

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**Efeito do estresse hídrico/salino na
expressão da oxidase alternativa de
Vigna unguiculata (L.) Walp e produção
da proteína recombinante**

José Hélio Costa

FORTALEZA - CEARÁ
2002

**Efeito do estresse hídrico/salino na
expressão da oxidase alternativa de
Vigna unguiculata (L.) Walp e produção
da proteína recombinante**

JOSÉ HÉLIO COSTA

Tese submetida à Coordenação do Curso de pós-
graduação em Bioquímica, como requisito parcial para obtenção
do grau de **Doutor em Bioquímica** da
Universidade Federal do Ceará

**FORTALEZA - CEARÁ
2002**

**Efeito do estresse hídrico/salino na
expressão da oxidase alternativa de
Vigna unguiculata (L.) Walp e produção
da proteína recombinante**

JOSÉ HÉLIO COSTA

ORIENTADORA : Prof^a. Dr^a. Dirce Fernandes de Melo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA, 2002

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A transcrição de qualquer texto desta Tese será permitida desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

José Hélio Costa

TESE APROVADA EM: 18 de outubro de 2002

Dr.^a Dirce Fernandes de Melo
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientadora

Dr. Yves Jolivet
UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières
Université Henri Poincaré, Nancy 1- France
Conselheiro

Dr. Jiri Borecky
Departamento de Plantas
Centro de Biologia Molecular e Engenharia
Genética
Universidade Estadual de Campinas
Conselheiro

Dr. José Albérico de Araújo Lima
Departamento de Fitotecnia
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Dr.^a Maria da Guia da Silva Lima
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

*A minha mãe Amélia, meus
irmãos Anaélia e Anaésio e a
minha avó Benvida.*

*... já ouvi dizer que a vida pode não ser
mais do que o sonho de um Deus, mas
estou convencido de que os caprichos
dos homens determinam a continuação
desse sonho ...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a profa. Dirce Fernandes de Melo por acreditar e confiar em mim. Sua orientação e os seus conselhos desde a iniciação científica foram fundamentais para a formação de minha ideologia científica.

Ao prof. Yves Jolivet, principalmente, pela sua simplicidade como ser humano. Sua participação foi essencial na realização deste trabalho, não só pela sua valiosa co-orientação, mas também por todo apoio dado em todos os momentos que estive na França.

A Profa. Marie Paule Hasenfratz-Sauder, por todos os ensinamentos práticos e teóricos em biologia molecular, bem como pela sua ajuda inicial na correção de meus protocolos em francês.

Ao Prof. Pierre Dizengremel, chefe do "Laboratoire de physiologie et ecophysiologie forestières" Nancy - França, por ter me recebido em seu Laboratório, dando apoio em todas as horas necessárias e tornando possível a realização deste trabalho.

A todos os outros componentes do "Laboratoire de ecologie et ecophysiologie forestières": Virginie, Xavière, Christine, Jérôme, Joelle, Dominique, Elizabeth, Jean Claude, Damien, Mireille, Dany et Lisiane, pelos momentos de harmonia vividos durante o meu "séjour" na França.

A Dra. Anh Thu Pham thi, pesquisadora da Universidade Paris 12, por sua valiosa colaboração, tornando possível o "screening" da biblioteca de cDNA, como também a produção da proteína recombinante.

A Profa. Maria da Guia, em particular, pelos seus conselhos desde a iniciação científica e pelo exemplo constante de coragem dado a todos os seus estudantes, mostrando que realmente "são nos pequenos frascos que se encontram as melhores essências".

Ao Dr. Jiri Borecky, pela crítica construtiva na apresentação dos resultados enriquecendo a qualidade deste trabalho.

Ao prof. Albérico, por suas valiosas sugestões que me ajudaram na padronização desta Tese.

A Profa. Elena Orellano, por ser responsável pelos meus primeiros passos em biologia molecular.

A profa. Denize, pelo seu espírito perfeccionista e positivista constante.

Aos colegas dos Laboratórios 2065 e 2090 do DBBM: Lourdinha, Isabella, Eduardo, Alana, Érica, Luciana, Édson, Yuri, Alaídes, Márcia, Desirée, Verônica, Adriana, Daniel Feijó, Leiliane, Alessandra e Ana Cláudia pela convivência harmoniosa de todos os dias.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no exterior.

SUMÁRIO

Conteúdo	Página
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xix
ABREVIATURAS.....	xx
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
 INTRODUÇÃO.....	 1
Família multi-gênica da oxidase alternativa.....	3
Expressão diferencial dos genes da AOX.....	5
Estrutura dos genes da AOX.....	9
Importação e processamento da oxidase alternativa	9
Estrutura protéica da oxidase alternativa.....	10
<i>Modelos estruturais da AOX.....</i>	11
Regulação da oxidase alternativa.....	16
Técnicas de biologia molecular na exploração da oxidase Alternativa.....	23
Biblioteca de cDNA.....	23
Vetores de Clonagem	24
Vetor λ ZIPLOX.....	25
Excisão <i>in vivo</i> do Plasmídeo pZL1.....	25
Sistema de expressão de proteína exógena em <i>Escherichia coli</i>	29
Vetor de expressão.....	29
Regulação da expressão.....	29
Purificação da proteína recombinante.....	31
 OBJETIVOS	 32
 MATERIAL E MÉTODOS	 33
1 – MATERIAL VEGETAL.....	33
2 – SISTEMA DE HIDROPONIA.....	33
2.1 – Solução nutritiva	34
2.2 – Estresse osmótico em plantas de <i>Vigna unguiculata</i>	34
2.2.1 – Potencial osmótico.....	36
2.2.2 – Medida da osmolalidade das soluções nutritivas.....	36
3 – ESTUDOS BIOQUÍMICOS.....	37
3.1 - Extração da fração mitocondrial.....	37
3.1.1 – Determinação da proteína mitocondrial.....	39
3.1.2 – Avaliação da integridade da membrana mitocondrial externa.....	40
3.2 – Preparação de Extrato Protéico Bruto.....	41
3.3 – Eletroforese em Sistema SDS-PAGE.....	41
3.3.1 – Preparação das amostras.....	41
3.3.1.1 – Amostras mitocondriais.....	41

3.3.1.2 – Amostras de extrato protéico bruto.....	42
3.3.2 – Preparação dos géis de poliacrilamida.....	42
3.3.3 – Condições de corrida das eletroforeses.....	42
3.3.4 – Coloração de géis SDS-PAGE.....	43
3.4 – Western Blotting.....	43
3.4.1 – Bloqueio e hibridização de membrana.....	45
3.4.1.1 – Amostras mitocondriais.....	45
3.4.1.2 – Amostras de extrato protéico bruto.....	46
3.4.2 – Revelação do Western blotting.....	46
4 – ESTUDOS MOLECULARES.....	47
4.1 – “Screening” de uma Biblioteca de cDNA de <i>Vigna unguiculata</i>	47
4.1.1 – 1º “screening”.....	47
4.1.1.1 – Obtenção de cDNA da AOX por RT-PCR.....	47
4.1.1.2 – Eletroforese do fragmento de cDNA amplificado.....	49
4.1.1.3 – Purificação do fragmento de cDNA da AOX.....	50
4.1.1.4 – Obtenção da sonda marcada com ³² P.....	51
4.1.1.5 – Hibridação de membranas.....	51
4.1.1.6 – Revelação e coleta de clones positivos da AOX.....	53
4.1.2 – Preparação de clones positivos para o 2º e 3º “screening”.....	53
4.1.2.1 – Preparação de meios de cultura.....	54
4.1.2.2 – Preparação de placas de LB agar MgSO ₄	55
4.1.2.3 – Cultura de bactérias de <i>Escherichia coli</i> Y1090 e DH10B.....	55
4.1.2.4 – Determinação da diluição ótima de clones (λZIPLOX) positivos...	56
4.1.2.5 – Cultura de clones (λZIPLOX) positivos.....	56
4.1.3 – 2º “screening”.....	58
4.1.3.1 – Obtenção da sonda marcada com ³² P.....	58
4.1.3.2 – Hibridação de membranas.....	59
4.1.3.3 – Revelação e coleta de clones positivos da AOX.....	59
4.1.4 – “3º screening”.....	60
4.2 – Caracterização de Clones de cDNA da AOX.....	60
4.2.1 – PCR dos clones isolados.....	60
4.2.2 – Mini preparação de DNA bacteriófago λZIPLOX.....	61
4.2.2.1 – Cultura de fagos λZIPLOX.....	62
4.2.3 – Digestão de DNA bacteriófago λZIPLOX.....	63
4.2.4 – Excisão <i>in vivo</i> do plasmídeo pZL1.....	63
4.2.4.1 – Transformação de <i>E. coli</i> DH10B.....	64
4.2.4.2 – Mini preparação de plasmídios pZL1.....	64
4.2.5 – Digestão de plasmídeo pZL1 por enzimas de restrição.....	65
4.2.6 – Preparação de clones <i>E. coli</i> DH10B (pZL1) para seqüenciamento.	65
4.2.6.1 – Cultura de bactérias DH10B (pZL1).....	65
4.2.6.2 – Midi preparação de plasmídios pZL1.....	66
4.2.6.3 – Seqüenciamento e comparação de seqüências.....	67
4.3 – Expressão da AOX em Cultivares de <i>Vigna unguiculata</i>	67
4.3.1 – Extração de RNA total utilizado no Northern blot.....	68
4.3.2 – Extração de RNA total utilizado na RT-PCR.....	68
4.3.3 – Quantificação e qualificação de RNA total.....	69
4.3.4 – Expressão da AOX detectada por Northern blot.....	69
4.3.4.1 – Eletroforese em condições desnaturantes.....	69

4.3.4.2 – Transferência de RNA total.....	70
4.3.4.3 – Obtenção de sonda marcada com [α - 32 P]dCTP.....	70
4.3.4.4 – Hibridização e revelação.....	70
4.3.4.5 – Análise de Northern blot por densitometria.....	72
4.3.5 – Expressão da AOX detectada por RT-PCR.....	72
4.4 – Expressão da AOX de <i>Vigna unguiculata</i> em <i>Escherichia coli</i>	73
4.4.1 – Preparação do plasmídio de expressão.....	73
4.4.1.1 – Midi preparação do plasmídio pQE-30.....	73
4.4.1.2 – Digestão do plasmídio pQE-30.....	74
4.4.1.3 – Purificação do plasmídio pQE-30.....	74
4.4.1.4 – Desfosforilação do plasmídio pQE-30.....	75
4.4.2 – Preparação do inserto da AOX de <i>Vigna unguiculata</i>	75
4.4.2.1 – Escolha dos primers.....	75
4.4.2.1.1 – Mapa de restrição do cDNA da AOX.....	76
4.4.2.1.2 – Sequência do cDNA da AOX correspondente a proteína madura.....	76
4.4.2.1.3 – Temperatura de anelamento.....	76
4.4.2.2 – Amplificação do cDNA da AOX por PCR.....	76
4.4.2.3 – Eletroforese em gel de agarose.....	77
4.4.2.4 – Purificação do produto de PCR.....	77
4.4.2.5 – Digestão do cDNA da AOX amplificado.....	78
4.4.2.6 – Purificação do cDNA da AOX digerido.....	78
4.4.3 – Ligação do inserto da AOX ao plasmídio de expressão.....	78
4.4.4 – Amplificação da construção do pQE-30 recombinante.....	79
4.4.4.1 – Preparação de bactérias JM 109 competentes.....	79
4.4.4.2 – Transformação de bactérias JM 109 competentes.....	79
4.4.4.3 – Seleção de colônias JM 109 transformadas.....	80
4.4.4.4 – Midi preparação do plasmídio pQE-30 recombinante.....	80
4.4.5 – Expressão da AOX em <i>E. coli</i> M15 (pREP4).....	80
4.4.5.1 – Transformação de <i>E. coli</i> M15 (pREP4) competentes.....	82
4.4.5.2 – Culturas de <i>E. coli</i> M15 (pREP4) transformadas.....	82
4.4.5.3 – Indução da síntese da proteína recombinante.....	82
4.4.5.4 – Purificação da proteína recombinante.....	83
4.4.5.5 – Eletroforese em SDS-PAGE.....	83
4.4.5.5.1 – Preparação das amostras.....	84
4.4.5.6 – Western blot.....	84
RESULTADOS.....	85
1 – ESTRESSE HÍDRICO E SALINO EM PLANTAS DE <i>Vigna unguiculata</i> cv. VITA 3 E VITA 5.....	85
1.1 – Parâmetros de Crescimento.....	85
2 – EXPRESSÃO DA OXIDASE ALTERNATIVA DE <i>Vigna unguiculata</i>	88
2.1 – Análise da expressão protéica da AOX.....	88
2.1.1 – Análise da expressão protéica da AOX: Extrato protéico bruto.....	88
2.1.2 – Análise da expressão protéica da AOX: Mitocôndrias purificadas....	88
2.2 – Análise da expressão de mRNA da AOX.....	90
2.2.1 – Quantificação de transcritos da AOX por RT-PCR.....	94
2.2.2 – Quantificação de transcritos da AOX através de “Northern blot”	94
2.3 – Análise da expressão de genes da AOX a partir de uma biblioteca	

de cDNA.....	97
2.3.1 – “Screenings”.....	97
2.3.2 – Análise dos clones por PCR e por RFLP.....	97
2.3.3 – Sequenciamento de clones de cDNA da AOX.....	102
2.3.4 – Análise da expressão da AOX de clones isolados.....	103
2.3.5 – Análise das AOXs de <i>Vigna unguiculata</i>	103
3 – EXPRESSÃO DA OXIDASE ALTERNATIVA DE <i>Vigna unguiculata</i> em <i>E. coli</i>	112
3.1 – Preparação do plasmídio de expressão e do inserto da AOX para ligação.....	112
3.2 – Plasmídio Recombinante.....	112
3.3 – Purificação e detecção da oxidase alternativa recombinante.....	112
DISCUSSÃO.....	118
<i>Expressão da oxidase alternativa em cultivares de Vigna unguiculata, submetidos aos estresses hídrico e salino</i>	118
<i>Caracterização de genes da AOX de Vigna unguiculata e expressão diferencial a partir de uma biblioteca de cDNA</i>	123
<i>Expressão da oxidase alternativa de Vigna unguiculata em E. coli</i>	126
CONCLUSÕES.....	127
PERSPECTIVAS.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial de plantas. As setas finas e grossas representam transferências de elétrons e de prótons, respectivamente, ao longo e através da membrana mitocondrial interna. DH, desidrogenase; Cit. C, citocromo c; AOX, oxidase alternativa; P (lado da membrana carregado positivamente) e N (lado da membrana carregado negativamente). (Affourtit <i>et al.</i> , 2001).	2
FIGURA 2 – Comparação de seqüências de aminoácidos da AOX de plantas, fungos, protozoário (<i>Trypanosoma brucei</i>) e alga (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>). Em amarelo, seqüência codificadora do peptídio sinal; em verde, resíduos de cisteína (ou serina) conservados na AOX de plantas; em azul, zonas de consenso.	12
FIGURA 3 – Monômero da estrutura da oxidase alternativa segundo o modelo proposto por Siedow <i>et al.</i> (1995). A numeração dos resíduos de aminoácidos é feita a partir da AOX de <i>Sauromatum guttatum</i> . α -hélices (retângulos azuis); E (resíduo de glutamato), H (resíduo de histidina), Y (resíduo de tirosina) e C (resíduo de cisteína). As 4 α -hélices do domínio C-terminal, juntamente com o centro bi-nuclear de ferro formam o sítio catalítico.	14
FIGURA 4 - Representação esquemática estrutural da oxidase alternativa (homodímero). A região helicoidal que abrange o centro binuclear de ferro (esferas vermelhas) é baseada na estrutura proposta por Andersson & Nordlund (1999) (Affourtit, 2002).	15

FIGURA 5 - Mecanismos de regulação da atividade da oxidase alternativa (Sluse & Jarmuszkiewicz, 1998).	18
FIGURA 6 - Diagrama esquemático das características regulatórias da oxidase alternativa de plantas (Siedow & Umbach, 2000).	21
FIGURA 7 – Mapa e sítio de multiclonagem do vetor bacteriofágico λ ZIPLOX. A região do sítio de multiclonagem é localizada no plasmídio pZL1 inserido.	26
FIGURA 8 – Mapa gênico e de enzimas de restrição do vetor plasmídico pZL1.	27
FIGURA 9 – Esquema representativo da excisão <i>in vivo</i> e circularização do plasmídio pZL1 em bactérias de <i>E. coli</i> DH10B(ZIP).	28
FIGURA 10 – Plasmídio de expressão pQE-30. PT5 (promotor T5); lac O (operador lac O); RBS (sítio de ligação a ribossomos); ATG (códon correspondente a metionina); MCS (sítio de poli clonagem).	30
FIGURA 11 – Representação do sistema de hidroponia utilizado para o desenvolvimento de plantas de <i>Vigna unguiculata</i>	35
FIGURA 12 – Esquema de extração e purificação de mitocôndrias de raízes de <i>Vigna unguiculata</i>	38
FIGURA 13 – Sistema de transferência de proteínas de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose.	44
FIGURA 14 – Etapas de “screening” de uma biblioteca de cDNA utilizando uma sonda radioativa.....	48

FIGURA 15 – Esquema representativo do cultivo de bactérias em placas de Petri LB Agar pelo método das estrias. Os números 1, 2 e 3 indicam o sentido e a ordem com que foram feitas as estrias. A placa "A" indica o momento em que as bactérias foram semeadas e a placa "B" mostra as colônias formadas após desenvolvimento durante a noite. 57

FIGURA 16 – Sistema de transferência por capilaridade de RNA total de um gel de agarose para uma membrana de nylon. 71

FIGURA 17 – Etapas de transformação e expressão de proteína recombinante em *Escherichia coli*. 81

FIGURA 18 – Plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, 17 dias após a germinação e 7 dias de início do estresse hídrico ou salino. ... 87

FIGURA 19 – Expressão da oxidase alternativa (AOX) em extrato protéico bruto de raízes de *Vigna unguiculata*, cultivar Vita 3, 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: C (controle), NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L (amostras em duplicata). (A) SDS – PAGE (adição de 40 μ L de extrato protéico bruto em cada poço) (B) – Western blotting; (C) – Gráfico representando as médias das densidades integradas das bandas reduzidas da AOX. 89

FIGURA 20 – Expressão da oxidase alternativa em mitocôndrias purificadas de raízes de *Vigna unguiculata*, cultivar Vita 3, 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: C (controle), NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L (amostras em duplicata). (A) SDS – PAGE (5 μ g de proteína mitocondrial em cada poço); (B) – Western blotting; (C) – Gráfico representando as médias das densidades integradas das bandas oxidadas e reduzidas da AOX. 91

FIGURA 21 – Expressão da oxidase alternativa em mitocôndrias purificadas de raízes de *Vigna unguiculata*, cultivar Vita 5, 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: C (controle), NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L (amostras em duplicata). (A) SDS – PAGE (5µg de proteína mitocondrial em cada poço); (B) - Western blotting; (C) – Gráfico representando as média das densidades integradas das bandas oxidadas e reduzidas da AOX. 92

FIGURA 22 – Expressão da oxidase alternativa em mitocôndrias purificadas de raízes de *Vigna unguiculata*, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 5 (V5), 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: C (controle), NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L. (A) Western blotting; (B) Gráfico representando as densidades integradas das bandas oxidadas e reduzidas da AOX. 93

FIGURA 23 – Quantificação de transcritos da oxidase alternativa em raízes de *Vigna unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: controle (1), NaCl 100 mM (2), NaCl 200 mM (3) e PEG 200,67 g/L (4). (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% do cDNA (620 pb) da AOX sintetizado e amplificado por RT-PCR usando os primers aox1 e aox6. (B) Eletroforese em gel de agarose 1,5% da quantidade de RNA total (~1µg) utilizada na RT-PCR. (C) Gráfico da normalização da quantidade de transcritos dado pela divisão da densidade integrada da banda de cDNA pela densidade da banda de RNAr 18 S correspondente. 95

FIGURA 24 – Quantificação de mRNA da oxidase alternativa em raízes e folhas de *Vigna unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, submetidas a diferentes condições: controle (1), NaCl 100mM (2), NaCl 200mM (3), PEG 200,67g/L (4) e PEG 276,28g/L (5) . (A) Northern blot hibridizado com cDNA da AOX de *V. unguiculata* (clone 5). (B) Bandas de RNAr 25 S coradas com azul de metileno após deshibridação da membrana. (C) Gráfico representando a quantidade relativa de transcritos da AOX (densidade da banda de mRNA /densidade da banda de RNAr 25 S). 96

FIGURA 25 – Radiografias dos filmes de raio-X revelados no 1º "screening" da biblioteca de cDNA de folhas de *Vigna unguiculata*. Os números de 1 a 14 indicam os clones positivos da AOX isolados. 98

FIGURA 26 – Tamanho dos insertos positivos para AOX dos diferentes clones λ ZIPLOX isolados no 3º "screening". Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos insertos amplificados por PCR usando os primers universais M13. Os números de 1 a 14 indicam os respectivos clones e M o marcador de tamanho molecular (DNA "ladder" 100 bp). 99

FIGURA 27 – Digestão do DNA bacteriofágico λ ZIPLOX dos diferentes clones positivos para AOX isolados no 3º "screening". Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de DNA obtidos em presença das enzimas de restrição *Bam*H I e *Eco*R I. Os números de 1 a 14 indicam os respectivos clones e M o marcador de tamanho molecular (DNA "ladder" 100 bp). 100

FIGURA 28 – Digestão do DNA plasmídico pZL1 dos clones positivos para AOX. Eletroforeses em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de DNA dos diferentes clones obtidos em presença das enzimas de restrição: (A) *Bam*H I e *Eco*R I; (B) *Hind* III e *Pst* I. Os números de 1 a 14 indicam os respectivos clones e M o marcador de tamanho molecular (DNA "ladder" 100 bp). 101

FIGURA 29 – Sequências nucleotídica (em preto) e de aminoácidos deduzidos (em verde) a partir do cDNA que codifica a oxidase alternativa de *Vigna unguiculata* (Vu-clone 3). * indica o códon de terminação da tradução protéica. 104

FIGURA 30 – Sequências nucleotídica (em preto) e de aminoácidos deduzidos (em azul) a partir do cDNA que codifica a oxidase alternativa de *Vigna unguiculata* (Vu-clone 5). * indica o códon de terminação da tradução protéica. 105

FIGURA 31 – Comparação das sequências de aminoácidos entre as oxidases alternativas de *Vigna unguiculata* (Vu-clone 3 e Vu-clone5). As regiões de consenso estão marcadas em azul. A numeração corresponde à contagem dos resíduos de aminoácidos. 106

FIGURA 32 – Comparação de sequências de aminoácidos entre as oxidases alternativas de *Vigna unguiculata* (Vu-clone 3 e Vu-clone 5) e *Glycine max* (Gm Aox1, Gm Aox2a e Gm Aox2b). As regiões de consenso estão marcadas em azul, os sítios de clivagem do peptídio sinal estão marcados em amarelo e as cisteínas (C) conservadas estão representadas em verde. A numeração corresponde à contagem dos resíduos de aminoácidos. 108

FIGURA 33 – Comparação das seqüências de aminoácidos entre as oxidases alternativas de *Vigna unguiculata* (Vu-clone 3) e de *Glycine max* (Gm Aox2a). As regiões de consenso estão marcadas em azul. A numeração corresponde à contagem dos resíduos de aminoácidos. 109

FIGURA 34 – Comparação das seqüências de aminoácidos entre as oxidases alternativas de *Vigna unguiculata* (Vu-clone 5) e de *Glycine max* (Gm Aox2b). As regiões de consenso estão marcadas em azul. A numeração corresponde à contagem dos resíduos de aminoácidos. 110

FIGURA 35 – Árvore filogenética da oxidase alternativa. A árvore filogenética foi construída através da submissão "on line" ao site: <http://www.genebee.msu.su>, de seqüências em aminoácidos completas da AOX de várias espécies obtidas do "GenBank". Ac (*Ajellomyces capsulatus*), An (*Aspergillus niger*), At (*Arabidopsis thaliana*), Bf (*Botryotinia fuckeliana*), Bg (*Blumeria graminis*), Cn (*Cryptococcus neoformans*), Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*), Cro (*Catharanthus roseus*), Dd (*Dictyostelium discoideum*), Gm (*Glycine max*), Ha (*Hansenula anomala*), Le (*Lycopersicon esculentum*), Mf (*Monilinia fructicola*), Mg (*Magnaporthe grisea*), Mi (*Mangifera indica*), Nt (*Nicotiana tabacum*), Os (*Oryza sativa*), Pa (*Podospora anserina*), Pt (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*), Sg (*Sauromatum guttatum*), Ta (*Triticum aestivum*), Tb (*Trypanosoma brucei*), Vi (*Venturia inaequalis*), Vu-clone 3 & Vu-clone 5 (*Vigna unguiculata*),.. Em amarelo ouro (plantas), verde (algas verdes), azul (protistas), vermelho (fungos) e verde musgo (proteínas homólogas de cloroplasto). 111

FIGURA 36 – Sequência nucleotídica do cDNA da oxidase alternativa (Vu-clone 5). Em amarelo – Extremidade não codante 5'; Em vermelho – Sequência codificadora do peptídio sinal; Em azul – Sequência codificadora da proteína MATURA; Em verde – Extremidade não codante 3'. **ATG** (códon que codifica para a primeira metionina); **TGA** (códon de terminação da tradução protéica). 113

FIGURA 37 – Controle da preparação do plasmídio de expressão e do inserto da oxidase alternativa. Eletroforeses em Gel de agarose 0,8%: (A) Digestão por *Bam* H I e *Pst* I e purificação do plasmídio pQE-30; 1- pQE não digerido, 2- pQE digerido por *Bam*H I e *Pst* I, desfosforilado e purificado. (B) Amplificação por PCR do inserto de cDNA da AOX (Vu-clone 5) correspondente a proteína madura. (C) Digestão por *Bam*H I e *Pst* I e purificação do inserto de cDNA da AOX (Vu-clone 5) correspondente a proteína madura. M – marcador de tamanho molecular (DNA "ladder" 1kb). 114

FIGURA 38 – Controle da ligação do plasmídio de expressão ao inserto da oxidase alternativa. Eletroforese em gel de agarose 0,8%: 1- Plasmídio pQE-30 vazio; 2- Plasmídio pQE-30 recombinante; 3 – Plasmídio pQE-30 vazio digerido com *Bam*H I e *Pst* I; 4 - Plasmídio pQE-30 recombinante digerido com *Bam*H I e *Pst* I e 5 – PCR do Plasmídio pQE-30 recombinante com os primers aox12 e aox13. 115

FIGURA 39 – Purificação e detecção da oxidase alternativa recombinante de *Vigna unguiculata*. (A) SDS-PAGE com gradiente phastGel 8-25%: M [marcador de peso molecular LMW (pharmacia)]; 1- Extrato de *E. coli* M15 (pREP4) transformadas com o pQE vazio (controle negativo) e induzidas por IPTG 1mM; 2- Extrato de *E. coli* M15 (pREP4) transformadas com o pQE recombinante e induzidas por IPTG 1mM; P1- precipitado bruto obtido das etapas iniciais de purificação; FT- "flow through"; L1, L2 e L3 (lavagens da resina Ni-NTA); E1, E2, E3 e E4 (eluições da proteína recombinante). (B) Western blotting utilizando o anticorpo monoclonal anti-AOX de *Sauromatum gutattum*. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparação do gradiente descontínuo de Percoll	39
Tabela 2 – Mistura da reação de transcrição reversa (RT)	49
Tabela 3 – Mistura da reação de PCR	49
Tabela 4 – Mistura da reação de marcação do cDNA da AOX	51
Tabela 5 – Mistura de reação de marcação de sonda com o kit Nonaprime II.	58
Tabela 6 – Mistura de reação da PCR	61
Tabela 7 – Mistura de reação para a RT-PCR	73
Tabela 8 – Mistura de reação da PCR do inserto da AOX	77

ABREVIATURAS

AOX – Oxidase alternativa

CTE – Cadeia transportadora de elétrons

E. coli – *Escherichia coli*

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

RT AMV - Transcriptase reversa de Moloney Murine Leukemia Virus

Raios UV – Raios ultravioleta

LB líquido - Caldo Luria-Bertani

LB Agar - Agar Luria-Bertani

lb/pol² – Libra por polegadas ao quadrado

X-gal – 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoil- β -D-galactosídeo

IPTG - Isopropiltiogalactosídeo

PCR – Reação em cadeia da DNA polimerase I

RT-PCR –Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da DNA polimerase I

PEG – Polietileno glicol

AIA – Álcool isoamílico

*Bam*H I – Enzima de restrição de *Bacillus amyloliquefaciens* H

*Eco*R I – Enzima de restrição de *Escherichia coli* RY 13

Pst I – Enzima de restrição de *Providencia stuartii*

Hind III – Enzima de restrição de *Haemophilus influenzae* Rd.

mRNA – RNA mensageiro

RNAr – RNA ribossômico

pb – Pares de bases

FCA – Fenol, clorofórmio e álcool isoamílico

ORF – “Open reading frame”

RESUMO

Plantas superiores, fungos, algumas algas e protistas possuem uma via alternativa transportadora de elétrons, não fosforilante, e insensível ao KCN, mediada pela Oxidase Alternativa (AOX). A oxidase alternativa é codificada por uma família multi-gênica em algumas plantas e sua expressão é induzida por vários tipos de estresse freqüentemente relacionados à produção de radicais livres. O presente trabalho foi realizado em 3 aspectos distintos: 1. estudo da expressão da AOX em cultivares de *Vigna unguiculata* L. walp com diferentes graus de resistência ao estresse hídrico/salino, cv. Vita 3 (mais resistente) e cv. Vita 5 (menos resistente); 2. caracterização de genes da AOX de *V. unguiculata*, a partir de uma biblioteca de cDNA λ ZIPLOX de folhas da cv. EPACE1; 3. descrição da produção de uma proteína recombinante em *Escherichia coli*. Plântulas de *V. unguiculata* germinadas em papel de filtro, no escuro, foram transferidas para um sistema de hidroponia, no claro, após o terceiro dia. O choque osmótico foi aplicado no décimo dia através da adição de Polietileno glicol (PEG) ou NaCl nas concentrações indicadas: PEG: 200,67 g/L ou 276,28 g/L; NaCl: 100 mM ou 200 mM à solução nutritiva. Raízes ou folhas da cv. Vita-3 e cv. Vita-5 foram selecionadas após sete dias de estresse para a extração e purificação de mitocôndrias, extração de RNA total e preparação de extrato protéico bruto. A quantidade de proteína da oxidase alternativa foi avaliada através de "Western blotting" de mitocôndrias e extrato protéico bruto e a quantificação de transcritos foi feita através de RT-PCR e "Northern blotting". Um fragmento de cDNA homólogo de zonas conservadas foi usado como sonda no "screening" da biblioteca de cDNA e a proteína recombinante foi produzida a partir do cDNA Vu-clone 5 num vetor de expressão pQE-30. A expressão da oxidase alternativa em raízes de *V. unguiculata* foi maior na cv. Vita 3 do que na cv. Vita-5, em todas as condições estudadas, tanto ao nível protéico quanto ao de transcritos revelados por RT-PCR com "primers" de regiões conservadas. Uma banda, correspondente à forma reduzida da AOX (ca. 35 kDa) aumentou com os estresses em extrato protéico de raízes da cv. Vita 3 e esse aumento foi confirmado pelos transcritos, revelados pela hibridização com a sonda Vu-clone 5. Em mitocôndrias de raízes das cultivares Vita 3 e Vita 5 foi observada uma intensa banda correspondente à forma oxidada da oxidase alternativa com ca 70 kDa, em todas as condições estudadas e uma banda

correspondente à forma reduzida com *ca.* 35 kDa que aumentou de intensidade nas condições de estresse nas duas cultivares. Raízes da cv. Vita 5 apresentaram um aumento na expressão protéica da oxidase alternativa de 85 e 45% nos estresses causados por NaCl 100 mM e PEG 200,67 g/L, respectivamente e essa taxa de expressão não foi observada em transcritos revelados com a sonda Vu-clone 5. 13 clones positivos para a oxidase alternativa foram isolados da biblioteca de cDNA e dois genes diferentes foram caracterizados, Vu-clone 3 e Vu-clone 5 numa proporção de 9:4. A oxidase alternativa Vu-clone 5 recombinante foi purificada em cromatografia de afinidade Ni-NTA e detectada com anticorpos monoclonais anti-AOX. Os resultados mostram que a oxidase alternativa de *V. unguiculata* é codificada por uma família multi-gênica de, pelo menos, dois genes distintos cuja expressão é induzida de modo diverso em cultivares com diferentes graus de resistência aos estresses hídrico e salino. Com base nos dados obtidos fica reforçada a sugestão que a oxidase alternativa participa nos mecanismos de ajustamento das plantas às condições ambientais desfavoráveis.

ABSTRACT

Higher plants, fungi, some algae and protists possess an alternative electron transport pathway, not coupled to ATP synthesis, KCN-insensitive, mediated by alternative oxidase (AOX). In some plants, the alternative oxidase is encoded by a multigene family and its expression is induced by several stress types often related to the production of free radicals. The present work was carried out in three different aspects: 1. Expression of AOX in cultivars of *Vigna unguiculata* L. walp with different resistance degrees to water/salt stress: cv. Vita 3 (more resistant) and cv. Vita 5 (less resistant); 2. Characterization of genes of AOX of *V. unguiculata*, starting from a cDNA library λ ZIPLOX of leaves of the cv. EPACE1; 3. Description of the production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. Dark-grown *V. unguiculata* seedlings were transferred into a hydroponic system, under light conditions, after the third day of germination. After the tenth day, an osmotic shock was applied through the addition, in the nutritive solution, of Polyethylene glycol (PEG) or NaCl under the corresponding concentrations: PEG 200,67 g/L or 276,28 g/L and NaCl 100 mM or 200 mM. After seven days of stress roots and leaves from Vita-3 and Vita-5 cultivars were collected in order to purify mitochondria, to isolate total RNA and to prepare crude protein extract. The amount of AOX protein was evaluated through "Western blotting" carried out with the mitochondrial fraction and crude protein extract. The quantification of the transcripts was done through RT-PCR and "Northern blotting". A fragment of cDNA, homologous to conserved regions, was used as probe in the "screening" of the cDNA library and the recombinant protein was produced starting from the cDNA Vu-clone 5 in a vector of expression pQE-30. In roots, the expression of AOX was higher in Vita 3 than in Vita-5, in all the studied conditions, either with proteins or transcripts revealed by RT-PCR with "primers" of conserved regions. The band corresponding to the AOX reduced form (*ca.* 35 kDa) increased with the stresses in crude protein extract of Vita 3 roots and such increase was confirmed by the transcripts, revealed by hybridization with the probe Vu-clone 5. In root mitochondria of both cultivars, an intense band corresponding to the oxidized form of AOX (*ca.* 70 kDa) was observed in all studied conditions and the band corresponding to the reduced form of AOX increased in the stress conditions. Vita 5 roots presented an increase in the amount of the AOX protein of 85 and 45% in the stresses,

respectively induced by NaCl 100 mM and PEG 200,67 g/L. A similar tendency was not observed with the transcripts, revealed with the probe Vu-clone 5. Thirteen positive clones of the AOX were isolated from the cDNA library and two different genes were characterized, Vu-clone 3 and Vu-clone 5 in the proportion of 9:4. The recombinant AOX encoded by Vu-clone 5 was purified by Ni-NTA affinity chromatography and detected with monoclonal antibodies against AOX. The results show that the *V. unguiculata* AOX is encoded by a multigene family of, at least, two distinct genes whose expression is induced, in a different way, in each cultivar with different resistance degrees to water/salt. These data reinforce the suggestion that the AOX participates in the adjustment mechanisms of the plants submitted to unfavorable environmental conditions.

INTRODUÇÃO

Os primeiros indícios da existência de uma via respiratória, dissipadora de energia, vieram dos trabalhos de Garreau em 1851, quando o mesmo demonstrou haver uma íntima relação entre o aumento de temperatura e o consumo de oxigênio nas plantas (Meeuse, 1975). A evidência dessa via respiratória somente foi formulada, segundo Sluse & Jarmuszkiewicz (1998), por Genevois em 1929, com a descoberta de uma rota de consumo de oxigênio insensível ao cianeto e ao monóxido de carbono estudando a germinação em ervilha de cheiro [*Lathyrus odoratus* (L.)]. Desde então, os avanços no entendimento da existência dessa via vieram a ter impulso somente a partir de 1970, após os trabalhos de Hackett *et al.* (1960a, 1960b); Storey & Bahr (1969); Wilson (1970) e Bendall & Bonner (1971) quando foi demonstrado que a insensibilidade ao cianeto residia nas mitocôndrias e que essas, quando isoladas mostravam conter duas vias para a transferência de elétrons na cadeia respiratória: a via clássica, transportadora de elétrons sensível ao CN^- e acoplada à fosforilação oxidativa e uma via insensível ao cianeto, que se ramificava a partir do "pool" de ubiquinonas (Figura 1), sendo menos fosforilativo e sensível a compostos como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) (Schonbaum *et al.*, 1971) e o n-propil galato (Siedow & Bickett, 1981).

Os primeiros trabalhos fisiológicos, utilizando tecidos intactos ou extratos indicaram que a ocorrência da resistência ao cianeto estava ligada à produção de calor em plantas termogênicas (Lance, 1972; Meeuse, 1975). Quando as mitocôndrias isoladas foram usadas, os estudos passaram a ser direcionados para a atividade relativa de ambas as vias, sensível e insensível ao cianeto, pela medida da taxa de respiração na presença de um inibidor de cada via. Em 1978, uma ubiquinol oxidase resistente ao cianeto foi solubilizada de mitocôndria de *Arum maculatum* (L.) (Huq & Palmer, 1978; Rich, 1978) e a respiração alternativa resistente ao cianeto foi atribuída a uma enzima chamada de oxidase alternativa (AOX). A proteína foi parcialmente purificada no entanto sua limitada atividade impediu os avanços nos estudos cinéticos e estruturais por um longo tempo (Sluse & Jarmuszkiewicz, 1998). Em 1986, anticorpos monoclonais a partir da AOX de *Sauromatum guttatum* (Schott) foram obtidos (Elthon *et al.*, 1986), o que impulsionou as pesquisas no campo da AOX, como a identificação desta proteína em várias espécies de plantas (Day *et al.*,

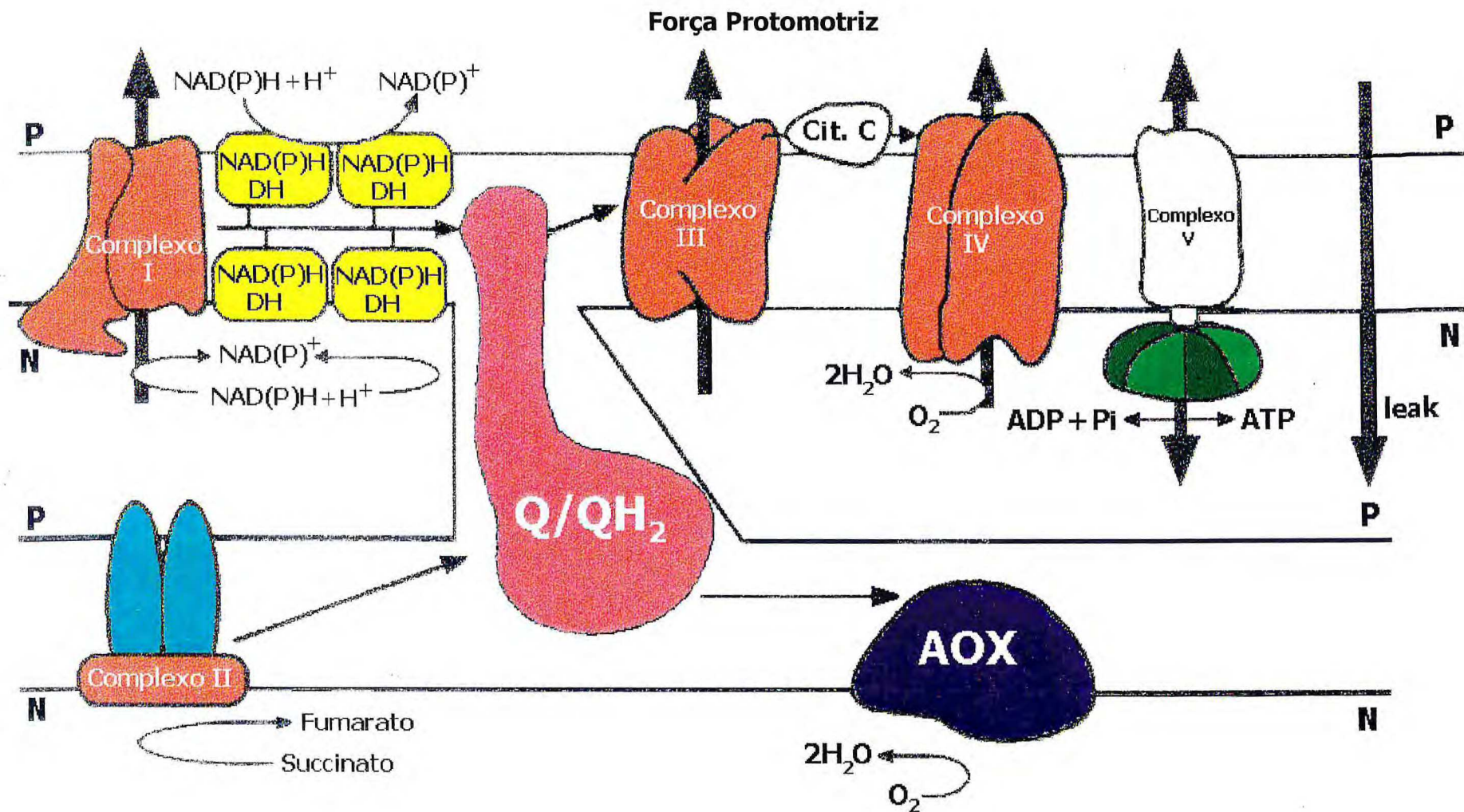


FIGURA 1 - Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial de plantas. As setas finas e grossas representam transferências de elétrons e de prótons, respectivamente, ao longo e através da membrana mitocondrial interna. DH, desidrogenase; Cit. C, citocromo c; AOX, oxidase alternativa; P (lado da membrana carregado positivamente) e N (lado da membrana carregado negativamente). (Affourtit *et al.*, 2001).

1995), fungos (Lambowitz *et al.*, 1989; Sakajo *et al.*, 1991) tripanossomas (Clarkson *et al.*, 1989) amebas (Jarmuskiewicz *et al.*, 1997) e algas (Eriksson *et al.*, 1995). Mais recentemente, com o advento das técnicas de biologia molecular foi possível o isolamento de genes e cDNAs que codificam a AOX, demonstrando que a proteína é codificada por uma família multi-gênica possibilitando um considerável progresso na compreensão da estrutura, da regulação e do papel da AOX.

Até o momento, o único papel fisiológico claro da AOX pode ser reconhecido em tecidos especializados de reprodução de plantas termogênicas (inflorescência das Aráceas) onde a via alternativa tem função na termogênese. Nessas inflorescências a temperatura pode subir até 10 °C acima da temperatura ambiente possibilitando a liberação de substâncias químicas voláteis capazes de atrair os polinizadores (Meeuse, 1975). Embora ainda não se possa atribuir uma função clara à AOX, em plantas não termogênicas sabe-se que essa enzima é induzida pela elevação no nível de carboidratos (Vanlerbergh *et al.*, 1995), pela elevação nos níveis de ácido salicílico (Rhoads & MacIntosh, 1993), pelas lesões e ataque de patógenos (Laties, 1982), pelo abaixamento de temperatura (Ito *et al.*, 1997), pelo estresse oxidativo durante o amadurecimento de frutos (Cruz-Hernández & Gómez-Lin, 1995; Sluse *et al.*, 1998, Considine *et al.*, 2001) e como consequência dessas condições pela elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Millar & Day, 1996; Maxwell *et al.*, 1999; Casolo *et al.*, 2000).

Família multi-gênica da oxidase alternativa

A produção do anticorpo monoclonal anti-AOX de *S. guttatum* (Elthon *et al.*, 1989) possibilitou que Rhoads & McIntosh (1991) clonassem, pela primeira vez, o gene da AOX, isolando e caracterizando um cDNA para a proteína da alternativa oxidase em *S. guttatum*. Utilizando esse anticorpo monoclonal, eles isolaram um clone de cDNA (*Aox1*) que codificava um polipeptídeo com 42 kDa. Quase simultaneamente, Sakajo *et al.* (1991) também isolaram um cDNA da AOX em *Hansenula anomala* (Hansen) H. & P. Sydow, mostrando existir um elevado incremento de sua transcrição após a adição de KCN ou antimicina A.

Os avanços de técnicas de biologia molecular como "screening" de bibliotecas de cDNA, PCR com "primers" degenerados construídos a partir de regiões conservadas e métodos de complementação têm identificado cDNAs que codificam

seqüências do tipo *Aox1* de uma ampla variedade de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas não termogênicas, assim como de fungos e protistas (Considine *et al.*, 2002).

Inicialmente, vários trabalhos levaram a crer que a AOX era codificada por um simples gene de origem nuclear *Aox1* em muitas espécies de vegetais superiores: *S. guttatum* (Rhoads & McIntosh, 1991), *Arabidopsis* [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh] (Kumar & Soll, 1992), soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (Whelan *et al.*, 1993), tabaco [*Nicotiana tabacum* (L.)] (Vanlerberghe & McIntosh, 1994; Whelan *et al.*, 1995), e Manga [*Mangifera indica* (L.)] (Cruz-Hernandez & Gómez-Lin, 1995). Em fungos, adicionalmente à seqüência já identificada de *H. anomala* (Sakajo *et al.*, 1991), Li *et al.* (1996) isolaram o gene *Aox1* de *Neurospora crassa* (Shear & Dodge) que também demonstrou seqüência similar aos genes encontrados em plantas. Entretanto, Whelan *et al.* (1996), com o uso de técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction), mostraram a existência de três genes codificando para a AOX em soja, sendo na época denominados de *Aox1*, *Aox2* e *Aox3* e apresentaram evidências de pelo menos dois genes em tabaco. Segundo esses autores, os métodos utilizados anteriormente através da hibridização com anticorpo monoclonal de *S. guttatum* e com sondas onde a homologia seria alta apenas para um dos tipos de genes, poderiam não detectar todos os produtos gênicos com igual eficiência. Posteriormente, foi demonstrado que a AOX também era codificada por uma família multi-gênica em outras espécies de plantas: *Arabidopsis*, 5 genes designados como *Aox1a*, *Aox1b*, *Aox1c*, *Aox2* (Saisho *et al.*, 1997) e *Aox1d* (Considine *et al.*, 2002); em arroz [*Oryza sativa* (L.)]: *Aox1a*, *Aox1b* (Ito *et al.*, 1997), *Aox1c* (Saika *et al.*, 2002) e *Aox1d* (Considine *et al.*, 2002); em manga : *Aox1a*, *Aox1b*, *Aox1c* e *Aox2* (Considine *et al.*, 2001) e em trigo [*Triticum aestivum* (L.)]: *Waox1a* e *Waox1c* (Takumi *et al.*, 2002). Ultimamente, foram encontrados 2 genes (*Aox1a* e *Aox1b*) no fungo *Candida albicans* (Huh & Kang, 1999, 2001) e 2 genes (*Aox1a* e *Aox1b*) na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* I. (Dinant *et al.*, 2001)

Recentemente, Considine *et al.*, (2002) observaram através de estudos experimentais, de dados disponíveis de ESTs "genomic and expressed sequence tag", assim como baseados na caracterização de genes de diferentes espécies ao longo desses últimos anos 10 anos, que o gene *Aox2* é encontrado em muitas eudicotiledôneas incluindo soja, manga, tabaco, *Arabidopsis* e tomate (*Lycopersicon*

esculentum L.) e está ausente em todas as monocotiledôneas examinadas até hoje, enquanto que o gene *Aox1* é encontrado em ambas plantas mono e dicotiledôneas. Nesse mesmo trabalho, os autores renomearam os genes *Aox2* e *Aox3* de soja como *Aox2a* e *Aox2b*, respectivamente, visto que havia grande similaridade entre os mesmos e o gene *Aox3* não tinha sido ainda relatado em outras espécies. Dessa forma, esses autores classificaram os genes da AOX em duas discretas subfamílias baseados no alinhamento de seqüências: *Aox* do tipo 1 e *Aox* do tipo 2, enquanto que os tipos de genes que não estavam de acordo com essa classificação foram denominados de *Aox0*, sendo assim classificados os genes de *C. albicans*, *Aox0A* e *Aox0B*; e de *C. reinhardtii*, *Aox0A* e *Aox0B*.

Expressão diferencial dos genes da AOX

O questionamento feito pelos cientistas desde a observação de que muitas plantas possuíam uma família multi-gênica para a AOX era o seguinte: essas famílias diferiam em sua expressão ou regulação e assim se explicariam suas funções no metabolismo respiratório? Considine *et al.* (2002) propõem atualmente dois papéis para essas isoenzimas, baseados na disponibilidade de dados de expressão da AOX em diferentes espécies: a) uma isoenzima seria constitutiva e requerida para uma função genérica na manutenção do metabolismo respiratório; b) outra isoenzima seria particularmente necessária sob condições de estresse. Segundo os mesmos autores esta proposta apóia a hipótese mantida há muito tempo de que a AOX atuaria como um "over flux" no metabolismo do carbono quando a célula estivesse com suas reservas supridas pela produção de ATP (Lambers, 1982), assim como também estaria de acordo com a mais recente hipótese de que a AOX funciona para minimizar a produção de espécies reativas de oxigênio do transporte de elétrons durante o estresse oxidativo (Purvis & Schewfelt, 1993; Wagner & Moore, 1997). Os genes de *C. albicans* *Aox0A* e *Aox0B* seguem os modelos funcionais propostos. *Aox0A* é constitutivamente expresso, enquanto que *Aox0B* é induzido em condições de estresse por agentes tais como antimicina A e herbicidas (Huh & Kang 1999, 2001; Considine *et al.*, 2002). Similarmente, em *C. reinhardtii*, apenas uma das duas isoenzimas caracterizadas induziu mRNA num mutante deficiente de atividade do complexo III mitocondrial (Dinant *et al.*, 2001; Considine *et al.*, 2002). As eudicotiledôneas soja e *Arabidopsis* com genes da AOX bem caracterizados também

seguem, aparentemente, este modelo. Em soja, as expressões do gene *Aox1* e da proteína são limitadas a condições de extremo estresse ambiental onde a expressão foi induzida por antimicina A, tratamento de plantas pelo frio ou tratamento de suspensão de células com ácido salicílico. Em condições normais, o gene *Aox1* é expresso apenas fracamente em algum tecido. Por outro lado, os genes do tipo *Aox2* (*Aox2a* e *Aox2b*) não são aparentemente induzidos pelo estresse, sendo *Aox2b* expresso em cotilédones, tecido fotossintético e raízes e *Aox2a* é expresso abundantemente apenas em tecido fotossintético (Finnegan *et al.*, 1997, 1999; Millar *et al.*, 1997; McCabe *et al.*, 1998; Tanudji *et al.*, 1998; Djajanegara *et al.*, 2002). Em *Arabidopsis*, o gene *Aox1a* é induzido por vários agentes que inibem a respiração celular ou síntese de ATP como antimicina A, NaN_3 , myxothiazol, oligomicina, 2,4 dinitrofenol e ataque de patógenos, enquanto o gene *Aox2* não é induzido pelo estresse mas foi expresso durante o desenvolvimento normal da semente (Saisho *et al.*, 1997, 2001; Simons *et al.*, 1999). Em manga, ambos os genes *Aox1* e *Aox2* são expressos no fruto, entretanto, há um pico de expressão do gene *Aox2* nos estágios iniciais do desenvolvimento, enquanto que os genes do tipo *Aox1* são expressos durante os últimos estágios de amadurecimento/senescência podendo envolver estresse oxidativo (Considine *et al.*, 2001). Nas monocotiledôneas como o arroz, os genes *Aox1a* e *Aox1b* tiveram seus níveis de mRNA aumentados sob condições de baixa temperatura e o gene *Aox1c*, aparentemente, não respondeu ao estresse (Saika *et al.*, 2002). Em trigo, os níveis de transcritos dos genes *Waox1a* e *Waox1c* aumentaram em condições de baixa temperatura, no entanto, quando as plantas foram tratadas com cianeto apenas o nível de *Waox1a* foi aumentado (Takumi *et al.*, 2002).

Os genes do tipo *Aox1* identificados e estudados até o momento em ambas monocotiledôneas e dicotiledôneas foram tipicamente, mas não exclusivamente, expressos em condições experimentais de estresses (Considine *et al.*, 2002). Em *Arabidopsis*, o gene *Aox1a* também foi expresso, embora numa intensidade menor, em flores e gemas florais, caule, "rosetas" e raízes sob condições normais. Da mesma forma, o gene *Aox1c* também se expressa nesses tecidos, porém sua transcrição não foi afetada por estresses causados pelos agentes inibidores da respiração celular. Da mesma forma, o gene *Aox1b*, detectado apenas em flores e gemas florais, não foi induzido pelos agentes químicos indutores do *Aox1a* (Saisho *et*

al., 1997, 2001; Simons *et al.*, 1999). Em arroz, o nível de *Aox1c* foi significativamente detectado em folhas jovens sob constante exposição à luz e em folhas maduras após aquecimento, mas não foram detectados em folhas jovens estioladas e raízes jovens. Por outro lado, o nível de mRNA dos genes *Aox1a* e *Aox1b* foram significativamente observados em folhas maduras e raízes jovens (Saika *et al.*, 2002). O que pode ser observado é que há uma diferença na expressão dos genes da AOX dependente não só da condição em que a planta é submetida, mas também há uma resposta dependente do tecido (Finnegan *et al.*, 1997; Saisho *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1997; Considine *et al.*, 2002).

A expressão das subfamílias *Aox1* também varia entre genes que são ortólogos em diferentes espécies. Por exemplo, os genes *Aox1a* e *Aox1b* que são arrançados um após o outro no mesmo cromossomo, tanto em arroz como em *Arabidopsis*, têm um padrão de resposta diferente. Os genes de arroz são induzidos pela baixa temperatura sem apresentarem nenhuma diferença entre eles no padrão de expressão o que não ocorre com os mesmos genes de *Arabidopsis*, onde estes apresentam um padrão de expressão diferencial (Ito *et al.*, 1997).

Com relação aos genes do tipo *Aox2*, eles são também expressos de maneira dependente do tecido (Finnegan *et al.*, 1997; Saisho *et al.*, 1997). Considine *et al.*, (2002) sugerem uma classificação num tipo de gene constitutivo por serem bem mais prevalentes do que os do tipo *Aox1*, embora eles também sejam diferencialmente regulados (Finnegan *et al.*, 1997; McCabe *et al.*, 1998).

A aparente ausência da subfamília do gene *Aox2* em plantas de monocotiledôneas pode ter implicações significativas na investigação da função e da regulação da AOX em plantas (Considine *et al.*, 2002).

Múltiplas isoformas da proteína têm sido detectadas imunologicamente e elas são atribuídas a produtos de genes diferentes (Finnegan *et al.*, 1997; McCabe *et al.*, 1998; Considine *et al.*, 2001). Em espécies termogênicas o anticorpo anti-AOX reconhece apenas um simples polipeptídeo de peso molecular em torno de 35 a 37 kDa em mitocôndrias de tecidos pré-termogênicos (Elthon & McIntosh, 1987). Em organelas de tecidos termogênicos essa proteína é detectada em grande abundância, juntando-se a ela duas outras proteínas de peso similar e em grande quantidade (Elthon & McIntosh, 1987; Elthon *et al.*, 1989). Tipicamente, mitocôndrias de plantas não termogênicas contêm uma ou mais proteínas de 32 a 39 kDa que reagem com o

anticorpo monoclonal anti-AOX. Em mitocôndrias de cotilédones de soja proteínas de 34 e 36 kDa são detectadas. O sequenciamento dessas proteínas em preparações da AOX parcialmente purificadas demonstrou que as mesmas correspondiam ao produto dos genes *Aox2* (*Aox2a*) e *Aox3* (*Aox2b*), respectivamente (Finnegan *et al.*, 1997). Finnegan *et al.* (1997) observaram que os transcritos da AOX mais abundantes em cotilédones eram *Aox2* e *Aox3* e que suas quantidades refletiam significativamente nas quantidades das respectivas proteínas detectadas por "immunoblotting". Essa observação foi apoiada pela exposição dos cotilédones estiolados à luz onde houve um aumento coordenado na quantidade relativa da proteína de 34 kDa e dos transcritos *Aox2* (*Aox2a*) assim como em mitocôndrias de raízes, onde uma simples proteína de 36 kDa era certamente correlacionada à predominante abundância de transcritos *Aox3* (*Aox2b*) nesse tecido. Uma proteína de 32 kDa encontrada em baixa quantidade nas mitocôndrias de cotilédones de soja também foi proporcionalmente correlacionada ao nível de transcritos *Aox1*. Entretanto, segundo ainda Finnegan *et al.* (1997) não é possível fazer um exato relacionamento entre a abundância de transcritos e a de proteína devido à relativa reatividade do anticorpo monoclonal com cada uma das 3 subunidades protéicas não ser conhecida.

Cruz-Hernandez & Gómez-Lim (1995) estudando o fruto de manga, observaram que 3 bandas protéicas de 27, 33 e 36 kDa eram reveladas através da reação com o anticorpo monoclonal anti-AOX. As bandas de 33 e 36 kDa foram detectadas antes do amadurecimento e aumentaram à medida que o fruto amadurecia sendo esse aumento também refletido no nível de mRNA. Já a banda de 27 KDa foi fracamente observada apenas em fruto verde. Na ocasião, esses autores sugeriram que a AOX estava presente em mais de uma isoforma. Posteriormente, Considine *et al.* (2001) identificaram 4 genes para a AOX (*Aox1a*, *Aox1b*, *Aox1c* e *Aox2*) sendo que um aumento na expressão dos genes *Aox1a* e *Aox1b* foi associada às bandas de 33 e 36 kDa.

A presença de mais de 01 tipo de AOX no mesmo tecido pode produzir heterodímeros (Umbach & Siedow, 1993; Finnegan *et al.*, 1997). Tal fato, segundo Sluse & Jarmuszkiewicz (1998) poderia fornecer um mecanismo muito flexível de regulação da atividade da AOX em resposta aos estados metabólicos celulares. Os mesmos autores acrescentam que as isoformas de AOX e seu heterodimerismo podem ser uma característica geral em plantas.

Estrutura dos genes da AOX

Os genes da AOX consistem de 4 éxons e de 3 íntrons na maior parte das plantas estudadas até aqui (Rhoads & McIntosh, 1993; Finnegan *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1997; Saisho *et al.*, 1997; Saika *et al.*, 2002). A posição de cada íntron é a mesma na maior parte dos genes da AOX até aqui identificados, havendo até o momento, duas exceções, o gene *Aox1b* de arroz (Ito *et al.*, 1997) e o gene *Aox2* de *Arabidopsis* (Saisho *et al.*, 2001). O gene *Aox1b* de arroz tem 3 éxons porque o éxon 2 contém regiões correspondentes a ambos os éxons 2 e 3 da maior parte dos genes da AOX (Ito *et al.*, 1997). Em contraste, os éxons 1 e 2 do gene *Aox2* de *Arabidopsis* são separados por 1 íntron na região que corresponde ao primeiro éxon na maioria dos genes da AOX.

Poucas famílias de genes da AOX têm sido estruturalmente bem caracterizadas, além de *Arabidopsis* e arroz, McCabe (2001) citado por Considine *et al.* (2002) caracterizou os genes da AOX de soja revelando íntrons nas seqüências dos genes *Aox1*, *Aox2a* e *Aox2b* em cada uma das 3 posições conservadas comum à maioria dos genes da AOX.

Os genes *Aox1a* e *Aox1b*, tanto em *Arabidopsis* como em arroz são encontrados um após o outro no mesmo cromossomo sendo separados por 1,9 kpb no caso em arroz e por cerca de 1,5 kpb em *Arabidopsis* (Ito *et al.*, 1997; Saisho *et al.*, 1997). Segundo Saisho *et al.* (1997) esses pares de genes encontrados um seguido do outro, provavelmente, ocorreram como um resultado da duplicação de uma forma ancestral do gene ou podem ter sido gerados por um mecanismo similar durante o curso da evolução.

Importação e processamento da oxidase alternativa

De acordo com Dessi *et al.* (2000) a importação de proteína para mitocôndria é geralmente vista como um processo de vários passos que envolvem desde a síntese do precursor da proteína no citosol até a montagem em unidades funcionais no compartimento correto dentro da mitocôndria.

Segundo Neupert (1997), o processo de importação mitocondrial requer a presença de fatores citosólicos e eventos de reconhecimento na superfície da mitocôndria. Dentro das mitocôndrias as proteínas são processadas para uma forma matura por peptidase(s) específica(s) de membrana (MPP) que requerem

informações localizadas dentro de uma pré-seqüência (peptídio sinal) para o correto reconhecimento do sítio de clivagem. As pré-seqüências mitocondriais podem ser divididas em dois domínios, N e C-terminal. De acordo com Roise (1993), citado por Tanudji *et al.* (1999) o domínio N-terminal tem o potencial para formar uma α -helice e é proposto funcionar no endereçamento do precursor. Por sua vez, o domínio C-terminal contém a informação necessária para propiciar a clivagem da pré-seqüência. Segundo Chaumont & Boutry (1995), citado por Finnegan *et al.* (1997), é típico dos peptídios sinais de mitocôndrias a falta de zonas conservadas, entretanto, através de comparação de seqüências foram observados resíduos de arginina (R) conservados na posição - 2 ou - 10 relativas ao sítio de clivagem num número de proteínas de plantas endereçadas a mitocôndria. Whelan *et al.* (1996) demonstraram que a arginina na posição - 2, assim como resíduos hidroxilados na posição + 2 e + 3 relativas ao sítio de clivagem são altamente conservados na maior parte das seqüências da AOX de plantas. Já a arginina na posição - 10 foi somente encontrada em soja, tabaco e Arabidopsis.

As proteínas precursoras mitocondriais são proteoliticamente processadas dentro da mitocôndria após a importação. A atividade de processamento mitocondrial geral em mitocôndrias de planta é integrada dentro do complexo citocrômico bc(1) da cadeia respiratória (Roise, 1997; Szigyarto *et al.*, 1998).

De acordo com Vanlerberghe & Macintosh (1997) é possível que a importação do precursor da proteína AOX para a mitocôndria bem como o processamento ou modificação subsequente da AOX represente outros pontos para o controle da atividade da AOX.

Estrutura protéica da oxidase alternativa

As seqüências de genes da AOX de plantas codificam uma proteína altamente semelhante conservando características como: cDNAs apresentando uma cauda poli A com tamanho variando de aproximadamente 1100 pb (Takumi *et al.*, 2002) a aproximadamente 1600 pb de nucleotídeos (Cruz-Hernandez & Gómez-Lim, 1995); um ORF "open reading frame" variando de 274 resíduos de aminoácidos em manga (Cruz-Hernandez & Gómez-Lim, 1995) a 352 resíduos em *N. crassa* (Li *et al.*, 1996); uma proteína madura tem sido encontrada variando de 241 resíduos de aminoácidos em mango a 322 resíduos em *H. anomala* (Sakajo *et al.*, 1991); regiões hidrofílicas N

e C terminal expostas para a matriz mitocondrial; dois resíduos de cisteína, conservados na região N terminal, sendo que a primeira cisteína provavelmente está envolvida na formação de uma ligação dissulfeto intramolecular (Rhoads *et al.*, 1998), exceção da AOX1b de arroz e de tomate que apresentam uma serina ao invés da cisteína (Djajanegara *et al.*, 1999); 4 regiões na seqüência de aminoácidos bem conservadas: LE_ _ A_VPGMV, NERMHL, G_LEEEA e RADE_ _H numa variedade de plantas, fungos, protistas e algas (Figura 2). (Bertold *et al.*, 2000); as regiões NERMHL e G_LEEEA parecem fazer parte do sítio ativo da proteína (Andersson & Nordlund, 1999), já a região RADE_ _H é responsável pelo reconhecimento feito pelo anticorpo monoclonal (Finnegan *et al.*, 1999).

Umbach & Siedow (1993) demonstraram que a proteína AOX existia como um dímero na membrana mitocondrial interna. Esse dímero existia em dois estados: um estado oxidado, no qual o dímero é covalentemente ligado por uma ligação dissulfeto intermolecular, e um estado reduzido, onde tal ligação é reduzida a sua forma sulfidrílica e a estrutura dimérica é mantida por interações não covalentes. Esses autores observaram através de "immunoblotting" que o dímero na forma oxidada migrava com pesos moleculares que variavam de 60 a 75 kDa e que quando na forma reduzida migrava com pesos moleculares entre 30 e 39 kDa nas diferentes espécies estudadas como *S. guttatum*, *soja* e feijão-mungo [*Vigna radiata* (L.) Wilczec].

Modelos estruturais da AOX

O conhecimento das seqüências em aminoácidos da AOX madura de *S. guttatum* (Rhoads & McIntosh (1991), *H. anomala* (Sakajo *et al.*, 1991), *A. thaliana* (Kumar & Söll, 1992) e *G. max* (Whelan *et al.*, 1993), assim como os trabalhos sobre regulação de Moore & Siedow (1991), Siedow & Moore (1993) e Umbach & Siedow (1993) foram essenciais para que Siedow *et al.* (1995) apresentassem a primeira das duas hipóteses existentes sobre a conformação estrutural da AOX na membrana mitocondrial interna.

O modelo de Siedow *et al.* (1995) baseava-se relativamente nas poucas seqüências da AOX até então conhecidas e classificava a AOX como um membro da família "bi-férrica" de proteínas que também incluíam a subunidade R2 da ribonucleotídeo redutase e o componente hidroxilase da metanomonoxigenase.

A.thaliana (1a)	-MMITRGGAKAAKSLVAAGPRLFFSTVTRTVSSHEALSASHILKPGVTSAWIWTTRAPTIGGMRFASTITLGEKTPMKEEDANQKKTENESTGGDAAGGNKNGDKGIASVWGVE--PNKITK	117
Soja (Aox1)	-----MMMSRSGANKRVANTAMFVAKLSGEVGGRLALYGGVRSSESTLALSEKE-----KIEKKVGLSSAGGNKEEKVIVSYWGIQ--PSKITK	84
Tabaco (Aox1b)	-----MWVRHFVPMGPRASSTVALNDKQ-----HDKKVENGGAAASGGGGGDEKSVSYWGVV--PSKVTK	60
S.guttatum (1)	MISSRLAGTALCRQLSHVVPVQYLPALRPTADTASSLLHRCSSAAAPQAGRLWPPSWFSPPRHASTLSARAQD-----GGKEKAAGTAGKVPPEGDGGAEKAVVSYWAVP--PSKVSK	112
Soja (Aox2a)	-----MKLTALNSTVRRALLNGRNQNGNRLGSAALMPYAAAEATRLLCAGGANGWFFYWKRTMVS-----PAAKVPEKEKEKEKAKAEKSVVSSYWGIS--RPKVVR	96
Manga (Aox2)	-----MSQLITKAALRVLLVCGRGNCNMFVSSVSSTSMKSPYEITAPMRIHDWCGGFGDFKIGSKHVQGNFNLKRWGMSSASAMEKEDENLTVKKGQNGGGSVAVPSYWGIEATAKMKITR	37
A.thaliana (2)	-----MGSRAAGSVLLRHLCPRVSSSTSAHAHAQRPPPLAGAGGGGVALWARLLSTSAAAAKEETAASKENTGSTAAAKAEATKAAKEGPASATASPVASSYWGIEA--SKLAS	108
Arroz (Aox1c)	-----MSSRMAGATLLRHLGPRLFAAEPVYSGLAASARGVMPAAARIFFARMASSTSSAGADVKEGAAEKLPEPAATAAAAATDPQNKAVVSYWGIQ--PPKLVK	98
Arroz (Aox1b)	-----MTSLPALVPFAALPALVPFAALASTGRLLGSMGSLVCGAQRRLPAHTAFARSHGTATGHAGIVGGAGLSHVKDAQAQFANGQSSSSPSFATSGVAPHPGMKAPSPPTDD	109
Alga verde (Cr2)	-----MFRNHASRIATAAAPWVLRATACRQKSDAKTPVWGHTQLNRLSFLETVPVPLRVSDSS	59
T.brucei	-----MNTPKVNILHAPGQAAQLSRALISTCHTRPLLLAGSRVATSLHPTQTNLSSPSPRNFSTTSVTRLKDFFPKATAYIRQTPPAWPHHGWTTEEMTSVVE	100
N.crassa	-----MIKTYQYRSILNSRNVGIRFLKTLSPSPHSDPNSKISFDIG----TKLIVNPPPMQADNQYVTHPLFPHPKYSDCEDCAVHFV	80
H.anomala		
A.thaliana (1a)	EDGSEWKWNCFRPWETYSKADITIDLKHHVPT-TFLDRIAYWTVKSLRWPTDLFFQRRYG-----CRAMMLETVAAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEQSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	233
Soja Aox1	KDGTETWKNCFSPWGTYSKADLSIDLEKHMPT-TFLDKMAFWTVKLVYPTDVFQRRYG-----CRAMMLETVAAVPGMVAGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	200
Tabaco (1b)	EDGTEWKWNCFRPWETYSKADLSIDLTKHVPT-TFLDKFAYWTVKALRYPTDIFQRRYG-----CRAMMLETVAAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEQSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	176
S.guttatum	EDGSEWRWTCFRPWETYSKADLSIDLKHVPT-TFLDKLALRTVKALRWPTDIFQRRYG-----CRAMMLETVAAVPGMVGGVLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	228
Soja Aox2a	EDGTEWPNWCFMPWESYRSNVSIDLTKHHVVK-NVLDKVAYRTVKLLRIPTDLFFKRRYG-----CRAMMLETVAAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	212
Manga Aox2	EDGSEWPNWCFMPWETYSRDLSDILKHHVPR-TFMDKFAAYRTVKLLRVPTDIFQRRYG-----CRAMMLETVAAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	153
A.thaliana (2)	KDGSWPNWCFMPWETYSQANLSIDLKHHVVK-NIADKVAYRIVKLLRIPTDIFQRRYG-----CRAMMLETVAAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	232
Arroz Aox1c	KDGEWKNWCFRPWETYSPTDITDLKHHVVK-VLLDKVAYWTVKALRVPTDIFQRRYG-----CRAMMLETVAAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	224
Arroz Aox1b	EDGTEWKWLSFRPWTYSSTDSIDVTKHHEPK-GLPDKLAYWTVRSVAVPRDLFFQRRHA-----SHALLETVAAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEQSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	214
Alga verde (Cr2)	EVEACWRPVYDTAYLEKVKPFHITPERLYQIRIGFRAIMAAARWTFDKLTGYGNMTEAKWL-----QRMIFLETIAAGVPGMVAGVLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	226
T.brucei	EDRPTWS-----LPDIENVAITHKKPN-GLVDTLAYRSVRTCRWLFDTFSLYRFGSITESKVISRCLFLETIVAGVPGMVGGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	173
N.crassa	HRKPETVGDWLAKLVIRICRWATDIATGIRPE----QQVDKHPHTATSADKPLTEAQWL-----VRFIFLBSIAGVPGMVAGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	213
H.anomala	HREPKTIGDKIADRGVKFCRASDFVTGYKKP----KDVNGMLKSWEGTRYEMTEKWL-----RCIFLESVAGVPGMVAAFIHCKSLRRFEHSGGWIKALLEBAENERMHLLMTMEVA	192
A.thaliana (1a)	KPKWYERALVITVQGVFFNAYFLGYLLSPKFAHRMVGYLEEEAIIHSYTEFLKELDKGNIE-----VPAPAIADYWRLPADA-TLRDVVMVVRADAEHHRDVRNHFASDIHQ-----	340
Soja Aox1	KPKWYERALVITVQGVFFNAYFLGYLLSPKFAHRMVGYLEEEAIIHSYTEFLKELDKGNIE-----VPAPAIADYWRLPADA-TLRDVVMVVRADAEHHRDVRNHFASDIHQ-----	307
Tabaco (1b)	KPNWYERALVFAVQGVFFINAYFVTVLLSPKLAXRIVGYLEEEAIIHSYTEFLKELDKGNIE-----VPAPAIADYWRLPKDS-TLRDVVLVVRADAEHHRDVRNHFASDIHQ-----	283
S.guttatum	QPRWYERALVLAVQGVFFNAYFLGYLLSPKFAHRVVGYLEEEAIIHSYTEFLKIDNGAIQD-----CPAPAIADYWRLPQGS-TLRDVVTVVRADAEHHRDVRNHFASDIHQ-----	335
Soja Aox2a	KPKWYERLLVLAVQGVFFNAFFVLYVLLSPKVAHRIVGYLEEEAIIHSYTEFLKIDNGAIQD-----VPAPAIADYWRLPKDA-RLKDVITVIRADAEHHRDVRNHFASDIHQ-----	319
Manga Aox2	QPKWYERLLVLAVQGVFFNSFFVLYVLLSPKLAHRIVGYLEEEAIIHSYTEFLKIDNGAIQD-----IPAPAIADYWRLPKDA-TLKDVITVVRADAEHHRDVRNHFASDIHQ-----	260
A.thaliana (2)	KPKWYERLLVLAVQGVFFNAYFLGYLLSPKLAHRVVGYLEEEAIIHSYTEFLKIDNGAIQD-----VAAPAIADYWRLPKDA-TLKDVITVIRADAEHHRDVRNHFASDIHQ-----	339
Arroz Aox1c	KPRWYERALVLAVQGVFFNAYFLGYLLSPKLAHRVVGYLEEEAIIHSYTEFLKIDNGAIQD-----VPAPAIADYWRLPADA-TLKDVVVVRADAEHHRDVRNHFASDIHQ-----	331
Arroz Aox1b	QPRWYERALVLAVQGVFFNAYFLGYLLSPKFAHRVVGYLEEEAIIHSYTEFLKIDNGAIQD-----TPAPAIADYWRLPADA-TLKDVITVIRADAEHHRDVRNHFASDIHQ-----	321
Alga verde (Cr2)	KPGPLFRASIIIVAGVFFNAYFLGYLLSPRTCHAAVGFLEEEAVKTYTHALQEIADGRWKG---KVAPPIACEYVGLKPGA-SMRDLILAVRADEACHAHVNHLSGLPAT-----	334
T.brucei	QEGPLPLRSIIITQAIMYLFLLVAVVISPRFVHRFVGYLEEEAVIIVYTGVMRAIDEGRLRPTK---NDVPEVARVYVWNLKNA-TFRDLINVIIRADEAEHHRVNHIFADMEHKLQNSVNPFFVL	294
N.crassa	EPGLLMKTLILGAQGVFFNAMFLSYLSPKITHRFVGYLEEEAVHTYTRCIREIEEGHLPKWSDEKFEIEMAVRYWRMPEGKRTMKDLIHYIRADEAEHHRVNHIFADMEHKLQNSVNPFFVL	326
H.anomala	NESWTFRTFIIYMGQGVFFANFLFLVYLKPRYCHRFVGYLEEEAVSTYTHLIKIDSKRLPKFDD---VNLPEISWLYWTDLNEKSTFRDLIQIRADEAEHHRVNHIFADMEHKLQNSVNPFFVL	303
A.thaliana (1a)	-----GRELKEAPAPIGYH-----	354
Soja Aox1	-----GRELREAAAPIGYH-----	321
Tabaco (1b)	-----GQQLKDSAPAPIGYH-----	297
S.guttatum	-----DLLEKTTAPPLGYH-----	349
Soja Aox2a	-----GKELREAPAPIGYH-----	333
Manga Aox2	-----GKELRDAPAPVGYH-----	274
A.thaliana (2)	-----GKELREAAAPIGYH-----	353
Arroz Aox1c	-----GMDLKDIAPPLDYH-----	345
Arroz Aox1b	-----GMKLDKTPAPIGYH-----	335
Alga verde (Cr2)	-----APNPFAYGASQLP-----	347
T.brucei	KKNPEEMYSNQPSGKTRTDFGSEGAKTASNVNKHV-----	329
N.crassa	-----EDNPFVSDYKEGEGRRPVNPAKPTGFERAIEVIG	362
H.anomala	-KDRNPFALKVEDVPKEQQPDEYSKLTPHPEGWNREQMRL	342

FIGURA 2 – Comparação de seqüências de aminoácidos da AOX de plantas, fungos, protozoário (*Tripanossoma brucei*) e alga (*Chlamydomonas reinhardtii*). Em amarelo, seqüência codificadora do peptídio sinal; em verde, resíduos de cisteína (ou serina) conservados na AOX de plantas; em azul, zonas de consenso.

Baseado em análises hidrofílicas da AOX foi projetado um modelo estrutural para o dímero no qual a proteína oxidase alternativa continha duas α -hélices transmembranares conectadas por uma hélice localizada no espaço intermembranar e quatro α -hélices ligadas por um centro bi-nuclear de átomos de ferro situado no domínio hidrofílico C-terminal da proteína, localizado na matriz mitocondrial (Figura 3). As α -hélices transmembranares, que apresentam uma alta conservação de resíduos dos aminoácidos Glutamina, Treonina e Tirosina, pareciam ser ou estarem envolvidas com um provável sítio de ligação para a ubiquinona.

A estrutura da AOX tem sido sujeita a muitas especulações. Conforme Albury *et al.* (1998) as 4 hélices do domínio C-terminal formariam o sítio catalítico da AOX devido a presença de um centro bi-nuclear de ferro (Fe^{++}) e de um resíduo Glutamato (E-270), propiciando uma estabilização da estrutura tridimensional da proteína. Embora nem dados de cristalografia nem de espectrofotometria sejam capazes de fornecer evidências diretas, o que é mais atualmente aceito é que o sítio ativo dessa enzima consiste de um centro bi-nuclear de ferro não-heme (Affourtit *et al.*, 2002).

Andersson & Nordlund (1999) revisaram o modelo proposto por Siedow *et al.* (1995) visto que tal modelo não correspondia a informação estrutural viável de enzimas com centro bi-nuclear de ferro em virtude dos resíduos de histidina (H273), assim como de Glutamato (E-270) relacionados com o centro bi-nuclear de ferro não serem inteiramente conservados em várias seqüências de AOX. Usando um motivo inteiramente conservado de glutamato-histidina (E217-X-X-H220) uma nova estrutura foi proposta com grande grau de similaridade a outras enzimas de centro bi-nuclear de ferro. Provavelmente a característica mais distinta do modelo revisado é que a proteína oxidase alternativa não é transmembranar, mas está associada perifericamente à membrana interna no lado da matriz mitocondrial (Affourtit *et al.*, 2002) (Figura 4).

Berthold *et al.* (2000) estudando uma oxidase alternativa de origem plastidial de *Arabidopsis*, proteína *Im*, com elevado grau de homologia à oxidase alternativa mitocondrial, concluíram através de comparação de seqüências que um resíduo invariante de tirosina (Y) da região hidrofóbica muito próximo ao sítio ativo da AOX (Andersson & Nordlund, 1999) ficava localizado numa posição análoga ao radical de tirosina do centro bi-nuclear de ferro da enzima ribonucleotídeo redutase, assim como

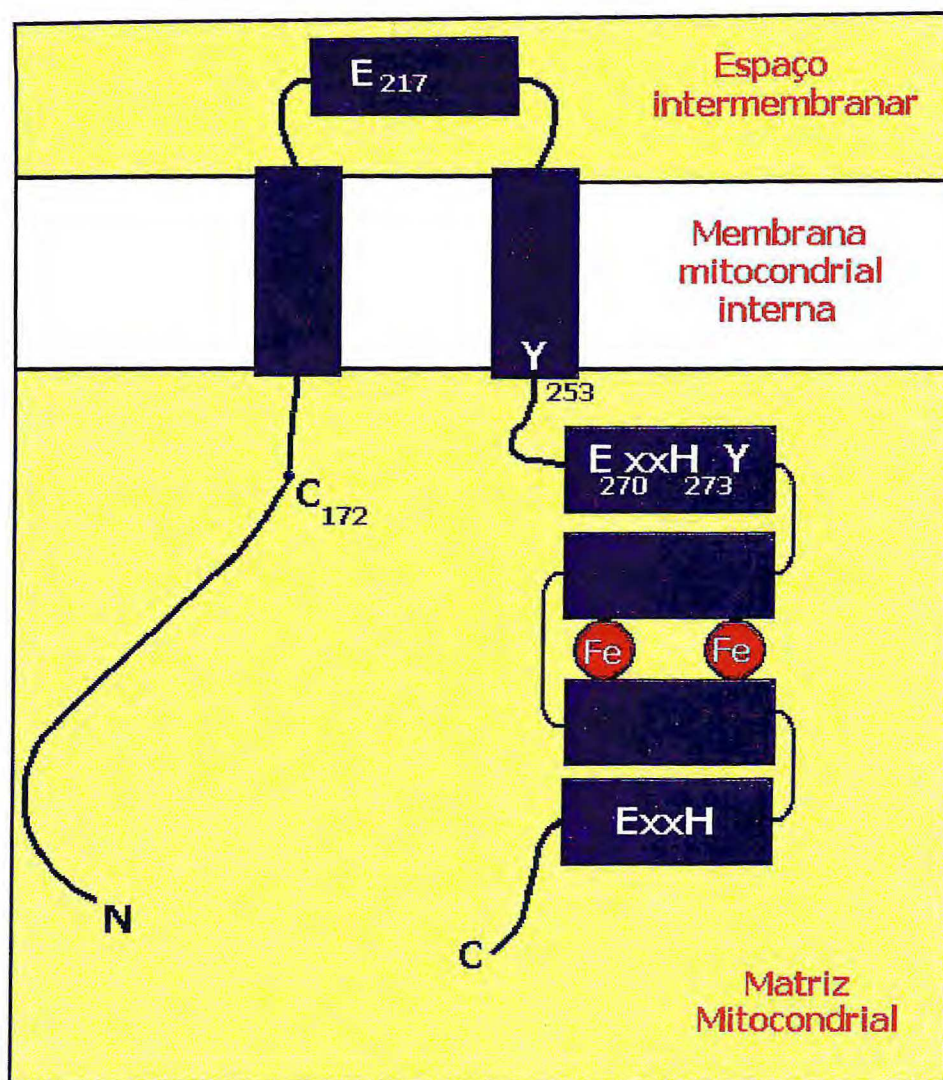


FIGURA 3 – Monômero da estrutura da oxidase alternativa segundo o modelo proposto por Siedow *et al.* (1995). A numeração dos resíduos de aminoácidos é feita a partir da AOX de *Sauromatum guttatum*. α -hélices (retângulos azuis); E (resíduo de glutamato), H (resíduo de histidina), Y (resíduo de tirosina) e C (resíduo de cisteína). As 4 α -hélices do domínio C-terminal, juntamente com o centro bi-nuclear de ferro formam o sítio catalítico.

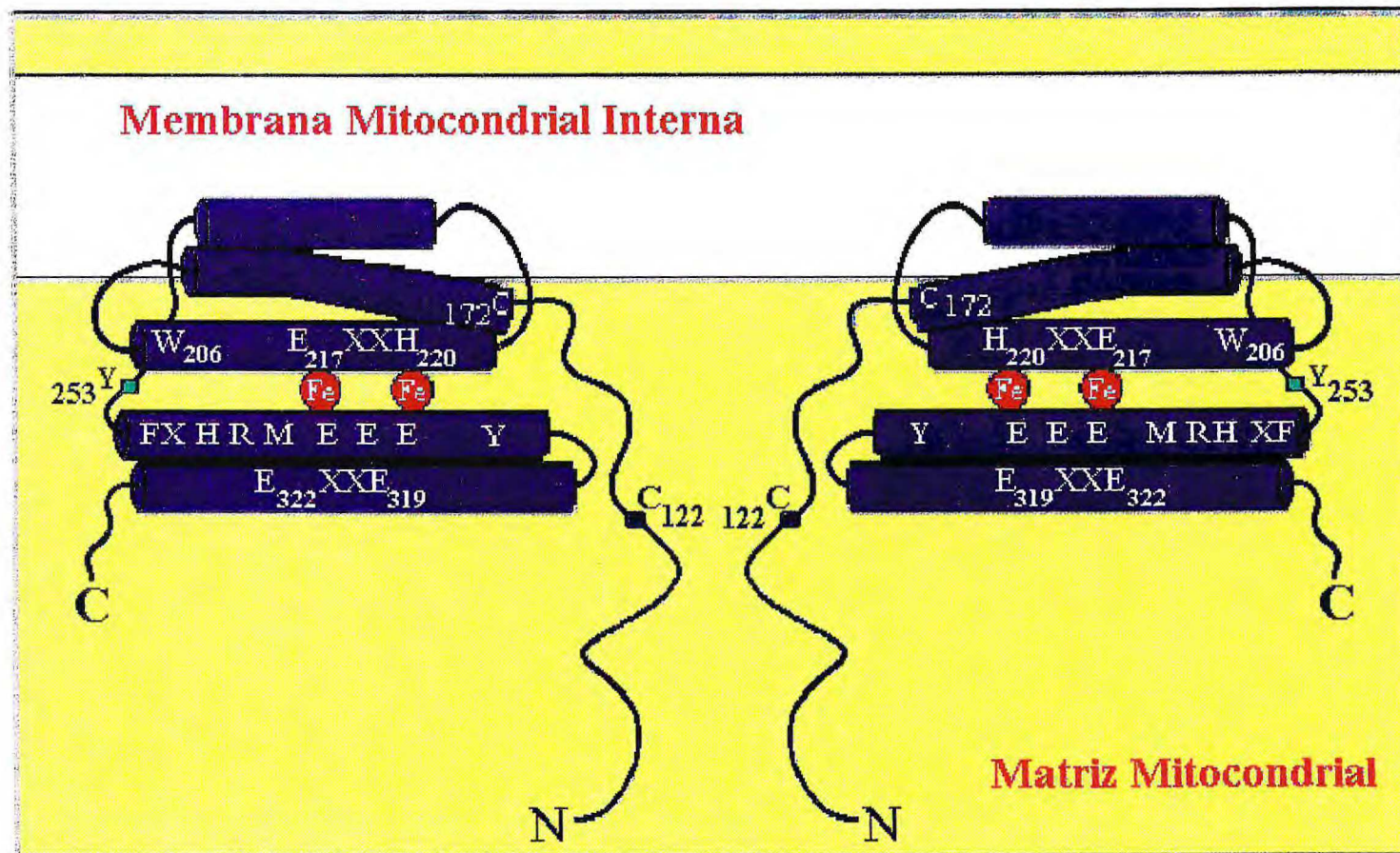


FIGURA 4 - Representação esquemática estrutural da oxidase alternativa (homodímero). A região helicoidal que abrange o centro binuclear de ferro (esferas vermelhas) é baseada na estrutura proposta por Andersson & Nordlund (1999) (Affourtit, 2002).

de forma similar às tirosinas próximas ao centro bi-nuclear de ferro das enzimas bacterioferritina e rubreritina. Baseados nessas observações esses autores caracterizaram a AOX como uma proteína carboxilato de centro bi-nuclear de ferro.

Diversos estudos têm sido realizados para revelar o comportamento cinético e os mecanismos que são direcionados para a genética e regulação pós-traducional da AOX. Muitos modelos estruturais têm sido desenvolvidos em que o sítio ativo da AOX consiste de um centro bi-nuclear de ferro não-heme (Fe^{++}). Recentemente, estudos mutagênicos e análises topológicas da membrana mitocondrial têm fornecido dados experimentais que permitem a avaliação dessas hipóteses estruturais (Affourtit *et al.*, 2002).

Albury *et al.* (2002), através de estudos mutagênicos em *Schizosaccharomyces pombe* concluíram que a AOX é uma proteína interfacial de membrana, embora tal estrutura não suporte a presença de esferas de ligação (Andersson & Nordlund, 1999) no centro bi-nuclear de ferro de várias oxidases alternativas. Mutações da Tyr-253 (Y-253) e Tyr-275 (Y-275) para fenilalaninas, mantêm ou excluem a atividade da AOX, respectivamente. Os mesmos autores também evidenciaram que E217 (Glu-217) é um resíduo de aminoácido essencial em termos de atividade da oxidase alternativa.

De acordo com o modelo de Siedow *et al.* (1995), E217 (Glu 217) é localizado no espaço intermembranar, uma localização que descarta uma função catalítica para esse resíduo. Em contraste, Andersson & Nordlund (1999) atribuem um papel essencial para o resíduo de glutamato que, no seu modelo, funciona como ponte entre a 2ª e a 4ª hélices do centro bi-nuclear de ferro. A completa falta de atividade da proteína oxidase alternativa quando E217 foi trocado por alanina, dá suporte à estrutura interfacial postulada por Albury *et al.* (2002) (Affourtit *et al.*, 2002).

Regulação da oxidase alternativa

A atividade da AOX é controlada por muitos parâmetros entre os quais podem ser distinguidos eventos regulatórios e disponibilidade de substrato. A regulação da atividade da AOX pode ocorrer em diferentes níveis: i) expressão do(s) gene(s) que afeta(m) a quantidade da proteína na membrana; ii) modificações pós-traducionais da proteína (ex: seu estado redox que afeta a natureza do dímero); iii) a ação de

efetores alostéricos como o piruvato (Sluse & Jarmuszkiewicz, 1998) (Figura 5).

A atividade da oxidase alternativa pode ser regulada a longo prazo (expressão gênica) ou a curto prazo (modificação pós-traducional e ativação alostérica) (Sluse & Jarmuszkiewicz, 1998).

A expressão da AOX é aumentada sob uma ampla variedade de estresses tais como o "chilling" em tabaco, injúria de tecido em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.), estresse osmótico e estresse oxidativo (Day *et al.*, 1995; McIntosh, 1994; Casolo *et al.*, 2000; Pastore *et al.*, 2000). Maxwell *et al.* (1999) sugeriram que as plantas submetidas a condições de estresses induzem a produção de espécies reativas de oxigênio e a oxidase alternativa funcionaria para minimizar a produção de tais radicais. Segundo Levine *et al.* (1994) e Sen & Packer (1996) espécies reativas de oxigênio (ROS) são sinais que regulam a expressão de inúmeros genes.

De acordo com Sluse & Jarmuszkiewicz (1998), a expressão nuclear do gene da AOX é sensível a atividade da via citocrômica existindo uma comunicação entre a mitocôndria e o núcleo. Em levedura, a capacidade de um inibidor da via citocrômica de induzir síntese de AOX (Minagawa *et al.*, 1992) é relacionada à sua habilidade de causar a formação de superóxidos durante a respiração mitocondrial.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) tais como superóxidos, H_2O_2 , ou um radical hidroxil, podem atuar como indicadores sensíveis para sinalização do núcleo com relação a mudanças no estado redox mitocondrial e servirem para modular a expressão da AOX (Vanlerberghe & Macintosh, 1997). A inibição da via citocrômica por antimicina A ou outros inibidores do Complexo III resulta na geração de ROS na mitocôndria (Minagawa *et al.*, 1992; Zykova *et al.*, 2002). A inibição da via citocrômica pode induzir a síntese da AOX em muitos organismos (Benichou *et al.*, 1988; Bertrant *et al.*, 1983; Sakajo *et al.*, 1991; Vanlerberghe & Macintosh, 1992; Wagner *et al.*, 1992; Vanlerberghe & Macintosh, 1994).

O mecanismo de transdução de sinais, que regula a expressão de genes que codificam componentes transdutores de energia deve envolver cascatas de fosforilação/desfosforilação de proteínas, assim como a ação de proteínas ligantes de DNA (Allen, 1993).

A expressão do gene nuclear da AOX pode também depender da regulação redox. O nível de ubiquinona reduzida pode atuar como um sinal regulatório na expressão da AOX. Dessa forma, um desequilíbrio entre o metabolismo do carbono e



FIGURA 5 - Mecanismos de regulação da atividade da oxidase alternativa (Sluse & Jarmuszkiewicz, 1998)

o transporte de elétrons resultaria em mudanças no nível de ubiquinona reduzida e isso poderia ser contornado pela expressão e conseqüente atividade da AOX (Hakansson & Allen, 1995).

De acordo com Siedow & Umbach (2000) a atividade da AOX *in vivo* é fortemente dependente da quantidade da proteína AOX presente e da concentração de seu substrato, ubiquinona reduzida.

Condições metabólicas que aumentem o poder redutor na célula levam a um aumento da relação Q_{red}/Q_{tot} , do nível de NADPH (favorecimento da redução do dímero da AOX) e do piruvato (ativador alostérico da AOX), aumentando a partição de elétrons para AOX. Um alto suprimento redutor aumenta o potencial fosfato (alta relação ATP/ADP) que conduzirá ao decréscimo do fluxo de elétrons para a via citocrômica aumentando o fluxo de elétrons para AOX. Tais condições são conseqüências de um desequilíbrio entre o suprimento de substratos reduzidos e demanda por compostos carbonados para a biossíntese, ambos sendo acoplados através da atividade da cadeia respiratória. A atividade da AOX pode impedir esse estado de desequilíbrio porque não é diretamente controlada pelo estado energético da célula e pode prevenir a fermentação e favorecer a biossíntese. Esses desequilíbrios poderiam ser impedidos por uma regulação rápida da atividade da AOX (estado alostérico e redox da proteína) ou como um resultado de mudanças lentas no ambiente (vários estresses), por modificação da quantidade de proteína AOX (expressão gênica) (Siedow & Umbach, 2000).

A expressão do gene *Aox* responde a um metabólito em particular cujo nível reflete algum parâmetro chave do estado mitocondrial. Um aumento no nível celular de um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), o citrato (suplementação exógena para as células, inibição da aconitase por monofluoracetato, ou após o tratamento das células com H_2O_2) foi rapidamente seguido por aumento dos níveis de mRNA de *Aox* (Vanlerberghe & Macintosh, 1997). O citrato é o primeiro ácido orgânico do ciclo TCA e sua acumulação (fluxo lento de carbono através do ciclo TCA) pode ser um importante sinal fisiológico que liga o metabolismo mitocondrial e a expressão do gene nuclear (Vanlerberghe & Macintosh, 1997).

Em mitocôndria de planta a isocitrato desidrogenase NADPH-dependente (mtICDH) atua como um elo de ligação entre o controle respiratório e o fluxo de carbono do ciclo do TCA. A mtICDH é envolvida na ativação da AOX, através da

produção de NADPH. Os equivalentes redutores gerados através da NADP-isocitrato desidrogenase na matriz atuam através de uma tioredoxina ou sistema glutathione intermediando a redução da cisteína regulatória e conseqüente ativação da AOX (MacIntosh *et al.*, 1998).

A atividade da AOX *in vitro* pode ser modulada de muitas maneiras. Em mitocôndrias de plantas, por exemplo, a atividade da AOX aumenta consideravelmente através da redução da ponte dissulfeto que liga as subunidades da AOX produzindo um homodímero ligado não covalentemente (Umbach & Siedow, 1993; Umbach *et al.*, 1994). A enzima reduzida é posteriormente ativada por α -cetoácidos, particularmente piruvato (Millar *et al.*, 1993), que reage com uma porção sulfidril formando um tiohemiacetal (Umbach & Siedow, 1996) (Figura 6). Em mitocôndrias de plantas, α -cetoácidos como hidroxipiruvato e glioxilato também podem ativar a AOX (Day *et al.*, 1995; Millar *et al.*, 1993; Millar *et al.*, 1996), entretanto o piruvato é o mais efetivo ativador, sendo necessário na concentração de 0.1 mM em mitocôndrias intactas e menos de 5 μ M em partículas mitocondriais invertidas para atingir metade da estimulação máxima (Millar *et al.*, 1996).

O piruvato atua do lado da matriz mitocondrial (Millar *et al.*, 1993; Millar *et al.*, 1996) ativando a AOX através da formação de um tiohemiacetal com o grupo sulfidril do primeiro resíduo de cisteína conservado da AOX (aminoácido nº 122 na AOX de *S. guttatum*). A estimulação do piruvato é reversível e é observada em mitocôndrias onde a AOX está na forma reduzida (Day & Wiskich, 1995).

De acordo com Millar *et al.* (1993) existem dois sistemas de regulação da AOX que interagem entre si modulando sua atividade, o estado redox da proteína e a ligação com o piruvato. O dímero de AOX tem que estar na sua forma reduzida para ser ativada pelo piruvato e a forma reduzida da enzima apresenta pouca atividade na ausência de piruvato.

Umbach *et al.* (1994) demonstraram que em mitocôndrias isoladas, o comportamento cinético da AOX com respeito ao nível de redução da quinona (Q) é alterado pelo piruvato a tal ponto que a atividade é aumentada predominantemente em baixos níveis de redução. Tais dados sugerem que o piruvato aumenta a afinidade da oxidase pelo ubiquinol.

Hoefnagel *et al.* (1997) usando análogos de ubiquinol como substrato artificial reduzido mostraram que o piruvato afeta exclusivamente a V_{max} da oxidase. Os

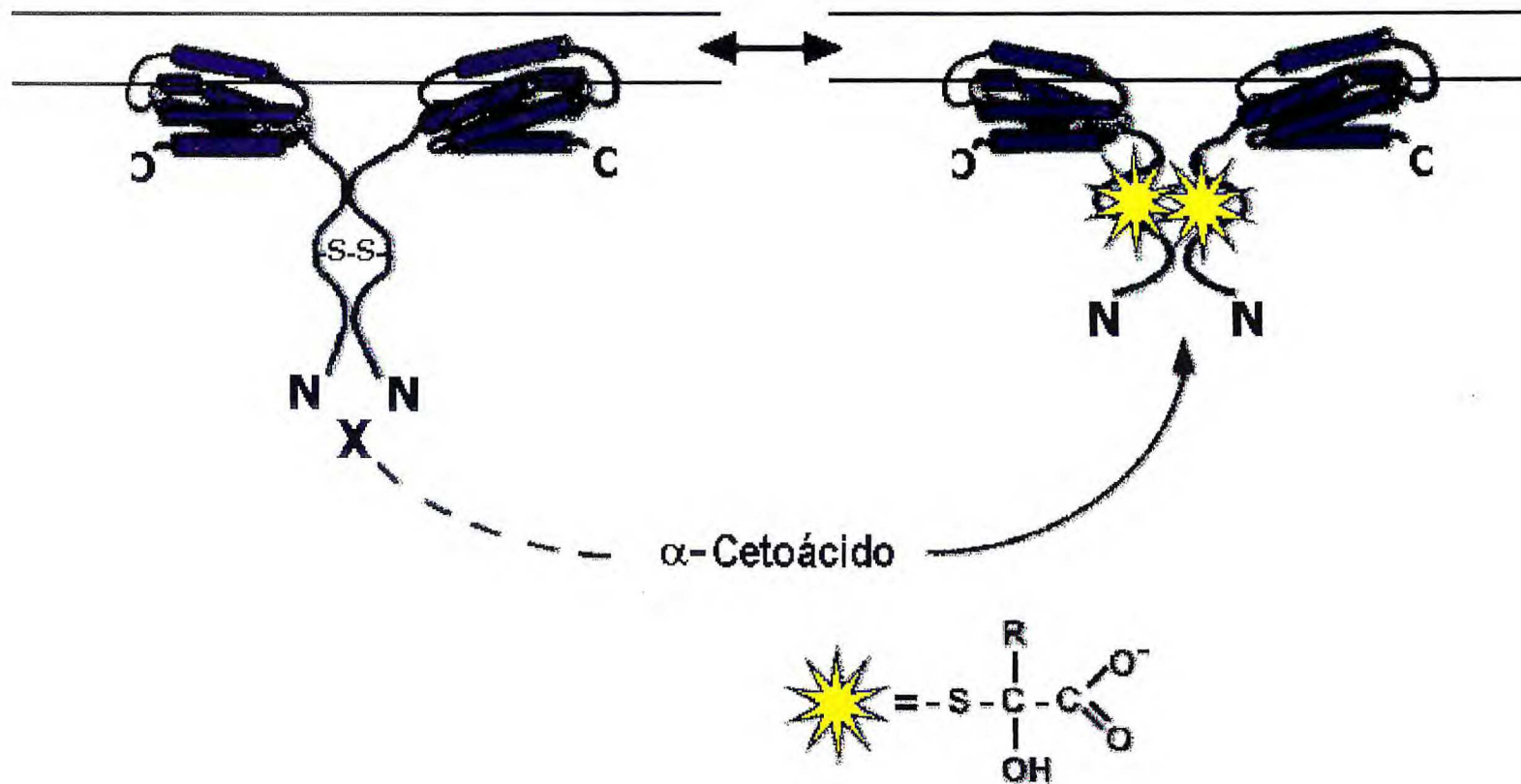


FIGURA 6 - Diagrama esquemático das características regulatórias da oxidase alternativa de plantas (Siedow & Umbach, 2000).

mesmos autores sugeriram que o piruvato pode afetar o potencial redox da oxidase alternativa ou pode reduzir a ligação do produto oxidado (Q), em ambos os casos permitindo altas atividades da enzima em níveis relativamente baixos de ubiquinona reduzida. Os autores ainda acrescentaram que o piruvato tem um duplo efeito na AOX, aumentando a V_{max} e decrescendo o K_m aparente da enzima pelo nível de ubiquinona reduzida e possivelmente envolve a ligação da ubiquinona em uma região da estrutura primária da AOX que é relativamente próxima do sítio ativo da enzima.

Rhoads *et al.* (1998) e Vanlerberghe *et al.* (1998), através de estudos mutagênicos, revelaram que C122 é o sítio onde os eventos regulatórios ocorrem e correspondem à porção mais N-terminal dos dois resíduos de cisteína. Uma mutação da C122 para glutamato produz uma enzima menos ativa que a proteína nativa estimulada pelo piruvato. De acordo com Affourtit *et al.* (2002) o fenômeno estimulatório da AOX observado em sistemas vegetais envolve pelo menos o resíduo de cisteína 122, dos 2 resíduos (C122 e C172 no exemplo de *S. guttatum*) que são altamente conservados.

Genes da AOX de arroz (*Aox1b*) e de tomate (Djajanegara *et al.*, 1999) apresentam uma serina no local da primeira cisteína regulatória (C122). Djajanegara *et al.* (1999) mostraram que a mutação na C122 da AOX de *S. guttatum* por serina resulta numa enzima que não é mais ativada pelo piruvato, no entanto é especificamente estimulada pelo succinato. A Mutação da C122 por alanina, também produz uma oxidase alternativa insensível ao piruvato (Rhoads *et al.*, 1998; Vanlerberghe *et al.*, 1998 e Djajanegara *et al.*, 1999) e baseado em dados de Siedow & Umbach (2000) e Djajanegara *et al.* (1999) esse mutante também foi estimulado pelo succinato. Já a oxidase alternativa de fungo não contém o domínio primário de aproximadamente 40 aminoácidos que circunda e inclui a cisteína "regulatória" (C122) na maioria das seqüências de planta. A ausência desse domínio estrutural que permite a dimerização da AOX, explica porque a maioria das AOXs de fungos estudadas têm sido encontradas como proteínas monoméricas e não são estimuladas por piruvato (Joseph-Horne *et al.*, 2000; Umbach & Siedow, 2000; Siedow & Umbach 2000).

As condições hipotetizadas para favorecer a partição de elétrons para a oxidase alternativa sob um modelo de "over flux" de energia (alto suprimento de substrato, alta carga de adenilatos) também geram os requerimentos para favorecer

a atividade da AOX (alta concentração de piruvato, "pool" de nucleotídeo de piridina reduzido, "pool" de ubiquinona reduzido). A partição de elétrons para a via alternativa não é um desvio estático (um simples "over flux" da via citocrômica), mas funciona como um sistema dinâmico capaz de responder à disponibilidade de carbono e poder redutor na mitocôndria (Vanlerberghe & Macintosh, 1997).

Apesar das dificuldades em obter uma proteína purificada estável, progressos consideráveis têm sido feitos nas últimas décadas para o entendimento da natureza molecular da regulação e catálise da AOX. Uma ampla variedade de mutantes de proteína em combinação com o desenvolvimento atual de sistemas bacterianos de "super-expressão" são ferramentas-chaves para uma melhor compreensão das hipóteses estruturais e mecânicas (Affourtit *et al.*, 2002).

Técnicas de Biologia Molecular na Exploração da Oxidase Alternativa:

Biblioteca de cDNA

As populações de RNA mensageiro (mRNA) acumuladas num dado tecido são representativas desse tecido. Dessa forma é possível caracterizar a expressão de diferentes genes expressos num dado órgão ou tecido a partir do isolamento e identificação das populações de mRNA dos genes de interesse. Entretanto, a manipulação de mRNA é delicada (pequena quantidade existente e sensibilidade a ação de nucleases) fazendo-se necessário transformar esses mRNAs em DNAs de dupla fita que são manipuláveis e adaptáveis a clonagens em vetores bacterianos. Uma biblioteca de cDNA (DNA complementar a um mRNA) é então representativa das populações de mRNAs de um dado tecido num estado determinado de seu desenvolvimento. Ao contrário da biblioteca genômica, uma biblioteca de cDNA será específica de um tecido podendo ser considerada como uma "fotografia instantânea" das populações de mRNAs (Tagu, 1999).

A construção de um banco de cDNA envolve várias etapas como: I) purificação dos mRNAs poli adenilados do tecido de interesse (através de cromatografia de afinidade numa coluna de poli T); II) transformação dos mRNAs em cDNAs de fita simples através de uma transcriptase reversa; III) eliminação específica dos mRNAs por uma RNase H; IV) síntese da segunda fita de DNA através de uma DNA polimerase; V) ligação de oligonucleotídeos (adaptadores) nas

extremidades dos cDNAs a fim de criar sítios de restrição; VI) ligação dos cDNAs em vetores de clonagem (plasmídeo ou fago) e VII) integração dos vetores recombinantes numa bactéria (Tagu, 1999).

Vetores de clonagem

Os vetores utilizados na construção de uma biblioteca de cDNA são plasmídios ou bacteriófagos.

Um plasmídeo é uma molécula de DNA de dupla fita circular, extra cromossômico, capaz de se replicar (independentemente do cromossomo bacteriano) dentro de uma célula e de ser transferido para uma outra célula. Os plasmídios são moléculas pequenas (de 3 a 10 kpb), possuindo uma origem de replicação, um ou vários genes que conferem resistência a antibióticos (permitem a seleção de bactérias que receberam um determinado plasmídeo) e um sítio de poli-clonagem. O sítio de poli-clonagem é uma seqüência de DNA constituída de uma sucessão de seqüências reconhecidas e seccionáveis por diferentes enzimas de restrição. Esses sítios de restrição são únicos (eles aparecem apenas no sítio de poli clonagem em toda a seqüência do plasmídeo) e são utilizados para inserir um DNA exógeno a ser clonado. Moléculas de DNA exógenas de até 4 kpb podem ser facilmente integrados nesses vetores plasmídicos, já as moléculas maiores serão dificilmente aceitas (Tagu, 1999).

Um bacteriófago é um vírus bacteriano que pode integrar moléculas de DNA maiores em relação aos plasmídios. O bacteriófago mais utilizado em clonagem é o bacteriófago λ que possui um DNA de tamanho aproximado de 50 kpb. O seu DNA possui extremidades coesivas (seqüência *cos*) o que lhe permite circularizar na infecção bacteriana. Na ocasião dessa infecção, a partícula do fago fixa-se no exterior da bactéria e lança sua molécula de DNA para o interior da célula bacteriana. A maquinaria enzimática da bactéria vai ser utilizada para transcrever e traduzir as proteínas codificadas pelo DNA do fago λ , notadamente as proteínas que constituem a capa protéica do vírus. O DNA fágico vai igualmente se replicar em um número muito grande de vezes e as novas moléculas de DNA sintetizadas serão encapsuladas dentro de novas capas fágicas no interior da célula bacteriana, em seguida esta célula irá romper-se e liberar milhares de partículas fágicas idênticas ao fago que infectou a bactéria. Esses novos fagos irão então infectar as bactérias vizinhas (Tagu,

1999).

A vantagem de um vetor bacteriofágico sobre um vetor plasmídico é que seu DNA aceita moléculas de DNA exógenos maiores, em média 20 kpb (Tagu, 1999).

vetor λ ZIPLOX

A biblioteca de cDNA utilizada nesse trabalho para o "screening" de clones positivos da AOX era construída com o vetor λ ZIPLOX (Figura 7).

O bacteriófago λ ZIPLOX (GIBCO BRL) é um vetor de expressão λ engenheirado a partir do bacteriófago P1 e do plasmídio pZL1, podendo acomodar insertos de cDNAs com até 7 kpb. O bacteriófago P1 tem um sistema de recombinação sítio específico composto de 2 elementos: um *lox P* "cis-acting locus" e uma proteína (Cre) que catalisam a troca de seqüências que flaqueiam os dois sítios *loxP* (Abremski *et al.*, 1983; Hoess & Abremski, 1985). O λ ZIPLOX foi construído através da inserção do plasmídio pZL1 entre os sítios *loxP* do bacteriófago P1. O plasmídio pZL1 é uma versão modificada do plasmídio pSPORT 1, diferindo por possuir um simples sítio *loxP* e a seqüência clonada *incA* (Figura 8). O plasmídio pZL1 apresenta 19 únicos sítios de restrição no sítio de poli clonagem flanqueados pelos promotores SP6 e T7 RNA polimerase, apresenta ainda a origem de replicação do bacteriófago f1 para a produção de uma simples fita de DNA, além de um gene *Ap^r* que confere resistência a ampicilina (Figuras 7 e 8). Na construção da biblioteca, os cDNAs com extremidades compatíveis são inseridos entre os sítios de restrição *Not*I e *Sa*/I do vetor λ ZIPLOX.

Excisão *in vivo* do plasmídio pZL1

O plasmídio pZL1 pode ser liberado *in vivo* do DNA fágico através da infecção de bactérias de *E. coli* DH10B (ZIP) com o fago λ ZIPLOX (Figura 9). O plasmídio pZL1 (e algum cDNA clonado dentro dele) é separado do genoma λ ZIPLOX e circularizado pela recombinação dos sítios Cre-*loxP* dentro de bactérias DH10B (ZIP). Esse processo também produz um fago λ intacto, entretanto, um profago λ residente em DH10B (ZIP) reprime a expressão do fago, prevenindo a iniciação da replicação lítica. Na bactéria DH10B (ZIP), à medida que o número de cópias do plasmídio pZL1 aumenta, o locus *incA* do pZL1 inibe a replicação do plasmídio residente pZIP pela interação com o seu *ori* P1. Em ausência de seleção por

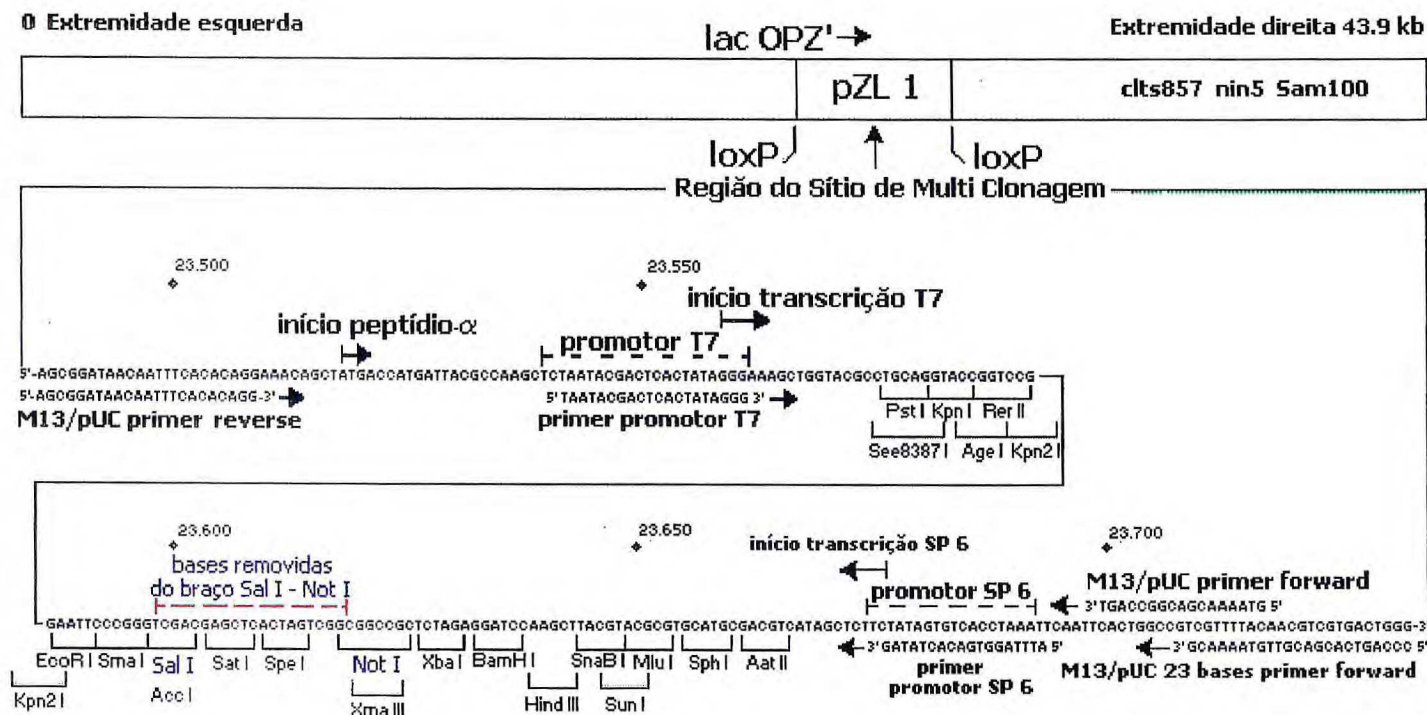


FIGURA 7 – Mapa e sítio de multiclonagem do vetor bacteriófágico λZIPLOX. A região do sítio de multiclonagem é localizada no plasmídeo pZL1 inserido.

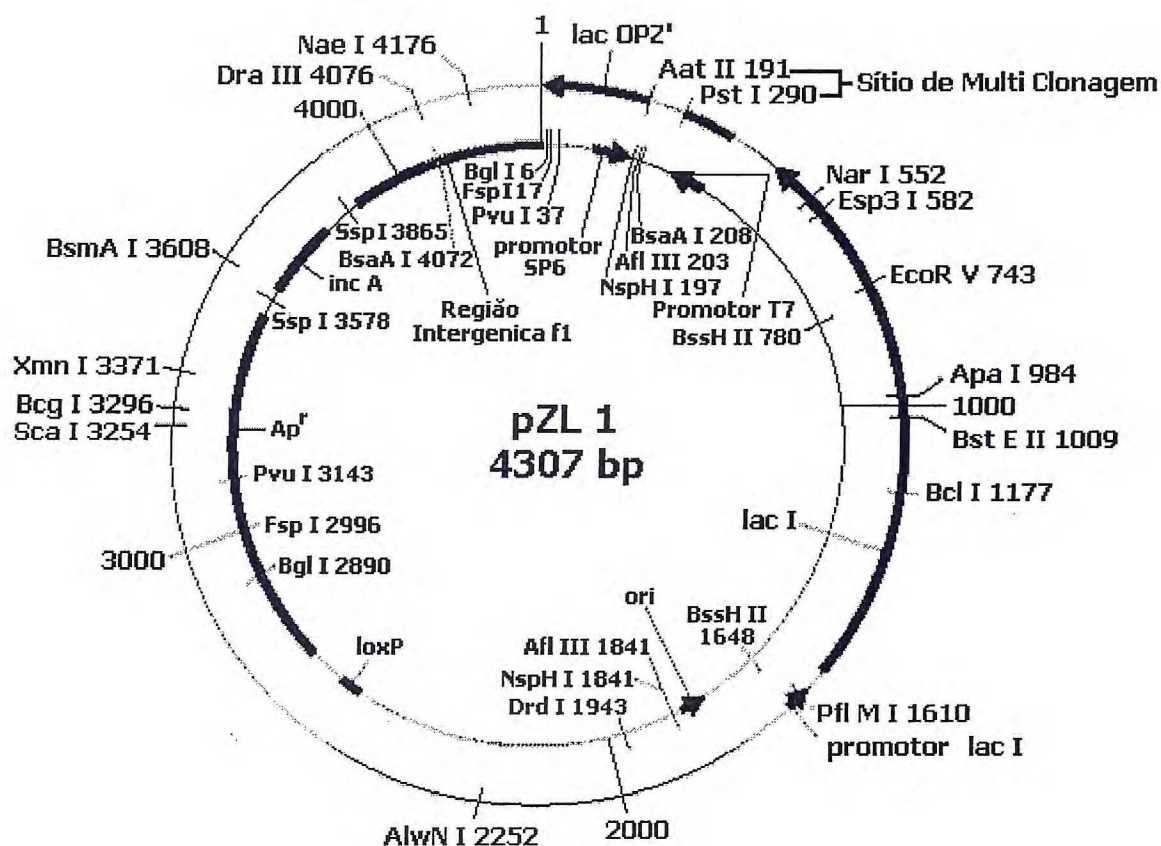


FIGURA 8 – Mapa gênico e de enzimas de restrição do vetor plasmídico pZL1

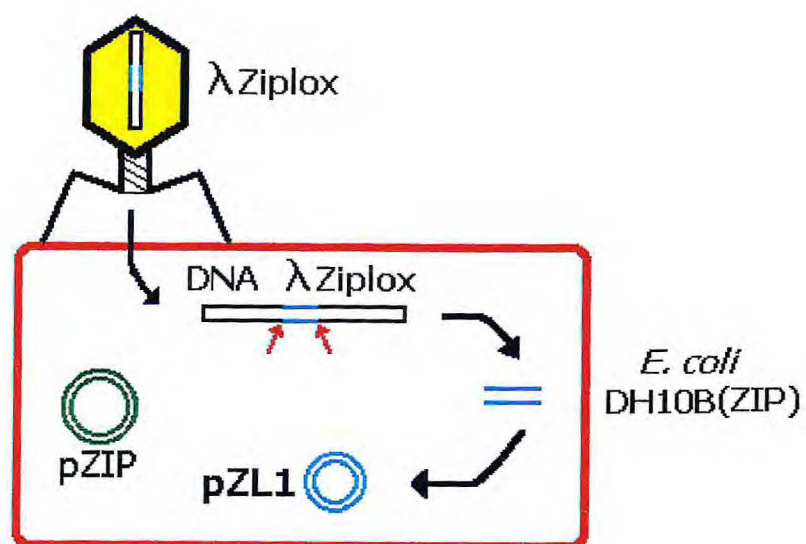


FIGURA 9 – Esquema representativo da excisão *in vivo* e circularização do plasmídeo pZL1 em bactérias de *E. coli* DH10B (ZIP).

canamicina, o bloqueio da replicação causa a rápida perda de pZIP e um declínio no nível da recombinase Cre endógena resultando numa alta produção de DNA pZL1.

Sistema de expressão de proteína exógena em *Escherichia coli*

O sistema de expressão da proteína recombinante produzida nesse trabalho foi o "QIAexpress" (QIAGEN). Esse sistema permite a expressão, purificação, detecção e análise de proteínas ligadas a 6 histidinas na extremidade amino terminal. Altos níveis de expressão dessa proteína em *E. coli*, usando vetores pQE QIAexpress são baseados no sistema transcrição-tradução do promotor T5.

Vetor de expressão

Os plasmídios pQE pertencem à família de plasmídios pDS (Bujard *et al.*, 1987) e foram derivados de plasmídios pDS56/RBSII e pDS781/RBSII-DHFRS (Stüder *et al.*, 1990). Esses plasmídios apresentam as seguintes características (Figura 10):

- Elemento promotor-operador otimizado consistindo de promotor T5 fágico (reconhecido pela RNA polimerase de *E. coli*) e duas seqüências do operador *lac* que melhora a ligação do repressor *lac* e assegura uma eficiente repressão do forte promotor T5;
- Sítio de ligação ribossomal sintético, RBS II, para alta taxa de tradução;
- Seqüência codante de 6 histidinas para possibilitar a purificação após a expressão;
- Sítio de poli-clonagem e códons "stop" em todo fragmento de leitura para conveniente preparação de plasmídios recombinantes;
- Gene da β -lactamase (*bla*) que confere resistência a ampicilina (Sutcliffe, 1979);
- Origem de replicação ColE1 (Sutcliffe, 1979).

Regulação da expressão

Altos níveis de transcrição iniciados pelo promotor T5 podem ser regulados e reprimidos eficientemente somente através da presença de altos níveis da proteína repressora *lac*. A linhagem de *E. coli* usada nesse sistema contém o plasmídio pREP4 que confere resistência a canamicina e expressa constitutivamente a proteína repressora *lac* codificada pelo gene *lac I* (Farabaugh, 1978). O plasmídio pREP4 é

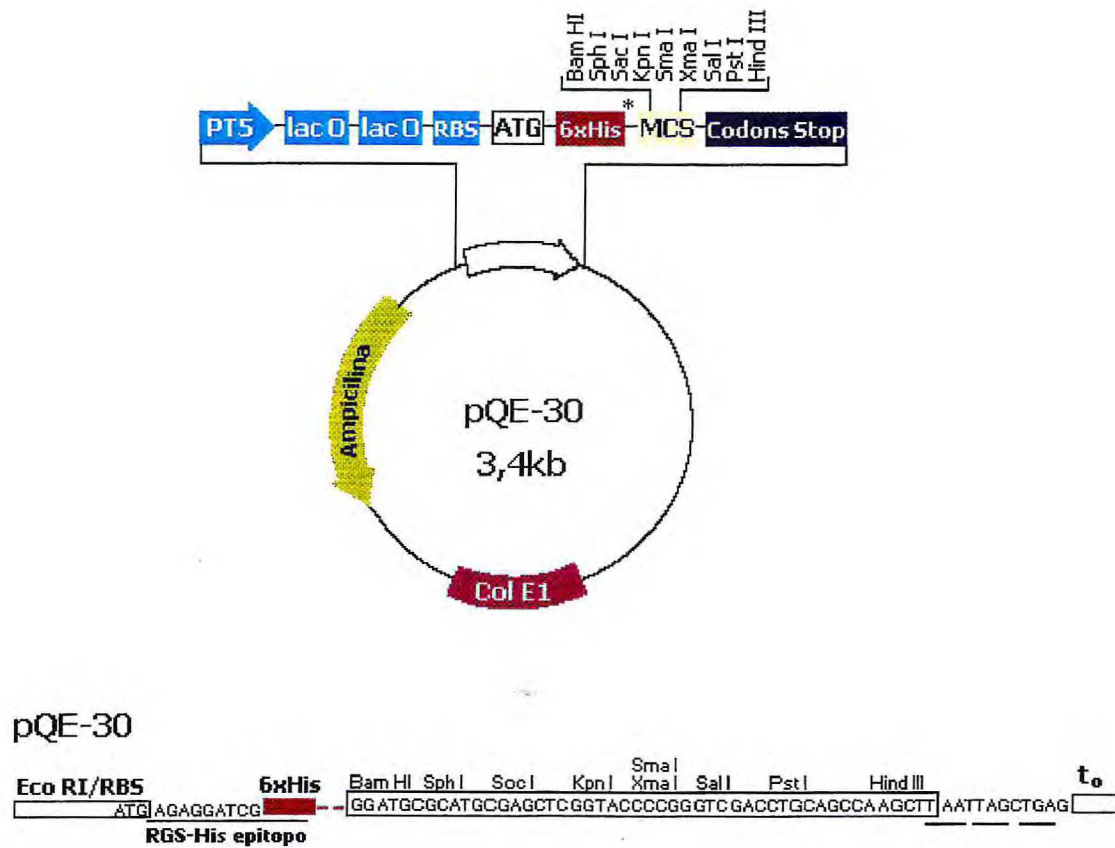


FIGURA 10 – Plasmídio de expressão pQE-30. PT5 (promotor T5); lac O (operador lac O); RBS (sítio de ligação a ribossomos); ATG (códon correspondente a metionina); MCS (sítio de poli clonagem).

derivado do pACYC e contém o replicon p15A. Múltiplas cópias do pREP4 estão presentes nas células de *E. coli* assegurando a produção de altos níveis da proteína repressora lac que se liga às seqüências do operador no plasmídio pQE e regula finamente a expressão da proteína recombinante. O plasmídio pREP4 é compatível com todos os plasmídios que possuem a origem de replicação ColE1 e é mantido em *E. coli* na presença de canamicina 25 µg/mL. A expressão de proteínas recombinantes codificadas pelos vetores pQE é rapidamente induzida pela adição de IPTG que se liga à proteína repressora lac e inativa-a. Uma vez que o repressor *lac* é inativado a RNA polimerase da *E. coli* pode transcrever as seqüências inseridas (gene) ao promotor T5. O sistema com duplo operador lac nos vetores pQE em combinação com altos níveis da proteína repressora lac produzidas pelo pREP4 assegura um fino controle da transcrição.

Purificação da proteína recombinante

A proteína recombinante expressa em *E. coli* através desse sistema "QIAexpress" é purificada por cromatografia de afinidade de matriz Ni-NTA [ácido nitrilotriacético (NTA) ligado ao íon níquel] graças à presença de 6 histidinas (6xHis tag) na porção amino terminal. NTA é um quelante adsorvente tetradentado que ocupa 4 dos 6 sítios de ligação na coordenação esférica com o íon níquel, ficando 2 sítios livres para interagir com a seqüência "6xHis tag".

OBJETIVOS

- 1) Estudar o efeito do estresse hídrico e salino na expressão da oxidase alternativa (AOX) em cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp com diferentes níveis de tolerância a esses estresses;
- 2) Isolar e caracterizar clones de cDNA da AOX de *V. unguiculata* a partir de uma biblioteca de cDNA de folhas de *V. unguiculata* cv. EPACE 1 em condições de estresse hídrico moderado;
- 3) Avaliar a expressão do(s) gene(s) da AOX identificados;
- 4) Produzir a AOX recombinante de *V. unguiculata* em *Escherichia coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - MATERIAL VEGETAL

O feijão de corda foi classificado por Verdcourt (1970), como uma dicotiledônea, pertencente à ordem *Fabales*, Família *Fabaceae*, sub-família *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, sub-tribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. As cultivares utilizadas neste trabalho foram escolhidas em virtude de suas diferenças de tolerâncias ao estresse salino, sendo a cultivar Vita 3 menos sensível do que a cultivar Vita 5 (Fernandes de Melo *et al.*, 1994).

Sementes de *V. unguiculata* das cultivares Vita 3 e Vita 5 fornecidas pelo Banco de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, foram imersas, por 5 minutos, em solução de hipoclorito de cálcio (CaOCl) a 0,5%, para remoção de possíveis esporos de fungos presentes no tegumento das sementes, sendo em seguida lavadas exaustivamente em água corrente para remoção do CaOCl. Após esse tratamento as sementes foram imersas em água destilada, por um período de 2-3 horas, até que atingissem, aproximadamente, o dobro do tamanho inicial. Esse tratamento visava possibilitar uma germinação mais uniforme.

A germinação das sementes foi feita em papel de filtro, com 20 a 25 sementes por 1/4 de folha embebida com água destilada, na obscuridade à temperatura controlada (25°C), por 3 dias quando as plântulas eram transferidas para um sistema de hidroponia.

2 – SISTEMA DE HIDROPONIA

O sistema de hidroponia utilizado para o desenvolvimento de plantas de *V. unguiculata* nesse trabalho, era constituído por um recipiente revestido com papel preto para evitar a passagem de raios de luz e conseqüente absorção destes pelas raízes, assim como um sistema de bombeamento de ar para evitar a desoxigenação do meio nutritivo. No experimento completo foram utilizados 10 recipientes, sendo 5 para cada cultivar (Vita 3 e Vita 5) correspondendo às condições controle, NaCl 100 mM, NaCl 200 mM, polietileno glicol 6000 (PEG) 200,67 g/L e PEG 276,28 g/L. Cada

recipiente, como é mostrado na Figura 11, comportava entre 50 e 55 plantas.

2.1 – Solução nutritiva

A solução nutritiva utilizada foi a solução “KNOP” contendo micro nutrientes:

Ca (NO ₃) ₂ . 4H ₂ O -----	1,44 g/L
KNO ₃ -----	0,25 g/L
KH ₂ PO ₄ -----	0,25 g/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O -----	0,246 g/L

Micro nutrientes

FeEDTA -----	65,7 mg/L
H ₃ BO ₃ -----	2,86 mg/L
MnCl ₂ . 4H ₂ O -----	2,84 mg/L
Na ₂ O ₄ Mo . 2H ₂ O -----	0,286 mg/L
ZnSO ₄ . 7H ₂ O -----	0,22 mg/L
CuSO ₄ . 5H ₂ O -----	0,079 mg/L
CoSO ₄ . 7H ₂ O -----	0,0476 mg/L

Após a fixação das plântulas de *V. unguiculata* no sistema de hidroponia, os recipientes hidropônicos eram transferidos para uma casa de vegetação com luz artificial nas seguintes condições: foto-período de 14 horas (14 horas-dia e 10 horas-noite); temperatura de 24°C dia / 20°C noite e umidade relativa do ar de 70% dia/noite.

2.2 – Estresse osmótico em plantas de *Vigna unguiculata*

O choque osmótico nas cultivares Vita 3 e Vita 5 foi aplicado após 10 dias de iniciada a germinação (7 dias em hidroponia). As plantas controle tiveram apenas a troca da solução nutritiva antiga por uma nova, enquanto que as demais plantas foram submetidas a estresse salino pela adição de NaCl 100 mM ou a estresse hídrico pela adição de PEG 200,67 g/L à nova solução nutritiva. Os estresses mais severos com NaCl 200 mM e PEG 276,28 g/L foram aplicados somente após 24 horas em metade das plantas já estressadas com NaCl 100 mM e PEG 200,67 g/L, respectivamente. A adição de NaCl ou PEG, estabeleceu um ambiente hidropônico

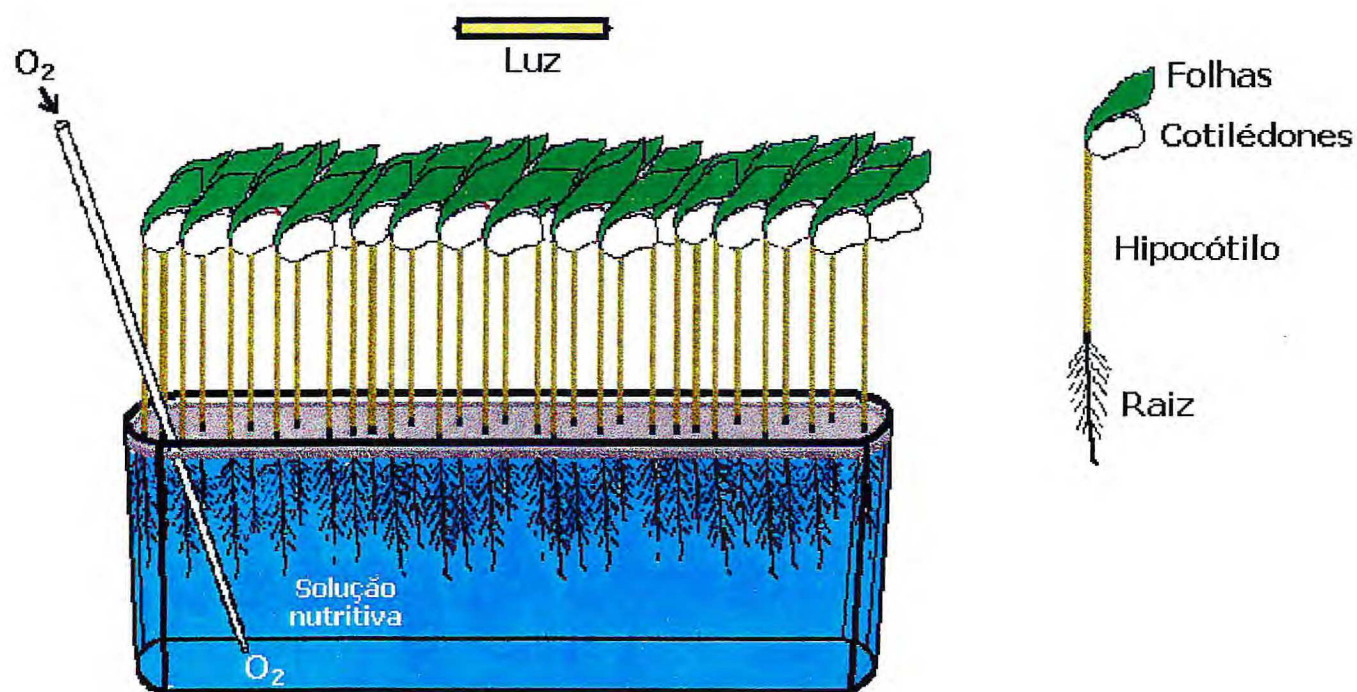


FIGURA 11 – Representação do sistema de hidroponia utilizado para o desenvolvimento de plantas de *Vigna unguiculata*

com diferentes potenciais osmóticos para as raízes das cultivares de *V. unguiculata*. Os estresses foram mantidos por um período de 7 dias (17 dias após a germinação), quando as raízes e ou folhas das plantas eram colhidas para a imediata extração mitocondrial ou congeladas à - 80°C para posterior extração de RNA total e preparação de extrato protéico bruto. Antes da coleta das raízes, estas eram lavadas em água destilada por 90 segundos para a retirada do excesso de sais ou de PEG.

2.2.1 – Potencial Osmótico

O potencial osmótico representa a força exercida pela interação entre a água e as partículas de soluto dissolvidas. Ele está ligado à osmolalidade ou molalidade (quantidade de moléculas de soluto osmoticamente ativas por kg de água) pela equação: $\pi = - i m R T$. Considerando π o potencial osmótico em MPa (mega pascal); $R = 0,00831 \text{ MPa} \cdot \text{kg} / \text{K}$; T temperatura em K ($=293$); m molalidade (mol/kg d'água); i constante de ionização (para o NaCl, $i=2$ considerando 1 mol de sal equivalente a 2 mols de íons osmoticamente ativos, se o sal está totalmente dissolvido).

A medida do potencial osmótico foi realizada com um osmômetro a pressão de vapor (VAPRO 5520, Wescor). O resultado era mostrado diretamente na unidade padrão internacional para a osmolalidade: mmol/kg.

2.2.2- Medida da osmolalidade das soluções nutritivas

Duas soluções nutritivas foram inicialmente preparadas diferindo pela presença de NaCl 100 mM ou 200 mM e a partir destas soluções foram medidas as osmolalidades. O osmômetro de Wescor era calibrado com soluções padrões de 100, 290 e 1000 mmol/kg, sendo a seguir pipetados 10 μL de solução nutritiva salinizada e depositados num disco de papel de filtro na câmara do aparelho, onde a medida se efetuava automaticamente. Para as soluções nutritivas com NaCl 100 mM ou 200 mM foram obtidas as osmolalidades de 211 e 391 mmol/kg, respectivamente. A partir desses valores obtiveram-se as soluções equivalentes em osmolalidades com PEG. Para a solução nutritiva com PEG 200,67 g/L obteve-se uma osmolalidade de 214 mmol/kg enquanto que a solução com PEG 276,28 g/L apresentou uma osmolalidade de 389 mmol/kg.

3 – ESTUDOS BIOQUÍMICOS

3.1 - Extração da Fração Mitocondrial

As mitocôndrias foram isoladas de raízes de "Vita 3" e "Vita 5" em condições controle, de estresse salino (NaCl 100 mM e 200 mM) e de estresse hídrico (PEG 200,67 g/L) pelo método de Cornu *et al.* (1996) modificado. As raízes (60 a 70 g) foram separadas dos hipocótilos e lavadas em água destilada à 4°C por 1 minuto e meio para retirada do excesso de sais e ou PEG, em seguida cortadas com auxílio de uma tesoura, em pequenos pedaços, num gral previamente resfriado contendo meio de extração à 4°C (30 g de raiz/170 mL de tampão de extração) e maceradas com o auxílio de um pistilo durante 7 minutos. O meio de extração continha: Manitol 0,45 M, DTT 5,0 mM, EDTA 5,0 mM, BSA 1% (p/v) em tampão MOPS 30 mM sendo o pH ajustado com KOH 5N para 7,4. O macerado obtido era filtrado em tela de nylon com malha de 150 μ m e o homogenato resultante era então submetido à centrifugação diferencial, conforme o esquema da Figura 12. Todo o processo de obtenção do homogenato foi feito em baixa temperatura e o pH do mesmo, ficou mantido em torno de 7,2.

O processo de centrifugação foi realizado em centrífuga refrigerada Beckman J2-HC, rotor JA-18, à temperatura de 4°C. A primeira centrifugação foi realizada à 1.500 x g por 15 minutos, o precipitado obtido era descartado e o sobrenadante submetido a nova centrifugação a 9.600 x g por 20 minutos. O sobrenadante obtido era descartado e o precipitado, onde se encontrava a fração mitocondrial, era ressuspensão em meio de lavagem contendo Manitol 0,45 M, EDTA 1 mM e BSA 0,5% (p/v) em tampão MOPS 10 mM, com pH ajustado para 7,2. Essa ressuspensão era feita com baixo volume de meio de lavagem, aproximadamente 1 mL, com ajuda de um pincel de cerdas macias, de modo suave para não romper as membranas mitocondriais. Os precipitados ressuspensos eram transferidos para tubos de centrífuga que tinham seus volumes completados com meio de lavagem e submetidos a centrifugação de 1.000 x g por 10 minutos, sendo o precipitado obtido descartado e o sobrenadante centrifugado a 9.600 x g por 15 minutos. O precipitado obtido nessa última centrifugação, continha a fração mitocondrial bruta, que seria então purificada. A purificação da fração mitocondrial era feita em gradiente descontínuo de Percoll (5, 28, 45 e 60%), preparado de acordo com a tabela 1.

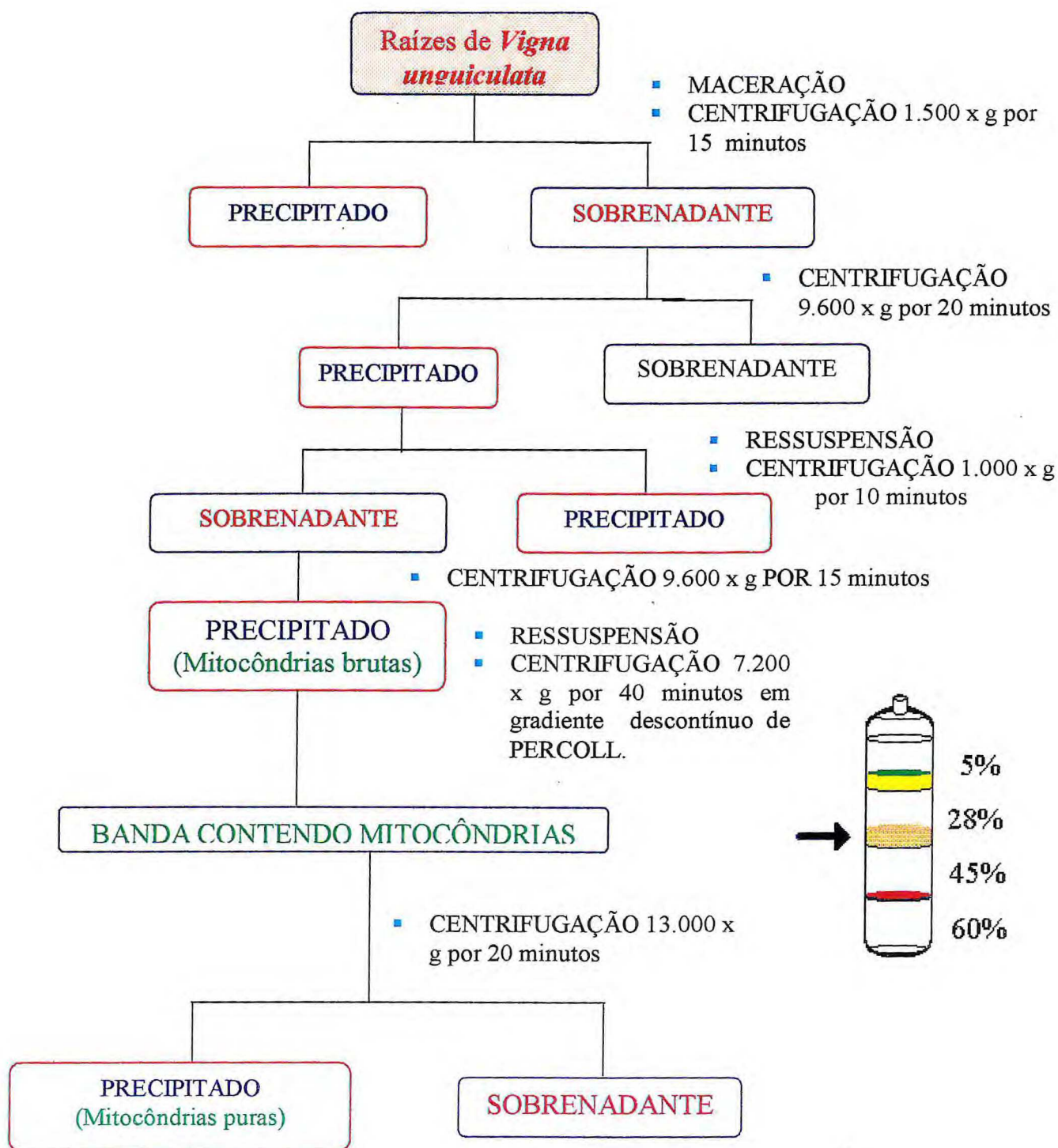


FIGURA 12 – Esquema de extração e purificação de mitocôndrias de raízes de *Vigna unguiculata*

Solução (2X):

Manitol ----- 0,9 M

MOPS pH 6,85 ----- 40 mM

BSA ----- 0,2% (p/v)

Tabela 1 - Preparação do gradiente descontínuo de Percoll

	5%	28%	45%	60%
Solução 2X	3 mL	3 mL	3 mL	1,8mL + 73,8mg de manitol
Percoll	0,3 mL	1,68 mL	2,70 mL	2,70 mL
H ₂ O	2,70 mL	1,32 mL	0,30 mL	-
PVP-25	60 mg	60 mg	60 mg	45 mg
Volume final	6 mL	6 mL	6 mL	4,5 mL

Obs. Ao final, os pHs das soluções gradiente eram ajustados para 7,2.

O gradiente era montado num único tubo de centrífuga adicionando-se as soluções de Percoll na ordem decrescente de concentração (60, 45, 28 e 5%) utilizando para tal uma bomba peristáltica. Em seguida, adicionava-se cuidadosamente ao tubo de gradiente aproximadamente 1,0 mL da fração mitocondrial bruta (ressuspensa com meio de lavagem) e centrifugava-se a 7.200 x g durante 40 minutos em rotor JA-18, resultando numa separação como esquematizado na Figura 12. A fração mitocondrial era removida com auxílio de uma pipeta, diluída 10 vezes em meio de lavagem e recentrifugada a 13.000 x g usando o mesmo rotor por 20 minutos. Após essa centrifugação o sobrenadante era descartado e as mitocôndrias purificadas eram ressuspensas em 5 gotas de meio de lavagem. Parte das mitocôndrias eram separadas para averiguar a qualidade da preparação (teste de integridade da membrana externa), e o restante era guardado a - 20°C para análises de Western blotting.

3.1.1 - Determinação da Proteína Mitocondrial

A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Amostras mitocondriais (5 µL) eram inicialmente diluídas em tubos eppendorf contendo 245 µL de H₂O destilada (dilução de 50x). Em seguida, eram pipetados

50 μ L dessa solução num outro tubo que continha 750 μ L de água destilada, sendo o tubo homogeneizado e a ele adicionado 200 μ L de Reativo de Bradford (diluição final de 1.000 x). As amostras eram novamente homogeneizadas e lidas contra um padrão branco em espectrofotômetro a 595 nm após um intervalo de 5 minutos. A concentração de proteína era determinada em relação a uma curva padrão de BSA.

Em média, partindo-se de 60 g de raízes eram obtidas de 1,5 a 3 mg de proteína mitocondrial. Como as amostras mitocondriais haviam sido ressuspensas em meio de lavagem contendo 0,5% de BSA, para se chegar ao valor real de proteína mitocondrial subtraía-se a proteína obtida num dado volume de amostra mitocondrial da proteína obtida no mesmo volume de meio de lavagem.

3.1.2 - Avaliação da Integridade da Membrana Mitocondrial Externa

A integridade da membrana mitocondrial externa foi avaliada comparando-se a cinética de oxidação do citocromo C reduzido, em ausência e presença de triton X-100 medida a 550 nm em espectrofotômetro. O princípio dessa avaliação baseia-se em que a molécula do citocromo C, reduzida com ditionite de sódio, é oxidada pela cadeia transportadora de elétrons (CTE) por ocasião da ruptura da membrana mitocondrial externa, que por sua vez é impermeável ao citocromo C. À medida que o citocromo C vai sendo oxidado pela CTE, vai havendo uma mudança na coloração de vermelho para laranja no tubo de reação que é detectada pelo decaimento de absorbância a 550 nm. O estímulo da velocidade de oxidação do citocromo C reduzido é função do grau de ruptura da membrana externa, sendo a máxima velocidade de oxidação obtida em presença de triton X-100 0,04% (Neuburger *et al.*, 1982).

Ensaio controle (ausência de triton X-100): 5 μ L de mitocôndrias purificadas eram adicionadas em 1 mL de uma solução de reação contendo: manitol 0,45 M, tampão fosfato 5 mM (pH 7,2), citocromo C 0,6 mg/mL e ditionite de sódio suficiente para reduzir o citocromo C. Após a adição de mitocôndrias, a oxidação do citocromo C era imediatamente medida a 550 nm durante 1 minuto.

O ensaio de ruptura membranar era feito em modo e condições semelhantes às anteriores, mas acrescentando previamente triton X-100 0,04% na solução de reação.

Os valores de integridade obtidos com mitocôndrias de "Vita 3" e "Vita 5" em

condições controle e de estresse hídrico/salino variaram de 75 a 92%.

3.2 – Preparação do Extrato Protéico Bruto

A preparação de extrato protéico bruto foi feita de acordo com Millenaar *et al.* (2000).

Aproximadamente 200 mg de raízes das cultivares Vita 3 e Vita 5 em condições controle, estresse salino (NaCl 100 mM e 200 mM) e estresse hídrico (PEG 200,67 g/L) eram macerados em nitrogênio líquido durante 2 minutos usando gral e pistilo previamente resfriados. Em seguida, eram adicionados 800 µL de tampão de extração [Tris-HCl (pH 6,8) 62,5 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (p/v)] e meia espátula de areia fina esterilizada. A amostra era macerada até que uma mistura pastosa formada se tornasse líquida. O macerado resultante era então centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente e o extrato protéico bruto era obtido a partir do sobrenadante.

3.3 - Eletroforese em Sistema SDS-PAGE

3.3.1 – Preparação das Amostras

As eletroforeses em SDS-PAGE eram feitas a partir de mitocôndrias purificadas e ou de extrato protéico bruto.

3.3.1.1 – Amostras Mitocondriais

Mitocôndrias ressuspensas em meio de lavagem com BSA, guardadas a -20°C eram descongeladas, diluídas 1:10 (v/v) em meio de lavagem sem BSA (100 µL de mitocôndrias/1 mL de meio de lavagem), homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Essa lavagem era repetida mais uma vez para a retirada do BSA e o precipitado final era dissolvido num volume de meio de lavagem (sem BSA) para atingir uma concentração média de 2 µg/µL. A proteína mitocondrial era novamente determinada pelo método de Bradford (1976).

Amostras de 5 µg de proteína mitocondrial eram então solubilizadas num volume final de 50 µL de tampão amostra contendo: Tris-HCl (pH 6,8) 0,1 M, SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,01%. Em seguida, as amostras eram aquecidas a 100°C durante 5 minutos, levemente centrifugadas e depositadas no gel para eletroforese.

3.3.1.2 – Amostras de Extrato Protéico Bruto

As amostras eram descongeladas e 50 μ L eram pipetados num tubo eppendorf, aquecidas à 100°C por 5 minutos, levemente centrifugadas e depositadas no gel para eletroforese.

3.3.2 - Preparação dos Géis de Poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida foram preparados de acordo com o método de Laemmli (1970) em presença de SDS, conforme protocolo a seguir:

a) Main gel (10%):

Água destilada -----	7,3 mL
Tris - HCl 1,0 M, pH 8,8 -----	7,5 mL
SDS 20 % (p/v) -----	100 μ L
bis-acrilamida 40 % -----	5,0 mL
Persulfato de Amônia 100mg/mL -----	64 μ L
TEMED -----	10 μ L

b) Stacking gel (4,5%)

Água destilada -----	7,46 mL
Tris - HCl 1,0 M, pH 6,8 -----	1,25 mL
SDS 20 % (p/v) -----	50 μ L
bis-acrilamida 40% -----	1,12 mL
Persulfato de Amônia 100mg/mL -----	100 μ L
TEMED -----	20 μ L

Este protocolo permitia a confecção de 2 géis com as seguintes dimensões: largura 8,5 cm, altura 6,5 cm e espessura de 2 mm.

3.3.3 - Condições de corrida das eletroforeses

As proteínas mitocondriais e ou extrato protéico bruto foram aplicadas nos géis de poliacrilamida e submetidas às mesmas condições de eletroforese: Tampão de migração contendo Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%; corrente de 40 mA (para 2 géis); tensão de 75 V e tempo de aproximadamente 2 horas. Nos géis era também aplicado marcador de peso molecular, "Low Range Prestained SDS-PAGE

Standards" (BIO-RAD), variando de 22 a 116 kDa.

3.3.4 – Coloração de géis SDS-PAGE

A coloração de géis SDS-PAGE foi feita usando o EZBlue™ Gel Staining Reagent (G 1041, Sigma) que é baseado no Coomassie Brilliant Blue G-250.

Os géis foram lavados 3 vezes por 5 minutos com excesso de água desionizada para a remoção do SDS, em seguida foram adicionados aproximadamente 20 mL (por gel) do reagente de coloração submetendo-se a agitação durante, pelo menos, 1 hora. Após o aparecimento das bandas protéicas, essa solução era descartada e o gel lavado com água destilada por 2 horas. Uma vez que os géis haviam sido corados, os mesmos eram secos em folhas de celofane.

3.4 - Western Blotting

O Western blotting consistiu na transferência de proteínas de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose. O esquema de montagem do sanduíche de transferência é mostrado na Figura 13. As proteínas das mitocôndrias ou do extrato protéico bruto foram transferidas de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose, marca SIGMA, com poros de 0,2 μm através do "Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell" de eletrotransferência horizontal, marca Bio-RAD. Esse aparelho faz a transferência de proteínas em condição semi-seca, onde os papéis Whatman, o gel e a membrana eram colocados em placas de Petri, embebidos por 30 minutos em tampão de transferência contendo glicina 39 mM, SDS 0,0375% (m/v), metanol 20% (v/v) e TRIS 48 mM pH 9,0, para, em seguida, montar-se o sanduíche de transferência tendo o cuidado de adicionar tampão de transferência no momento da sobreposição de cada camada. A amperagem de transferência era calculada de acordo com a área do gel, onde para cada cm^2 utilizava-se 5 mA (em média 180 mA por gel), enquanto que a voltagem era mantida constante em 25 V. Nessas condições o tempo de transferência era de 30 minutos.

Após a transferência, desmontava-se o sanduíche e deixava a membrana secar sobre um papel Whatman por 2 minutos, em seguida, para verificar a qualidade da transferência, corava-se a membrana com uma solução de "Rouge Ponceau" a 0,5% (p/v) (0,5 g do corante de Ponceau, 1,0 mL de ácido acético glacial e água destilada q.s.p. 100 mL) durante 2 minutos, recuperava-se o corante e

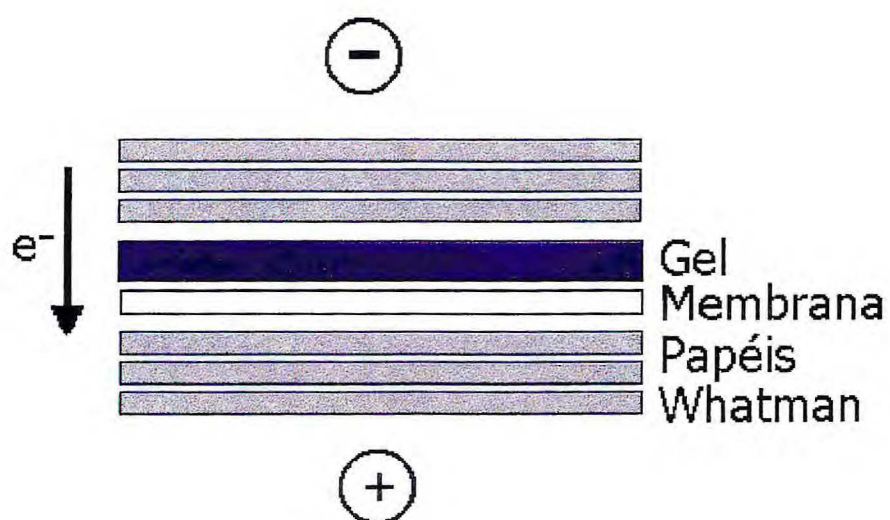


FIGURA 13 – Sistema de transferência de proteínas de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose

lavava-se a membrana com água destilada até a remoção do excesso de corante, quando então era visualizada a presença de proteínas. A membrana era lavada 2 vezes (5 minutos) com PBST 1x para ser bloqueada durante a noite e hibridizada no dia seguinte.

O tampão PBST 10X era constituído por:

NaCl 1,38 M -----	40,5 g
KCl 27,1 mM -----	1,01 g
Na ₂ HPO ₄ (anidrido) 98,9 mM -----	7,02 g
KH ₂ PO ₄ (anidrido) 21,5 mM -----	1,46 g
Tween-20 (1%) -----	5 mL
H ₂ O destilada q.s.p. -----	500 mL

3.4.1 – Bloqueio e Hibridização de Membranas

O bloqueio e a hibridização de membranas teve algumas diferenças entre as amostras mitocondriais e extrato protéico bruto.

3.4.1.1 - Amostras Mitocondriais

O bloqueio das membranas com as amostras mitocondriais foi feito em placa de Petri contendo 30 mL de solução de bloqueio (PBST 1x, leite desnatado 5%) e deixada sob agitação durante a noite para o bloqueio dos sítios ativos livres dessas membranas.

No dia seguinte a solução de bloqueio era descartada e a membrana lavada 2 vezes com PBST 1x durante 5 minutos cada. A seguir, a membrana era hibridizada com anticorpo monoclonal PM 043 isotipo G1, fornecido pela GT Monoclonal Antibodies (Lincoln, USA) específico para AOX desenvolvido em camundongo, dirigido contra AOX de *S. guttatum*, (denominado anticorpo primário) numa diluição de 1/500 em 30 mL de solução A (PBST 1x e BSA 1%). Após 1 hora de hibridização, esse anticorpo primário era recuperado e a membrana lavada 2 vezes com PBST 1x durante 5 minutos. Em seguida, a membrana era novamente hibridizada, agora com um anticorpo conjugado a uma peroxidase HRT (anticorpo secundário) desenvolvido em ovelha contra imunoglobulina de camundongo (fornecido pela Bio-Rad), diluído 1/5.000 em solução A. Após hibridização de 1 hora, o anticorpo secundário era

descartado e a membrana era lavada 5 vezes com PBST 1x (primeira lavagem era de 15 minutos e as 4 lavagens seguintes eram de 5 minutos cada) antes da revelação.

3.4.1.2- Amostras de Extrato Protéico Bruto

O bloqueio dos sítios ativos de membrana foi feito de maneira semelhante ao descrito para as amostras mitocondriais, diferindo apenas na solução de bloqueio que era composta de PBST 1x e BSA 3%.

A hibridização de membrana também foi semelhante, tendo como diferenças: a diluição do anticorpo primário que foi de 1/100; as lavagens de membrana entre as hibridações com anticorpo primário e o secundário (foram 5 lavagens, sendo a primeira de 15 minutos e as restantes de 5 minutos); e a diluição do anticorpo secundário que foi de 1/12.500.

3.4.2 - Revelação do Western Blotting

As membranas foram reveladas por quimioluminescência.

Após a última lavagem, as membranas eram ligeiramente secas em papel whatman, colocadas sobre uma nova placa de Petri e incubadas por 1 minuto numa solução de luminol (125 μ L de solução de luminol/cm² de membrana) que continha os reagentes "enhanced luminol" e "oxidazing" (na proporção 1:1) fornecidos pela NEN life science. A seguir, as membranas eram enxutas suavemente em papel toalha, enroladas em "filmito de polietileno" e levadas a uma sala de revelação fotográfica, onde a membrana era colocada dentro de um "cassete" para, em seguida, ser sobreposta por um filme de raio-X. O cassete era fechado deixando-se a membrana em contato com o filme por até 5 minutos, quando então o mesmo era recuperado e imerso numa solução reveladora por 5 minutos, lavado em água destilada e fixado numa solução fixadora por mais 5 minutos.

4 – ESTUDOS MOLECULARES

4.1 – “Screening” de uma Biblioteca de cDNA de *Vigna unguiculata*

Clones de cDNAs da AOX de *V. unguiculata* foram isolados de uma biblioteca de cDNA λ ZIPLOX (Gibco-BRL) construída a partir de RNAs de cauda poli (A)⁺ de folhas de *V. unguiculata*, cultivar EPACE 1, submetido a condições de estresse hídrico moderado (El Maarouf *et al.*, 1999).

As etapas de isolamento dos clones de cDNA da AOX compreenderam a realização de 3 “screenings”, nos quais foi necessária a utilização de uma sonda homóloga da AOX marcada radioativamente para detecção dos mesmos. A Figura 14 mostra esquematicamente as etapas de um “screening”.

4.1.1 - 1º “Screening”

Para a realização do 1º Screening, antes de tudo foi necessária a preparação, purificação e marcação radioativa de uma sonda homóloga (cDNA) da AOX de *V. unguiculata*.

4.1.1.1 – Obtenção de cDNA da AOX por RT- PCR

Um fragmento de cDNA da AOX foi obtido da reação da AMV transcriptase reversa a partir de RNA total de *V. unguiculata* e do oligonucleotídeo degenerado (primer aox6) como iniciador. Posteriormente o produto de transcrição reversa (RT) foi amplificado por PCR (reação em cadeia da DNA polimerase I) usando os primers aox1 e aox6 que foram deduzidos de zonas conservadas da AOX de *Arabidopsis* e *S. guttatum* segundo Cruz Hernandez and Gómez-Lim (1995).

5'- TGGACCTGCTTCAGGCCATGGGAGACGTA-3' primer aox1 (senso)

5'- TGRTT8ACRTC8CKRTGRTG8GCYTCRTC8GC-3' Primer aox6 (anti-senso)

A reação de transcrição reversa foi feita de acordo com a tabela 2:

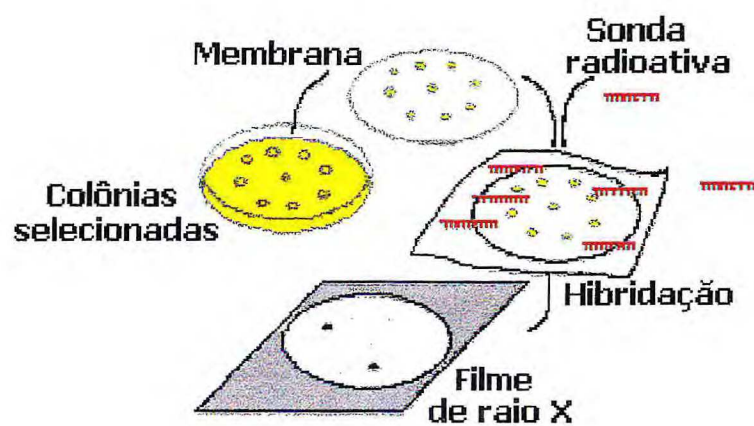


FIGURA 14 – Etapas de “screening” de uma biblioteca de cDNA utilizando uma sonda radioativa

Tabela 2 – Mistura da reação de transcrição reversa (RT)

RNA total de folhas de <i>Vigna unguiculata</i> 1 µg/µL (7 dias de estresse com NaCl 200 mM)	1 µL
Primer 6 - 10 p mols/µL	0,5 µL
H ₂ O esterilizada	5 µL
Aquecimento à 70°C durante 10 minutos seguido de resfriamento à 4°C	
d NTPs (5 mM de cada)	5 µL
Tampão 10x da RT AMV	2,5 µL
RNAsina (inibidor de RNase) 40 U/µL	0,6 µL
H ₂ O esterilizada	10,15 µL
Transcriptase reversa AMV (F – 570S Finnzymes) – 20 U/µL	0,25 µL

Três tubos de reação foram incubados à 42°C durante 40 minutos, aquecidos à 95°C por 5 minutos e rapidamente resfriados à 4°C. Posteriormente, o produto de RT foi amplificado por PCR como mostrado na tabela 3.

Tabela 3 – Mistura da reação de PCR

Produto de RT	10 µL
H ₂ O esterilizada	11 µL
Ebulição (100°C) durante 5 minutos e rapidamente resfriado à 4°C	
Primer 1 (10 pmols/µL)	0,5 µL
Primer 6 (10 pmols/µL)	0,5 µL
Tampão da Taq polimerase 10x	2,5 µL
Red- Taq polimerase 1 U/µL	0,5 µL

Programa de PCR para amplificação do produto de RT

35 ciclos 92°C ---- 1minuto
 50°C ---- 2 minutos
 72°C ---- 2 minutos

Extensão 72°C --- 10minutos
 Armazenagem 4°C --- α (infinito)

4.1.1.2 – Eletroforese do fragmento de cDNA Amplificado

Os Produtos de PCR (6 tubos de 25 µL) foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% (agarose 1,5% em TBE 1x) e TBE 1x como tampão de corrida utilizando uma cuba de eletroforese GNA 100 (Pharmacia Biotech). Em cada tubo de PCR foram adicionados 5 µL de azul de bromofenol [azul de bromofenol 0,4% (m/v) e glicerol 50%] e em seguida os produtos de RT foram aplicados em 6 poços do gel de agarose, sendo um sétimo poço preenchido com 200

ng do marcador 100 pb (pares de base) DNA ladder. A eletroforese foi realizada nas condições de 90 V, 25 mA, durante 1 hora e 30 minutos. Após a eletroforese, o gel era imerso numa solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL durante 20 minutos e em seguida lavado em água destilada durante 15 minutos quando então era visualizado num transluminador.

4.1.1.3 – Purificação do Fragmento de cDNA da AOX

O fragmento de cDNA amplificado foi extraído do gel de agarose 1,5% com o "QiAquick Gel extraction kit" (Quiagen, Alemanha).

Bandas do gel contendo o fragmento de cDNA de aproximadamente 620 pb foram cortadas com a ajuda de um bisturi estéril e pesadas em dois tubos "eppendorfs", obtendo-se aproximadamente 360 mg de gel em cada tubo. Foram adicionados 3 volumes de tampão QG para um volume de gel (100 mg de gel correspondia a aproximadamente 100 µL de tampão QG). A mistura foi então incubada à 50°C, durante 10 minutos, invertendo-se os tubos em intervalos de 2 ou 3 minutos. Uma vez dissolvido o gel, a coloração esperada da mistura era amarela. Em seguida, a amostra foi aplicada em uma coluna de "QiAquick", a qual era centrifugada durante 1 minuto à 10.000 x g. Descartou-se o eluato e lavou-se a coluna com 0,75 mL de tampão PE, centrifugando-se durante 1 minuto a alta velocidade. Mais uma vez, o eluato foi descartado e a coluna recentrifugada por 1 minuto à 10.000 x g para eliminar restos de etanol. Em seguida, o fragmento de cDNA foi eluído por centrifugação, após 1 minuto, em velocidade máxima, com 50 µL de água. A amostra de cDNA foi então precipitada com acetato de sódio 0,3 M e 2,5 volumes de etanol durante 2 horas à -20°C. Finalmente a amostra foi centrifugada a 22.000 x g (centrifuga eppendorf) durante 15 minutos e o precipitado, invisível a olho nu, foi ressuspenso em 10 µL de H₂O esterilizada. A qualidade e a quantidade de cDNA purificado foram estimadas através de eletroforese em gel de agarose 1,5%. A concentração de cDNA foi estimada em 20 ng/µL através da comparação da intensidade da banda do cDNA com as intensidades das bandas do marcador (100 bp DNA ladder) reveladas pela emissão de fluorescência do brometo de etídio ao ser irradiado por raios UV.

4.1.1.4 – Obtenção da sonda marcada com ^{32}P

O fragmento de cDNA da AOX de *V. unguiculata* purificado foi marcado com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ utilizando o kit "PRIME AGENE".

O tubo de reação (tabela 4) foi incubado à 37°C durante 1 hora e posteriormente a sonda marcada foi purificada em coluna de sephadex G-50 DNA grade (Pharmacia Biotech).

Tabela 4 – Mistura da reação de marcação do cDNA da AOX

Fragmento de cDNA (20 ng/ μL)	4 μL
H ₂ O esterilizada	58 μL
Ebulição (100°C) durante 5 minutos, seguido de resfriamento à 4°C	
Tampão da DNA polimerase 5x	20 μL
DNTPs (5 mM de cada, menos dCTP)	4 μL
BSA	4 μL
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (80 μCi)	8 μL
DNA polimerase I (2,5 U/ μL)	2 μL

O volume de reação (100 μL) foi adicionado a 5 mL de TE e eluído em coluna de sephadex. O eluato foi recolhido em diferentes tubos eppendorf e o tubo de eluição contendo 900 μL da sonda marcada foi identificado através de um detector de radiação.

4.1.1.5 – Hibridação de membranas

A biblioteca de cDNA de *V. unguiculata* contendo aproximadamente 500.000 clones de bacteriófagos (λZIPLOX) proliferados de *Escherichia coli* Y1090 (ZL) em meio sólido de cultura LB Agar (Agar Luria-Bertani) era formada por 10 placas de Petri com diâmetro de 15 cm (15 x 150 mm).

Membranas de nitrocelulose (hibond) foram cortadas em círculos similares à área de superfície das placas de Petri e numeradas de 1 a 10. Para cada placa de Petri foram cortadas 2 membranas objetivando evitar a coleta de clones falso-positivos. Assim, para a placa de Petri nº 1, havia as membranas 1A e 1B.

Inicialmente, as membranas foram marcadas com grafite, colocadas em

contato com o LB Agar de suas respectivas placas de Petri durante 2 minutos. Enquanto isso, a superfície inferior externa das placas era também marcada de acordo com marcas de grafite feitas nas respectivas membranas. Esse procedimento possibilitava a orientação e detecção dos clones positivos no meio de cultura após a revelação dos filmes radiográficos. Em seguida, as membranas eram pinçadas do LB Agar, imersas numa solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) por 2 minutos, transferidas para uma solução de neutralização [NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5)], deixadas por 5 minutos e lavadas em SSC 2x também por 5 minutos. As membranas eram então colocadas para secar sobre papel Whatman durante 2 horas com a face de clones transferidos voltada para cima. Em seguida, esses clones eram fixados através da exposição das membranas aos raios UV por um tempo de 2 minutos.

As membranas foram enroladas em telas de nylon, colocadas em 4 tubos de acrílico (5 membranas por tubo) com cada tubo contendo 30 mL de tampão de hibridação 2x. As membranas foram então pré-hibridizadas à 42°C durante 4 horas num forno de hibridação (Techne Hybridization incubator). Passado esse tempo, a sonda marcada foi aquecida à 100°C por 10 minutos e rapidamente resfriada em gelo por 5 minutos. O tampão de pré-hibridação foi diluído 1:1 com água esterilizada à 42°C, 225 µL da sonda marcada foram adicionados a cada tubo e as membranas foram hibridizadas à 42°C durante a noite.

Tampão de hibridação 1x

Formamida -----	50%
SSC-----	5x
Solução de Denhardt's -----	5X
(PVP 0,1%, ficoll 0,1%, BSA 0,1%)	
Fosfato de sódio (pH 6,8)-----	50 mM
SDS (p/v) -----	1%
DNA de esperma de salmão -----	100 µg/mL

O tempo de hibridação foi de 16 horas. No dia seguinte, a sonda diluída no tampão de hibridação foi recuperada e as membranas foram lavadas com diferentes concentrações de SSPE (NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ . H₂O 10 mM (pH 7,4), EDTA 1,25

mM) na seguinte ordem:

1ª lavagem – 50 mL de SSPE 1x durante 20 minutos à 42°C;

2ª lavagem - 50 mL de SSPE 0,5x durante 35 minutos à 42°C

3ª lavagem – 50 mL de SSPE 0,2x por 45 minutos à 42°C

4ª lavagem – 50 mL de SSPE 0,2x por 20 minutos à 42°C

Após as lavagens, as membranas foram desenroladas da tela de nylon, plastificadas em 4 grupos de membranas (5 membranas/grupo) e marcadas com pontos radioativos para a identificação da orientação do filme de raio-X após a revelação. Numa sala fotográfica, cada grupo de membranas com a face radioativa voltada para cima foi então posicionado dentro de um "cassette" sendo a seguir sobreposto um filme de raio-X. Os "cassetes" foram fechados e armazenados à - 80°C durante 48 horas.

4.1.1.6 – Revelação e coleta de clones positivos da AOX

Os "cassetes" foram retirados do freezer à - 80°C e levados para uma sala fotográfica. Os filmes foram recuperados, imersos numa solução reveladora por 5 minutos, lavados em água e fixados por 5 minutos numa solução fixadora.

Após a revelação, os filmes foram cortados de acordo com a imagem circular pressionada das membranas e das marcas dos pontos radioativos feitos antes da exposição. Em seguida, cada placa de Petri da biblioteca de cDNA foi sobreposta ao par de filmes de raio-X correspondente (por exemplo, os filmes 1A e 1B eram relativos a placa 1) e a posição dos clones positivos no LB Agar foi marcada na placa de Petri para realizar a coleta. A coleta foi feita numa câmara de fluxo laminar com o auxílio de uma ponteira esterilizada de pipeta automática (P-200), utilizando-se a extremidade de encaixe para remoção do LB Agar contendo o clone positivo. O LB Agar foi então adicionado a um tubo eppendorf previamente etiquetado com as informações do referido clone e contendo 250 µL de tampão SM (NaCl 100 mM, MgSO₄ . 7H₂O 10 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), gelatina 0,01% p/v). Ao final foi adicionada 1 gota de clorofórmio em cada tubo.

4.1.2 – Preparação de clones positivos para o 2º e 3º "Screenings"

Uma vez obtidos os clones de λZIPLOX positivos no 1º "screening" foi necessária a realização de dois "screenings" complementares até o isolamento

completo desses clones. Para isso, os clones coletados de λ ZIPLOX deveriam ser proliferados em placas de Petri com LB Agar de forma que fosse possível obter zonas de lise bem isoladas. Dessa forma, para a realização desses "screenings" era previamente indispensável: preparar meios de cultura, fazer cultura de bactérias *E. coli* Y1090 (ZL) e DH10B (ZIP), determinar a diluição adequada para cada clone de λ ZIPLOX positivo, preparar placas de Petri (LB Agar) dos clones de λ ZIPLOX com a diluição adequada e enfim, realizar os "screenings".

4.1.2.1 – Preparação de Meios de cultura

Os meios de cultura necessários à realização dos experimentos foram preparados com MgSO_4 10 mM para favorecer o desenvolvimento de fagos λ ZIPLOX.

TOP Agarose 0,6%

Bacto-triptona -----	2 g
Extrato de levedura -----	1 g
NaCl -----	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,52 g
<i>H₂O destilada suficiente</i>	
<i>para a dissolução</i>	
NaOH 2,5N -----	0,2 mL
Agarose -----	1,2 g
H ₂ O destilada q.s.p. -----	200 mL

LB Líquido MgSO_4

Bacto-triptona -----	2 g
Extrato de levedura -----	1 g
NaCl -----	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,52 g
<i>H₂O destilada suficiente</i>	
<i>para a dissolução</i>	
NaOH 2,5N -----	0,2 mL
H ₂ O destilada q.s.p. -----	200 mL

LB Agar MgSO₄

Bacto-triptona-----	10 g
Extrato de levedura -----	5 g
NaCl -----	2,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O -----	2,6 g
<i>H₂O destilada suficiente</i>	
<i>para a dissolução</i>	
NaOH 2,5N -----	0,1 mL
Bacto-Agar -----	15 g
H ₂ O destilada q.s.p.-----	1000 mL

O top agarose foi aquecido até a dissolução, dividido em alíquotas de 3,7 mL e adicionados em tubos de ensaio com tampa, enquanto que o LB líquido foi dividido em alíquotas de 20 mL em erlenmeyers fechados com tampas feitas de "gaze", algodão e recobertas com papel alumínio. Os meios foram esterilizados por autoclavagem (121°C por 20 minutos a 15 lb/pol²).

4.1.2.2 – Preparação de placas de LB Agar MgSO₄

Após autoclavagem, uma parte do LB Agar foi deixado resfriar num banho maria à 60°C para ser adicionado antibiótico, enquanto que a outra parte foi utilizada diretamente para preparar placas sem antibiótico. Uma vez que o LB Agar atingiu 60°C adicionou-se canamicina ou tetraciclina numa concentração final de 12 µg/mL, homogeneizou-se e numa câmara de fluxo de laminar verteu-se cerca de 20 mL do meio em cada placa de Petri estéril (10 x 95 mm), deixando-se solidificar a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. As placas foram posteriormente armazenadas numa câmara fria à 4°C.

4.1.2.3 – Cultura de bactérias de *Escherichia coli* Y1090 (ZL) e DH10B (ZIP)

As linhagens de *E. coli*, Y 1090 (ZL) ou DH10B (ZIP) foram cultivadas em placas de LB Agar contendo o antibiótico específico, tetraciclina ou canamicina, respectivamente. Bactérias conservadas em glicerol à - 80°C foram descongeladas e semeadas em LB Agar MgSO₄ antibiótico específico. Próximo a uma chama, utilizando-se uma pipeta Pasteur com a ponta fechada por flambagem, traçou-se

rápida e levemente, diversas estrias sobre a superfície de gelatina como mostrado na Figura 15A. Em seguida, as placas foram colocadas numa estufa à 37°C e deixadas por uma noite. No dia seguinte, com o crescimento bacteriano, foi possível visualizar colônias completamente isoladas (Figura 15B). As placas eram então guardadas à 4°C ou colônias isoladas eram utilizadas diretamente para preparação de cultura em LB líquido. Nesse caso, trabalhando próxima de uma chama, uma colônia bem isolada era coletada com um toque de uma ponteira de pipeta automática (P-200) estéril, sendo adicionada num erlenmeyer contendo 20 mL de LB líquido, antibiótico específico [tetraciclina 12 µg/mL para bactérias *E. coli* Y1090 (ZL); canamicina 12 µg/mL para bactérias *E. coli* DH10B (ZIP)] e maltose 0,2% quando se tratava de cultura de *E. coli* Y1090 (ZL). Em seguida, os erlenmeyers eram incubados à 37°C sob agitação de 140 rpm num "Orbital incubator SI 50" (marca Stuart scientific) durante uma noite. No dia seguinte a cultura líquida de bactérias *E. coli* DH10B (ZIP) era guardada à 4 °C para posterior utilização nos experimentos de excisão, enquanto que a cultura de bactérias *E. coli* Y1090 (ZL) era centrifugada à 4.000 × g (20°C), durante 10 minutos e ressuspensa em 2 mL de uma solução contendo MgSO₄ .7H₂O 10 mM obtendo uma solução de bactérias agora 10x concentrada. As bactérias concentradas foram armazenadas à 4°C para serem utilizadas no 2º e 3º "screenings".

4.1.2.4 – Determinação da diluição ótima de clones (λZIPLOX) positivos

A determinação da diluição ótima de fagos (λZIPLOX) positivos, para obter zonas de lise bem isoladas, foi feita testando a incubação de diferentes diluições de fagos com bactérias *E. coli* Y1090(ZL) e posterior cultivo em LB Agar. As diluições ótimas variaram de 10⁻¹ a 10⁻⁴.

4.1.2.5 – Cultura de clones (λZIPLOX) positivos

A cultura de clones positivos consistia em incubar fagos (clones positivos do 1º screening) com bactérias *E. coli* Y1090 (ZL) sendo em seguida semeados em placas de LB Agar e deixados em estufa à 37°C durante uma noite para formação das zonas de lise.

Para a realização desse experimento utilizavam-se 3 banhos maria em diferentes temperaturas (100°C, 48°C e 37°C).

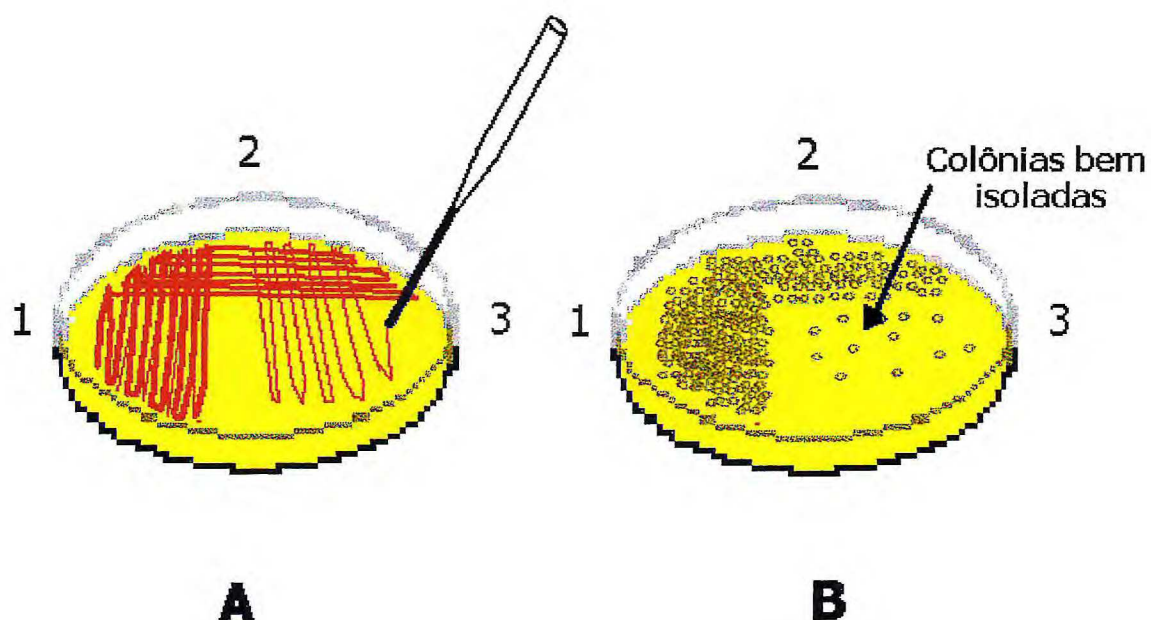


FIGURA 15 – Esquema representativo do cultivo de bactérias em placas de Petri LB Agar pelo método das estrias. Os números 1, 2 e 3 indicam o sentido e a ordem com que foram feitas as estrias. A placa "A" indica o momento em que as bactérias foram semeadas e a placa "B" mostra as colônias formadas após desenvolvimento durante a noite.

Inicialmente, bactérias *E. coli* Y1090 (ZL) 10x concentradas, guardadas à 4°C, eram diluídas 1:10 em solução contendo MgSO₄ 10 mM, enquanto que os fagos dos diferentes clones positivos eram diluídos em tampão SM nas concentrações ótimas previamente determinadas. Em seguida, 5 ou 10 µL da diluição ótima de fagos eram adicionados num tubo de ensaio contendo 200 µL de bactérias *E. coli* Y1090 1x e incubados à 37°C por 30 minutos. Durante esse tempo, aqueciam-se os tubos com top agarose (3,7 mL) à 100°C até dissolução e transferiam-se para um outro banho à 48°C. Após incubação, próximo a uma chama, adicionava-se o top agarose no tubo contendo fagos e bactérias *E. coli* Y1090 (ZL), homogeneizava-se rapidamente e depositava-se sobre uma placa de Petri com LB Agar MgSO₄ tendo o cuidado de espalhar bem. Após fazer esse procedimento para todos os clones, as placas eram então colocadas em estufa à 37°C e cultivadas durante uma noite.

4.1.3 – 2º “Screening”

Tanto o 2º “screening” como o 3º foram realizados de modo semelhante ao 1º, mas com algumas modificações.

4.1.3.1 – Obtenção da sonda marcada com ³²P

O fragmento de cDNA purificado (item 4.1.1.3) da AOX de *V. unguiculata* foi marcado com [α-³²P]dCTP (Amersham, França) utilizando o kit Nonaprime II (Appligene).

Tabela 5 – Mistura de reação de marcação de sonda com o kit Nonaprime II

Fragmento de cDNA purificado (15ng/µL)	5,5 µL
H ₂ O esterilizada	1,5 µL
Ebulição (100°C) durante 10 minutos seguido de resfriamento à 4°C	
Solução L ₂ (primers aleatórios misturados em Tampão de incubação 5x)	4 µL
L ₃ (dATP)	1 µL
L ₅ (dGTP)	1 µL
L ₆ (dTTP)	1 µL
[α- ³² P]dCTP (80 µCi)	5 µL
L ₇ (DNA polimerase Klenow 2,5 U/µL)	1 µL

O tubo de reação foi incubado à 37°C durante 1 hora e posteriormente a sonda marcada foi purificada em coluna sephadex G-25 DNA grade (Pharmacia Biotech).

O volume do meio de reação (20 µL) foi adicionado a 200 µL de TE, aplicado em coluna de sephadex G-25 (volume 1 mL) e o eluato foi recolhido num tubo 1 (± 200 µL). Em seguida, foram aplicados consecutivamente 200, 400, 200 e 200 µL de TE sendo o eluato recolhido respectivamente nos tubos 2, 3, 4 e 5. O tubo 3 (± 400 µL) continha a sonda marcada e purificada.

4.1.3.2 – Hibridação de membranas

As membranas foram preparadas de maneira semelhante ao já descrito a partir de cultura dos diferentes clones positivos em placas de Petri com LB Agar MgSO_4 .

A pré-hibridação das membranas foi feita num único tubo de acrílico contendo tampão de hibridação 1x (sem formamida e com SDS 0,5% p/v) à 60°C num forno de hibridização (Techne Hybridization incubator) durante 2 horas e 30 minutos. Após a pré-hibridização, a sonda marcada (270 µL) foi desnaturada à 100°C por 10 minutos, rapidamente resfriada em gelo e adicionada ao tubo de hibridação, deixando-se sob agitação em carrossel durante a noite, sempre à 60°C.

A sonda foi recuperada após 16 horas de hibridação e as membranas foram lavadas como é descrito abaixo:

1ª e 2ª lavagens – cada lavagem foi feita com 25 mL de solução contendo SSC 2x, SDS 0,1% durante 20 minutos à temperatura ambiente (alta adstringência);

3ª e 4ª lavagens - cada lavagem foi feita com 25 mL de solução contendo SSC 0,2x, SDS 0,1% durante 20 minutos à 60°C (baixa adstringência);

4.1.3.3 – Revelação e coleta de clones positivos da AOX

Filmes de raio-X foram expostos às membranas radioativas durante 2 horas e 30 minutos à - 80°C e em seguida revelados como já descrito no item 4.1.1.6. Os filmes revelados foram então sobrepostos as suas respectivas placas de cultura, os clones (zonas de lise) positivos foram identificados e 3 ou 4 clones por placa foram coletados num tubo eppendorf contendo 500 µL de tampão SM. Em razão da baixa separação dos clones tornou-se necessária a realização de um terceiro "screening".

4.1.4 – 3º Screening

A partir dos clones λ ZIPLOX positivos coletados no 2º “screening” foi feita uma nova determinação da diluição ótima de fagos, cultura de fagos em LB Agar, hibridização de membranas, revelação e enfim, coleta de clones positivos da AOX completamente isolados. Todos os procedimentos experimentais foram similares aos do 2º screening e ao final, foram coletados de 3 a 4 clones de cada placa de LB Agar, que correspondiam a um dado clone isolado no primeiro screening, sendo em seguida adicionados a eppendorfs previamente etiquetados com 200 μ L de tampão SM.

4.2 – Caracterização de clones de cDNA da AOX

Os clones de cDNAs da AOX foram caracterizados através da análise dos clones positivos λ ZIPLOX isolados do 3º “screening” em diferentes etapas como: PCR dos clones λ ZIPLOX isolados; mini preparação e digestão de DNA bacteriofágico λ ZIPLOX; excisão *in vivo*; mini preparação e digestão de plasmídios pZL1, bem como midi preparação e seqüenciamento de plasmídios pZL1.

4.2.1 – PCR dos clones isolados

Para verificar o tamanho dos insertos nos diferentes clones isolados foi feita uma PCR usando os primers universais M13.

5'- CCCAGTCACGACGACGTTGTAAAACG-3' (M13 Forward)

5'- AGCGGATAACAATTTACACAGG -3' (M13 Reverse)

Tabela 6 – Mistura de reação da PCR

fagos λ ZIPLOX (3 ^o "screening")	5 μ L
d NTPs (5 mM de cada)	1 μ l
H ₂ O esterilizada	15 μ l
Ebulição (100°C) durante 5 minutos e rapidamente resfriado à 4°C	
M 13 F (10 p mols/ μ L)	0,5 μ L
M 13 R (10 p mols/ μ L)	0,5 μ L
Tampão da Taq polimerase 10x	2,5 μ L
Red - Taq polimerase 1 U/ μ L	0,5 μ L

Programa de PCR para amplificação dos insertos

30 ciclos 92°C ---- 1 minuto
 50°C ---- 2 minutos
 72°C ---- 2 minutos

Extensão 72°C --- 10 minutos
 Armazenagem 4°C --- α (infinito)

Após a PCR, o tamanho dos insertos amplificados foi observado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

4.2.2 – Mini preparação de DNA bacteriofágico λ ZIPLOX

Os clones de fagos λ ZIPLOX isolados do 3^o screening foram cultivados em meio líquido NZY e o DNA bacteriofágico foi isolado e purificado através do método de lise alcalina e precipitação por PEG (Sambrook *et al.*, 1989).

O meio de cultura NZY e a solução de PEG 20% foram preparados como abaixo:

Meio NZY		PEG 20%	
NaCl -----	2 g	Polietilenoglicol 6000 -----	60 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O -----	0,8 g	NaCl -----	35,1 g
Extrato de Levedura -----	2 g	Tris 2M (pH = 7,5) -----	1,5 mL
NZ amina -----	4 g	MgSO ₄ . 7H ₂ O -----	7,39 g
H ₂ O destilada q. s. p.	400 mL	H ₂ O destilada q. s. p. -----	300 mL

* PH =7,5 ajustado com NaOH

O meio NZY foi dividido em alíquotas de 20 mL em erlenmeyers fechados com tampas feitas de algodão enrolado em gaze e revestidas de papel alumínio. Os meios foram, em seguida, esterilizados por autoclavagem (121°C por 20 minutos à 15

lb/pol²).

4.2.2.1 – Cultura de fagos λ ZIPLOX

Alíquotas de 80 μ L de fagos (coleta 3^o screening) foram incubadas à 37°C, durante 20 minutos com 50 μ L de bactérias *E. coli* Y1090 (ZL) 2x e posteriormente adicionadas em erlenmeyers contendo 20 mL de meio NZY estéril. Em seguida, os erlenmeyers foram colocados sob agitação de 140 rpm num "Orbital incubator SI 50" (marca Stuart scientific) à 37°C, durante a noite.

No dia seguinte, adicionaram-se 5 gotas de clorofórmio em cada erlenmeyer deixando-se agitar por mais 20 minutos à 37°C. O volume de cada erlenmeyer foi então transferido para um tubo falcon e centrifugado à 8.000 x g por 10 minutos à 4°C. Em seguida, 10 mL do sobrenadante foram recuperados em tubos corex, adicionados 5 μ L de RNase A (10 μ g/ μ L) e 3 μ L de DNase I (5 μ g/ μ L) para a degradação de ácidos nucleicos bacterianos, enquanto que a outra parte do sobrenadante foi guardada à 4°C como um estoque de fagos concentrados. Os tubos corex foram então homogeneizados e incubados à 37°C durante 30 minutos. Logo em seguida, adicionou-se igual volume de PEG 20%, homogeneizou-se e deixou-se à 4°C durante 1 hora para precipitar as partículas de fagos. Os tubos foram centrifugados à 10.000 x g, (rotor JA-18, centrífuga Beckman J2-HC) durante 20 minutos à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de solução λ (tris 10 mM (pH 7,5), MgSO₄ . 7H₂O 10mM). O homogenato foi transferido para tubos eppendorf sendo adicionados 10 μ L de SDS 10% e 10 μ L de EDTA 0,5 M (pH 8,0) para em seguida os tubos serem aquecidos à 68°C durante 15 minutos. O homogenato foi então submetido a 3 extrações em solventes orgânicos sendo 2 extrações em fenol-clorofórmio 1:1 e uma extração em clorofórmio/AIA (24:1). Após as extrações, aproximadamente 500 μ L de fase aquosa foram recuperados em eppendorfs e o DNA bacteriofágico foi deixado precipitar à - 20°C, durante uma noite, após a adição de 50 μ L de acetato de sódio 3 M e 500 μ L de isopropanol. No dia seguinte, a mistura contendo o DNA bacteriofágico foi centrifugada à 18.000 x g durante 15 minutos à 4°C e o DNA foi ressuspenso em 50 μ L de TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

4.2.3 – Digestão de DNA bacteriofágico λ ZIPLOX

O DNA dos diferentes clones λ ZIPLOX foi digerido pelas enzimas de restrição *Bam*H I e *Eco*R I durante 4 horas e à 37°C em tubos eppendorf contendo:

DNA λ ZIPLOX -----	3 μ L
H ₂ O estéril -----	3,5 μ L
Tampão violeta 10x (eurogentec) --	1 μ L
RNAse A 1 μ g/ μ L -----	0,5 μ L
<i>Eco</i> R I 10 U/ μ L (eurogentec) -----	1 μ L
<i>Bam</i> H I 12 U/ μ L (eurogentec) -----	1 μ L

Após a digestão, 2 μ L de azul de bromofenol (azul de bromofenol 0,04%, glicerol 50%) foram adicionados ao volume de reação e as amostras foram submetidas a eletroforese gel de agarose 0,8%.

4.2.4 – Excisão *in vivo* do plasmídio pZL1

A excisão *in vivo* do plasmídio pZL1 foi feita em *E. coli* DH10B (ZIP) e para a cultura dessas bactérias foram preparadas placas de LB Agar (MgCl₂ 10 mM) com ampicilina 100 μ g/mL e meio LB líquido.

LB Agar MgCl ₂		LB líquido	
Bacto-triptona -----	3,5 g	Bacto-triptona -----	1 g
NaCl -----	3,5 g	Extrato de levedura -----	0,5 g
Extrato de levedura -----	1,75 g	NaCl -----	1 g
- H ₂ O destilada suficiente		- H ₂ O destilada suficiente	
Para dissolução		Para dissolução	
- pH = 7 ajustado com NaOH 2,5 N		- pH = 7 ajustado com NaOH 2,5 N	
Bacto-Agar -----	7 g	H ₂ O q.s.p. -----	100 mL
MgCl ₂ 1 M -----	3,5 mL		
H ₂ O q.s.p. -----	350 mL		
#A solução foi autoclavada, deixada resfriar a 60°C, adicionado 700 μ L de ampicilina 50mg/mL e preparado placas com 20 mL de meio.		#O LB líquido foi dividido em alíquotas de 20mL e autoclavado.	

Ensaios de cultura foram feitos em placas de LB Agar (MgCl_2) ampicilina com diferentes diluições de fagos incubados em *E. coli* DH10B (ZIP) objetivando determinar a diluição ótima de fagos de cada clone para obter colônias de *E. coli* DH10B (ZIP) com o plasmídio de excisão, bem isoladas.

4.2.4.1 – Transformação de *E. coli* DH10B

Alíquotas de 5 μL de fagos (coleta 3^o "screening") dos diferentes clones foram diluídas 1:2.000 em tampão SM e 100 μL dessa diluição foram incubados em tubos de ensaio contendo 100 μL de bactérias *E. coli* DH10B 2x, durante 5 minutos e à temperatura ambiente. Posteriormente, próximo a uma chama, adicionava-se 1 μL de Xgal 2% e 4 μL de IPTG 100 mM em cada tubo de ensaio, homogeneizava-se e imediatamente versava-se as misturas de bactérias *E. coli* DH10B infectadas sobre placas de LB Agar (MgCl_2) ampicilina espalhando até a completa difusão. As placas de Petri eram então colocadas em estufa à 37°C durante uma noite para no dia seguinte coletar-se de cada placa uma colônia bem isolada de *E. coli* DH10B transformada com o plasmídio pZL1 através do auxílio de uma ponteira de pipeta automática estéril (P-200). Cada colônia era depositada num tubo falcon contendo 3 mL de LB líquido e ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ sendo em seguida incubadas à 37°C sob agitação de 140 rpm num "Orbital incubator SI 50" (marca Stuart scientific) durante a noite.

4.2.4.2 – Mini preparação de plasmídios pZL1

A mini preparação de plasmídios foi feita segundo Holmes & Quicley (1981).

No dia seguinte, 2 mL da cultura de *E. coli* DH10B (ZIP) transformadas com o plasmídio pZL1, referente a cada clone, foram coletados em eppendorfs (2 mL) e centrifugados à 8.000 x g durante 2 minutos e a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram ressuspensas com 150 μL de tampão STET (NaCl 0,1 M, Tris-HCl (pH 8) 10 mM, EDTA (pH 8) 1 mM e triton X-100 5% v/v) sendo em seguida adicionado 15 μL de lisozima 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e agitado em vortex vigorosamente. Os eppendorfs foram então aquecidos à 100°C durante 1 minuto, resfriados e centrifugados à 18.000 x g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante ($\pm$ 120 μL) foi recuperado em novos tubos eppendorf, sendo adicionado igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 e centrifugado à 8.000 x g por 3

minutos. A fase aquosa foi recuperada e reextraída, agora com mesmo volume de clorofórmio. A fase aquosa foi novamente recuperada em eppendorfs e o plasmídeo pZL1 foi precipitado à -20°C , durante 30 minutos com 150 μL de isopropanol sendo em seguida centrifugado à $18.000 \times g$ durante 15 minutos à 4°C . O precipitado foi deixado secar sobre a bancada e depois ressuspensão em 50 μL de H_2O estéril.

4.2.5 – Digestão de plasmídeo pZL1 por enzimas de restrição

O plasmídeo pZL1 isolado dos diferentes clones foi digerido com diferentes enzimas de restrição durante 2 horas e 30 minutos à 37°C , em eppendorfs contendo:

<u>Digestão I</u>		<u>Digestão II</u>	
DNA plasmídico (mini-prep.) -----	5 μL	DNA plasmídico (mini-prep.)----	1,5 μL
H_2O estéril -----	6 μL	H_2O estéril -----	8,2 μL
Tampão violeta 10x (eurogentec) -	1,5 μL	Tampão nº 2 10x (Gibco) -----	1,2 μL
RNAse A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -----	0,5 μL	RNAse A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -----	0,5 μL
<i>EcoR</i> I 10 u/ μL (eurogentec) -----	1 μL	<i>Hind</i> III 50u/ μL (Gibco) -----	0,3 μL
<i>Bam</i> H I 12 u/ μL (eurogentec) -----	1 μL	<i>Pst</i> I 50 u/ μL (Gibco) -----	0,3 μL

Após a digestão, 2 μL de azul de bromofenol (azul de bromofenol 0,04%, glicerol 50%) foram adicionados ao volume do meio de reação de cada eppendorf e em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.2.6 – Preparação de clones *E. coli* DH10B (pZL1) para Seqüenciamento

Para o seqüenciamento dos clones positivos era necessário obter plasmídios purificados e em quantidade suficiente. Dessa forma, fez-se necessária a realização de uma midi preparação de plasmídios pZL1.

4.2.6.1 – Cultura de bactérias DH10B (pZL1)

A midi preparação de plasmídios pZL1 foi feita a partir de uma cultura de *E. coli* DH10B (pZL1) em meio líquido Terrific Broth.

Terrific Broth

Bacto-triptona -----	3,6 g
Extrato de levedura -----	7,2 g
Glicerol -----	1,2 mL
H ₂ O deionizada q.s.p. -----	270 mL
- O volume foi separado em 6 alíquotas de 45 mL	
- Autoclavagem	
Adição de tampão fosfato (KH ₂ PO ₄ 0,17 M, K ₂ HPO ₄ 0,72 M) autoclavado -----	
	5 mL

A mesma colônia de *E. coli* DH10B (pZL1) utilizada para a mini preparação de plasmídios foi tocada com uma ponteira P-200 (amarela) e em seguida depositada num erlenmeyer contendo 50 mL de meio Terrific Broth e ampicilina 100 µg/mL. Erlenmeyers com colônias de diferentes clones foram então incubados à 37°C e mantidos sob agitação de 140 rpm num "Orbital incubator SI 50" (marca Stuart scientific) durante uma noite.

4.2.6.2 – Midi preparação de plasmídios pZL1

A midi preparação de plasmídios pZL1 foi feita utilizando o "Qiagen Plasmid Midi Kit".

A cultura de *E. coli* DH10B (pZL1) de cada clone preparada anteriormente foi dividida em dois tubos falcon estéreis e centrifugada à 6.000 x g durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de cada um dos 2 tubos foi ressuspensão com 2 mL de tampão P1, sendo a seguir agrupados num só tubo, adicionados 4 mL de solução P2 e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 4 mL de solução P3 e a mistura resultante foi imediatamente transferida para um "QIA filter cartridge" sendo deixada em repouso por 10 minutos para que o precipitado flutuasse. A mistura foi então filtrada diretamente numa coluna (Tip 100) previamente equilibrada com 4 mL de QBT, o 1º eluato foi descartado, a coluna foi lavada duas vezes com 10 mL de tampão de lavagem (Tampão QC) e, em seguida, eluída com 5 mL de tampão QF num novo

tubo falcon estéril. Os plasmídios foram precipitados adicionando-se ao eluato 3,5 mL de isopropanol e centrifugando-se à 15.000 x g durante 30 minutos à 4°C. O precipitado foi ainda lavado com etanol 70%, recentrifugado à 15.000 x g durante 10 minutos e ressuspenso em 100 µL de TE.

4.2.6.3 – Seqüenciamento e comparação de seqüências

O seqüenciamento dos clones dos cDNAs da AOX foi feito por um laboratório de prestação de serviços do "Institut National de la Recherche Agronomique" (INRA) Nancy – França. Esse sequenciamento foi feito a partir de 7 µg de plasmídio pZL1 purificado (midi preparação) utilizando inicialmente os primers universais M13 para o plasmídio pZL1, seguido de sequenciamento com primers específicos para a AOX: aox1, aox3, aox6, aox8 e aox9. As seqüências nucleotídicas parciais foram alinhadas e comparadas utilizando o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). A inversão/complementação das seqüências nucleotídicas como também a tradução em aminoácidos foram feitas através do site: <http://www.infobiogen.fr>. A árvore filogenética foi construída no formato "Phylip" através da submissão "on line" de seqüências em aminoácidos completas da AOX de várias espécies ao site: <http://www.genebee.msu.su>.

Primers utilizados no sequenciamento:

M13 F 5'- CCCAGTCACGACGACGTTGTAAAACG-3'

M13 R 5'- AGCGGATAACAATTTACACAGG -3'

promotor T7 5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'

aox1 (senso) 5'- TGGACCTGCTTCAGGCCATGGGAGACGTA-3'

aox3 (anti-senso) 5'-YTCRTTYTC9GCYTC9TC -3'

aox6 (anti-senso) 5'- TGRTT8ACRTC8CKRTGRTG8GCYTCRTC8GC-3'

aox8 (anti-senso) 5'-ACCATGCCTGGAACAGCAGC-3'

aox9 (senso) 5'-CCATGGAACTGTTTCATGC-3'

4.3 – Expressão da AOX em Cultivares de *Vigna unguiculata*

O nível de transcritos (mRNA) da AOX em cultivares de *V. unguiculata*, Vita 3 e Vita 5, submetidos a diferentes tratamentos foi avaliado através de técnicas de Northern blot e RT- PCR.

4.3.1 – Extração de RNA total utilizado no Northern blot

Os RNAs totais foram extraídos a partir de 1 g de raízes ou folhas de *V. unguiculata*, cultivares de Vita 3 e Vita 5, em diferentes tratamentos: controle, NaCl 100 mM, NaCl 200 mM, PEG 200,67 g/L e PEG 276,28 g/L segundo protocolo modificado de Chang *et al.* (1993). O material foi inicialmente macerado em nitrogênio líquido durante 3 minutos utilizando gral e pistilo previamente resfriados. Em seguida, após a obtenção de um pó fino, esse era transferido rapidamente para um tubo falcon com 15 mL de tampão de extração aquecido à 65°C contendo: Tris-HCl pH 8 0,1 M, CTAB 2% (m/v), PVP-40 2% (m/v), EDTA 25 mM pH 8, NaCl 2M, espermidina 0,5 g/L e β -mercaptoetanol 1% (v/v). Depois de 15 minutos de incubação nessa temperatura, adicionavam-se 15 mL de clorofórmio/AIA (24:1, v/v). O extrato era centrifugado a 3000 x g por 20 minutos à temperatura ambiente e a fase aquosa era reextraída mais 2 vezes em clorofórmio/AIA. Após a última extração, adicionava-se ¼ de volume de LiCl 10 M à fase aquosa e deixava-se precipitar à 4°C durante a noite. No dia seguinte, centrifugava-se à 8.300 x g durante 30 minutos, à 4°C, o precipitado era recuperado e ressuspensão em 500 μ L de tampão SSTE contendo: Tris-HCl pH 8 10 mM, NaCl 1M, SDS 0,5% e EDTA (pH 8) 1 mM e a fase aquosa formada era reextraída em clorofórmio/AIA. Em seguida, a fase aquosa era recuperada num tubo eppendorf, adicionado acetato de sódio 0,3 M, 2 volumes de etanol absoluto à - 20°C e deixado precipitar por 2 horas nessa temperatura. Os RNAs eram então precipitados à 22.900 x g, durante 30 minutos à 4°C e a seguir ressuspensos em 100 μ L de água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato 0,1%).

4.3.2 – Extração de RNA total utilizado na RT-PCR

A extração de RNA total de raízes de *V. unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, submetidos a diferentes tratamentos: controle, NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L foi feita utilizando o "RNeasy Plant Mini Kit".

Raízes de *V. unguiculata* (200 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo até a obtenção de um pó fino, que então era transferido para um eppendorf contendo 900 μ L de tampão RLT e 20 μ L de β -mercaptoetanol. A mistura no eppendorf foi homogeneizada por uma vigorosa agitação em "vortex". A amostra homogeneizada foi aplicada numa mini coluna do "kit" ("QIAshredder spin column"- lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e em seguida centrifugada à

10.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente em centrífuga 5415C, rotor F-4518-11 (Eppendorf, Alemanha). Um total de 900 μ L do eluato foi então recuperado, transferido para um novo tubo eppendorf de 2 mL e adicionado 0.5 volume de etanol 95% (450 μ L) misturando por pipetagem. Posteriormente, transferiu-se o volume dessa mistura para a coluna de fixação de RNA ("RNeasy mini spin column" - rósea, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugou-se a 10.000 rpm por 15 segundos. O eluato foi descartado, adicionou-se 700 μ L de tampão RW1 à coluna e centrifugou-se novamente à 10.000 rpm por 15 segundos, para lavagem. A coluna foi em seguida transferida para um novo tubo coletor e submetida a duas centrifugações de 10.000 rpm durante 15 segundos e 2 minutos, respectivamente, com 500 μ L de RPE. Os eluatos e o tubo coletor foram descartados, a coluna foi reutilizada com um novo tubo coletor de 1,5 mL e o RNA total foi eluído da coluna com 40 μ L de água livre-de-RNase centrifugando-se à 10.000 rpm por 1 minuto. O RNA total foi quantificado, analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2% e armazenado a - 20°C para subseqüentes reações de RT-PCR.

4.3.3 – Quantificação e qualificação de RNA total

A quantificação de RNA total foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm em cubeta de quartzo. Para o cálculo da concentração utilizava-se a seguinte relação: densidade ótica igual a 1 corresponde a uma concentração de 40 μ g/mL de RNA total.

A pureza dos RNAs totais foi calculada através da relação de absorbância A_{260}/A_{280} que deve ficar entre 1,8 e 2,0.

A degradação dos RNAs totais foi avaliada a partir de eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1x (Tris 90mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM). As amostras eram preparadas com 1/10 do volume de tampão de carga contendo azul de bromofenol 0,4% (m/v), xileno cyanol 0,4% e glicerol 50% (v/v). A migração era feita a 80 V.

4.3.4 – Expressão da AOX detectada por Northern blot

4.3.4.1 – Eletroforese em condições desnaturantes

Alíquotas de 30 μ g de RNA total foram separadas em gel de agarose 1,2% preparado com tampão MOPS 1x (MOPS 20 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1

mM) e contendo formaldeído 12,3 M.

As amostras eram desnaturadas adicionando 3 volumes de tampão de desnaturação [formamida 50% (v/v), formaldeído 12,3 M, MOPS 1x, azul de bromofenol 0,01% (m/v) e glicerol 10%] ao volume de RNA total. Em seguida as amostras eram aquecidas à 65°C durante 15 minutos e resfriadas rapidamente à 4°C por 5 minutos antes de depositá-las em gel. A migração de 20 amostras em gel de agarose 1,2% era feita a 80 V, 100 mA durante aproximadamente 4 horas.

4.3.4.2 – Transferência de RNA total

Após a eletroforese o gel era incubado em solução de SSC 20x (NaCl 3 M, citrato de sódio 300 mM) e os RNAs eram transferidos passivamente para uma membrana de nylon N⁺ (Boehringer), durante a noite, como mostrado na Figura 16 (Sambrook *et al.*, 1989). No dia seguinte, o sistema era desmontado, os poços eram marcados na membrana com grafite, a membrana era rapidamente lavada em SSC 2x, deixada secar e os RNAs eram fixados através da exposição a raios UV durante 2 minutos.

4.3.4.3 – Obtenção de sonda marcada com [α -³²P]dCTP

A sonda utilizada para a hibridização do Northern blot foi obtida a partir da digestão do plasmídeo pZL1 (midi preparação) referente ao clone 5 com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Pst* I. O produto de digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e uma banda de aproximadamente 1400 pb foi extraída e purificada do gel utilizando o "QiAquick Gel extraction kit" como já descrito. Em seguida, a sonda purificada foi marcada com [α -³²P]dCTP (Amersham, França) utilizando o "kit Nonaprime II" (Appligene).

4.3.4.4 – Hibridização e revelação

A membrana foi pré-hibridizada e hibridizada com a sonda radioativa recém marcada de maneira similar ao descrito no item 4.1.3.2. Posteriormente, a membrana radioativa foi exposta a um filme de raio-X durante 10 dias à -80°C e a seguir, o filme foi recuperado, imerso numa solução reveladora por 5 minutos, lavado em água e fixado por 5 minutos numa solução fixadora.

Após a revelação do filme de raio-X, a membrana foi deshibridizada

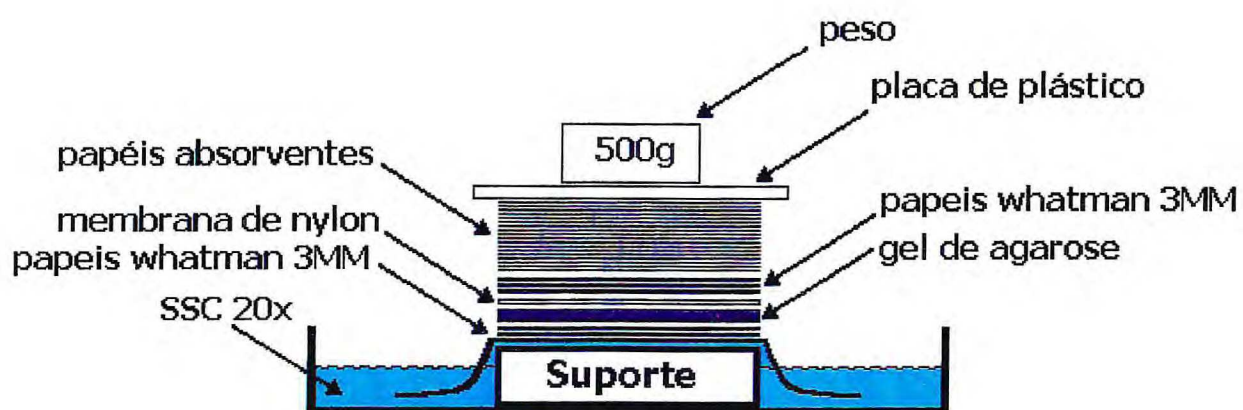


FIGURA 16 – Sistema de transferência por capilaridade de RNA total de um gel de agarose para uma membrana de nylon.

aquecendo-se a 100°C numa solução de SDS 0,5% durante 10 minutos ou até não haver mais radiação. A membrana foi então lavada com água esterilizada, incubada em ácido acético 5% durante 15 minutos, corada em solução de azul de metileno 0,04% (azul de metileno 0,04% , acetato de sódio 0,5 M) durante 10 minutos e novamente lavada em água esterilizada até o aparecimento das bandas de RNAs ribossômicos (RNAr) 25 S e 18 S (Sambrook *et al.*, 1989).

4.3.4.5 – Análise de Northern blot por densitometria

O Northern blot foi analisado por densitometria através do "Bio-Rad molecular imager and imaging densitometer and software" (Bio-Rad Multi-Analyst, version 1.0.2; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Mediu-se a densidade obtida das bandas reveladas no filme de raio-X (mRNA), como também a densidade das bandas de RNAr 25 S na membrana corada com azul de metileno e a quantificação foi feita através de um valor relativo obtido pela divisão da densidade das bandas de mRNA pela densidade das bandas de RNAr 25 S.

4.3.5 – Expressão da AOX por RT- PCR

As reações de RT-PCR para avaliar a expressão da AOX em raízes de *V. unguiculata*, cultivares de Vita 3 e Vita 5, foram feitas utilizando o "kit" "Ready-To-Go™ RT-PCR Beads" (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Cada tubo eppendorf do "kit" contém esferas liofilizadas que reúnem todos os reagentes para uma reação de RT-PCR num volume final de 50 µL, contendo: 2 U de Taq DNA polimerase, TRIS-HCl 10 mM (pH 9.0), KCl 60 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, transcriptase reversa de Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) (FPLC *pure™*), inibidor de ribonuclease (porcine) (RNAguardtm) e estabilizadores tais como BSA livre de RNase e DNase. O "kit" fornece primers para construção da primeira fita de cDNA: pd(N)₆ e pd(T)₁₂₋₁₈. A Tabela 7 mostra a mistura que foi adicionada aos tubos de reação contendo as esferas para o processamento da RT- PCR.

Os tubos contendo a mistura reativa foram colocados no gelo para a dissolução das esferas e preservação a atividade da M-MuLV sendo logo em seguida incubados à 42°C durante 25 min para a síntese da primeira fita de cDNA. Essa mistura era submetida a ciclos de amplificação conforme está descrito no programa ao lado da Tabela 7.

Tabela 7 – Mistura de reação para a RT-PCR

H ₂ O DEPC q.s.p.	50 µL
pd(T) ₁₂₋₁₈ 0,5 µg/µL	1 µL
Primer aox1 10 pmoles/µL	1 µL
Primer aox6 10 pmoles/µL	1 µL
RNA total (1 µg)	± 1 ou 2 µL

Programa da RT-PCR

42°C----25 minutos

92°C ---- 1 minuto

30 ciclos 50°C ---- 2 minutos72°C ---- 2 minutos

Extensão 72°C --- 10 minutos

Armazenagem 4°C --- α (Infinito)

Após a amplificação do cDNA, 25 µL das amostras eram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, posteriormente a banda de cDNA era revelada pela fluorescência emitida pelo brometo de etídio irradiado por luz UV. A intensidade da banda era analisada por densitometria através do "Bio-Rad molecular imager and imaging densitometer and software" (Bio-Rad Multi-Analyst, version 1.0.2; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

4.4 – Expressão da AOX de *Vigna unguiculata* em *Escherichia coli*

A produção da oxidase alternativa recombinante envolveu várias etapas de preparação do sistema de expressão *E. coli* tais como: preparação do plasmídio de expressão, preparação do inserto da AOX de *V. unguiculata*, ligação do inserto ao plasmídio de expressão, amplificação da construção do plasmídio de expressão recombinante e expressão e purificação da AOX. As etapas de preparação do plasmídio de expressão e do inserto foram sempre acompanhadas de eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

4.4.1 – Preparação do plasmídio de expressão

O Plasmídio de expressão escolhido (pQE-30) foi inicialmente clonado em bactérias de *E. coli* XL1 bleu, digerido por enzimas de restrição específicas, desfosforilado e purificado para as etapas seguintes.

4.4.1.1 – Midi preparação do plasmídio pQE-30

Bactérias XL1 bleu transformadas com o plasmídio pQE-30 e armazenadas em glicerol 15% à - 80°C foram descongeladas e cultivadas em placas de LB Agar

ampicilina 100 µg/µL de forma semelhante ao já descrito no item 4.1.2.3 . Em seguida, uma colônia bem isolada de XL1 bleu foi tocada com uma ponteira P-200 estéril e adicionada em meio líquido Terrific Broth contendo ampicilina 100 µg/µL sendo cultivada à 37°C e sob agitação durante 14 horas.

A midi preparação do plasmídeo pQE-30 clonado em XL1 bleu, foi feita usando o "Qiagen Plasmid Midi Kit" como já foi descrito para o plasmídeo pZL1.

4.4.1.2 – Digestão do plasmídeo pQE-30

A escolha das enzimas de restrição para digestão do plasmídeo pQE-30 envolveu previamente uma análise do mapa de restrição do cDNA da AOX (clone 5) seqüenciado e dos sítios de restrição da região de multi clonagem do plasmídeo pQE-30. Com base nessas análises escolheram - se os sítios *Bam*H I e *Pst* I.

O plasmídeo pQE-30 foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Pst* I à 37°C, durante 4 horas num tubo de reação contendo:

Plasmídeo pQE-30 (7,5 µg) -----	39 µL
<i>Bam</i> H I 12 U/µL (eurogentec)-----	3 µL
<i>Pst</i> I 10 U/µL (eurogentec) -----	3 µL
Tampão azul 10x (eurogentec) -----	5 µL

4.4.1.3 – Purificação do plasmídeo pQE-30

O plasmídeo pQE-30 digerido foi purificado por FCA (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico).

1ª extração – Num tubo eppendorf foram adicionado 49 µL da reação de digestão por *Bam*H I e *Pst* I, 151 µL de TE, 100 µL de fenol e 100 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A mistura foi bem homogeneizada em "vortex" e centrifugada à 9.000 x g durante 3 minutos e à temperatura ambiente.

2ª e 3ª extrações – Aproximadamente 190 µL de fase aquosa foram recuperados, adicionados num novo tubo eppendorf com igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e o eppendorf foi centrifugado à 9.000 x g durante 3 minutos e à temperatura ambiente.

Após a 3ª extração a fase aquosa (180 µL) foi novamente recuperada, adicionada 19 µL de acetato de amônia 7,5 M, 400 µL de etanol absoluto (- 20°C) e

deixada à - 20°C durante 15 minutos. O DNA plasmídico foi precipitado por centrifugação à 16.000 x g durante 30 minutos à 4°C e em seguida ressuspensão em 40 µL de H₂O estéril.

4.4.1.4 – Desfosforilação do plasmídio pQE-30

Os grupos fosfatos das extremidades digeridas 3' e 5' do plasmídio pQE-30 foram removidos pela ação da CIAP (fosfatase alcalina de intestino de bezerro) incubada à 37°C durante 30 minutos num tubo de reação contendo:

Plasmídio pQE-30	
(digerido, purificado) -----	40 µL
Tris-HCl 1M (pH 8) -----	2,5 µL
EDTA 1mM -----	5 µL
CIAP 70 U/µL -----	1 µL
H ₂ O q.s.p. -----	50 µL

O plasmídio pQE-30 desfosforilado foi então repurificado por FCA, precipitado com acetato de amônia e etanol (- 20°C), centrifugado e ressuspensão em 20 µL de TE. A concentração do plasmídio pQE-30 foi estimada em 30 ng/µL pela comparação da intensidade de sua banda com as bandas do marcador (DNA Ladder 1kb, 0,5 µg) no gel de agarose 0,8% reveladas pela fluorescência emitida pelo brometo de etídio após eletroforese.

4.4.2 – Preparação do inserto da AOX de *Vigna unguiculata*

A preparação do inserto da AOX envolveu a escolha de primers , amplificação do cDNA da AOX por PCR, eletroforese em gel de agarose, purificação do produto de PCR, digestão do cDNA da AOX amplificado, purificação por FCA do cDNA da AOX digerido.

4.4.2.1 – Escolha dos primers

Os primers foram deduzidos a partir da análise de vários parâmetros tais como: mapa de restrição do cDNA da AOX (clone 5); sequência desse cDNA correspondente a proteína madura; temperatura de anelamento.

4.4.2.1.1 – Mapa de restrição do cDNA da AOX

O mapa das enzimas restrição ausentes na seqüência de cDNA da AOX foi obtido a partir da submissão "on line" dessa seqüência de cDNA ao site da internet:

http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/carteres_in.pl

Os sítios de restrição, escolhidos para serem colados nas extremidades do cDNA da AOX a ser amplificado e servirem para a ligação desse cDNA ao plasmídio pQE-30, foram *Bam*H I e *Pst* I por estarem ausentes na seqüência do cDNA da AOX como também por estarem presentes no sítio de multi clonagem do plasmídio pQE-30.

4.4.2.1.2 – Seqüência do cDNA da AOX correspondente a proteína madura

A seqüência do cDNA correspondente a proteína madura a ser amplificada foi determinada através da identificação do sítio de clivagem do peptídio sinal e do códon de terminação da transcrição (TGA) na seqüência completa do cDNA da AOX (clone 5).

O sítio de clivagem do peptídio sinal foi determinado por comparação de peptídios sinais de várias AOXs (Finnegan *et al.*, 1997) e através da submissão da seqüência protéica da AOX (clone 5) ao site: <http://psort.nibb.ac.jp/form.html>. O PSORT compara a seqüência fornecida a um banco de dados de peptídios sinais já determinados e prevê o sítio de clivagem de acordo com o método descrito por Nakai and Kanehisa, (1992).

4.4.2.1.3 – Temperatura de anelamento

A temperatura de anelamento foi calculada através da fórmula: $TM = 4 (G + C) + 2 (A + T)$; onde, G, C, A, T representam o número de vezes que cada um desses nucleotídeos aparecem na seqüência do primer. O valor do TM deve ficar entre 50 e 80.

4.4.2.2 – Amplificação do cDNA da AOX por PCR

O cDNA da AOX a ser inserido no plasmídio pQE-30 foi amplificado através da reação da DNA polimerase *Pfu* nativa a partir do plasmídio pZL1 recombinante (clone 5) isolado da biblioteca de cDNA de *V. unguiculata* e de primers deduzidos a partir

das condições acima descritas:

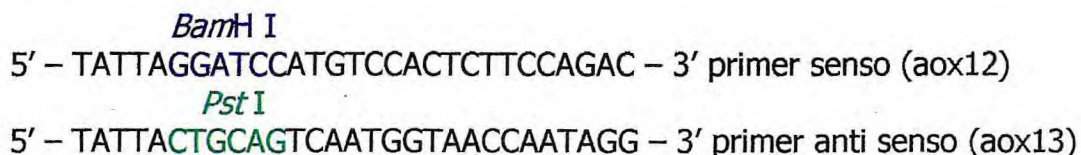


Tabela 8 – Mistura de reação da PCR do inserto da AOX

DNA pZL1 (clone 5) 1,2 µg/µL	0,2 µL
dNTPs (5mM de cada)	3 µL
H ₂ O estéril	31,8 µL
Ebulição (100°C) durante 5 minutos e resfriado rapidamente a 4°C	
Primer aox12 (12 p mols/µL)	4 µL
Primer aox13 (12 p mols/µL)	4 µL
Tampão da DNA polimerase 10x	5 µL
DNA polimerase <i>Pfu</i> nativa 2,5U/µL	2 µL

Programa para amplificação da PCR

92°C ----- 5 minutos
80°C ----20 minutos

25 ciclos 92°C ---- 1 minuto
 55°C ---- 1 minuto
 72°C ---- 4 minutos

Extensão 72°C --- 10 minutos
Armazenagem 4°C --- ∞ (infinito)

4.4.2.3 – Eletroforese em gel de agarose

O produto de PCR (2 x 50 µL) foi misturado a 10 µL de tampão de carga 10x (azul de bromofenol 0,04%, glicerol 50%), aplicado num único poço do gel de agarose 0,8% e separado por eletroforese em tampão de migração TBE 1x, a 90 V e 25 mA.

Após a eletroforese, o gel foi imerso numa solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL durante 20 minutos, lavado em água por 15 minutos e a banda do inserto de cDNA amplificado foi visualizada pela fluorescência emitida pelo brometo de etídio irradiado por raios UV num transluminador. A banda foi cortada do gel com um bisturi estéril e guardada à – 20°C para purificação.

4.4.2.4 – Purificação do produto de PCR

O cDNA da AOX amplificado foi extraído e purificado do gel de agarose 0,8% com o "QiAquick Gel extraction kit" (Quiagen, Alemanha) conforme já descrito. Ao final, o cDNA purificado foi ressuspenso em 30 µL de TE.

4.4.2.5 – Digestão do cDNA da AOX amplificado

O cDNA da AOX amplificado (inserto) foi então digerido por enzimas de restrição *Bam*H I e *Pst* I incubadas à 37°C, durante 2 horas e 30 minutos, num tubo de reação contendo:

Inserto purificado -----	27 μ L
<i>Bam</i> H I 12 U/ μ L (eurogentec) -----	2 μ L
<i>Pst</i> I 10 U/ μ L (eurogentec) -----	2 μ L
Tampão azul 10x (eurogentec) -----	3,1 μ L

4.4.2.6 – Purificação do cDNA da AOX digerido

Após a digestão foram adicionados 69 μ L de TE ao tubo de reação e o cDNA da AOX digerido foi purificado por FCA como já descrito, sendo ao final ressuspensão em 15 μ L de TE.

O cDNA purificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% e após visualização num transluminador do gel tratado com brometo de etídio, sua concentração foi estimada em 50 ng/ μ L.

4.4.3 – Ligação do Inserto da AOX ao plasmídeo de expressão

A partir da estimativa da concentração do cDNA da AOX ($\pm$ 50 ng/ μ L) e do plasmídeo de expressão pQE-30 ($\pm$ 30 ng/ μ L) foram preparados tubos de reação com excesso de cDNA nas proporções 2:1 e 4:1 como é mostrado abaixo.

Reação de Ligação 1		Reação de Ligação 2	
Inserto / plasmídeo pQE-30 (2:1)		Inserto / plasmídeo pQE-30 (4:1)	
cDNA da AOX ($\pm$ 200 ng) -----	4 μ L	cDNA da AOX ($\pm$ 200 ng) -----	4 μ L
Plasmídeo pQE-30 ($\pm$ 100 ng) --	3 μ L	Plasmídeo pQE-30 ($\pm$ 50 ng) ----	1,5 μ L
T4 DNA ligase 5 U/ μ L -----	0,5 μ L	T4 DNA ligase 5 U/ μ L -----	0,5 μ L
Tampão de incubação 10x -----	1 μ L	Tampão de incubação 10x -----	1 μ L
H ₂ O estéril -----	2 μ L	H ₂ O estéril -----	3 μ L

Os tubos de reação foram incubados à 16°C durante 20 horas e a reação foi

encerrada através do aquecimento à 70°C durante 10 minutos.

4.4.4 – Amplificação da construção do pQE-30 recombinante

Uma vez feita a ligação do cDNA da AOX ao plasmídio de expressão pQE-30 foi necessário clonar (amplificar) esse plasmídio recombinante. A clonagem foi feita através de cultura de bactérias *E. coli* JM 109 transformadas com o plasmídio recombinante.

4.4.4.1 – Preparação de bactérias JM 109 competentes

Bactérias JM 109 conservadas em glicerol 15% à - 80°C foram descongeladas e uma pequena fração foi colocada em cultura num tubo falcon com 2 mL de LB líquido, sob agitação de 145 rpm, à 37°C e durante uma noite num incubador orbital SI 50. No dia seguinte, os 2 mL de cultura foram versados num erlenmeyer contendo 50 mL de LB líquido e incubados nas mesmas condições anteriores, durante 3 horas e 30 minutos. Em seguida, a cultura de bactérias JM 109 foi dividida em 2 tubos falcon e centrifugada à 926 x g durante 15 minutos e à 4°C, o sobrenadante foi descartado, cada precipitado foi ressuspense em 12,5 mL de CaCl₂ 50 mM (4°C) e deixados no gelo durante 40 minutos. Os tubos falcon foram novamente centrifugados à 926 x g por 15 minutos e à 4°C, o sobrenadante foi descartado, os precipitados ressuspensos em 2,5 mL de CaCl₂ 50mM e em seguida guardados à 4°C.

4.4.4.2 – Transformação de bactérias JM 109 competentes

Alíquotas de 2 µL do produto da reação de ligação 1 e 2 foram adicionadas a eppendorfs contendo 150 µL de bactérias JM 109 competentes, deixados no gelo durante 40 minutos, submetidos a um choque térmico de 42°C durante 3 minutos e novamente resfriados no gelo. Em seguida, foram adicionados a cada eppendorf, 1 mL de meio 2x YT, submetendo-se a agitação de 145 rpm à 37°C num "incubador orbital SI 50", durante 1 hora. A cultura resultante foi então semeada em placas de petri LB Agar ampicilina (100 µg/mL) sendo, em seguida, incubadas em estufa à 37°C durante uma noite.

2x YT

Bacto triptona -----	1,6 g
Extrato de levedura -----	1,0 g
NaCl -----	0,5 g
H ₂ O q.s.p.-----	100 mL

pH é ajustado a 7 com NaOH

4.4.4.3 – Seleção de colônias JM 109 transformadas

Para avaliar que colônias haviam sido transformadas com o plasmídio pQE-30 recombinante, fez-se uma PCR usando os primers aox12 e aox13 a partir de uma pequena amostra de cada colônia, obtida pelo toque com uma ponteira. Dentre as colônias que apresentaram a amplificação de uma banda de tamanho aproximado de 850 pb escolheu-se uma para fazer uma midi preparação de plasmídio.

4.4.4.4 – Midi preparação do plasmídio pQE-30 recombinante

Uma colônia JM 109 bem isolada, previamente avaliada por PCR, foi coletada com um toque de uma ponteira p-200 estéril, adicionada a meio líquido terrific broth contendo ampicilina 100 µg/µL e incubada à 37°C, sob agitação de 145 rpm num incubador orbital durante 16 horas. A midi preparação foi feita como já foi descrito anteriormente.

O plasmídio recombinante obtido da midi preparação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% através do produto de PCR utilizando os primers aox12 e aox13, como também através de sua digestão com enzimas de restrição *Bam*H I e *Pst* I.

4.4.5 – Expressão da AOX em *E. coli* M15 (pREP4)

Como mostrado na Figura 17, a expressão da AOX em bactérias *E. coli*, envolveu a transformação de bactérias *E. coli* M15 (pREP4) competentes com o plasmídio recombinante, como também a preparação de uma grande cultura da *E. coli* M15 (pREP4) transformada para a indução da expressão e purificação da proteína de interesse (AOX).

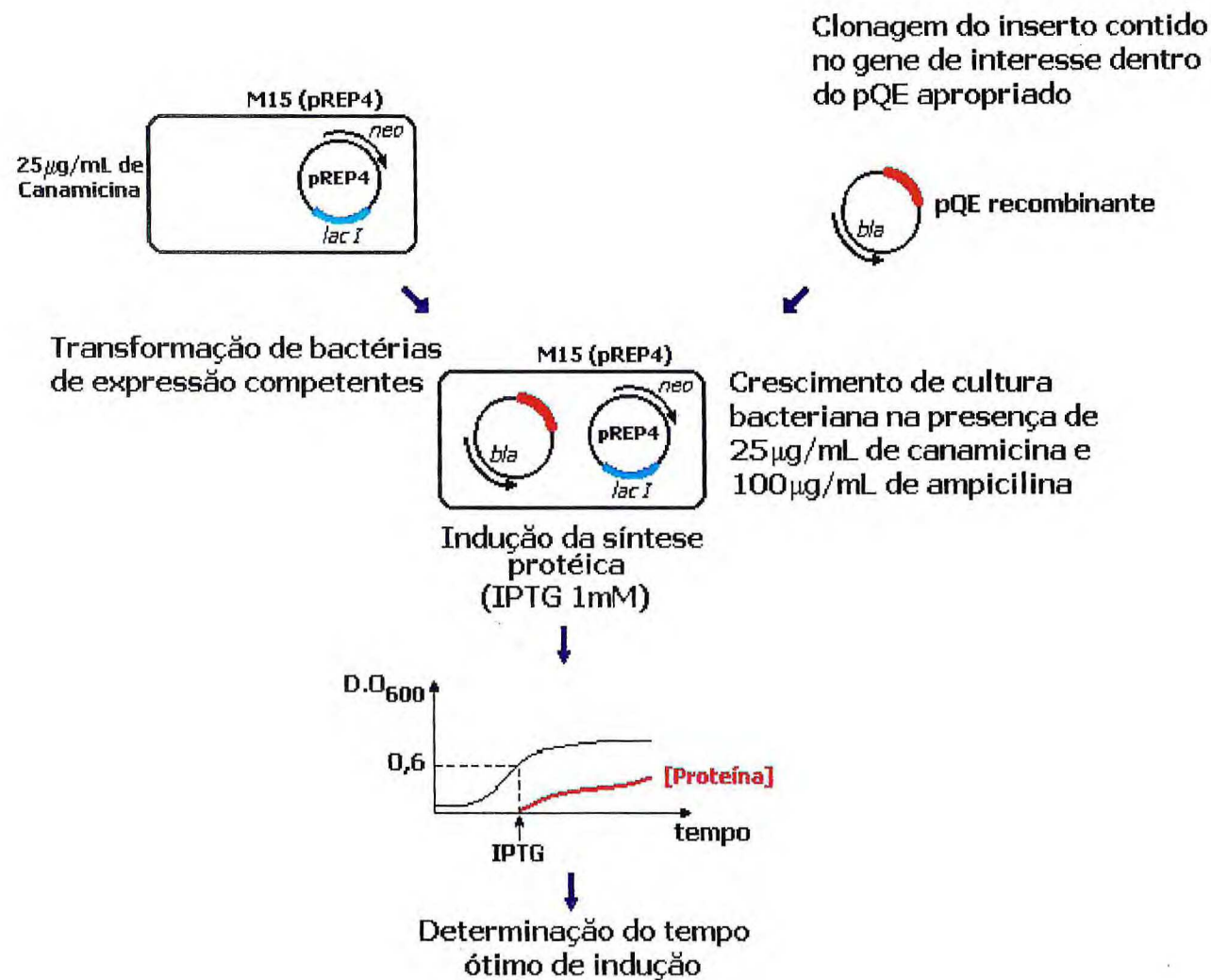


FIGURA 17 – Etapas de transformação e expressão de proteína recombinante em *Escherichia coli*

4.4.5.1 – Transformação de *E. coli* M15 (pREP4) competentes

Em eppendorfs contendo 100 μ L de *E. coli* M15 (pREP4) competentes foram adicionados aproximadamente 50 ng de plasmídio pQE-30 recombinante ou plasmídio pQE-30 vazio (controle negativo), colocados no gelo durante 20 minutos, submetidos a um choque térmico à 42°C durante 90 segundos e imediatamente transferidos pro gelo deixando-os por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados aos eppendorfs 300 μ L de meio Psi Broth (bacto triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 171 mM, MgSO₄ 4 mM, KCl 10 mM), incubando-os à 37°C sob agitação de 200 rpm num incubador orbital durante 90 minutos. A mini cultura foi então semeada em placas LB Agar ampicilina 100 μ g/mL, canamicina 25 μ g/mL e deixadas em estufa à 37°C durante uma noite.

4.4.5.2 – Cultura de *E. coli* M15 (pREP4) transformadas

Uma colônia bem isolada de *E. coli* M15 (pREP4) transformada com o pQE-30 recombinante ou com o pQE-30 vazio foi adicionada num tubo falcon contendo 10 mL de LB, ampicilina 100 μ g/mL, canamicina 25 μ g/mL e em seguida incubada à 37°C, sob agitação de 220 rpm num incubador orbital durante uma noite.

No dia seguinte, lançou-se uma grande cultura de *E. coli* M15 (pREP4) transformada com o pQE-30 recombinante para a indução da expressão protéica. Uma alíquota de 10 mL da mini-cultura feita anteriormente foi adicionada num vidro contendo 200 mL de LB, ampicilina 100 μ g/mL e canamicina 25 μ g/mL sendo a seguir incubado à 37°C, sob agitação de 220 rpm num incubador orbital até que a densidade ótica a 600 nm atingisse o valor de 0,6 (aproximadamente 2 horas).

4.4.5.3 – Indução da síntese da proteína recombinante

A indução da síntese protéica foi feita pela adição de 400 μ L de IPTG 500mM (1 mM final) ao vidro de cultura com densidade ótica a 600 nm de 0,6 e deixando-se sob agitação de 220 rpm, à 37°C durante 2 horas e 30 minutos num incubador orbital.

Em seguida, a cultura foi dividida em alíquotas de 100 mL em tubos de centrífuga e centrifugada à 3840 x g durante 25 minutos à 4°C, o sobrenadante foi descartado e os precipitados foram guardados à - 20°C para a purificação da proteína recombinante.

4.4.5.4 – Purificação da proteína recombinante

A purificação da proteína recombinante foi feita em condição nativa. Os precipitados guardados à -20°C foram descongelados e ressuspensos em 4 mL de tampão de lise nativa contendo: 3,86 mL de Tampão de lise (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM), 100 μL de inibidores de proteases (p8849, sigma) 0,01 g de lisozima e 40 μL de triton 25% (0,1% final). Após a ressuspensão, o homogenato bacteriano foi deixado no gelo durante 30 minutos sendo em seguida submetido a sonicação à 4°C (6 pulsos de 10 segundos) e centrifugado à $10.000 \times g$ durante 30 minutos à 4°C . O precipitado (P1) foi dissolvido em 4 mL de tampão de lise e guardado para eletroforese à -20°C , já o sobrenadante foi recuperado num tubo de ensaio, adicionado 500 μL de resina Ni-NTA (resina de níquel coordenada com o ácido nitrilo triacético) e colocado sob forte agitação à 4°C durante 1 hora. Em seguida essa mistura foi transferida para uma coluna de filtração com tampa, deixada em repouso até que a resina Ni-NTA depositasse no fundo, quando então a tampa foi removida e o "flow through" (FT) foi recolhido. A coluna foi lavada 3 vezes com 4 mL de tampão de lavagem (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM) e o produto de lavagem foi recuperado em 3 eppendorfs consecutivamente (L1, L2 e L3). Enfim, a coluna foi eluída 4 vezes com 250 μL de tampão de eluição (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 250 mM) sendo os eluatos recolhidos em 4 eppendorfs consecutivamente (E1, E2, E3 e E4).

4.4.5.5 – Eletroforese em SDS-PAGE

A separação das proteínas bacterianas, como das várias frações obtidas durante a purificação protéica foi feita num PhastSystemTM (Pharmacia) em SDS-PAGE com gradiente PhastGel 8-25 usando o tampão SDS PhastGel. O gradiente PhastGel 8-25 é formado por um gel de 0,45 mm de espessura em gradiente contínuo de 8 a 25% com 2% de ligações cruzadas. O sistema de tampão no gel é constituído de acetato 0,112 M e Tris 0,112 M, (pH 6.4), enquanto que o tampão de empilhamento (equivalente ao tampão de corrida) feito de agarose 2% é constituído por: tricina 0,2 M, Tris 0,2 M (pH 8,1) e SDS 0,55%.

As condições utilizadas na eletroforese foram de 250 V, 10 mA, 3 W e 15°C para um tempo de corrida aproximado de 20 minutos. Os géis foram coloridos em solução de coloração [PhastGel bleu R 0,02%, metanol 30%, ácido acético 10% e

CuSO₄ 0,1% (p/v)] durante 8 minutos, lavado 3 vezes (8 minutos) em solução de descoloração (metanol 30%, ácido acético 10%), preservados em solução contendo glicerol 10%, ácido acético 10% e colocados para secar.

4.4.5.5.1 – Preparação das amostras

As amostras de bactérias transformadas com o plasmídio pQE-30 recombinante ou com o plasmídio pQE-30 vazio induzidas com IPTG 1 mM foram obtidas a partir de 500 µL da cultura de bactérias após 2 horas e 30 minutos de indução. Então, esse volume de cultura bacteriana foi adicionado num eppendorf, centrifugado à 9.000 x g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensão em 50 µL de Tris 0,1 M (pH 6,8), adicionado 50 µL de tampão de amostra 2x (Tris 0,1 M (pH 6,8), SDS 4%, azul de bromofenol 0,02%) e aquecido à 100°C durante 5 minutos antes de depositar 4µL no gel.

Com relação às outras amostras, 20 µL das frações P1, FT, L1, L2, L3, E1, E2, E3 e E4 também foram adicionadas em 20 µL de tampão de amostra 2x, aquecidas a 100°C durante 5 minutos e 4 µL foram aplicados em gel.

4.4.5.6 – Western blot

As proteínas do "PhastGel" foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, marca SIGMA, com poros de 0.2 µm em uma cuba de eletrotransferência vertical marca HÖEFFER com uma solução tampão de transferência composta de glicina 39 mM, SDS 0,0375 % (m/v) e metanol 20 % (v/v) em tampão TRIS 48 mM pH 7,2, num volume final de 1500 ml, sob condições de amperagem constante de 200 mA fornecida por uma fonte marca PHARMACIA BIOTECH, modelo EPS-600. O tempo de transferência foi de 2 horas e todo o processo ocorreu em câmara fria, sendo a agitação do tampão de transferência realizada por um agitador magnético.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada, hibridizada com anticorpos e revelada por quimioluminescência como já descrito para o "Western blot" de amostras de extrato protéico bruto.

RESULTADOS

1 – ESTRESSE HÍDRICO E SALINO EM PLANTAS DE *Vigna unguiculata* cv. VITA 3 E VITA 5.

1.1 – Parâmetros de Crescimento

O desenvolvimento das plantas de *V. unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, foi avaliado após o 10º dia da semeadura, quando então as plantas apresentavam-se bem adaptadas ao sistema de hidroponia tendo como características observáveis, o início da queda dos cotilédones, folhas primárias bem desenvolvidas, consistentes e iniciando o processo de desenvolvimento das folhas secundárias. Tomando esses parâmetros como base, observou-se o desenvolvimento das plantas desde o momento da aplicação dos estresses (10º dia da semeadura) ou troca da solução nutritiva (no caso do controle) até 72 horas depois, como também após o 7º dia de início dos estresses (17º dia da semeadura) quando os tecidos eram coletados para as análises bioquímicas e moleculares de expressão da AOX.

As plantas controle, tanto da cultivar Vita 3 quanto da cultivar Vita 5, não foram visualmente afetadas pela troca da solução nutritiva antiga por uma outra recém preparada e após 72 horas já apresentavam as folhas secundárias bem desenvolvidas. As folhas primárias de Vita 5 apresentavam uma característica peculiar de semi-enrolamento. Com relação ao desenvolvimento das plantas submetidas ao choque osmótico com NaCl 100 mM, essas apresentavam folhas consistentes porém, em ambas as cultivares, observou-se visualmente uma diminuição no desenvolvimento das folhas secundárias em torno de 30% quando comparadas com as folhas das plantas controle. Já as plantas de Vita 3 e de Vita 5 submetidas a estresse com NaCl 200 mM apresentaram uma diminuição no desenvolvimento das folhas secundárias em torno de 80% e as folhas primárias de Vita 3 aparentavam perda de consistência. Quanto aos estresses causados por PEG 200,67 g/L e PEG 276,28 g/L, esses parecem ter sido mais severos vez que as folhas primárias das duas cultivares apresentaram perda de consistência. No caso da cultivar Vita 5, 72 horas após a aplicação do estresse, presença de PEG 200,67 g/L, as folhas primárias voltaram a apresentar consistência comparável à das plantas-controle. Entretanto, em presença de PEG 276,28 g/L, não foi verificado recuperação

da consistência das folhas primárias e no caso da cultivar Vita 3 essas folhas murcharam. Quanto ao desenvolvimento das folhas secundárias, houve uma redução de crescimento estimada entre 60 e 70% em relação às folhas das plantas controle, tanto em Vita 3 quanto em Vita 5, quando o estresse foi causado por PEG 200,67 g/L. Já na presença de estresse hídrico, provocado por PEG 276,28 g/L, não se observou desenvolvimento das folhas secundárias na cultivar Vita 5 enquanto que na cultivar Vita 3 verificou-se desenvolvimento dessas folhas, embora inferior ao das folhas das plantas controle.

As plantas de *V. unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, após 7 dias de início da aplicação dos estresses estão mostradas na Figura 18. Durante esse período, as plantas-controle consumiram muito mais solução nutritiva do que as plantas estressadas, vez que, dependendo do grau do estresse aplicado, as plantas praticamente paravam de consumir solução nutritiva.

As folhas das cultivares Vita 3 e Vita 5, estressadas com NaCl 100 mM, apresentaram uma coloração verde escura, como também um desenvolvimento reduzido das folhas secundárias em aproximadamente 50% em relação às folhas das plantas-controle, enquanto que as folhas primárias apresentavam-se consistentes. Já em presença de NaCl 200 mM, as folhas primárias da cultivar Vita 3 revelaram-se menos consistentes que as da cultivar Vita 5. No tocante ao desenvolvimento das folhas secundárias observou-se um decréscimo em torno de 50% em relação ao tratamento com NaCl 100 mM, tanto na cultivar Vita 5 quanto na cultivar Vita 3. As plantas estressadas com PEG 200,67 g/L e PEG 276,28 g/L apresentaram-se menos desenvolvidas quando comparadas ao estresse salino. Na presença de PEG 200,67 g/L por exemplo, a maior parte das plantas estava com as folhas primárias murchas sendo essa observação predominante na cultivar Vita 3 que também apresentava uma coloração verde escura e acinzentada nas folhas primárias. Já no estresse com PEG 276,28 g/L, observava-se que as folhas primárias estavam caindo e as folhas secundárias praticamente não tinham se desenvolvido desde o início da aplicação do estresse.

VITA 3



CONTROLE



NaCl 100mM



NaCl 200mM



PEG 200,67g/L



PEG 276,28g/L

VITA 5



CONTROLE



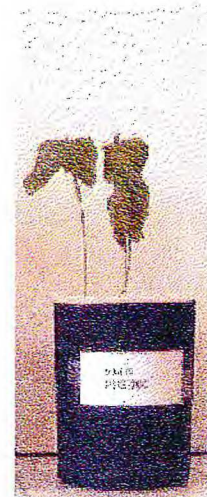
NaCl 100mM



NaCl 200mM



PEG 200,67g/L



PEG 276,28g/L

FIGURA 18 – Plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, 17 dias após a germinação e 7 dias de início do estresse hídrico ou salino

2 – EXPRESSÃO DA OXIDASE ALTERNATIVA DE *Vigna unguiculata*

A expressão da oxidase alternativa foi analisada através da quantificação protéica e da quantificação de transcritos nas cultivares Vita 3 e Vita 5 de *V. unguiculata*, submetidas a diferentes condições de tratamentos, 17 dias após a semeadura.

2.1 – Análise da expressão protéica da AOX

A expressão protéica da AOX foi estudada em raízes de *V. unguiculata* a partir do extrato protéico bruto de raízes de Vita 3 e de mitocôndrias purificadas de raízes de Vita 3 e Vita 5 em condição – controle e em presença de NaCl 100 mM, NaCl 200 mM, e PEG 200,67 g/L.

2.1.1 – Análise da expressão protéica da AOX: Extrato protéico bruto

A expressão da oxidase alternativa em extrato protéico bruto de raízes de Vita 3 está mostrada na Figura 19. A Figura 19A revela a quantidade de extrato protéico bruto de raízes da cultivar Vita 3 através da visualização da intensidade das proteínas separadas por SDS-PAGE. Duas bandas de massas moleculares muito próximas compreendidas na faixa de 34 a 36 kDa (forma reduzida) foram reveladas por anticorpos anti-AOX de *S. guttatum* em todas as amostras de extrato protéico bruto (Figura 19B), sendo a intensidade das bandas usada como parâmetro para avaliar a expressão da AOX. A exposição das plantas de Vita 3 aos estresses hídrico e salino aumentou a expressão protéica da AOX sobretudo na forma correspondente a banda de menor massa molecular. Quando as plantas foram estressadas com PEG 200,67 g/L houve um acréscimo em torno de 50% na quantidade da AOX comparada a do controle. Já quando o estresse foi causado por NaCl 100 mM ou 200 mM a quantidade da AOX aumentou em média de 30 e 20%, respectivamente (Figuras 19B e 19C).

2.1.2 – Análise da expressão protéica da AOX: Mitocôndrias purificadas

Em mitocôndrias de raízes purificadas dos cultivares Vita 3 e Vita 5, foram reveladas por "Western blotting", 4 bandas protéicas, sendo uma banda oxidada (*c.a.* 70 kDa) e 3 bandas reduzidas com massas moleculares variando na faixa de 32

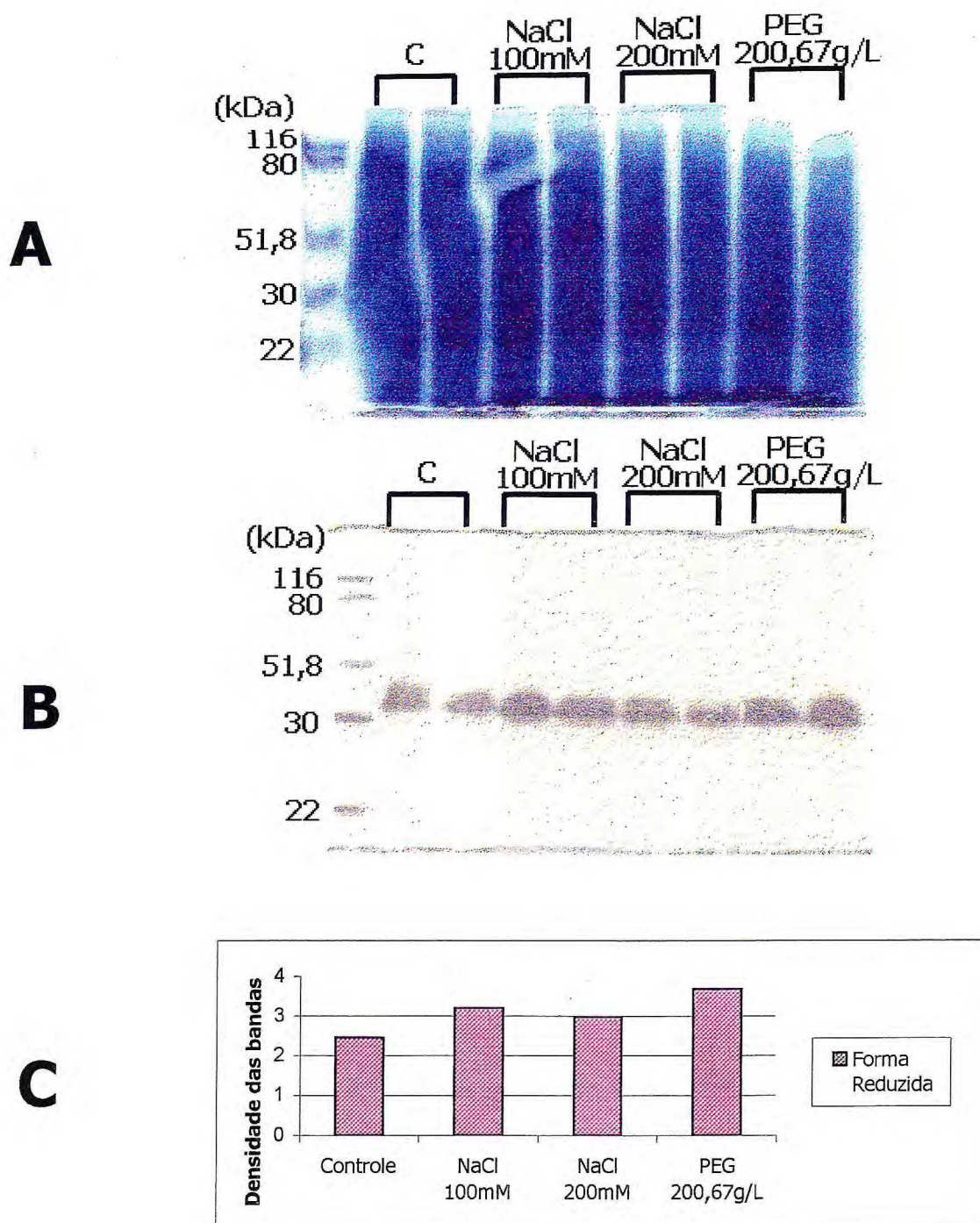


FIGURA 19 – Expressão da oxidase alternativa (AOX) em extrato protéico bruto de raízes de *Vigna unguiculata*, cultivar Vita 3, 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: C (controle), NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L (amostras em duplicata). **(A)** SDS – PAGE (adição de 40 μ L de extrato protéico bruto em cada poço) **(B)** – Western blotting; **(C)** – Gráfico representando as médias das densidades integradas das bandas reduzidas da AOX.

a 36 kDa. A banda oxidada é intensa e visível em todas as condições. Já as bandas reduzidas são bem menos intensas e apenas uma banda de massa molecular intermediária (*c.a.* de 35 kDa) aumenta de intensidade, tornando-se nitidamente visível, em função do estresse aplicado.

As Figuras 20 e 21 mostram a expressão da oxidase alternativa em mitocôndrias purificadas de raízes de Vita 3 e de Vita 5, respectivamente. A quantificação protéica da fração mitocondrial purificada foi estimada através da visualização da intensidade das bandas separadas por SDS-PAGE (Figuras 20A e 21A). Em termos quantitativos, não se constata diferença significativa de expressão da AOX na cultivar Vita 3 quando se compara o somatório das intensidades das bandas oxidada e reduzida em condições controle e de estresse. Contudo, se for comparada somente a forma reduzida (*c.a.* 35 kDa), observa-se que há um aumento de no mínimo 100% na intensidade das bandas em condições de estresse (Figuras 20B, 20C e 22). Esse aumento na intensidade da banda reduzida (*c.a.* 35 kDa) em condições de estresse também foi observado para a cultivar Vita 5 sendo no mínimo de 200% (Figuras 21B, 21C e 22). Já com relação ao somatório das bandas oxidada e reduzida (*c.a.* 35 kDa), observa-se um aumento em torno de 85 e 45%, em relação ao controle, na expressão da AOX em presença de NaCl 100 mM e de PEG 200,67 g/L respectivamente. Entretanto, em presença de NaCl 200 mM, o somatório das referidas bandas apresentou-se semelhante ao somatório das do controle (Figura 21C).

A Figura 22 mostra a comparação da expressão da AOX em mitocôndrias purificadas de raízes das cultivares Vita 3 e Vita 5. Quantitativamente a expressão da AOX na cultivar Vita 3 é maior do que a expressão na cultivar Vita 5 independente da condição de tratamento que as plantas sejam submetidas.

2.2 – Análise da expressão de mRNA da AOX

A quantificação do mRNA da AOX foi feita tanto de forma indireta através da transcrição reversa do cDNA da AOX e de sua amplificação por PCR (RT-PCR), como de forma direta através da hibridização do cDNA da AOX de *V. unguiculata* (clone 5) com uma membrana de nylon contendo amostras de RNA total de diferentes tecidos de *V. unguiculata* ("Northern blot").

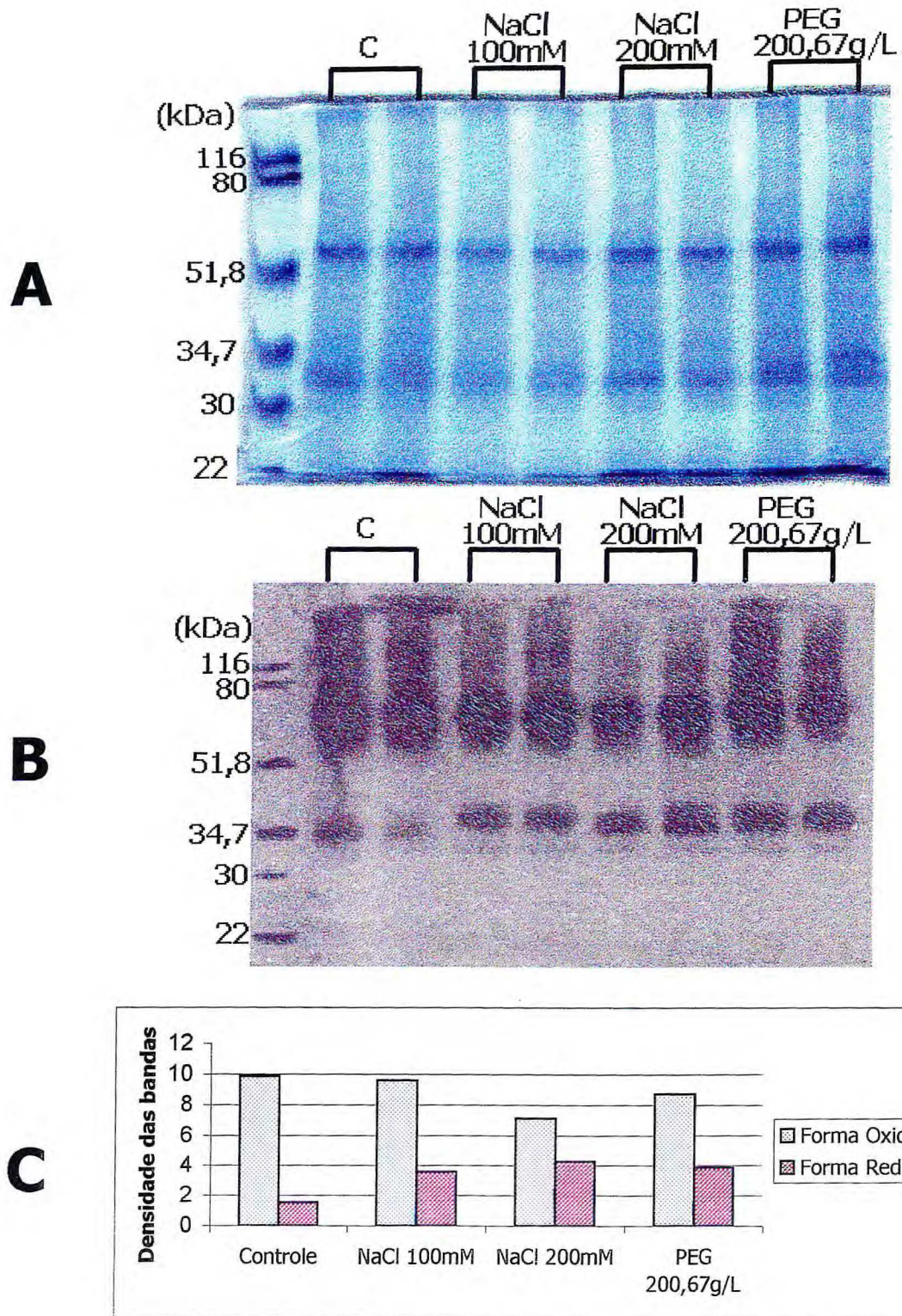


FIGURA 20 – Expressão da oxidase alternativa em mitocôndrias purificadas de raízes de *Vigna unguiculata*, cultivar Vita 3, 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: C (controle), NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L (amostras em duplicata). **(A)** SDS – PAGE (5µg de proteína mitocondrial em cada poço); **(B)** – Western blotting; **(C)** – Gráfico representando as médias das densidades integradas das bandas oxidadas e reduzidas da AOX.

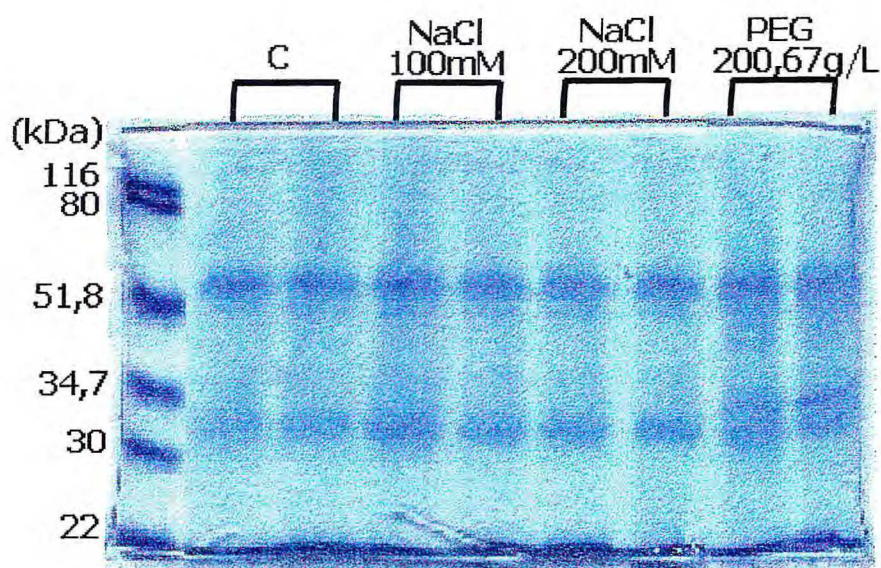
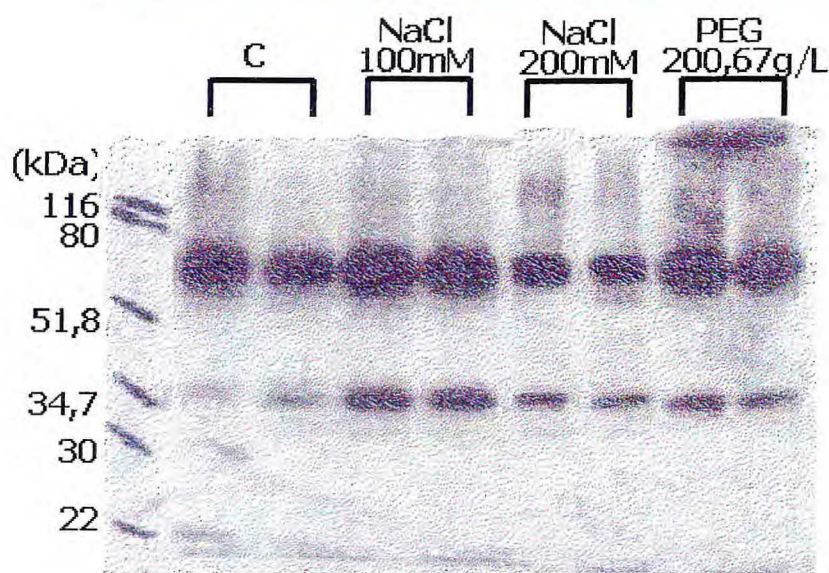
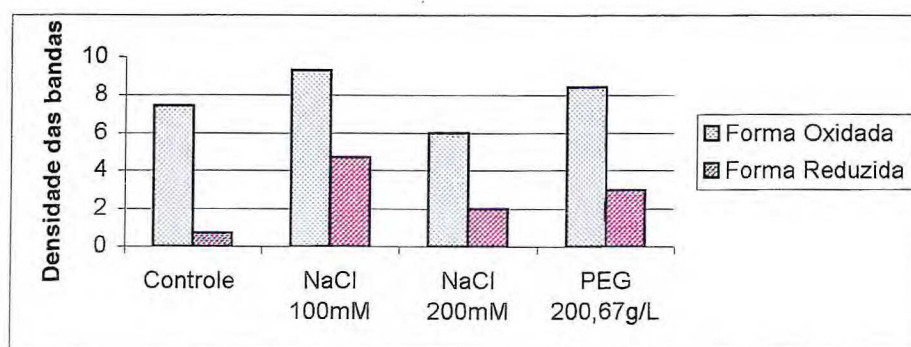
A**B****C**

FIGURA 21 – Expressão da oxidase alternativa em mitocôndrias purificadas de raízes de *Vigna unguiculata*, cultivar Vita 5, 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: C (controle), NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L (amostras em duplicata). **(A)** SDS – PAGE (5µg de proteína mitocondrial em cada poço); **(B)** - Western blotting; **(C)** – Gráfico representando as média das densidades integradas das bandas oxidadas e reduzidas da AOX.

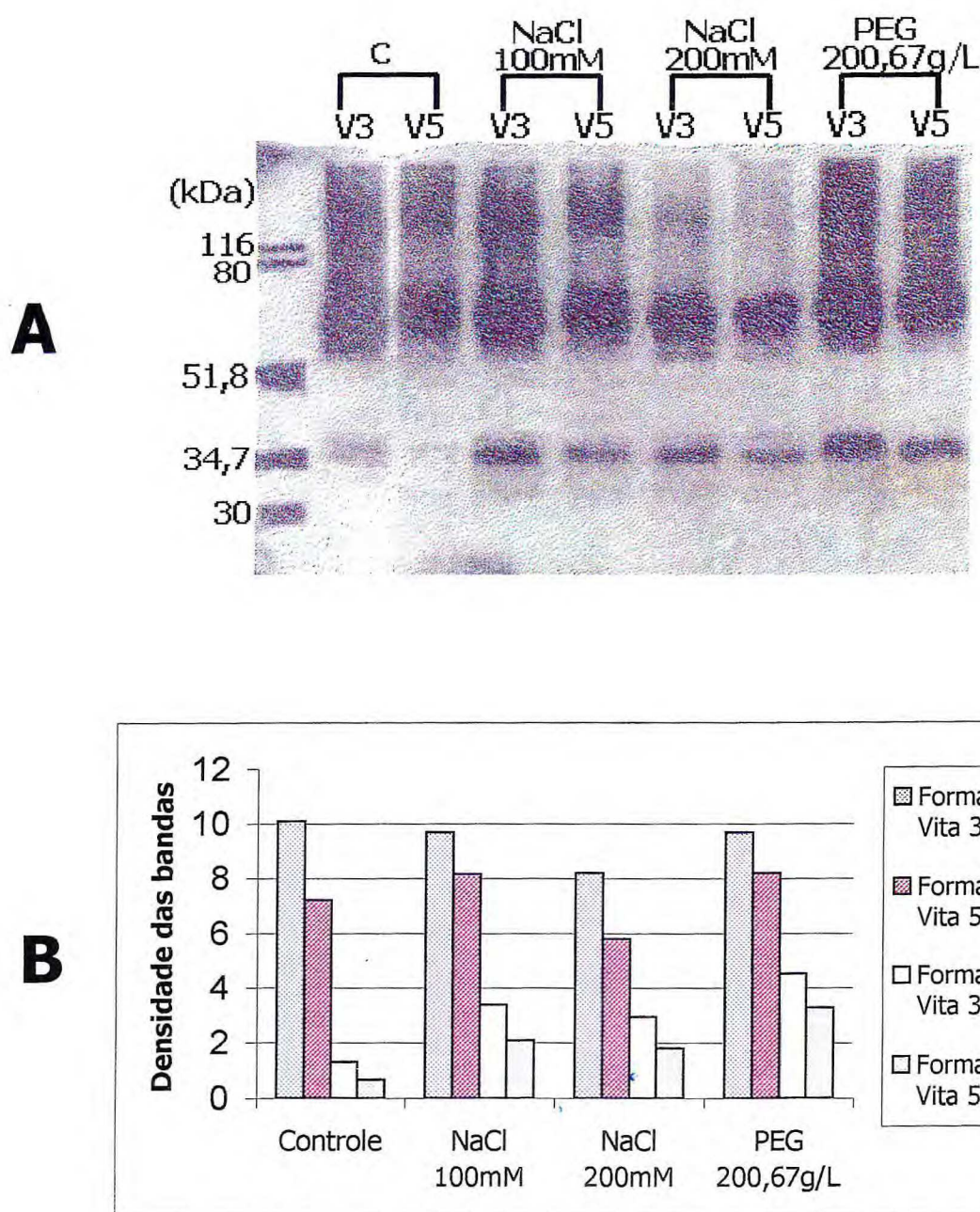


FIGURA 22 – Expressão da oxidase alternativa em mitocôndrias purificadas de raízes de *Vigna unguiculata*, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 5 (V5), 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: C (controle), NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L. **(A)** Western blotting; **(B)** Gráfico representando as densidades integradas das bandas oxidadas e reduzidas da AOX.

2.2.1 – Quantificação de transcritos da AOX por RT-PCR

A Figura 23 mostra a quantificação de transcritos da AOX em raízes de *V. unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, submetidas a diferentes condições: controle, NaCl 100 mM, NaCl 200 mM e PEG 200,67 g/L. A RT-PCR de 1 µg de RNA total utilizando os “primers” aox1 e aox6 amplificou um fragmento de cDNA da AOX de tamanho molecular esperado de 620 pb em todas as condições nas duas cultivares (Figura 23A). A Figura 23B mostra a eletroforese da quantidade de RNA total (c.a. 1µg) usada como matriz para a RT-PCR, onde foram reveladas as bandas de RNAr 25 S e 18 S. A quantidade de cDNA da AOX amplificada foi normalizada pela divisão da densidade da banda de cDNA pela densidade da banda de RNAr 18 S correspondente (Figura 23C) possibilitando assim, corrigir um erro prático de quantificação do RNA total. A Figura 23C mostra então as quantidades relativas de mRNA (cDNA) da AOX em raízes de Vita 3 e Vita 5 submetidas a diferentes condições de estresses, revelando haver uma maior expressão da AOX na cultivar Vita 3 em todas as condições em torno de pelo menos 30%. Com relação ao efeito dos estresses na expressão de mRNA da AOX houve uma diminuição em torno de 30% em Vita 3 e de 50% em Vita 5 apenas quando o estresse foi causado pelo PEG 200,67 g/L. Já nas demais condições (NaCl 100 mM e NaCl 200 mM) não houve diferença significativa em comparação ao controle tanto em Vita 3 quanto em Vita 5.

2.2.2 – Quantificação de transcritos da AOX Através de “Northern blot”

A quantificação de transcritos da AOX através de “Northern blot” é mostrada na Figura 24. Uma banda de mRNA de tamanho aparente de 1,2 kb foi revelada pela hibridização da sonda da AOX de *V. unguiculata* (clone 5) com as diferentes amostras de RNA total de raízes e de folhas das cultivares Vita 3 e Vita 5 (Figura 24A). Na análise da expressão da AOX, a intensidade da banda de mRNA foi normalizada através da divisão da densidade dessa banda pela densidade da banda de RNAr 25 S correspondente (Figura 24B), obtendo um número relativo proporcional a quantidade de mRNA (Figura 24C). Como mostrado na Figura 24C, a expressão da AOX em folhas de Vita 3 de plantas submetidas a estresse com NaCl 100 mM foi semelhante a do controle, aumentou em torno de 100 e 40% em presença de NaCl 200 mM e de PEG 200,67 g/L respectivamente e foi decrescida aproximadamente 30% em presença de PEG 276,28 g/L. Já em raízes da mesma

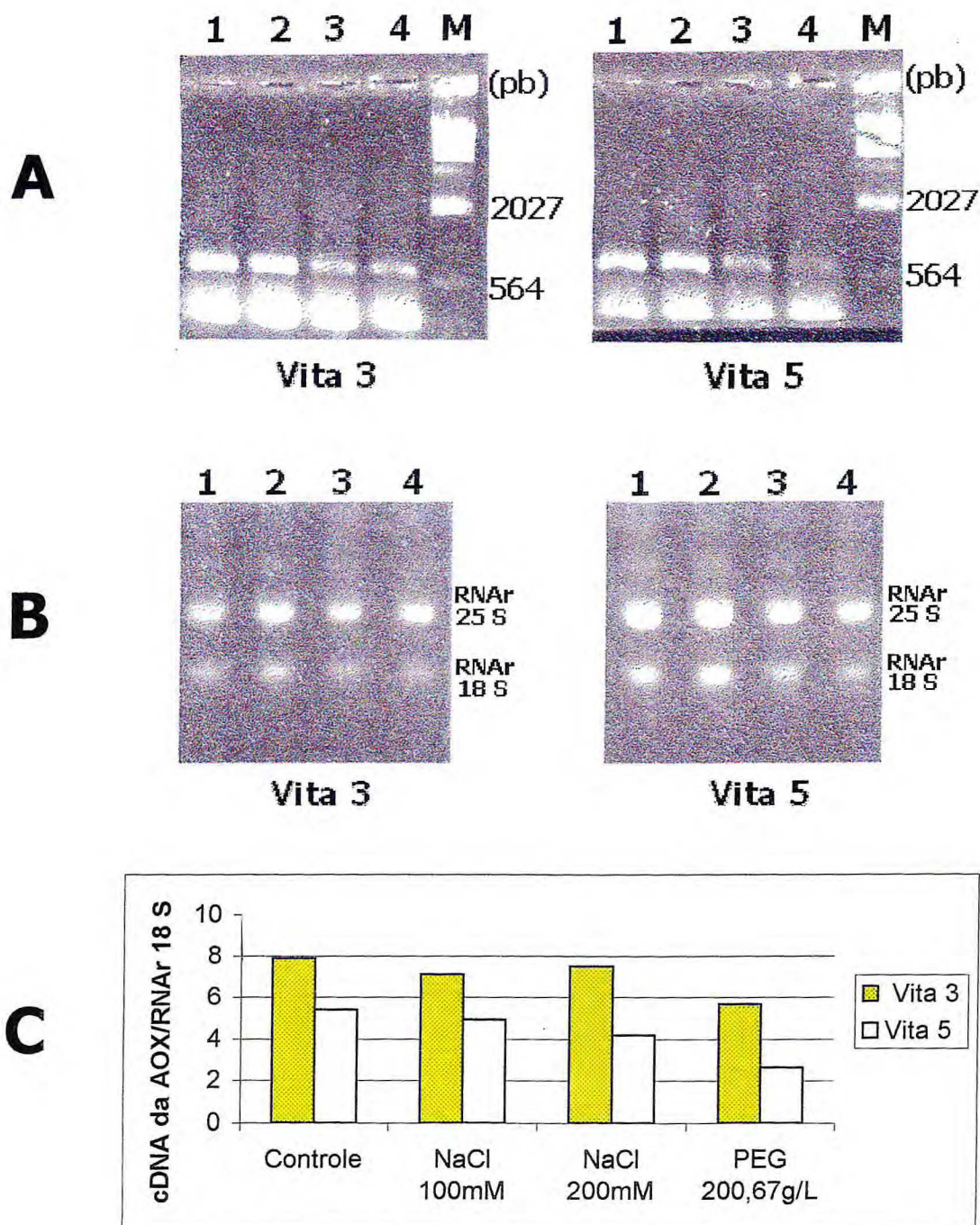


FIGURA 23 – Quantificação de transcritos da oxidase alternativa em raízes de *Vigna unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, 17 dias após a semeadura, submetidas a diferentes condições: controle (1), NaCl 100 mM (2), NaCl 200 mM (3) e PEG 200,67 g/L (4). **(A)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% do cDNA (620 pb) da AOX sintetizado e amplificado por RT-PCR usando os primers *aox1* e *aox6*. **(B)** Eletroforese em gel de agarose 1,5% da quantidade de RNA total (~1µg) utilizada na RT-PCR. **(C)** Gráfico da normalização da quantidade de transcritos dado pela divisão da densidade integrada da banda de cDNA pela densidade da banda de RNAr 18 S correspondente.

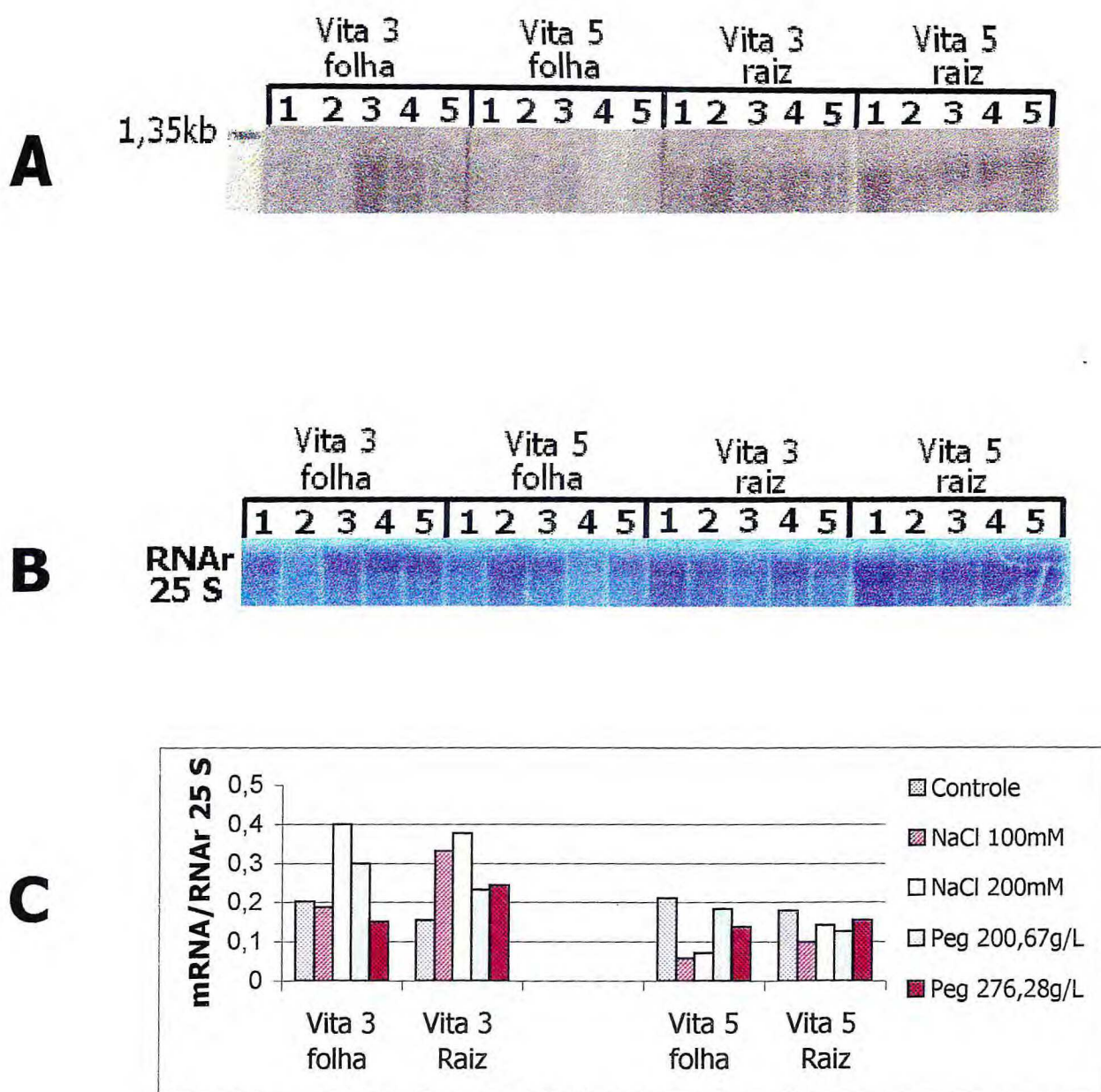


FIGURA 24 – Quantificação de mRNA da oxidase alternativa em raízes e folhas de *Vigna unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, submetidas a diferentes condições: controle (1), NaCl 100mM (2), NaCl 200mM (3), PEG 200,67g/L (4) e PEG 276,28g/L (5). **(A)** Northern blot hibridizado com cDNA da AOX de *V. unguiculata* (clone 5). **(B)** Bandas de RNAr 25 S coradas com azul de metileno após deshibridação da membrana. **(C)** Gráfico representando a quantidade relativa de transcritos da AOX (densidade da banda de mRNA /densidade da banda de RNAr 25 S).

cultivar foi observado um aumento de transcritos em todos os estresses comparados ao controle, variando de 111 a 144% em presença de NaCl 100 e 200 mM respectivamente e de 44 a 55% em presença de PEG 200,67 e 276,28 g/L respectivamente. Contrariamente, em folhas e raízes da cultivar Vita 5 sob condições de estresse, houve uma redução na expressão de mRNA da AOX comparando-se aos respectivos controles. Essa redução de mRNA em folhas de Vita 5 variou de aproximadamente 75% (variação máxima) em presença de NaCl a 17% (variação mínima) em presença de PEG. Já em raízes, a percentagem de redução de transcritos da AOX em condições de estresse foi no máximo 50% em presença de NaCl e no mínimo 10% em presença de PEG.

2.3 – Análise da expressão de genes da AOX a partir de uma biblioteca de cDNA

2.3.1 – “Screenings”

A Figura 25 mostra os 14 clones positivos para AOX que foram coletados no 1º “screening” do banco de cDNA de folhas de *V. unguiculata*, cv. EPACE 1 submetido a um estresse hídrico moderado. Após a realização de 2 “screenings” complementares foram isolados 13 clones uma vez que o clone nº 2 foi perdido na coleta do 1º “screening”.

2.3.2 – Análise dos clones por PCR e por RFLP

A Figura 26 mostra o tamanho dos insertos de cDNA positivos para AOX nos diferentes clones de λ ZIPLOX isolados, amplificados por PCR usando os “primers” universais M13. Esses “primers” são específicos para o plasmídeo pZL1 e se hibridizam nos flancos do sítio de “multi clonagem” possibilitando amplificar um cDNA inserido nesse plasmídeo. Essencialmente, os clones positivos para AOX apresentaram dois padrões de tamanhos diferentes. Os clones 1, 4, 8, 11 e 12 revelaram uma banda de tamanho aparente de 850 pb e os clones 3, 6, 7, 10 e 13 apresentaram uma banda em torno de 1.450 pb. Os clones 5, 9 e 14 não apresentaram amplificação.

Os perfis de RFLP (“Restriction Fragments Length Polymorphism”) dos diferentes clones são mostrados nas Figuras 27 e 28. A Figura 27 mostra o perfil de RFLP da digestão do DNA bacteriofágico λ ZIPLOX com as enzimas de restrição *Bam*H

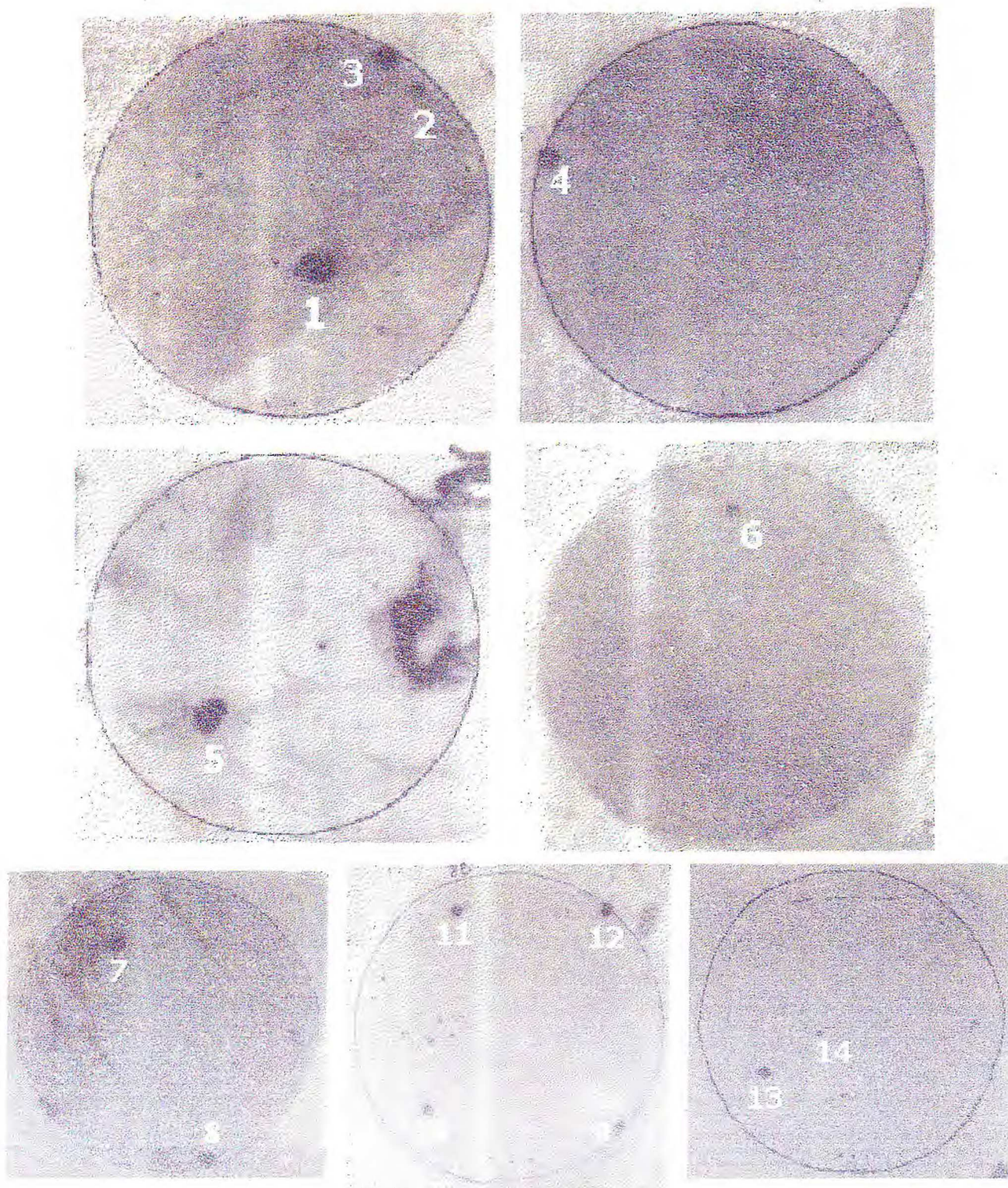


FIGURA 25 – Radiografias dos filmes de raio-X revelados no 1º “screening” da biblioteca de cDNA de folhas de *Vigna unguiculata*. Os números de 1 a 14 indicam os clones positivos da AOX isolados.



FIGURA 26 – Tamanho dos insertos positivos para AOX dos diferentes clones λ ZIPLOX isolados no 3º "screening". Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos insertos amplificados por PCR usando os primers universais M13. Os números de 1 a 14 indicam os respectivos clones e M o marcador de tamanho molecular (DNA "ladder" 100bp).

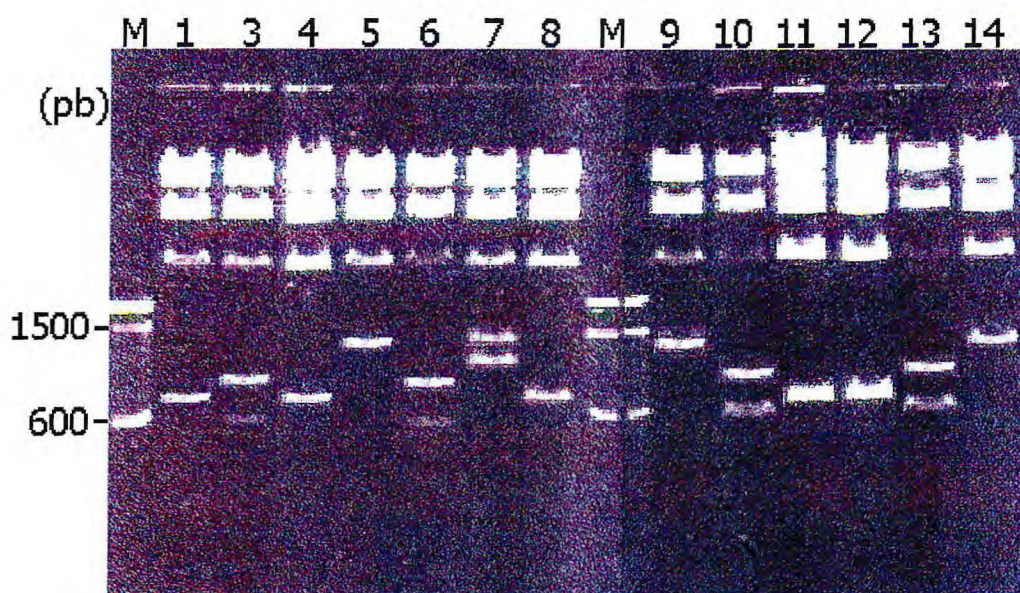


FIGURA 27 – Digestão do DNA bacteriofágico λ ZIPLOX dos diferentes clones positivos para AOX isolados no 3º "screening". Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de DNA obtidos em presença das enzimas de restrição *Bam*H I e *Eco*R I. Os números de 1 a 14 indicam os respectivos clones e M o marcador de tamanho molecular (DNA "ladder" 100bp).

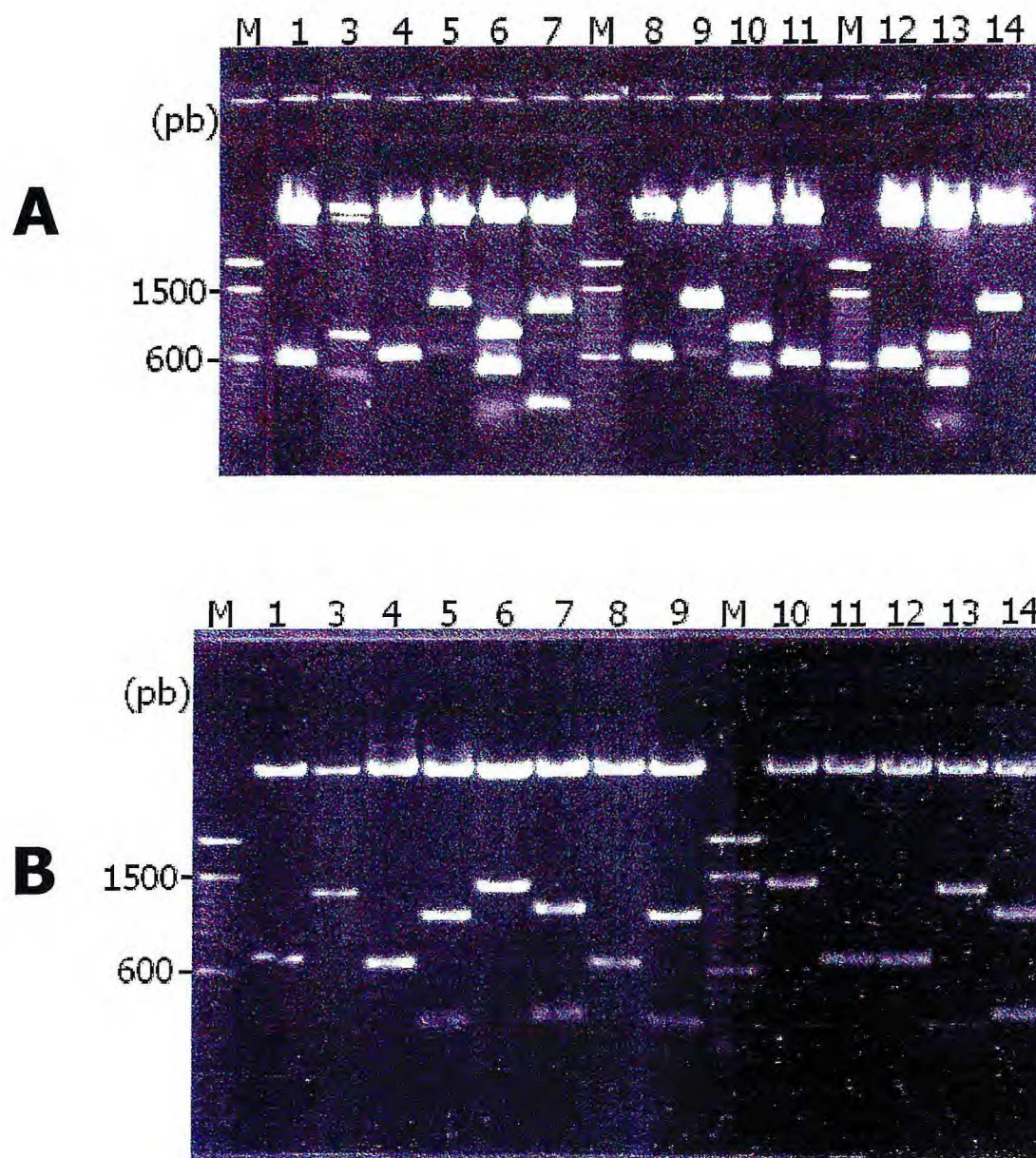


FIGURA 28 – Digestão do DNA plasmídico pZL1 dos clones positivos para AOX. Eletroforeses em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de DNA dos diferentes clones obtidos em presença das enzimas de restrição: **(A)** *Bam*H I e *Eco*R I; **(B)** *Hind* III e *Pst* I. Os números de 1 a 14 indicam os respectivos clones e M o marcador de tamanho molecular (DNA "ladder" 100bp).

I e *EcoR* I que são específicas para os flancos do sítio de poli clonagem do plasmídeo pZL1 onde está inserido o cDNA de interesse. As bandas superiores representam “os braços” do DNA λ ZIPLOX e as bandas menores, com tamanhos entre 600 e 1.500 pb, correspondem aos insertos. Os clones 1, 4, 8, 11 e 12 apresentaram uma única banda de aproximadamente 700 pb e os clones 5, 9, e 14 também apresentaram uma única banda em torno de 1.400 pb. Por outro lado, os clones 3, 6, 10 e 13 revelaram duas bandas de tamanhos aparentes de 800 e 600 pb e o clone 7 apresentou um perfil estranho de duas bandas em torno de 1.400 e 1.200 pb. A Figura 28 mostra a digestão do DNA plasmídico pZL1 com as enzimas de restrição *BamH* I e *EcoR* I (Figura 28A) e *Hind* III e *Pst* I (Figura 28B). O DNA plasmídico possui sítios de restrição que flanqueiam o inserto e são específicos para as referidas enzimas. As Figuras 28A e 28B apresentam em todos os clones positivos para AOX uma banda superior de tamanho aproximado de 4.300 pb correspondente ao plasmídeo pZL1 sem o inserto, enquanto que as bandas que aparecem principalmente entre os tamanhos de 600 e 1.500 pb correspondem aos insertos. O perfil de RFLP dos insertos obtidos da digestão do DNA plasmídico pZL1 com as enzimas *BamH* I e *EcoR* I foi semelhante ao perfil apresentado pela digestão do DNA bacteriofágico com as mesmas enzimas, com exceção do clone 7 que apresentou duas bandas, uma em torno de 1.200 pb e outra de aproximadamente 200 pb. A digestão do DNA plasmídico com as enzimas *Hind* III e *Pst* I apresentou três padrões de cortes de restrição diferentes. Os clones 1, 4, 8, 11 e 12 revelaram uma única banda correspondente ao inserto de tamanho molecular em torno de 700 pb e os clones 3, 6, 10 e 13 apresentaram uma única banda em torno de 1.350 pb. Já os clones 5, 9 e 14 apresentaram duas bandas com tamanhos aproximados de 1.200 e 200 pb. O clone 7, igualmente aos clones 5, 9 e 14 também apresentou duas bandas mas com diferentes tamanhos que foram em torno de 1.250 e 250 pb (Figura 28B).

2.3.3 – Seqüenciamento de clones de cDNA da AOX

A análise dos perfis de PCR (Figura 26) e de RFLP (Figuras 27 e 28) revelou a existência de 4 padrões distintos de clones. Padrão A: clones 1, 4, 8, 11 e 12; padrão B: clones 3, 6, 10 e 13; padrão C: clones 5, 9 e 14; padrão D: somente o clone 7. Dessa forma, foi selecionado um clone de cada padrão (clones 8, 3, 5 e 7) para o seqüenciamento dos insertos. Os insertos (cDNAs) dos clones 3, 5 e 8 foram

seqüenciados completamente sendo observado por comparação de seqüências com outras espécies de plantas que os cDNAs dos clones 3 e 5 eram completos, enquanto que o cDNA do clone 8 era incompleto e possuía 100% de identidade com parte da seqüência do cDNA da AOX do clone 3. O cDNA do clone 7 foi parcialmente seqüenciado sendo observado que era um híbrido do cDNA do clone 5 com outra seqüência diferente que não codificava para AOX.

O cDNA da AOX do clone 3 (Figura 29) apresentou um tamanho molecular de 1.201 pb. Tomando a fita senso 5'-3' como correspondente ao mRNA foi observado que esse cDNA possuía 19 bases na extremidade não codante 5', 195 bases na extremidade não codante 3' sendo 23 correspondentes à cauda poli A e um "Open reading frame" (ORF) de 987 bases que codificavam para 329 aminoácidos. Já o cDNA da AOX do clone 5 (Figura 30) apresentou um tamanho molecular de 1203 pb, onde foram observadas 79 bases na extremidade não codante 5', um ORF de 978 bases codificando para 326 aminoácidos e 146 bases na extremidade não codante 3' que continha uma cauda poli A de 15 bases.

2.3.4 – Análise da expressão da AOX de clones isolados

Os perfis de PCR (Figura 26) e RFLP (Figuras 27 e 28) e o seqüenciamento dos cDNAs (Figuras 29 e 30) sugerem que em plantas de EPACE 1 sob condições de estresse hídrico moderado houve pelo menos a expressão de 2 genes diferentes da AOX, um gene representado pelo Vu-clone 3 (clones completos 3, 6, 10 e 13, além dos incompletos 1, 4, 8, 11 e 12) e o outro representado pelo Vu-clone 5 (clones 5, 9, 7 e 14) fazendo uma razão de 9 clones para o gene Vu-clone 3 e 4 clones para o gene Vu-clone 5.

2.3.5 – Análise das AOXs de *Vigna unguiculata*

A comparação entre as seqüências protéicas da AOX Vu-clone 3 e da AOX Vu-clone 5 (Figura 31) mostra que há uma homologia de 65% entre as duas proteínas sendo as diferenças observadas principalmente na extremidade N- terminal onde é encontrada a seqüência do peptídeo sinal. O sítio de clivagem do peptídeo sinal nos dois clones foi presumido pela comparação de seqüências peptídicas já determinadas em soja (Finnegan *et al.*, 1997), pela arginina (R) na posição -2 e através do programa PSORT que utiliza o método de Nakai & Kanehisa (1992). Os "motifs"

Vu-clone 3

```

          1                                10
GCGATTCTTCTCTCGAGAG ATG AAG TTC ATT GCA TTG AGT TGT ACG GTT CGG CGA GCT CTG 61
                      M  K  F  I  A  L  S  C  T  V  R  R  A  L
          20                                30
CTC AAT GGC CGC AAC TGC AAC GGC CTC GGT TCG ACG GCG GTG ATG GCA TAT GCG GCA CCG 121
L  N  G  R  N  C  N  G  L  G  S  T  A  V  M  A  Y  A  A  P
          40                                50
GAA ACG AGG TTT CTC TGT GCC GGC GCC GCT AAC GGA GGT CTC TTC TAC TGG AGG AGG TCG 181
E  T  R  F  L  C  A  G  A  A  N  G  G  L  F  Y  W  R  R  S
          60                                70
ATG GCT TCG CAG GCG GAA GCT AAG TTG CCG GAG AAG GAT AAG GAG AAG GCC GAG GCC GAG 241
M  A  S  Q  A  E  A  K  L  P  E  K  D  K  E  K  A  E  A  E
          80                                90
AAG AGT GTG GTA GAG TCC AGT TAT TGG GGG ATT TCG AGG CCG AGG ATT ATG AGA GAG GAC 301
K  S  V  V  E  S  S  Y  W  G  I  S  R  P  R  I  M  R  E  D
          100                               110
GGA ACG GAG TGG CCT TGG AAC TGC TTC ATG CCT TGG GAG ACT TAT CAT TCA AAC CTG TCG 361
G  T  E  W  P  W  N  C  F  M  P  W  E  T  Y  H  S  N  L  S
          120                               130
ATA GAT CTT ACT AAA CAT CAT GTG CCA AAG AAT TTT CTG GAC AAA GTT GCT TAC AGG ACC 421
I  D  L  T  K  H  H  V  P  K  N  F  L  D  K  V  A  Y  R  T
          140                               150
GTG AAA CTC CTC AGA ATT CCT ACA GAT TTG TTT TTT CAG AGA CGG TAT GGT TGC CGC GCA 481
V  K  L  L  R  I  P  T  D  L  F  F  Q  R  R  Y  G  C  R  A
          160                               170
ATG ATG CTA GAA ACA GTT GCA GCT GTA CCT GGC ATG GTA GGA GGG ATG TTG TTG CAC CTC 541
M  M  L  E  T  V  A  A  V  P  G  M  V  G  G  M  L  L  H  L
          180                               190
AGG TCT CTC CGT AAG TTT CAG CAA AGC GGT GGT TGG ATC AAA GCA TTG ATG GAG GAA GCA 601
R  S  L  R  K  F  Q  Q  S  G  G  W  I  K  A  L  M  E  E  A
          200                               210
GAA AAT GAG AGA ATG CAC CTA ATG ACT ATG GTG GAA CTT GTG AAG CCC AAA TGG TAC GAA 661
E  N  E  R  M  H  L  M  T  M  V  E  L  V  K  P  K  W  Y  E
          220                               230
AGA CTG CTG GTT ATT GCT GTA CAG GGA GTT TTC TTC AAT GCG TTT TTC GTA CTT TAC ATA 721
R  L  L  V  I  A  V  Q  G  V  F  F  N  A  F  F  V  L  Y  I
          240                               250
CTC TCC CCC AAG GTG GCT CAT AGA ATA GTT GGG TAC CTT GAG GAG GAG GCT ATA CAT TCT 781
L  S  P  K  V  A  H  R  I  V  G  Y  L  E  E  E  A  I  H  S
          260                               270
TAC ACG GAG TAT TTA AAG GAT ATT GAA AGT GGT GCA ATC GAA AAT GTT CCT GCT CCT GCC 841
Y  T  E  Y  L  K  D  I  E  S  G  A  I  E  N  V  P  A  P  A
          280                               290
ATT GCA ATA GAC TAC TGG AGG CTT CCC AAG GAT GCC AAA TTG AAA GAT GTT ATA ACA GTC 901
I  A  I  D  Y  W  R  L  P  K  D  A  K  L  K  D  V  I  T  V
          300                               310
ATT CGT GCT GAC GAG GCT CAT CAT CGA GAT GTG AAT CAT TTT GCT TCT GAT ATC CAC TTT 961
I  R  A  D  E  A  H  H  R  D  V  N  H  F  A  S  D  I  H  F
          320
CAA GGT AAA GAA CTG CGG GAA GCA CCA GCT CCT ATT GGT TAT CAC TAA GTCTTTGCTGCCACG 1024
Q  G  K  E  L  R  E  A  P  A  P  I  G  Y  H  *
AAGATGAAGTACGTTTTGCTTAGTACAGTCCTTTACCATGACACCGTTGGATATAGCATTTAAAGTAAATATGTCAATG 1103
ATTATAGTGCAATATCTCATCTGAGAACCATGTATGTTACCATGATATAGATAAGTACTTCTTCCTCGAGTAAAAA 1182
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1201

```

FIGURA 29 – Sequências nucleotídica (em preto) e de aminoácidos deduzidos (em verde) a partir do cDNA que codifica a oxidase alternativa de *Vigna unguiculata* (Vu-clone 3). * indica o códon de terminação da tradução protéica.

Vu-clone 5

ATTTTCATTACAGAAAGATCTCAGCCATTTTCATTACAGATCAAGAAATAGAAAC																				56
1										10										
ATTACATGCTGTCAAGATCCACC	ATG	AAG	CAT	ACT	TTA	GTA	AGG	TCA	GCG	GCA	CGA	GCT	CTG	CTT						121
	M	K	H	T	L	V	R	S	A	A	R	A	L	L						
20										30										
GGC GGC GGC CGT AGC TAC	TAC	CGC	CAC	GCC	CCA	ACA	GCG	GCG	ATC	GTG	GAG	CCG	ACA	CGC						181
G G G R S Y Y	R	H	A	P	T	A	A	I	V	E	P	T	R							
40										50										
CAG CAT GGC GGC GGC GCG	TTT	GGA	AGC	TTC	TAT	TTG	CGG	AGG	ATG	TCC	ACT	CTT	CCA	GAC						241
Q H G G G A F	G	S	F	Y	L	R	R	M	S	T	L	P	D							
60										70										
ATC AAG GAT CAC AAC TCA	GAG	GAG	AAA	AAA	AAC	GAG	GTC	AAA	GAC	GAC	AAC	ACC	AAC	GCC						301
I K D H N S E	E	K	K	N	E	V	K	D	D	N	T	N	A							
80										90										
GTC ATT TCC AGT TAC TGG	GGG	ATC	TCA	AGA	CCC	AAG	GTC	GCG	AGG	GAG	GAC	GGA	ACT	GAG						361
V I S S Y W	G	I	S	R	P	K	V	R	R	E	D	G	T	E						
100										110										
TGG CCA TGG AAC TGT TTC	ATG	CCA	TGG	GAT	ACT	TAC	CAC	TCA	GAT	GTG	TCA	ATA	GAC	GTG						421
W P W N C F	M	P	W	D	T	Y	H	S	D	V	S	I	D	V						
120										130										
ACC AAG CAT CAC ACA CCG	AAG	TCG	TTA	ACC	GAC	AAG	GTT	GCT	TTT	AGG	TCT	GTC	AAG	TTT						481
T K H H T P	K	S	L	T	D	K	V	A	F	R	S	V	K	F						
140										150										
CTA AGG GTT CTC TCT GAT	TTA	TAC	TTC	AAG	GAA	CGG	TAT	GGG	TGC	CAT	GCC	ATG	ATG	CTG						541
L R V L S D	L	Y	F	K	E	R	Y	G	C	H	A	M	M	L						
160										170										
GAA ACA ATT GCA GCG GTT	CCA	GGA	ATG	GTG	GGA	GGG	ATG	CTG	CTG	CAC	CTG	AAG	TCT	CTG						601
E T I A A V	P	G	M	V	G	G	M	L	L	H	L	K	S	L						
180										190										
AGG AAG TTT CAG CAC TCT	GGG	GGA	TGG	ATC	AAG	GCA	TTG	CTT	GAG	GAA	GCA	GAG	AAC	GAG						661
R K F Q H S	G	G	W	I	K	A	L	L	E	E	A	E	N	E						
200										210										
AGG ATG CAC CTT ATG ACG	ATG	GTG	GAG	CTG	GTG	CAG	CCA	AAA	TGG	CAC	GAG	AGG	CTT	CTG						721
R M H L M T	M	V	E	L	V	Q	P	K	W	H	E	R	L	L						
220										230										
ATT TTC ACT GCA CAG GGC	GTT	TTC	TTC	AAC	GCA	TTC	TTC	GTC	TTT	TAC	CTC	CTC	TCA	CCA						781
I F T A Q G	V	F	F	N	A	F	F	V	F	Y	L	L	S	P						
240										250										
AAA GCA GCA CAC AGG TTT	GTT	GGG	TAC	TTA	GAG	GAA	GAG	GCT	GTG	ATT	TCA	TAC	ACA	CAA						841
K A A H R F	V	G	Y	L	E	E	E	A	V	I	S	Y	T	Q						
260										270										
CAT TTG GAA GCA ATT GAG	AGT	GGC	AAA	GTT	GAA	AAC	GTC	CCT	GCT	CCT	GCC	ATT	GCC	ATC						901
H L E A I E	S	G	K	V	E	N	V	P	A	P	A	I	A	I						
280										290										
GAC TAC TGG AGG CTC CCC	AAG	GAT	GCA	ACT	CTC	AAA	GAC	GTT	GTC	ACT	GTG	ATT	CGT	GCA						961
D Y W R L P	K	D	A	T	L	K	D	V	V	T	V	I	R	A						
300										310										
GAT GAG GCT CAC CAC AGA	GAT	GTC	AAC	CAC	TTT	GCT	TCT	GAT	ATT	CAC	CAC	CAA	GGA	AAG						1021
D E A H H R	D	V	N	H	F	A	S	D	I	H	H	Q	G	K						
320																				
GAA TTA AGA GAT GCT CCA	GCT	CCT	ATT	GGT	TAC	CAT	TGA	GCCATTGTTTGTAA	AACCATTTGTAGC											1087
E L R D A P	A	P	I	G	Y	H	*													
TTTTCTCATCTAAACTTTTCTATTCGTGCCTGGAGGTTCAATAAAATGTATTTTCACTCACTTTTAAACAGAAAGTTTTA																				1166
TTGAGATCAGTAGTTATATTATAAAAAAAAAAAAAAAAAA																				1203

FIGURA 30 – Sequências nucleotídica (em preto) e de aminoácidos deduzidos (em azul) a partir do cDNA que codifica a oxidase alternativa de *Vigna unguiculata* (Vu-clone 5). * indica o códon de terminação da tradução protéica.

RSMASQ na AOX Vu-clone 3 e RRMSTL na AOX Vu-clone 5 foram determinados como pontos de clivagem possibilitando a dedução da seqüência da proteína matura onde as AOX Vu-clone 3 e Vu clone 5 teriam 274 e 277 resíduos de aminoácidos respectivamente.

A Figura 32 compara seqüências protéicas das AOXs de soja Gm AOX1, Gm AOX2a, Gm AOX2b e de feijão de corda Vu-clone 3 e Vu-clone 5. O alinhamento das diferentes seqüências mostra 8 zonas de consenso com pelo menos 6 aminoácidos, nessa ordem: **AMMLET, AAVPGMV, EEAENERMHLMT, QGVFFNA, GYLEEEA, ENVPAPAIAIDYW, RADEAHHRDVNHFASDIH e APIGYH**. A proteína Gm AOX1 mostrou maior diferença entre as seqüências, apresentando uma homologia de 58, 53, 60 e 54% com Gm AOX2a, Gm AOX2b, Vu-clone 3 e Vu-clone 5, respectivamente. Gm AOX2a e Gm AOX2b tinham uma homologia de 68%, semelhante a apresentada entre Gm AOX2a e Vu-clone 5 que era de 69%, enquanto que a homologia entre Gm AOX2b e Vu-clone 3 foi de 64%. Por outro lado, Gm AOX2a apresentou alta homologia (90%) com Vu-clone 3 da mesma forma que Gm AOX2b foi 91% idêntica a Vu-clone 5.

As Figuras 33 e 34 mostram as comparações de seqüências protéicas de Gm AOX2a com Vu-clone 3 e Gm AOX2b com Vu-clone 5, respectivamente. Foi observado que as diferenças entre as respectivas seqüências de aminoácidos ocorria principalmente no peptídio sinal.

A árvore filogenética da AOX comparando diferentes espécies de plantas, algas verdes, protozoários, fungos e proteínas homólogas de cloroplastos é mostrada na Figura 35. Como já observado por Considine *et al.* (2002), em plantas há dois grupos diferenciados da AOX, um grupo formado pelas AOXs do tipo 1 e o outro formado pelas AOXs do tipo 2 (representado por Gm AOX2a, **Vu-clone 3**, Gm AOX2b, **Vu-clone 5**, At AOX2 e Mi AOX2). A distância filogenética entre as proteínas Gm Aox2b e Vu-clone 5 foi um pouco maior do que a distância observada entre as proteínas Gm AOX2a e Vu-clone3. Pode ser observado também que as proteínas homólogas de cloroplasto possuem uma grande distância filogenética quando comparadas com as AOXs mitocondriais correspondentes de *A. thaliana* como também de outras espécies de plantas.

Gm_Aox2a	MKLTALNSTVRRALLNGRNQNGNRLGSAALMPYAAAETRLLCAGGANGWFFYWKRTMVSP	60
Vu-clone3	MKFIALSCTVRRALLNGRNCNG--LGSTAVMAYAAPETRELCAGAANGGLFYWRRSMASQ	58
	** : ** . ***** ** *** : * : * . *** . *** : *** . *** : *** : * : * . *	
Gm_Aox2a	AEAKVPEKEKEKEKAKAEKSVVESSYWGISRPKVVREDGTEWPWNCFMPWESYRSNVSID	120
Vu-clone3	AEAKLPEKDKEK--AEAEKSVVESSYWGISRPRIMREDGTEWPWNCFMPWETYSNLSID	116
	**** : *** : *** * : ***** : : : ***** : * : ** : ***	
Gm_Aox2a	LTKHHVPKNVLDKVAAYRTVKLLRIPTDLFFKRRYGCRAMMLETVAAVPGMVGGMLLHLRS	180
Vu-clone3	LTKHHVPKNFLDKVAAYRTVKLLRIPTDLFFQRRYGCRAMMLETVAAVPGMVGGMLLHLRS	176
	***** . ***** : ***** : *****	
Gm_Aox2a	LRKFQQSGGWIKALLLEEAENERMHLMTMVELVKPKWYERLLVLAVQGVFFNAFFVLYILS	240
Vu-clone3	LRKFQQSGGWIKALMEEAENERMHLMTMVELVKPKWYERLLVLAVQGVFFNAFFVLYILS	236
	***** : ***** : *****	
Gm_Aox2a	PKVAHRIVGYLEEEAIHSYTEYLDLESAGAIENVPAPAIADYWRLPKDARLKDVITVIR	300
Vu-clone3	PKVAHRIVGYLEEEAIHSYTEYLDLESAGAIENVPAPAIADYWRLPKDAKLKDVITVIR	296
	***** : ***** : *****	
Gm_Aox2a	ADEAHHRDYNHFA SDIHFQGKELREAPAPIGYH	333
Vu-clone3	ADEAHHRDYNHFA SDIHFQGKELREAPAPIGYH	329

FIGURA 33 – Comparação das seqüências de aminoácidos entre as oxidases alternativas de *Vigna unguiculata* (Vu-clone 3) e de *Glycine max* (Gm Aox2a). As regiões de consenso estão marcadas em azul. A numeração corresponde à contagem dos resíduos de aminoácidos.

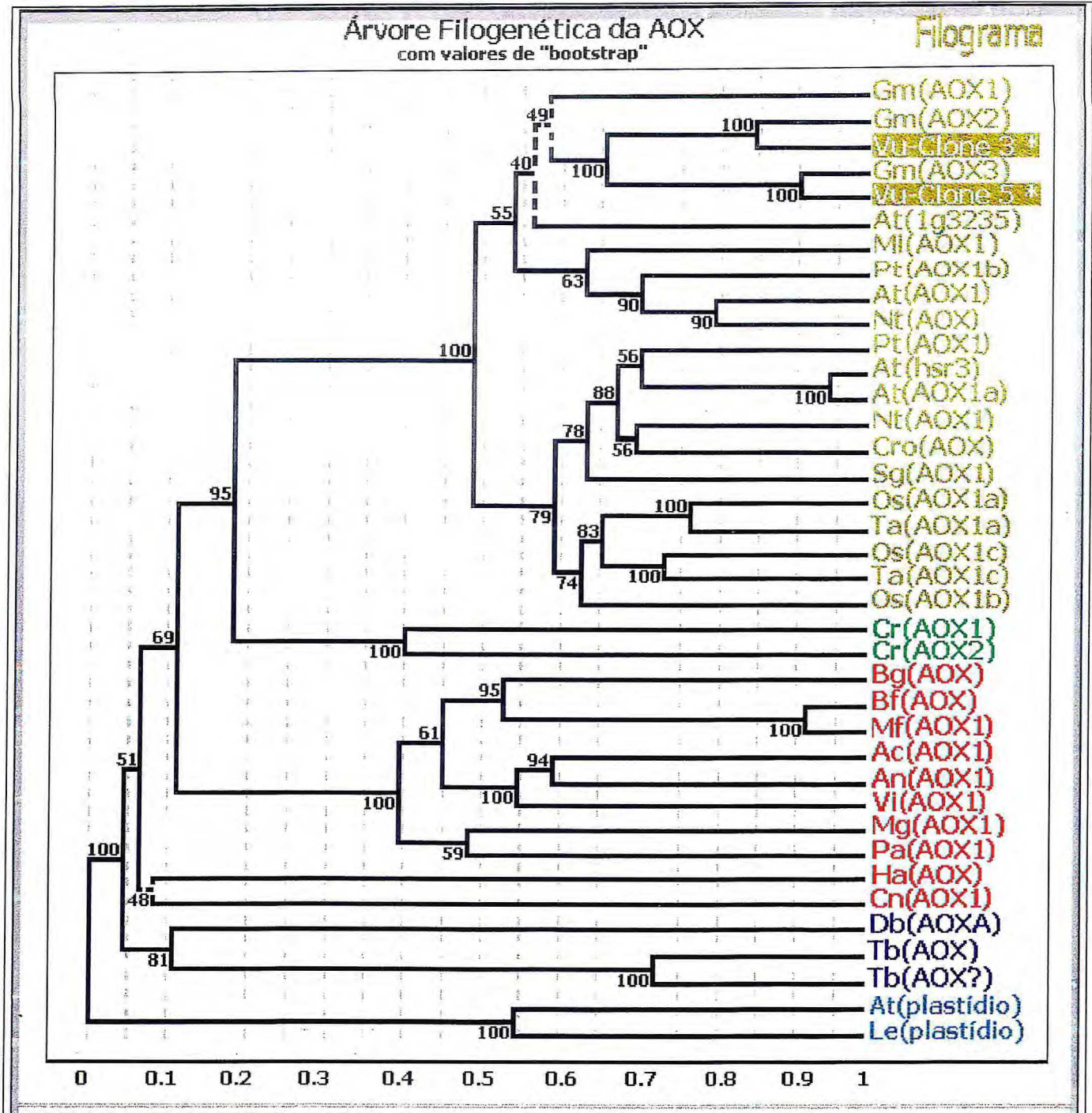


FIGURA 35 – Árvore filogenética da oxidase alternativa. A árvore filogenética foi construída através da submissão "on line" ao site: <http://www.genebee.msu.su>, de seqüências em aminoácidos completas da AOX de várias espécies obtidas do "GenBank". Ac (*Ajellomyces capsulatus*), An (*Aspergillus niger*), At (*Arabidopsis thaliana*), Bf (*Botryotinia fuckeliana*), Bg (*Blumeria graminis*), Cn (*Cryptococcus neoformans*), Cr (*Chlamydomonas reinhardtii*), Cro (*Catharanthus roseus*), Dd (*Dictyostelium discoideum*), Gm (*Glycine max*), Ha (*Hansenula anomala*), Le (*Lycopersicon esculentum*), Mf (*Monilinia fructicola*), Mg (*Magnaporthe grisea*), Mi (*Mangifera indica*), Nt (*Nicotiana tabacum*), Os (*Oryza sativa*), Pa (*Podospora anserina*), Pt (*Populus tremula x Populus tremuloides*), Sg (*Sauromatum guttatum*), Ta (*Triticum aestivum*), Tb (*Trypanosoma brucei*), Vi (*Venturia inaequalis*), Vu-clone 3 & Vu-clone 5 (*Vigna unguiculata*),. Em amarelo ouro (plantas), verde (algas verdes), azul (protistas), vermelho (fungos) e verde musgo (proteínas homólogas de cloroplasto).

3 – EXPRESSÃO DA OXIDASE ALTERNATIVA DE *Vigna unguiculata* em *E. coli*.

3.1 – Preparação do plasmídio de expressão e do inserto da AOX para ligação

A Figura 36 mostra a discriminação das diferentes partes do cDNA da AOX de *V. unguiculata* (Vu-clone 5). A seqüência codante da proteína madura (837pb), mostrada em azul, foi amplificada com extremidades de sítios de restrição *Bam*H I e *Pst* I para ser ligada ao vetor de expressão pQE-30. As etapas de preparação do inserto da AOX e do plasmídio de expressão foram acompanhadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 37). A Figura 37A acompanha a preparação do plasmídio pQE-30. Após digestão, desfosforilação e purificação, o plasmídio linearizado (pQE-30 digerido) apresentou um tamanho de aproximadamente 3,4 kpb, enquanto que o plasmídio circular (pQE-30 não digerido) migrou de forma diferente. A Figura 37B mostra o inserto da AOX (Vu-clone 5) correspondente à proteína madura, amplificado por PCR usando os "primers" aox12 e aox13. Teoricamente o inserto tinha 859 pb uma vez que haviam sido adicionados os sítios de restrição *Bam*H I e *Pst* I nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O inserto foi posteriormente digerido pelas enzimas *Bam*H I e *Pst* I e purificado (Figura 37C), ficando disponível para a ligação ao vetor.

3.2 – Plasmídio recombinante

A eletroforese da Figura 38 controla a ligação do plasmídio de expressão ao inserto da AOX. Foi observado que o plasmídio recombinante (poço nº 2) tinha um tamanho molecular maior do que o plasmídio vazio (poço nº 1). Quando esses plasmídios foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Pst* I (poços nºs 3 e 4) observou-se que no plasmídio recombinante (poço nº 4) havia um inserto de tamanho aproximado de 850 pb não havendo nenhuma banda correspondente no plasmídio vazio (poço nº 3). A inserção da AOX foi confirmada pela PCR do plasmídio recombinante com os "primers" específicos aox12 e aox13 (poço nº 5) que apresentou uma banda de mesmo tamanho molecular comparado à da digestão do plasmídio recombinante (poço nº 4).

3.3 – Purificação e detecção da oxidase alternativa recombinante

A purificação e a detecção da proteína recombinante é mostrada na Figura 39.

5' **ATTTTCATTTCACAGAAGATCTCAGCCATTTTCATTTCACAGATCAAGAAATAG**
AAACATTACATGCTGTCAAGATCCACCATGAAGCATACTTTAGTAAGGTCAGCG
GCACGAGCTCTGCTTGGCGGCGGCCGTAGCTACTACCGCCACGCCCAACAGCG
GCGATCGTGGAGCCGACACGCCAGCATGGCGGCGGCGCGTTTGGAAGCTTCTAT
TTGCGGAGGATGTCCACTCTTCCAGACATCAAGGATCACAACCTCAGAGGAGAAA
 AAAAACGAGGTCAAAGACGACAACACCAACGCCGTCATTTCCAGTTACTGGGGG
 ATCTCAAGACCCAAGGTCCGCAGGGAGGACGGAACCTGAGTGGCCATGGAACGT
 TTCATGCCATGGGATACTTACCACTCAGATGTGTCAATAGACGTGACCAAGCAT
 CACACACCGAAGTCGTTAACCGACAAGGTTGCTTTTAGGTCTGTCAAGTTTCTA
 AGGGTTCTCTCTGATTTATACTTCAAGGAACGGTATGGGTGCCATGCCATGATG
 CTGGAAACAATTGCAGCGGTTCCAGGAATGGTGGGAGGGATGCTGCTGCACCTG
 AAGTCTCTGAGGAAGTTTCAGCACTCTGGGGGATGGATCAAGGCATTGCTTGAG
 GAAGCAGAGAACGAGAGGATGCACCTTATGACGATGGTGGAGCTGGTGCAGCCA
 AAATGGCACGAGAGGCTTCTGATTTTCACTGCACAGGGCGTTTTCTTCAACGCA
 TTCTTCGTCTTTTACCTCCTCTCACCAAAGCAGCACACAGGTTTGTTGGGTAC
 TTAGAGGAAGAGGCTGTGATTTTACATACACAACATTTGGAAGCAATTGAGAGT
 GGCAAAGTTGAAAACGTCCCTGCTCCTGCCATTGCCATCGACTACTGGAGGCTC
 CCAAGGATGCAACTCTCAAAGACGTTGTCACTGTGATTTCGTGCAGATGAGGCT
 CACCACAGAGATGTCAACCACTTTGCTTCTGATATTACCAACCAAGGAAAGGAA
 TTAAGAGATGCTCCAGCTCCTATTGGTTACCATTGAGCCATTGTTTGTAACC
 ATTTGTAGCTTTTCTCATCTAAACTTTCTATTCGTGCCTGGAGGTTCAATAAA
 ATGTATTTTCACTCACTTTAAACAGAGTTTATTGAGATCAGTAGTTATATT
 ATAAAAAAAAAAAAAA 3'

FIGURA 36 – Sequência nucleotídica do cDNA da oxidase alternativa (Vu-clone 5). Em amarelo – **Extremidade não codante 5'**; Em vermelho – **Sequência codificadora do peptídeo sinal**; Em azul – **Sequência codificadora da proteína MATURA**; Em verde – **Extremidade não codante 3'**. **ATG** (códon que codifica para a primeira metionina); **TGA** (códon de terminação da tradução protéica).

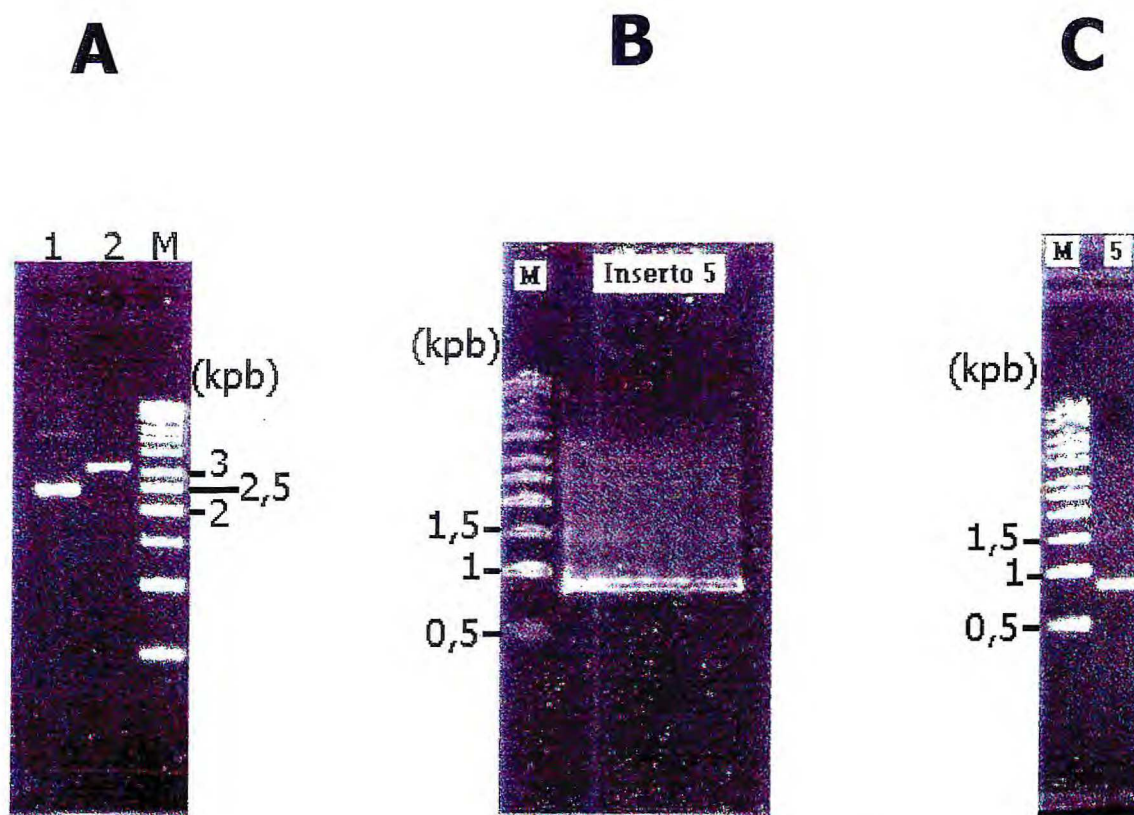


FIGURA 37 – Controle da preparação do plasmídio de expressão e do inserto da oxidase alternativa. Eletroforeses em Gel de agarose 0,8%: **(A)** Digestão por *Bam* H I e *Pst* I e purificação do plasmídio pQE-30; 1- pQE não digerido, 2- pQE digerido por *Bam* H I e *Pst* I, desfosforilado e purificado. **(B)** Amplificação por PCR do inserto de cDNA da AOX (Vu-clone 5) correspondente a proteína madura. **(C)** Digestão por *Bam* H I e *Pst* I e purificação do inserto de cDNA da AOX (Vu-clone 5) correspondente a proteína madura. M – marcador de tamanho molecular (DNA "ladder" 1kb)

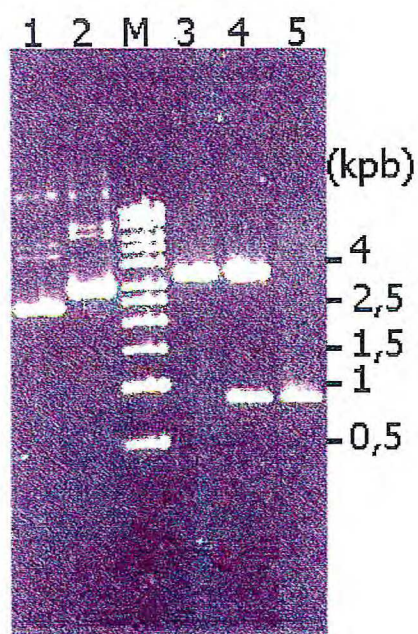


FIGURA 38 – Controle da ligação do plasmídio de expressão ao inserto da oxidase alternativa. Eletroforese em gel de agarose 0,8%: 1- Plasmídio pQE-30 vazio; 2- Plasmídio pQE-30 recombinante; 3 – Plasmídio pQE-30 vazio digerido com *Bam*H I e *Pst* I; 4 - Plasmídio pQE-30 recombinante digerido com *Bam*H I e *Pst* I e 5 – PCR do Plasmídio pQE-30 recombinante com os primers aox12 e aox13.

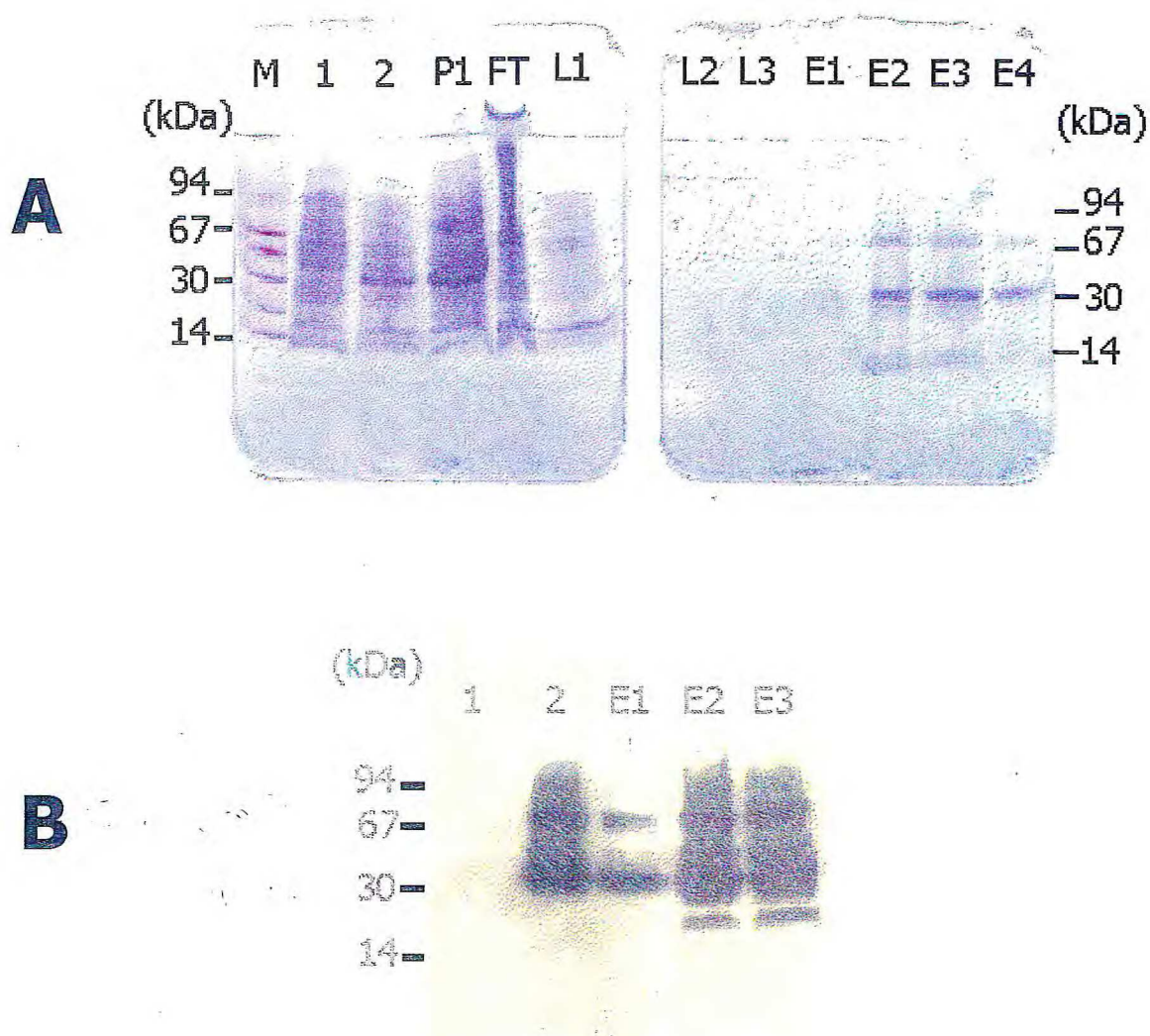


FIGURA 39 – Purificação e detecção da oxidase alternativa recombinante de *Vigna unguiculata*. **(A)** SDS-PAGE com gradiente phastGel 8-25%: M [marcador de peso molecular LMW (pharmacia)]; 1- Extrato de *E. coli* M15 (pREP4) transformadas com o pQE vazio (controle negativo) e induzidas por IPTG 1mM; 2- Extrato de *E. coli* M15 (pREP4) transformadas com o pQE recombinante e induzidas por IPTG 1mM; P1- precipitado bruto obtido das etapas iniciais de purificação; FT- "flow through"; L1, L2 e L3 (lavagens da resina Ni-NTA); E1, E2, E3 e E4 (eluições da proteína recombinante). **(B)** Western blotting utilizando o anticorpo monoclonal anti-AOX de *Sauromatum gutattum*.

A eletroforese da Figura 39A em gradiente phastgel 8-25% mostra a separação protéica dos extratos obtidos de bactérias transformadas com o plasmídio vazio (amostra 1) e com o plasmídio recombinante (amostra 2), induzidas por IPTG 1 mM, assim como as frações P1, FT, L1, L2, L3, E1, E2, E3 e E4 obtidas das etapas de purificação da proteína recombinante a partir do extrato de bactérias da amostra 2. O extrato de bactérias da amostra 2 apresentou uma banda protéica na faixa de 35 kDa que não foi observado no extrato da amostra 1. A mesma banda também foi observada de forma até mais intensa na fração P1 que correspondia ao precipitado (parede celular bacteriana etc.) após solubilização do extrato bacteriano em tampão contendo triton 0,1%. As frações de eluições E1, E2, E3 e E4 apresentaram duas bandas principais em torno de 35 e 70 kDa, estando mais intensas nas frações E2 e E3 onde também aparecia uma terceira banda em torno de 28 kDa.

A oxidase alternativa de *V. unguiculata* foi detectada com anticorpos anti-AOX de *S. guttatum* (Figura 39B). Foram reveladas as bandas na faixa de 35 e 70 kDa, já observadas na eletroforese (Figura 39A), tanto na amostra 2 como nas frações E1, E2 e E3.

DISCUSSÃO

Expressão da oxidase alternativa em cultivares de Vigna unguiculata, submetidos aos estresses hídrico e salino

Os resultados apresentados no "Western blotting" do extrato protéico bruto de raízes de *V. unguiculata* da cultivar Vita 3 (Figura 19B) revelaram a existência de duas bandas protéicas na forma reduzida compreendidas na faixa de 34 a 36 kDa e não foi observada nenhuma banda na forma oxidada. Esses resultados estão de acordo com Millenaar *et al.* (1998) que utilizaram extrato protéico bruto de raízes de *Poa annua* L. para analisar o estado de redução da AOX *in vivo* e observaram que a proteína estava quase que completamente na forma reduzida, sendo detectadas uma banda maior e 3 bandas menores em torno de 35 kDa. Quando esses autores isolaram mitocôndrias de raízes e detectaram a AOX, observaram que a forma oxidada (duas bandas em torno de 66 kDa) foi bem mais intensa do que as bandas correspondentes às formas reduzidas. Esse fato poderia ser devido às oxidações que ocorrem ao longo do processo de extração de mitocôndrias. No entanto, ainda segundo os mesmos autores, isso não significaria, necessariamente, que o estado de redução da AOX *in vivo* nunca mudasse para a forma oxidada (forma menos ativa) em outras circunstâncias como, por exemplo, diferentes estágios de desenvolvimento, diferentes condições de crescimento etc. Igualmente, os resultados de "Western blottings" de mitocôndrias purificadas das cultivares de *V. unguiculata* Vita 3 e Vita 5 (Figuras 20B, 21B e 22A), apresentaram uma banda oxidada intensa em torno de 70 kDa enquanto que as 3 bandas reduzidas compreendidas na faixa de 32 a 36 kDa foram bem menos intensas e duas delas foram pouco visíveis.

O fato de não ter sido detectada uma terceira banda reduzida da AOX no extrato protéico bruto de raízes da cultivar Vita 3 (Figura 19), como foi detectada nas mitocôndrias purificadas correspondentes (Figura 20) pode ser devido à baixa quantidade da mesma associada às interferências causadas pela grande quantidade de proteínas citossólicas e membranares presentes no extrato protéico mascarando a presença das bandas protéicas mais tênues.

As múltiplas bandas reduzidas da AOX detectadas imunologicamente são atribuídas à expressão de diferentes genes (Finnegan *et al.*, 1997; McCabe *et al.*,

1998; Considine *et al.*, 2001). Dessa forma, o aumento de intensidade observado na banda de menor massa molecular (*ca.* de 35 kDa) da AOX, em raízes da cultivar Vita 3 submetidas a estresses hídrico e salino (Figura 19), sugere que há expressão diferencial de um gene da AOX, em resposta aos estresses hídrico e salino. Essa resposta foi mais acentuada em plantas de Vita 3 submetidas ao estresse hídrico causado por PEG 200,67 g/L. Em mitocôndrias purificadas de Vita 3, assim como de Vita 5, a evidência da expressão diferencial de um gene em resposta aos estresses é reforçada pelo aumento na intensidade de apenas uma das 3 bandas reduzidas (com massa molecular de *ca.* 35 kDa) (Figuras 20 e 21) que corresponde à banda de menor massa molecular observada (Figura 19). Além disso, o fato das condições-controle tanto de Vita 3 quanto de Vita 5 apresentarem uma intensa banda oxidada e praticamente nenhuma banda reduzida, sugere que a AOX possa também sofrer uma regulação pós-traducional no seu estado redox em plantas submetidas a estresses hídrico e salino. Essa regulação pode se dar *in vivo* pela isocitrato desidrogenase NADPH-dependente, envolvida na ativação da AOX, através da produção de NADPH. Assim, os equivalentes redutores gerados pela ação dessa enzima na matriz mitocôndrial atuam por meio de uma tioredoxina ou sistema glutatona intermediando a redução da cisteína regulatória da AOX e promovendo sua ativação (MacIntosh *et al.*, 1998).

Estudos *in vitro* mostram que a redução da ponte dissulfeto que liga as subunidades da AOX produzindo um homodímero ligado não covalentemente aumenta consideravelmente a atividade da AOX (Umbach & Siedow, 1993; Umbach *et al.*, 1994). A enzima reduzida pode ser ainda ativada por α -cetoácidos, particularmente piruvato (Millar *et al.*, 1993), que reage com a porção sulfidrila da cisteína regulatória formando um tiohemiacetal (Umbach & Siedow 1996). Em mitocôndrias de plantas, α -cetoácidos como hidroxipiruvato e glioxilato também podem ativar a AOX (Day *et al.*, 1995; Millar *et al.*, 1993; Millar *et al.*, 1996), embora o piruvato seja o mais efetivo ativador (Millar *et al.*, 1996).

O "Western blotting" de mitocôndrias purificadas de raízes do cultivar Vita 3 (Figura 20) mostra que não há diferenças significativas entre os somatórios das bandas oxidadas e reduzidas da AOX nas condições estudadas, embora em condições de estresse exista uma quantidade de AOX levemente maior em relação ao controle o que de certa forma dá suporte à tendência observada na expressão da

AOX em extrato protéico bruto de raízes (Figura 19).

O somatório das bandas oxidadas e reduzidas em mitocôndrias purificadas de raízes da cultivar Vita 5 indica que a expressão da AOX foi induzida em 85% no estresse causado por NaCl 100mM e em 45% no estresse causado por PEG 200,67 g/L quando comparadas ao controle (Figura 21). Já quando o estresse foi provocado por NaCl 200 mM não houve diferença significativa relacionada à quantidade protéica da AOX detectada no controle. Esses resultados levam a crer que em estresses mais moderados há uma resposta significativa de indução na expressão da AOX em raízes da cultivar Vita 5, diferindo da expressão observada em Vita 3 que foi quantitativamente mais uniforme entre o controle e as condições de estresses.

A expressão protéica da AOX em raízes da cultivar Vita 3 é quantitativamente maior do que em raízes da cultivar Vita 5 em todas as condições estudadas (Figura 22). Essa evidência é confirmada pelos resultados obtidos na análise dos transcritos por RT-PCR (Figura 23), onde o nível de cDNA (mRNA) foi em torno de, pelos menos, 30% maior em raízes de Vita 3 do que em raízes de Vita 5 em todas as condições estudadas.

Nos resultados de "Northern blotting" (Figura 24) a banda de mRNA, detectada com a sonda de cDNA da AOX obtida a partir da digestão do plasmídeo pZL1 (clone 5) com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Pst* I, teve um tamanho aparente de 1200 pb que é correspondente aos tamanhos dos cDNAs da AOX de *V. unguiculata* isolados da biblioteca de cDNA e representados nas Figuras 29 e 30 (Vu-clone 3 = 1201 pb e Vu-clone 5 = 1203 pb). A sonda de cDNA (completo) usada na hibridização do "Northern blotting" apresenta um tamanho molecular em torno de 1400 pb justificado pelo fato que essa sonda contém em cada extremidade aproximadamente 100 pb correspondente ao vetor pZL1. Segundo Saisho *et al.* (1997) as hibridizações com sondas obtidas de insertos de clones de cDNAs completos provavelmente não identificam todos os produtos gênicos, isso porque as homologias entre as seqüências inteiras dos genes são menores do que aquelas entre as regiões conservadas. Isso possibilita que em hibridizações com lavagens de alta severidade, uma sonda contendo uma seqüência completa de um dos genes da AOX possa não se hibridizar com bandas contendo cópias de outros genes da AOX. Além disso, de acordo com Whelan *et al.* (1996), as hibridizações com sondas de cDNAs completos dificultavam a identificação das famílias multi-gênicas visto que

revelava apenas um gene. Portanto, considerando que a sonda de cDNA (completo) da AOX de *V. unguiculata* utilizada tinha extremidades com 100 pares de bases não homólogos aos genes da AOX, bem como o fato das lavagens das membranas terem sido feitas sob alta severidade, pode ser sugerido que as bandas reveladas no "Northern blotting" representem apenas a expressão do gene Vu-clone 5.

O aumento de intensidade na banda protéica da AOX (ca. 35 kDa) observada no "Western blotting" de extrato protéico bruto de raízes da cultivar Vita 3 (Figura 19), em resposta às condições de estresses, correlaciona-se com o aumento de mRNA (Vu-clone 5) observado em raízes de Vita 3 e detectado através do "Northern blotting" (Figura 24). O aumento dos transcritos da AOX não foi observado nos resultados de RT-PCR (Figura 23), talvez porque a RT-PCR represente a expressão de mais de um gene da AOX, uma vez que foi feita usando os "primers" *aox1* e *aox6* que são específico e degenerado, respectivamente. Esses "primers" foram deduzidos de zonas conservadas da AOX de *A. thaliana* e *S. guttatum* (Cruz Hernandez and Gómez-Lim, 1995). Portanto, a RT-PCR pode representar a expressão de uma população de genes diferentes da AOX na cultivar Vita 3 (Figura 23). Como observado por Finnegan *et al.* (1997), o aumento na expressão do gene *Aox2a* (*Aox2*) em cotilédones de soja, acontecido após a transferência das plântulas da obscuridade para condições luminosas, era seguido pelo decréscimo na expressão do gene *Aox2b* (*Aox3*). Dessa forma, o aumento na expressão do gene Vu-clone 5 em raízes de *V. unguiculata*, cultivar Vita 3 pode ser seguido pelo decréscimo na expressão de outros genes da AOX no mesmo tecido justificando então a diferença observada nos resultados de RT-PCR em relação aos do "Northern blotting". Já a expressão do gene Vu-clone 5 em raízes da cultivar Vita 5, observado no "Northern blotting," está relacionado com os resultados de RT-PCR. Isso sugere que em Vita 5 não há aumento de mRNA (Vu-clone 5) em resposta aos estresses após 7 dias. No entanto, o grande aumento na quantidade de proteína observada em mitocôndrias purificadas, 85% no estresse provocado por NaCl 100 mM e 45% no estresse provocado por PEG 200,67 g/L, pode ter sido devido a um grande aumento de transcritos nos primeiros dias dos estresses.

Em mitocôndrias de soja foi demonstrado que duas proteínas de 34 e 36 kDa, detectadas imunologicamente pelo anticorpo monoclonal anti-AOX, correspondiam ao produto dos genes *Aox2* (*Aox2a*) e *Aox3* (*Aox2b*), respectivamente (Finnegan *et al.*,

1997). Essa observação poderia deixar dúvidas de que a banda da AOX (ca. 35 kDa), observada nos "Western blottings" de raízes das cultivares Vita 3 e Vita 5, não estivesse relacionada com a expressão do gene Vu-clone 5. A dúvida estaria em que, uma banda de aproximadamente 36 kDa também é observada nos "Western blottings" de *V. unguiculata* e o gene Vu-clone 5 é orto-homologo do gene *Aox2b* de soja (Figura 35) que expressa a proteína mais pesada (36 kDa) em soja. Entretanto, Abe *et al.* (2002) observaram que o produto do gene *Aox1a* de *O. sativa* correspondia a uma proteína AOX que migrava com massa molecular de 32 kDa em "blots" de gel SDS e que a troca de um simples nucleotídeo na seqüência desse gene *Aox1a*, provocou a troca de resíduo de aminoácido produzindo uma proteína de 34 kDa. Segundo esses autores, é possível que a substituição de um simples aminoácido possa afetar a mobilidade da proteína em SDS-PAGE. Além disso, mais evidências fortalecem a expressão do gene Vu-clone 5. Em raízes de *V. unguiculata*, Finnegan *et al.* (1997) observaram que os transcritos da AOX mais abundantes em cotilédones eram *Aox2* e *Aox3*, enquanto que em raízes, a expressão da AOX foi quase que exclusivamente devido à expressão do gene *Aox2b*, havendo apenas traços dos genes *Aox1* e *Aox2a*. Também foi observado que as quantidades dos transcritos refletiam significativamente nas quantidades das respectivas proteínas detectadas por "immunoblotting".

Embora Considine *et al.* (2002) atribuam o papel de resposta aos estresses ao gene do tipo *Aox1*, em *G. max*, modelo de genes da AOX mais próximo de *V. unguiculata* até então estudado. Contudo, o gene *Aox1* foi raramente detectado em tecidos e sua indução em condições de estresses como inibição da cadeia respiratória por antimicina A, tratamentos de plantas por baixa temperatura ou ácido salicílico foram observados apenas em estudos de suspensões de células ou em cotilédones (Djajanegara *et al.*, 2002). Considerando essas observações é possível que, no tecido radicular de *V. unguiculata* exista uma estratégia de indução/manutenção da expressão gênica de um gene do tipo *Aox2b* (Vu-clone 5), bem como uma regulação no estado redox da proteína resultante, AOX2b, possibilitando um aumento na atividade dessa AOX não só pelo estado reduzido da proteína como também pela sua modulação por α - cetoácidos como o piruvato. Dentre as duas cultivares de *V. unguiculata* estudadas, a cultivar Vita 3 parece estar mais adaptada para suportar as condições desfavoráveis de estresses. Essa afirmação seria fundamentada no fato

que a cv. Vita 3 apresentou, em todas as condições observadas, uma maior quantidade de AOX do que na cultivar Vita 5 que por sua vez demonstrou reagir, expressando mais AOX, nos estresses menos severos (NaCl 100mM e PEG 200,67g/L). Diante das evidências constatadas, a AOX parece ter um importante papel no ajustamento das plantas aos estresses hídrico e salino.

Caracterização de genes da AOX de Vigna unguiculata e expressão diferencial a partir de uma biblioteca de cDNA.

Dentre os diferentes perfis de clones de cDNA, positivos para AOX, isolados de uma biblioteca de cDNA e divididos em 4 padrões distintos para seqüenciamento (Figuras 26, 27 e 28) foi revelada a existência de dois cDNAs completos de cauda poli-A que codificavam duas proteínas AOX distintas, com homologia de 65% (Figuras 29, 30 e 31), apresentando seqüências de aminoácidos que conservam características comuns às oxidases alternativas de plantas. O múltiplo alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas, das proteínas de *V. unguiculata* e de *G. max* (Figura 32), apresenta regiões N – terminais com características assumidas pelos peptídios sinais de mitocôndrias (Nakai & Kanehisa, 1992). Praticamente não houve homologia entre os 5 genes das duas espécies que são filogeneticamente próximas. Essa é uma característica encontrada nas mitocôndrias (Finnegan *et al.*, 1997). As duas AOXs de *V. unguiculata* chamadas de Vu-clone 3 e Vu-clone 5 apresentam dois resíduos de cisteína nas posições 102 e 152 da AOX Vu-clone3 e nas posições 99 e 149 da AOX Vu-clone 5 que são conservados não só em soja como também na grande maioria das plantas superiores. A 1ª cisteína está envolvida na dimerização da AOX através da formação da ligação da ponte dissulfeto (Umbach & Siedow, 1993, Rhoads *et al.*, 1998). Os "motifs" EEAENERMHLMT e GYLEEEA contendo os resíduos de E (glutamato) e H (histidina), responsáveis pela ligação ao centro bi-nuclear de ferro (Andersson & Nordlund, 1999), foram também conservados nas duas proteínas da AOX de *V. unguiculata*. O "motif" RADEAHHRDVNHFASDIH, conservado nas AOXs de *V. unguiculata* e *G. max*, apresenta os resíduos de A (alanina na posição 2) e H (histidina na posição 7), responsáveis pelo reconhecimento feito pelo anticorpo monoclonal anti-AOX em espécies de plantas, algas verdes, protistas e fungos (Finnegan *et al.*, 1999). Essas

conservações estruturais sugerem fortemente que os genes até então denominados: Vu-clone 3 e Vu-clone 5, codificam proteínas funcionais da oxidase alternativa em *V. unguiculata*.

O alinhamento das oxidases alternativas, Gm Aox2a e Vu-clone 3 (Figura 33) e Gm Aox2b e Vu-clone 5 (Figura 34), mostra que há grande homologia entre as respectivas proteínas, sendo de 90% entre Gm Aox2a e Vu-clone 3 e de 91% entre Gm Aox2b e Vu-clone 3. Essa homologia é observada inclusive na porção N-terminal que é bastante variável em proteínas mitocondriais, até mesmo em proteínas de genes diferentes da mesma espécie, como no exemplo da AOX de Vu-clone 3 e Vu-clone 5 (Figura 31). Esse fato sugere que os genes *Gm Aox2a* e Vu-clone 3, bem como *Gm Aox2b* e Vu-clone 5 sejam originários de genes ancestrais comuns.

A comparação das seqüências de aminoácidos da AOX de várias espécies de plantas, algas, protistas, fungos e proteínas homólogas de cloroplastos confirma a proximidade filogenética entre os diferentes genes da AOX de *V. unguiculata* e *G. max* (Figura 35) onde o gene Vu-clone 3 é orto-homologo ao gene *Gm Aox2a*, enquanto que o gene Vu-clone 5 é orto-homologo ao gene *Gm Aox2b*. Orto homologia semelhante também é observada entre os genes *Aox1a* e *Aox1c* de duas outras espécies próximas filogeneticamente como *O. sativa* e *T. aestivum*. Essas evidências possibilitam classificar os genes Vu-clone 3 e Vu-clone 5 em genes do tipo *Aox2* como propõe Considine *et al.* (2002) e devido também às orto homologias apresentadas com as proteínas de soja passam a chamar-se *Vu Aox2a* e *Vu Aox2b*, respectivamente.

A biblioteca de cDNA utilizada para o "screening" de clones da AOX de *V. unguiculata* e conseqüente análise da expressão dos respectivos genes caracterizados foi construída a partir de RNAs mensageiros de cauda poli-A obtidos de folhas da cultivar EPACE 1 (tolerante à seca) de *V. unguiculata*, submetida a estresse hídrico moderado (El Maarouf *et al.*, 1999). Dos 13 clones isolados da biblioteca de cDNA, 9 foram caracterizados como originários do gene *Vu Aox2a* (Vu_clone 3) e 4 originários do gene *Vu Aox2b* (Vu_clone 5). Portanto, é observado que em folhas da cultivar EPACE 1, em condições de estresse hídrico moderado, houve a expressão dos genes do tipo *Aox2a* e *Aox2b* na proporção de 9:4. Esse resultado está de acordo com Finnegan *et al.* (1997), McCabe *et al.* (1998), Considine *et al.* (2002) que estudando a expressão da AOX em diferentes tecidos,

observaram que o gene do tipo *Aox2a* é um gene expresso em abundância apenas em tecidos fotossintetizantes. Já o gene *Aox2b* é um gene expresso também em tecidos verdes além de tecido floral e raízes. Finnegan *et al.* (1997) observaram a transição de expressão entre os genes *Aox2a* (*Aox2*) e *Aox2b* (*Aox3*), demonstrando que o gene *Aox2a* é induzido nos cotilédones de soja pela presença da luz. Em plantas estioladas, o nível de transcritos observado era devido principalmente ao gene *Aox2b* (*Aox3*), havendo apenas uma baixa expressão do gene *Aox2a* (*Aox2*). Após 24 horas da transferência das plantas do escuro para o claro observou-se uma inversão na quantidade desses transcritos onde o gene *Aox2a* passou a ser o mais abundante. Esse resultado, de certa forma, não confirma a proposta de Considine *et al.* (2002) sobre o papel desempenhado pelo gene *Aox1* em resposta aos estresses, uma vez que não foi detectada a expressão desse gene em folhas da cultivar EPACE 1 submetida a estresse hídrico moderado. Embora esse gene do tipo *Aox1* não tenha sido detectado em folhas, acredita-se que ele exista em *V. unguiculata* uma vez que os genes *Aox2a* e *Aox2b* apresentam orto-homologia. A sonda que foi utilizada para fazer o "screening" da biblioteca de cDNA era uma sonda de regiões altamente conservadas, compreendendo o "motif" WNCFS (M) PW correspondente a 1ª cisteína conservada (regulatória) e o "motif" RADEAHHRD na extremidade C- terminal (Figura 32). Mesmo considerando a perda do clone de nº 2 durante o segundo "screening", nessas condições, é muito pouco provável que tenha ocorrido uma indução de um gene *Aox1* e que o mesmo não tenha sido detectado, em resposta ao estresse hídrico moderado em folhas da cultivar EPACE 1.

Os resultados da expressão dos genes da AOX, observados em raízes e folhas de *V. unguiculata*, sugerem que o gene *Aox1* pode não ser induzido por estresses hídrico ou salino em tecidos específicos como esses que foram realizados. Entretanto, estudos mais aprofundados serão necessários para compreender melhor o papel dos diferentes genes da AOX na adaptação de plantas aos estresses hídrico e salino.

Expressão da oxidase alternativa de Vigna unguiculata em E. coli

A proteína recombinante, produzida em sistema *E. coli* mostrada (Figura 39), apresenta-se no extrato de *E. coli* transformada com o plasmídeo recombinante e nas frações de purificação P1, E1, E2, E3 e E4 como uma banda protéica de massa molecular em torno de 35 kDa. Além disso, uma banda adicional de 70 kDa foi observada nas frações E1, E2, E3 e E4. Essas bandas de 35 e 70 kDa correspondem respectivamente às formas reduzida e oxidada da AOX de mitocôndrias de *V. unguiculata* reveladas nos resultados de "Western blottings" (Figuras 20, 21 e 22). A fração resultante de etapa de purificação, P1 (insolúvel em triton X-100 0,1%), apresenta uma banda intensa (em torno de 35 kDa) significando que a oxidase alternativa recombinante produzida em *E. coli* possui propriedades hidrofóbicas e é possivelmente associada à membrana bacteriana ou à formação de corpos de inclusão. As bandas em torno de 10 kDa, observadas nas frações E2, E3 e E4 na eletroforese em gradiente phastgel 8-25% (Figura 39A), mas não reveladas pelo anticorpo monoclonal anti-AOX nas frações E2 e E3 (Figura 39B), provavelmente correspondem a proteínas contaminantes. Por outro lado, a banda dotada de massa molecular aparente de 29 kDa revelada pelo anticorpo anti-AOX nas frações E2 e E3 (Figura 39B) pode corresponder a um produto de degradação da AOX como já foi observado por Umbach *et al.*, (2002). Esses autores acreditam ser pouco provável que uma banda em tal faixa de massa molecular e revelada através do anticorpo Anti-AOX fosse um produto de reação inespecífica.

CONCLUSÕES

Os estresses hídrico e salino induzem a expressão de um gene da AOX, possivelmente um gene do tipo *Aox2b* (Vu-clone 5);

A AOX sofre regulação pós-traducional no seu estado redox em resposta aos estresses hídrico e salino;

A AOX de *V. unguiculata* é codificada por uma família multi-gênica composta de, pelos menos, dois genes: Vu-clone 3 (*Vu Aox2a*) e Vu-clone 5 (*Vu Aox2b*);

A expressão da AOX em raízes de *V. unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, demonstrou ser mais intensa na cultivar Vita 3 (mais tolerante aos estresses hídrico e salino) do que na cultivar Vita 5 (menos tolerante) tanto no teor protéico quanto no teor de transcritos, em todas as condições estudadas;

A proteína recombinante produzida em *E. coli* exibiu uma banda de massa molecular comparável à da AOX nativa de *V. unguiculata*.

PERSPECTIVAS

Estudar a expressão diferencial dos genes da AOX em diferentes tecidos de *V. unguiculata*;

Utilizar a AOX recombinante para estudar sua atividade através de mutagênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE F., SAITO K., MIURA K. and TORIYAMA K. A single nucleotide polymorphism in the alternative oxidase gene among rice varieties differing in low temperature tolerance. **FEBS Lett.** 527: 181-185, 2002.
- ABREMSKI, K., HOESS, R. and STERNBERG, N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. **Cell** 32: 1301-1311, 1983.
- AFFOURTIT C., ALBURY, M. S., CRICHTON, P. G. and MOORE A. L. Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis **FEBS Lett.** 510: 121-126, 2002.
- ALBURY, M. S., AFFOURTIT, C. and MOORE, A. L. A highly conserved glutamate residue (Glu-270) is essential for plant alternative oxidase activity **J. Biol. Chem.** 273: 30301-30305, 1998.
- ALBURY, M. S., AFFOURTIT, C. and MOORE, A. L. Structure of the plant alternative oxidase - Site-directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology **J. Biol. Chem.** 277: 1190-1194, 2002.
- ALLEN, J. F. Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. **J. Theor. Biol.** 165: 609-631, 1993.
- ANDERSSON, M. E. and NORDLUND, P. A revised model of the active site of the alternative oxidase . **FEBS Lett.** 449: 17-22, 1999.
- BENDALL, D. S. and BONNER, W. D. Jr. Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. **Plant Physiol.** 47: 236-245, 1971.
- BENICHO, P., CALVAYRAC, R., CLAISSE, M. Induction by antimycin A of cyanide-resistant respiration in heterotrophic *Euglena gracilis*: effects on growth, respiration and protein biosynthesis **Planta** 175: 23-32, 1988.

- BERTHOLD, D.A. , ANDERSSON, M.E., NORDLUND A. P - New insight into the structure and function of the alternative oxidase. **Biochim. Biophys. Acta.** 1460: 241-254, 2000.
- BERTRANT, H., ARGAN, C.A., SZAKACS, N.A. - Genetic control of the biogenesis of cyanide insensitive respiration in *Neurospora crassa*. **In**: SCHWEYEN, K. WOLF, F. KAUDEWITZ Mitochondria , ed. RJ, Berlin: de Gruyter, 495-507, 1983.
- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254, 1976.
- BUJARD, H., GENTZ, R., LANZER, M., STÜBER, D., MÜLLER, M., IBRAHIMI, I., HÄUPTLE, M. T. and DOBBERSTEIN B. A T5 promotor based transcription translation system for the analysis of proteins in vivo and in vitro. **Methods Enzymol.** 155: 416 – 433. 1987.
- CASOLO, V., BRAIDOT, E., CHIANDUSSI, E., MACRI, F., VIANELLO, A. The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria. **FEBS Lett.** 474: 53-57, 2000.
- CHANG S., PURYEAR J. and CARNEY J. A simple and efficient method for isolating RNA from Pine trees. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11: 113-116, 1993.
- CLARKSON, A. B., BIENEN, E. J., POLLAKIS, G. and GRADY, R. J. Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. **J. Biol. Chem.** 264: 17770-17776, 1989.
- CONSIDINE M. J., HOLTZAPFFEL R. C., DAY D. A., WHELAN J. and MILLAR A. H. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. **Plant Physiol** 129: 949 – 953, 2002.
- CONSIDINE, M. J, DALEY, D. O. and WHELAN, J. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango **Plant Physiol** 126: 1619 - 1629, 2001.
- CORNU, S., PIREAUX, J. C., GERARD, J. and DIZEMGREMEL P. NAD(P)⁺ - dependent

- isocitrate dehydrogenases in mitochondria purified from *Picea abies* seedlings. **Physiol. Plant.** 96: 312-318, 1996.
- CRUZ-HERNANDEZ, A. and GOMEZ-LIM, M. A. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening. **Planta**, 197(4): 569-576, 1995.
- DAY, D. A and WISKICH, J. T. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. **J. Bioenerg. Biomemb.** 27(4): 379-385. 1995.
- DAY, D. A., WHELAN, J., MILLAR A. H., SIEDOW J. N. and WISKICH J. T. Regulation of the alternative oxidase in plants and fungi. **Austr. J. Plant Physiol.** 22: 497-509, 1995.
- DESSI, P., RUDHE, C. and GLASER, E. Studies on the topology of the protein import channel in relation to the plant mitochondrial processing peptidase integrated into the cytochrome bc(1) complex. **Plant J.** 24: 637-644, 2000.
- DINANT, M., BAURAIN, D., COOSEMANS, N., JORIS, B. and MATAGNE, R. F., Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Curr. Genetics** 39(2): 101-108, 2001.
- DJAJANEGARA, I., FINNEGAN, P. M., MATHIEU C., McCABE T., WHELAN J. and DAY D. A. Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. **Plant Mol. Biol.** 50(4): 735-742, 2002.
- DJAJANEGARA, I., HOLTZAPFFEL, R., FINNEGAN, P.M. HOEFNAGEL, M. H. N., BERTHOLD, D. A., WISKICH, J. T. and DAY D. A. A single amino acid change in the plant alternative oxidase alters the specificity of organic acid activation . **FEBS Lett.** 454: 220-224, 1999.
- EL MAAROUF H., ZUILY-FODIL Y., GAREIL M., D'ARCY-LAMETA, A. and PHAM-THI, A. T. Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. differing in drought tolerance. **Plant Mol. Biol.** 39(6): 1257-1265, 1999.
- ELTHON T. E. and MCINTOSH L. Characterization and solubilization of the alternative

- oxidase of *Sauromatum guttatum* mitochondria. **Plant Physiol.** 82: 1-6, 1986.
- ELTHON, T. E. and MCINTOSH, L. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 84 : 8399-8403. 1987.
- ELTHON, T.E., NICKELS, R.L. and MCINTOSH, L. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. **Plant Physiol.** 89: 1311-1317, 1989.
- ERIKSSON M., GARDESTROM P. and SAMUELSSON G. Isolation, purification, and characterization of mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiol.** 107: 479-483, 1995.
- FARABAUGH P. J. Sequence of the *lac I* gene. **Nature** 274: 765-769. 1978.
- FERNANDES DE MELO, D., JOLIVET, Y., FAÇANHA, A. R., GOMES FILHO, E., SILVA LIMA, M. and DIZENGREMEL, P. Effect of salt stress on mitochondrial energy metabolism of *Vigna unguiculata* cultivars differing in NaCl tolerance. **Plant Physiol. Biochem.** 32(3): 405-412, 1994.
- FINNEGAN P. M., WOODING A. R. and DAY D. A. An alternative oxidase monoclonal antibody recognizes a highly conserved sequence among alternative oxidase subunits. **FEBS Lett.** 447: 21-24, 1999.
- FINNENGAN, P. M., WHELAN, J., MILLAR, A. H., ZHANG, Q., SMITH, M. K. WISKICH, J. T. and DAY, D. A. Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase **Plant Physiol.** 114: 455-466, 1997.
- HACKETT, D. P., HASS, D. W., GRIFFITHS, S. K. and NIEDERPRUEM, D. J. Studies on development of cyanide-resistant respiration in potato tuber slices. **Plant Physiol.** 35: 8-19, 1960 a.
- HACKETT, D. P., RICE, B. and SCHMID, C. The partial dissociation of phosphorylation from oxidation in plant mitochondria by respiratory chain inhibitors. **J. Biol. Chem.** 235: 2140-44, 1960 b.

- HAKANSSON G. and ALLEN, F. Histidine and tyrosine phosphorylation in pea mitochondria: evidence for protein phosphorylation in respiratory redox signalling. **FEBS Lett.** 372: 238-42, 1995.
- HOEFNAGEL M. H. N., RICH P. R. and ZHANG Q. The substrate affinity of the alternative oxidase of plant mitochondria is not increased by pyruvate. **Plant Physiol** 114: 287-287, 1997.
- HOESS, R. and ABREMSKI, K. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. **J. Mol. Biol.** 181: 351-362, 1985.
- HOLMES, D. S. and QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal Biochem.** 114(1):193-197, 1981.
- HUH, W. K. and KANG, S. O. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. **Biochem Journal** 356: 595 – 604, 2001.
- HUH, W. K. and KANG, S. O. Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology** 181(13): 4098 – 4102, 1999.
- HUQ, S. and PALMER, J. M. Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. **FEBS Lett.** 95: 217-220, 1978.
- ITO, Y., SAISHO, D., NAKAZONO, M., TSUTSUMI, N. and HIRAI, A. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. **Gene**, 203: 121-129, 1997.
- JARMUSKIEWICZ, W., WAGNER A. M., WAGNER J. M. and HRYNIEWIECKA L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. **FEBS Lett.** 411: 110-114, 1997.
- JOSEPH-HORNE, T., BABIJ, J., WOOD P. M. New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate **FEBS Lett.** 481: 141-146, 2000.

- KUMAR, A.M. and SOLL, D. Arapdopsis alternative oxidase sustains *Escherichia coli* respiration. **Proc. Natl, Acad. Sci. USA** 89: 10842-10846, 1992.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of strutural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685, 1970 .
- LAMBERS, H. Cyanide-resistant respiration: a nonphosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. **Physiol. Plant.** 55: 478-85, 1982.
- LAMBOWITZ, A. M., SABOURIN, J. R., BERTRAND, H., NICKELS, R. and MCINTOSH, L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. **Molecular Cell Biology**, 9: 1362-1364, 1989.
- LANCE, C. La respiration de l'*Arum maculatum* au cours du developement de l'inflorescence. **Annales des Sciences Naturelles Botaniques**, 12: 477-495, 1972.
- LATIES G.G. The cyanide-resistant alternative pathway in higher plant respiration. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 33: 519-555, 1982.
- LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell** 79: 583-593, 1994.
- LI, Q., RITZEL, R. G., MCLEAN, L. L. T., MCINTOSH, L., KO, T., BERTRAND, H., NARGANG, F. E. Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. **Genetics** 142: 129-140, 1996.
- MAXWELL, D. P., WANG, Y. and MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 96(14): 8271-8276, 1999.
- MCCABE, P. C., FINNEGAN, P. M., MILLAR, H., DAY, D. A. and WHELAN, J. Differential expression of alternative oxidase genes in soybean cotyledons during postgerminative development. **Plant Physiol.** 118: 675-682, 1998.
- MCINTOSH, L. Molecular biology of the alternative oxidase. **Plant Physiol.** 105: 781-786, 1994.

- McINTOSH, L., EICHLER, T., GRAY, G. *et al* - Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria **Biochim. Biophys. Acta.** 1365: 278-284, 1998.
- MEEUSE, B. J. D. Thermogenic respiration in Aroid. **Ann. Rev. Plant Physiol** 26: 117-126, 1975.
- MILLAR, A. H., FINNEGAN, P. M., WHELAN, J., DREVON, J. J. and DAY, D. A. **Plant Cell Environ.** 20: 1273-1282, 1997.
- MILLAR, A. H., HOEFNAGEL, M. H. N., DAY, D. A. and WISKICH, J. T. Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondria. **Plant Physiol.** 111: 613-618, 1996.
- MILLAR, A. H., WISKICH, J. T., WHELAN, J. and DAY, D. A. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. **FEBS Lett.** 329(3): 259-262, 1993.
- MILLAR, A.H. and DAY, D.A. - Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. **FEBS Letters**, 398: 155-158, 1996.
- MILLENAAR F. F., BENSCHOP J. J., WAGNER A. M. and LAMBERS H. The role of the alternative oxidase in stabilizing the *in vivo* reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. **Plant Physiol** 118(2): 599-607, 1998.
- MILLENAAR F. F., ROELOFS R., GONZÁLEZ-MELER M. A., SIEDOW J. N., WAGNER A. M. and LAMBERS H. The alternative oxidase in roots of *Poa annua* after transfer from high-light conditions. **The Plant Journal** 23(5): 623-632, 2000.
- MINAGAWA, N., KOGA, S., NAKANO, M., SAKAJO, S., YOSHIMOTO, A. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **FEBS Lett.** 302(3): 217-219, 1992.
- MOORE, A. L. and SIEDOW, J.N. The regulation and nature of cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.** 1059: 121-140, 1991.
- NAKAI, K. and KANEHISA, M. A Knowledge base for predicting protein localization sites

- in eucaryotic cells. **Genomics** 14: 897-911, 1992.
- NEUBURGER, M., JOURNET, E. P., BLIGNY, R., CARDE, J. P. and DOUCE, R. Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. **Arch. Biochem. Biophys.** 217(1): 312-323, 1982.
- NEUPERT, W. Protein Import Into mitochondria **Annu. Rev. Biochem.** 66: 863-917, 1997.
- PASTORE, D., FRATIANNI, A., DI PEDE, S. and PASSARELLA, S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. **FEBS Lett.** 470(1): 88-92, 2000.
- PURVIS, A. C. and SHEWFELT, R. L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? **Physiol. Plant..** 88: 712-718, 1993.
- RHOADS, D. M. and McINTOSH, L. Isolation and characterization of cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Shott.) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88: 2122-26, 1991.
- RHOADS, D. M. and McINTOSH, L. The salicylic acid-inducible alternative oxidase gene *aox1* and genes encoding pathogenesis – related proteins share regions of sequence similarity in their promoters. **Plant Mol. Biol.**, 21: 615-624, 1993.
- RHOADS, D. M., UMBACH A. L, SWEET C. R., LENNON A. M., RAUCH G. S. and SIEDOW J. N. Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria - Identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation **J. Biol. Chem.** 273: 30750-30756, 1998.
- RICH, P. R. Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilisation and partial purification of the alternative oxidase. **FEBS Letters**, 96: 252-256, 1978.
- ROISE, D. Recognition and binding of mitochondrial presequences during the import of proteins into mitochondria **J. Bioenerg. Biomembr.** 29: 19-27, 1997.
- SAIKA H., OHTSU K., HAMANAKA S., NAKAZONO M., TSUTSUMI N. and HIRAI A. AOX1c,

a novel rice gene for alternative oxidase; comparison with Aox1a and Aox1b. **Genes Genet. Syst.** 77: 31 – 38, 2002.

SAISHO, D., NAKAZONO, M., LEE, K. H., TSUTSUMI, N., AKITA, S. and HIRAI, A. The gene for alternative oxidase-2 (AOX2) from *Arabidopsis thaliana* consists of five exons unlike other AOX genes and is transcribed at an early stage during germination. **Genes Genet. Syst.** 76: 89-97, 2001.

SAISHO, D., NAMBARA, E., NAITO, S., TSUTSUMI, N., HIRAI, A. and NAKAZONO, M. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.** 35: 585-596, 1997.

SAKAJO, S.; MINAGAWA, N. KOMIYAMA, T. and YOSHIMOTO, A. Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **Biochim. Biophys. Acta** 1092: 102-108, 1991.

SAMBROOK, J., FRITCSH, E.F., MANIAST, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** v.1 Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHONBAUM, G. R., BONNER, W., STOREY, B. T. and BAHR, J. T. Specific inhibition of cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. **Plant Physiol.** 47: 124-28 1971

SEN, C. K. and PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene-transcription. **FASEB J.** 10: 709-720, 1996.

SIEDOW, J. N. and MOORE, A. L. A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.** 1142: 165-174, 1993.

SIEDOW, J. N. and UMBACH, A. L. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. **Biochim. Biophys. Acta** 1459: 432-439, 2000.

SIEDOW, J. N., UMBACH, A. L. and MOORE, A. L. The active site of the cyanide-resistant oxidation from plant mitochondria contains a binuclear iron center. **FEBS Lett.** 362: 10-14, 1995.

- SIEDOW, J.N. and BICKETT, D.M. Structural features required for inhibition of cyanide-insensitive electron transfer by propyl gallate. **Arch. Biochem. Biophys.** 207: 32-39, 1981.
- SIMONS, B. H., MILLENAAR, F. F., MULDER, L., VAN LOON, L. C. and LAMBERS, H. **Plant Physiol.** 120: 529-538, 1999.
- SLUSE, F. E. and JARMUSZKIEWICZ, W. - Alternative oxidase in branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. **Braz. J. Med. Res.** 31: 733-747, 1998.
- SLUSE, F. E., ALMEIDA, A. M., JARMUSZKIEWICZ, W. and VERCESI, A. E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. **FEBS Lett.** 433: 237-240, 1998.
- STOREY, B. T. and BAHR, J. T. The respiratory chain of plant mitochondria. II. Oxidative phosphorylation in skunk cabbage mitochondria. **Plant. Physiol.** 44: 126-24, 1969.
- STÜDER D., MATILE H. and GAROTTA G. System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. **In**: Immunological Methods, Lefkovits, I. And Pernis, B., eds., vol. IV, Academic Press, New York, pp. 121-152, 1990.
- SUTCLIFFE J. G. Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 43: 77-90. 1979.
- SZIGYARTO, C., DESSI, P., SMITH, M. K., KNORRP, C., HARMEY, M., DAY, D. A., GLASER, E. and WHELAN, J. A matrix-located processing peptidase of plant mitochondria **Plant Mol. Biol.** 36: 171-181, 1998.
- TAGU, D. Principes des Techniques de Biologie Moléculaire. INRA eds. Paris. ISSN 1144-7605. ISBN 2-7380-0859-3. 1999.
- TAKUMI, S., TOMIOKA, M., ETO, K., NAYDENOV, N. and NAKAMURA, C. Characterization of two non-homoeologous nuclear genes encoding mitochondrial alternative oxidase in common wheat. **Genes Genet. Syst.** 77: 81-88, 2002.

- TANUDJI, M., DALEY, D. O., MCCABE, T. C., FINNEGAN, P. M., DJAJANEGARA I. N., DAY, D. A., WHELAN, J. Alternative oxidase proteins of soybean mitochondria: Identification of the multiple isoforms in soybean tissues. **In:** I. M. MOLLER, P. GARDESTROM, K. GLIMELIUS, E. GLASER, eds, *Plant Mitochondria: From Gene to Function*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 525-529.
- TANUDJI, M., SJÖLING, S. GLASER, E. and WHELAN, J. Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria. **J. Biol. Chem.** 274: 1286-1293, 1999.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, J. T. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids Res.** 62: 4673-4680, 1994.
- UMBACH, A. L. and SIEDOW, J. N. The reaction of the soybean cotyledon mitochondrial cyanide-resistant oxidase with sulfhydryl reagents suggests that α -keto acid activation involves the formation of a thiohemiacetal. **J. Biol. Chem.** 271(40): 25019-25066, 1996.
- UMBACH, A. L. and SIEDOW, J. N. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. **Plant Physiol.** 103: 845-854, 1993.
- UMBACH, A. L. and SIEDOW, J. N. The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme **Arch. Biochem. Biophys.** 378: 234-245, 2000.
- UMBACH, A. L., GONZALEZ-MELER, M. A., SWEET, C. R. and SIEDOW, J. N. Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta** 1554: 118-128, 2002.
- UMBACH, A. L., WISKICH, J. T. and SIEDOW, J. N. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. **FEBS Lett.** 348: 181-184, 1994.

- VANLERBEGHE, G. C. and MCINTOSH, L. Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression: studies with the alternative oxidase gene of tobacc. **Plant Physiol.**, 105: 867-74, 1994.
- VANLERBERGH, G. C., DAY, D. A., WISKICH, J. T., VANLERBERGH, A. E. and MCINTOSH, L. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. **Plant Physiol.**, 109: 353-361, 1995.
- VANLERBERGHE, G. C. and MCINTOSH, L. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. **Plant Physiol.** 100: 115-119, 1992 a.
- VANLERBERGHE, G. C. and MCINTOSH, L. Coordinate regulation of cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco. **Plant Physiol.** 100: 1846-1851, 1992 b.
- VANLERBERGHE, G. C., MCINTOSH L. and YIP, J. Y. H. Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport **Plant Cell.** 10: 1551-1560, 1998.
- VANLERBERGHE, G.C. and MCINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function. **Ann. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol.** 48: 703-734, 1997.
- VERDCOURT, B. 1970. IV Kew Bulletin 24: 507-569, 1999.
- WAGNER, A. M., VAN DEN BERGEN C. W. M. and KRAB, K. Modulation of the access of exogenous NAD(P)H to the alternative pathway in potato-tuber callus mitochondria with triton X-100. **Plant Physiol.** 100: 1259-1262, 1992.
- WAGNER, A. M. and MOORE A. L. Structure and function of the plant alternative oxidase: Its putative role in the oxygen defense mechanism. **Bioscience Rep.** 17: 319-333, 1997.
- WHELAN, J., MCINTOSH, L. and DAY, D.A. Sequencing of soybean alternative oxidase cDNA clone. **Plant Physiol.** 102: 1481, 1993.

- WHELAN, J., MILLAR, A. H. and DAY, D. A. The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. **Planta** 198(2): 197-201. 1996.
- WHELAN, J., SMITH, M. K., MEIJER, M., YU, J., BADGER, M. R., PRICE, G.D. and DAY, D. A. Cloning of an additional cDNA for the alternative oxidase in tobacco. **Plant Physiol.** 107: 1469-1470, 1995.
- WILSON, S.B. Energy conservation associated with cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** 223: 383-87, 1970.
- ZYKOVA, V. V., KOLESNICHENKO, A. V. and VOINIKOV, V.K. Involvement of reactive oxygen species in plant mitochondrial response to low-temperature stress **Russ J Plant Physiol** 49: 269-276, 2002.