

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MEMBRO DA SUPERFAMÍLIA DE
PEROXIDASES NÃO ANIMAIS: ASCORBATO PEROXIDASE-RELACIONADA

Autora: Fernanda Lazzarotto

-Tese submetida ao Programa de Pós- Graduação em Genética e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do
grau de Doutora em Genética e Biologia Molecular-

Orientadora: Dra. Márcia Maria Pinheiro Margis

Co-orientador: Dr. Felipe dos Santos Maraschin

Porto Alegre, julho de 2015

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

(Marcel Proust)

- Sumário -

Instituições e fontes financiadoras.....	4
Agradecimentos.....	5
Lista de abreviaturas.....	6
Resumo/Abstract.....	7
Capítulo I – Introdução.....	9
Objetivos.....	19
Capítulo II - Inferências filogenéticas sobre ascorbato peroxidase-relacionada e a superfamília das peroxidases não-animais.....	20
Capítulo III - Caracterização funcional de ascorbato peroxidase-relacionada em <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
Discussão.....	90
Referências.....	97

- Instituição e fonte financiadoras -

Esta tese de doutorado foi plenamente realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Núcleo de Genômica Funcional de Plantas do Laboratório de Genética Vegetal, localizado no Instituto de Biociências desta Universidade. Os recursos utilizados para o financiamento da pesquisa, assim como a bolsa de estudos da aluna, foram obtidos através do CNPq.

- Agradecimentos -

A realização desta tese de doutorado só foi possível graças à ajuda de algumas pessoas. Gostaria de fazer um agradecimento especial à minha orientadora, Márcia, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pelo carinho, por sempre acreditar nas minhas ideias, sugestões, na minha capacidade de executar um projeto a partir de estudos em uma espécie que, até então, não trabalhávamos no laboratório. Pelo suporte emocional, pelo carinho, pelas conversas. Depois de oito anos no laboratório, posso dizer que hoje tenho muito mais que uma orientadora, tenho uma amiga. Também tenho muito a agradecer ao meu co-orientador Felipe pelo grande suporte científico, pela disponibilidade, pela atenção e incentivo. Ao meu noivo Felipe, um muito obrigada pelo carinho, paciência, amor, pelo suporte. Poucas pessoas tem a sorte de ter um parceiro assim ao seu lado, muito obrigada, meu amor. À Andreia, que possibilitou a execução do capítulo II desta tese, muito obrigada pelos ensinamentos, pela atenção, por toda a ajuda que me foi dada durante toda a execução deste capítulo. Obrigada por possibilitar um estudo tão importante para minha tese. Obrigada pela paciência e pelo carinho. À minha pequena grande IC, Maiara, um muito obrigada cheio de carinho e boas lembranças. Obrigada por acreditar no nosso projeto, por confiar a mim a chance de te ensinar um pouco do que eu sei. Obrigada por me ajudar nas tarefas mais chatas, mais demoradas, por embarcar em novos protocolos, por comemorar comigo todas as pequenas conquistas do dia-a-dia no laboratório. Gostaria também de agradecer ao Nelson e Alexandra, os quais abriram a porta da sua casa para mim em Portugal. Muitas das boas recordações que tenho de lá são ligadas a vocês dois, muito obrigada por tudo. À minha amiga Graciela, obrigada por ter embarcado comigo na ideia de irmos a Portugal. Não teria sido o mesmo sem ti, amiga. Obrigada aos amigos do laboratório, por ajudarem nas pequenas tarefas do dia-a-dia, pela conversa, pelo chimarrão, pelo carinho. Por fim, um enorme muito obrigada aos meus pais, por tudo. Amo vocês demais.

- Lista de abreviaturas -

·OH: radical hidroxila

¹O₂: oxigênio singleto

APx: ascorbato peroxidase

APx-R: ascorbato peroxidase-relacionada

DNA: ácido desoxirribonucleico

T-DNA: DNA de transferência

ERO: espécie(s) reativa(s) de oxigênio

GPx: glutaciona peroxidase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

O₂⁻: íon superóxido

O₂: oxigênio molecular

Prx: peroxidase de classe III

RNA: ácido ribonucleico

ROS: do inglês, *reactive oxygen species*

RNA: ácido ribonucleico

CP ou KatG: catalase-peroxidase

LiP: lignina peroxidase

MnP: manganês peroxidase

APx-L: do inglês, *ascorbate peroxidase-like*

VP: peroxidases versáteis

YFP: do inglês, *yellow fluorescent protein*

TL29: do inglês, *thylakoid lumen 29kDa*

ABA: do inglês, *abscisic acid*

GA: do inglês, *gibberellin acid*

CDS: sequência codificadora

qRT-PCR: do inglês, *real time quantitative polymerase chain reaction*

MS: meio de cultivo Murashige and Skoog

- Resumo -

Peroxidases atuam catalisando a redução do peróxido de hidrogênio à água a fim de minimizar o dano celular e modular, direta ou indiretamente, respostas celulares dependentes da sinalização operada por esta espécie reativa de oxigênio. Análises prévias, feitas em bancos de dados de sequências genômicas, permitiram a identificação de uma nova heme peroxidase não-animal (ascorbato peroxidase-relacionada ou APx-R), a qual foi descrita pela primeira vez em 2011 em um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa. O trabalho detalhado nos próximos capítulos desta tese teve como objetivo caracterizar a participação de APx-R no metabolismo antioxidante vegetal através de abordagens filogenéticas e funcionais. Os resultados apresentados nos capítulos dois e três mostram que APx-R é uma peroxidase de classe I, filogeneticamente relacionada à ascorbato peroxidase, citocromo-c peroxidase e catalase peroxidase. Em *Arabidopsis thaliana*, APx-R codifica uma proteína cloroplastídica que atua regulando os processos de germinação e maturação da semente. A superexpressão de APx-R *in planta* afetou drasticamente a viabilidade das sementes, sugerindo que os níveis de expressão deste gene devem ser rigorosamente controlados para permitir o desenvolvimento da planta. Além disso, as análises filogenéticas aqui apresentadas levaram à identificação de uma nova família de peroxidases (intitulada ascorbato peroxidase-like ou APx-L), adicionando um novo componente ao complexo sistema antioxidante vegetal.

- Abstract -

Peroxidases act reducing hydrogen peroxide into water, minimizing cell injury and modulating cell responses through hydrogen peroxide signaling. From analysis in public genome databases, we identified a non-animal heme-peroxidase (ascorbate peroxidase-related or APx-R) present from basal to vascular plants, which was initially described in a study published by our group in 2011. The work described hereafter aimed to characterize APx-R participation in the antioxidant metabolism through phylogenetic and functional approaches. The results presented on chapters two and three showed that APx-R is a class I peroxidase, phylogenetically related to ascorbate peroxidase, cytochrome-c peroxidase and catalase peroxidase. In *Arabidopsis thaliana*, APx-R gene encodes a chloroplast protein which acts regulating germination and seed maturation

processes. The overexpression of APx-R in planta impaired seed viability, showing that APx-R expression level must be tightly controlled in order to enable plants to develop properly. In addition, the phylogenetic analysis here presented allowed the identification of a new peroxidase family, called ascorbate peroxidase-like (APx-L), which adds a new component into plant antioxidant metabolism.

Capítulo I

- Introdução -

1. Espécies reativas de oxigênio em organismos vegetais

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são subprodutos originados a partir da redução parcial do oxigênio molecular (O_2), sendo a sua produção uma consequência inevitável do metabolismo aeróbico. Processos metabólicos dependentes de oxigênio, como a respiração aeróbica, fotossíntese e fotorrespiração, desencadeiam a produção de ERO em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, respectivamente. Nestes processos, é necessário que ocorra a transferência de quatro elétrons para que o oxigênio molecular seja reduzido a duas moléculas de água; no entanto, o oxigênio tem preferência por vias univalentes de redução, o que acarreta na produção de moléculas parcialmente reduzidas (Scandalios, 2002; Foyer & Noctor, 2003). A excitação de um elétron do O_2 para um orbital de maior energia resulta na formação de uma ERO denominada oxigênio singlete (1O_2). A transferência de um, dois ou três elétrons para uma molécula de O_2 leva à formação das ERO radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila ($\cdot OH$), respectivamente (Scandalios, 2002).

Em condições ideais de cultivo, a produção de ERO em plantas fica em torno de $240 \mu M s^{-1}$ de superóxido e de uma concentração de $0,5 \mu M$ de peróxido de hidrogênio nos cloroplastos, principal fonte de geração destas moléculas. Entretanto, esta produção é aumentada frente a adversidades bióticas ou abióticas, de forma que os níveis intracelulares de superóxido e peróxido de hidrogênio podem chegar a $720 \mu M s^{-1}$ e $15 \mu M$, respectivamente (Polle, 2001; Mittler, 2002). O aumento da concentração de ERO na célula deve ser atenuado pelo metabolismo antioxidante, uma vez que a exposição dos componentes celulares a níveis exacerbados destas moléculas pode levar a um quadro de estresse oxidativo, caracterizado pela peroxidação dos lipídios celulares, oxidação proteica, inibição enzimática e ao dano ao DNA e RNA, além de possível indução de vias de morte celular programada (Mittler, 2002).

As plantas desenvolveram mecanismos de percepção de sinais externos que as permitem responder de maneira adequada às mais diversas mudanças no ambiente, através de vias de sinalização que muitas vezes estão intimamente relacionadas com a produção de ERO (Xia et al., 2009). Não apenas no que se refere a situações de estresse oxidativo, mas também em relação ao ciclo de desenvolvimento, as plantas tem se mostrado dependentes da produção e percepção de ERO, de forma que o papel destas moléculas como sinalizadores têm ficado cada vez mais evidente (Kocsy et al., 2013). Apesar de ainda pouco documentada, a regulação espacial e temporal da produção e

acúmulo de ERO parece ser o ponto chave para que as mesmas moléculas sejam capazes de desencadear diferentes respostas. Em analogia ao papel do cálcio como mensageiro secundário, postula-se que a dinâmica de formação/degradação de ERO em diferentes compartimentos subcelulares, tecidos e fases de desenvolvimento seja responsável pela especificidade de resposta a estímulos variados (Mittler et al., 2011; Xia et al., 2015). Neste cenário, o metabolismo antioxidante de diferentes células e/ou compartimentos subcelulares tem um papel essencial, exercendo não apenas função protetiva, mas também regulando direta e/ou indiretamente a sinalização de processos de defesa e desenvolvimento.

2. A superfamília das peroxidases não-animais

Peroxidases são enzimas responsáveis pela catálise da redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) às custas da oxidação de um substrato, que pode ser orgânico ou inorgânico. A superfamília de peroxidases não-animais faz parte de um grupo de peroxidases que se utiliza de um grupamento prostético férrico (grupamento heme) para exercer atividade catalítica nas células, sendo denominadas, portanto, heme peroxidases. Apesar dos membros desta superfamília apresentarem relativamente baixa homologia de sequência entre si (podendo ser de menos de 20%), estes conservam características de dobramento proteico e estrutura secundária (Battistuzzi et al., 2010). Estas peroxidases apresentam duas alfa-hélices em orientação antiparalela, as quais envolvem o grupamento heme e permitem a distinção entre domínios amino e carboxi terminais (Dunford, 1999). Para exercer sua função catalítica, as peroxidases desta superfamília contam com resíduos específicos, os quais se encontram conservados em todos os membros já descritos. Na porção amino-terminal das proteínas ficam localizados dois resíduos essenciais para catalisar a clivagem heterolítica do peróxido de hidrogênio, histina (distal) e arginina, sendo estes dois aminoácidos separados por outro de cadeia lateral aromática (triptofano ou fenilalanina) (Pipirou et al., 2009). Na porção carboxi-terminal encontra-se outro resíduo de histidina, convencionada como histidina proximal, ao qual o grupamento heme se liga (Sharp et al., 2003). Além destes, resíduos responsáveis pela interação das proteínas com substratos apresentam-se conservados; no entanto, como veremos nos próximos parágrafos, estes diferem de acordo com a especificidade de cada enzima.

A superfamília de peroxidases não-animais foi inicialmente descrita por Karen Welinder em 1992 sob o nome de “superfamília de peroxidases de plantas, fungos e bactérias”. Vários anos depois, a identificação de membros desta superfamília em outros grupos de organismos, como archea, algas e protistas, motivou a modificação deste primeiro nome para “superfamília de peroxidases não-animais” (Passardi et al., 2007). No entanto, a crescente descrição de supostos membros desta superfamília em genomas de metazoários (Wang et al., 2001; Habetha & Bosch, 2005; Adak & Datta, 2005) tem motivado discussões sobre a necessidade de uma nova alteração no nome, bem como sobre a origem e evolução dos genes codificadores destas peroxidases (Zamocký & Obinger, 2010). Apesar destas questões ainda permanecerem em aberto, a separação dos membros da superfamília em três classes (classes I, II e III), com base na similaridade entre sequências (Welinder, 1992; Welinder & Gajhede, 1993), é muito bem aceita até hoje. A classe I é formada por peroxidases intracelulares de grande prevalência nos mais diversos organismos, estando presente desde bactérias a plantas. Esta classe é formada pelas enzimas catalase peroxidase (CP ou KatG), ascorbato peroxidase (APx), citocromo c peroxidase (CcP) e enzimas híbridas ascorbato peroxidase-citocromo c peroxidase (APx-CcP ou Híbridas). Enzimas secretórias de fungos formam a classe II, cujos membros mais estudados são lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). Por fim, a classe III é formada por peroxidases secretórias de plantas, sendo a peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*) o seu membro mais conhecido e estudado. Estas classes são filogeneticamente relacionadas e tem sua origem na classe I, a qual provavelmente se originou a partir de um único gene codificador de uma peroxidase ancestral em um organismo procariótico (Passardi et al., 2007). O surgimento de todas estas diferentes enzimas, as quais são codificadas por grandes famílias gênicas, teve sua origem ao longo da evolução dos genomas, a partir de eventos de duplicação, divergência e transferência gênica (Passardi et al., 2007). Apesar de diferentes sob muitos aspectos, todas as peroxidases desta superfamília operam de acordo com o mesmo ciclo catalítico, o qual possui três passos: (1) a enzima reage com o peróxido de hidrogênio, este é reduzido à água e a enzima é oxidada na sua porção heme, formando um radical chamado porfirina; (2) a enzima é parcialmente reduzida através da oxidação de uma molécula de substrato; (3) a enzima é completamente reduzida, voltando ao seu estado original, através da oxidação de uma segunda molécula de substrato. Quando a enzima é oxidada pelo peróxido de hidrogênio (passo 1), ela

passa a ser chamada de composto I. Quando parcialmente reduzida (passo 2), é então chamada de Composto II (Dunford, 1999).

2.1. A classe I

2.1.1. Catalase-peroxidase (CP ou KatG)

Catalase-peroxidases (CP ou KatG) exibem atividade predominantemente catalásica, no entanto diferem de outras catalases por também apresentarem significativa atividade de peroxidase (Sun et al., 1994; Klotz & Lowen, 2003). Atualmente, existem 475 sequências completas de catalases-peroxidases depositadas no *PeroxiBase* (peroxibase.toulouse.inra.fr; Fawal et al., 2013), sendo estas derivadas de organismos procarióticos (eubactérias), archaea, organismos protistas e fungos, principalmente. Catalases-peroxidases apresentam uma estrutura gênica peculiar em relação a outros membros da superfamília, a qual parece ter sido originada a partir de uma duplicação gênica em tandem com posterior diferenciação entre cada uma das partes, originando, portanto, dois domínios (Welinder, 1992). O domínio amino-terminal reteve os resíduos necessários para exercer ambas as atividades (peroxidase e catalase), enquanto a função do domínio carboxi-terminal permanece não compreendida, em razão da ausência de resíduos catalíticos nesta região da proteína (Zamocký & Obinger, 2010). Duas teorias coexistem atualmente para explicar o surgimento das demais enzimas da superfamília: uma delas credita à perda do domínio carboxi-terminal da catalase-peroxidase o surgimento de todas as outras enzimas da superfamília, as quais são, na sua maioria, proteínas com apenas um domínio, o qual tem extensa homologia com o domínio amino-terminal de KatG (sendo este subdivido nos domínios amino e carboxi terminais de heme peroxidases, discutidos anteriormente) (Klotz & Loewen, 2003). Outra teoria sugere que tanto KatG quanto as demais peroxidases de classe I (APx e CcP) tiveram sua origem a partir de um gene de peroxidase ancestral, sendo a duplicação em tandem encontrada em KatG um evento posterior, específico desta peroxidase (Passardi et al., 2007). Ainda não existem informações suficientes para explicar o surgimento da superfamília de

peroxidases não-animais, mas muito provavelmente as enzimas de classe I (KatG, APx e CcP) estão na base desta história evolutiva e estão envolvidas com a origem das demais classes.

2.1.2. Citocromo c peroxidase (CcP)

Primeiramente identificada em mitocôndrias de levedura (Williams e Stewart, 1976; Daum et al., 1982), a citocromo c peroxidase (CcP) foi a primeira enzima heme-dependente a ter sua estrutura cristalográfica resolvida (Poulos et al., 1978; Poulos et al., 1980). Atualmente, existem 334 sequências completas de CcP depositadas no PeroxiBase, sendo estas sequências derivadas principalmente de fungos, mas também de alguns poucos organismos protistas. Estas peroxidases atuam catalisando a redução do peróxido de hidrogênio, gerado durante a respiração aeróbica, a partir da oxidação de moléculas de citocromo c, substrato para esta enzima. Alguns autores verificaram que um pequeno grupo de CcP parece não possuir o peptídeo de direcionamento para a mitocôndria, o que implicaria na existência de CcP ativas no citosol de alguns organismos (Zamocký and Obinger, 2010); no entanto, dados experimentais ainda não foram conduzidos para elucidar esta questão. Em comparação às outras peroxidases da superfamília, citocromo c peroxidase possui uma diferença marcante: esta enzima não forma radical porfirina durante sua atividade catalítica, como as demais enzimas; a formação do radical neste caso se dá pela interação do peróxido de hidrogênio com um resíduo de triptofano da própria CcP, o qual se encontra conservado em todos os membros desta família. As demais enzimas da superfamília possuem uma fenilalanina nesta posição, a qual, por possuir maior potencial redox, é mais dificilmente oxidada e, assim, favorece a oxidação do grupamento heme e a consequente formação do radical porfirina (Poulos, 2010).

2.1.3. Ascorbato peroxidase (APx)

As ascorbato peroxidases estão entre as enzimas mais estudadas da superfamília. Até o momento, existem 2844 estudos depositados no PubMed sobre estas enzimas. Estas peroxidases respondem aos mais diversos fatores

ambientais, como exposição à radiação ultravioleta (UV-B), deficiência de água, excesso de sal, alta intensidade luminosa, alta ou baixa temperatura e excesso de íons metálicos (Mittler & Zilinskas, 1994; Rao et al., 1996; Lopez et al., 1996; Karpinski et al., 1997; Vansuyt et al., 1997; Yoshimura et al., 2000; Blokhina et al., 2001; Mittova et al., 2004a,b). Atualmente, existem 462 sequências completas de APx depositadas no PeroxiBase, sendo estas derivadas de alguns organismos protistas, algas e plantas, principalmente. Em plantas, estas enzimas são codificadas por pequenas famílias gênicas, sendo suas isoformas classificadas de acordo com a sua localização subcelular. A localização subcelular final de cada isoforma é determinada pela presença ou ausência de peptídeos de direcionamento organela-específicos e pela presença ou ausência de domínios transmembrana, encontrados nas regiões amino e carboxi-terminais, respectivamente (Teixeira et al., 2004). Ascorbato peroxidases utilizam o ascorbato como substrato, sendo estas proteínas extremamente sensíveis a baixas concentrações desta molécula (Shigeoka et al., 2002). O ascorbato interage com estas peroxidases através de ligações de hidrogênio entre esta molécula e dois resíduos extremamente conservados em APx: cisteína³² e arginina¹⁷² (Sharp et al., 2003).

2.2. A classe II

A classe II da superfamília de peroxidases não-animais é composta por enzimas extracelulares de fungos, sendo seus principais membros lignina peroxidases (LiP), manganês peroxidases (MnP) e peroxidases versáteis (VP), as quais combinam características das duas primeiras. Atualmente, existem 68 sequências completas de LiP; 85, de MnP e 50 sequências completas de VP depositadas no PeroxiBase. As enzimas de classe II possuem peptídeos sinais de direcionamento para o retículo endoplasmático, onde são posteriormente encaminhadas para vias de secreção (Conesa et al., 2002; Passardi et al., 2007). Estas enzimas são capazes de utilizar moléculas com grande potencial redox como substrato, como a lignina. Enquanto que LiP consegue utilizar lignina diretamente como seu substrato, MnP atua retirando elétrons de moléculas de manganês (2+), resultando na formação de manganês (3+), o qual, por sua vez, atua na quebra de moléculas de lignina (Conesa et al., 2002). Estas enzimas são

de grande importância ambiental por atuarem na degradação de material vegetal morto e na reciclagem do solo.

2.3. A classe III

As peroxidases desta classe são enzimas extracelulares encontradas essencialmente em plantas, onde são codificadas por grandes famílias gênicas (Passardi et al., 2004). Apenas no genoma de *Arabidopsis*, existem 73 genes codificadores de peroxidases de classe III (Tognolli et al., 2002). Atualmente, existem 3840 sequências completas de peroxidases desta classe depositadas no PeroxiBase, sendo estas derivadas de plantas e de algumas poucas algas. Sugere-se que estas peroxidases tenham tido sua origem em algas pouco antes dos organismos fotossintetizantes colonizarem a terra, permitindo a adaptação das plantas a ambientes com mais oxigênio (Passardi et al., 2004). Estas enzimas são secretadas na parede celular, compartimento apoplástico e vacúolo (Nehaus, 1996; Welinder et al., 2002; Matsui et al., 2003). Além de catalisar a redução do peróxido de hidrogênio a água, como as demais enzimas da superfamília, estas peroxidases são capazes de gerar ERO em uma reação chamada hidroxílica. Um exemplo da funcionalidade destas reações é durante o crescimento da planta, onde as ERO geradas atuam na parede celular, diminuindo a rigidez desta estrutura e permitindo, assim, o alongamento do tecido (Liszkay et al., 2003; Mathé et al., 2010).

2.4. Ascorbato peroxidase-relacionada (APx-R)

Esta peroxidase foi descrita pelo nosso grupo de pesquisa em 2011, através de um estudo no qual verificamos que alguns genes, supostamente codificadores de APx, na verdade codificavam peroxidases de características únicas, as quais não agrupavam com a família APx em análises filogenéticas (Lazzarotto et al., 2011). Apesar de apresentar certa similaridade de sequência com membros da família APx, APx-R possui algumas diferenças marcantes, como em alguns resíduos do sítio catalítico. A estrutura éxon-intron também é um ponto de divergência entre APx e APx-R, sendo esta extremamente conservada entre os membros de uma mesma família, mas diferente entre ambas.

Neste mesmo trabalho, a relação filogenética entre APx-R e as demais heme peroxidases não-animais foi inferida por análise de *Neighbor-joining* a partir de 8 sequências proteicas de APx-R e 61 sequências representativas das três classes de heme peroxidases não-animais. A topologia do cladograma gerado mostrou que APx-R forma um grupo distinto dentro das peroxidases não-animais, o qual não agrupa com nenhuma das três classes já descritas desta superfamília. Posteriormente, novas análises de *Neighbor-joining* e máxima verossimilhança foram feitas incluindo todas as sequências proteicas disponíveis de APx, APx-R e CcP, totalizando 296 sequências. A topologia obtida confirmou, com grande suporte estatístico, que APx-R de diferentes organismos formam um grupo distinto do grupo das APx e do grupo das CcP, as quais são filogeneticamente mais próximas entre si que APx-R, evidenciando, assim, as diferenças existentes nesta peroxidase. Para investigar a participação de APx-R no metabolismo antioxidante, plantas de arroz silenciadas para o gene codificador de APx-R foram obtidas e analisadas. Verificamos que o silenciamento deste gene foi responsável pela modulação indireta das atividades enzimáticas de superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase, as quais estão envolvidas na regulação dos níveis endógenos de peróxido de hidrogênio. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) apresentou-se maior nas plantas silenciadas em relação às plantas controles. Esta medição reflete a taxa de peroxidação lipídica das membranas celulares em decorrência do excesso de ERO nas células, indicando, portanto, que o silenciamento de APx-R promoveu a configuração de um quadro de estresse oxidativo nestas plantas. A localização subcelular de APx-R foi inferida através da transformação transiente de protoplastos de arroz, onde a localização cloroplastídica desta proteína foi verificada. Nestas análises observamos que APx-R também se localiza em pequenos pontos dentro da célula, em um padrão que assemelha-se à localização mitocondrial de algumas proteínas; no entanto, este dado não pode ser devidamente confirmado. Em análise feita no banco de dados PeroxiBase, foram identificados 40 genes codificadores de APx-R, os quais estão presentes em 40 espécies distintas. Assim, foi observado que *APx-R* é um gene cópia-única em virtualmente todos os organismos que o possuem. Sabe-se que diversos eventos de duplicação gênica e cromossômica ocorreram durante a evolução dos genomas vegetais, o que também é verdadeiro para os segmentos

cromossômicos que contêm APx-R nestas espécies. O segmento cromossômico onde APx-R se localiza sofreu dez eventos de duplicação em álamo (*Populus trichocarpa*) e sete em soja (*Glycine max*). Entretanto, o genoma de ambas as espécies possui apenas uma cópia deste gene, evidenciando a perda sistemática das cópias extras de APx-R. Este fato também se mostrou verdadeiro para todas as outras espécies analisadas, indicando que há forte pressão seletiva para que este *locus* permaneça como cópia-única nos genomas vegetais (Lazzarotto et al., 2011; Dunand et al., 2011).

Recentemente, a caracterização de APx-R em *Arabidopsis thaliana* (At4g32320) foi publicada em uma revista de grande impacto na área (Chen et al., 2014). No entanto, este trabalho partiu da premissa que este gene codificaria uma isoforma citosólica de ascorbato peroxidase nesta espécie, a qual foi nomeada APx6. Este dado está fundamentado na anotação existente para este gene em bancos de dados. Os autores mostraram, através do uso de mutantes com perda de função, que APx-R (APx6) parece estar envolvida na proteção de sementes durante os processos de dessecação e germinação. Além disso, mostraram que a perda de função deste gene está relacionada com um desbalanço hormonal nas plantas, as quais apresentaram níveis alterados de ácido absísico, auxinas e citocininas (Chen et al., 2014). No entanto, os autores deste trabalho não fizeram nenhuma menção sobre a descrição deste gene como uma ascorbato peroxidase-relacionada, nem sobre a localização cloroplastídica desta proteína. A discussão de todos os resultados apresentados relaciona estes com a provável função gênica de uma ascorbato peroxidase citosólica, o que pode ter prejudicado a interpretação correta de alguns dados.

- Objetivos -

1. Objetivo geral

Tendo em vista a escassez de dados na literatura acerca da função de APx-R como parte do sistema antioxidante e visando ainda clarificar a relação filogenética entre esta peroxidase e as demais enzimas pertencentes à superfamília, a presente tese de doutorado objetivou a caracterização de APx-R através de uma ampla abordagem filogenética e de estudos funcionais conduzidos na planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

2. Objetivos específicos

- 2.1. Através de uma abordagem filogenética, analisar a relação de APx-R com os demais membros da superfamília de peroxidases não-animais para fins de classificação desta peroxidase;
- 2.2. Verificar a localização subcelular de APx-R em *Arabidopsis thaliana*;
- 2.3. Caracterizar APx-R funcionalmente através da análise de mutantes de perda de função para este gene;
- 2.4. Analisar o efeito da inserção de cópias extras do gene codificador de APx-R no genoma através da obtenção de plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando este gene.

Capítulo II

- Inferências filogenéticas sobre ascorbato peroxidase-relacionada e a
superfamília das peroxidases não-animais -

Artigo científico aceito para publicação pelo periódico *Trends in Plant Science*

Revisiting the Non-animal Peroxidase Superfamily

Fernanda Lazzarotto¹, Andreia Carina Turchetto Zolet¹, Márcia Margis-Pinheiro¹

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Margis-Pinheiro, M. (marcia.margis@ufrgs.br)

Keywords: heme peroxidases, antioxidant metabolism, molecular evolution

Abstract

Peroxidases reduce peroxide through substrate oxidation in order to alleviate oxidative stress in aerobic organisms. Since the initial description of the non-animal peroxidase superfamily, great effort has been made to characterize this large and heterogeneous group of proteins. Next generation sequencing data has permitted an in-depth study of the molecular evolution of this superfamily and allowed us to perform a phylogenetic reconstruction. Through this analysis, we identified two additional class I members, and here, we discuss the similarities and differences among members of this class. Our results provide new insights into the organization of these antioxidant enzymes, allowing us to propose a new model for the emergence and evolution of this superfamily.

Reorganization of the non-animal peroxidase superfamily

Peroxidases are proteins that play a prominent role in antioxidant defense in aerobic organisms by removing the peroxides generated by oxy-reduction reactions. Since the characterization of the non-animal peroxidase superfamily (previously named plant, fungal and bacterial peroxidases) [1, 2], great effort has been made to understand and characterize this heterogeneous group of proteins. Superfamily members were divided into three classes of phylogenetically related proteins designated class I, II and III [1]. Class I is the most widespread and is prevalent in organisms ranging from prokaryotes to complex eukaryotes. This class is composed of the intracellular peroxidases Ascorbate Peroxidase (APx), Cytochrome-c Peroxidase (CcP), the hybrid Ascorbate Peroxidase-Cytochrome-c Peroxidase (APx-CcP, or Hybrid) and Catalase-Peroxidase (CP, or KatG). Class II comprises fungal secretory peroxidases such as Lignin Peroxidase (LiP), Manganese Peroxidase (MnP), and Versatile Peroxidases (VP). Finally, class III contains plant peroxidases targeted to secretory pathways that are called Class III Peroxidases (Prx) [2-4]. In recent years, an increasing number of sequencing projects (i.e., genome, transcriptome, and EST sequencing) have generated an enormous amount of data, which added more information but also complexity to this subject, raising new questions about the origin and evolution of these peroxidases. New putative superfamily members were identified, and peroxidases initially predicted to be species-specific were described in many other organisms. To accommodate all these

novelties, families were further subdivided and the superfamily became even more complex than previously thought [5, 6]. To organize and correctly classify these peroxidases, we further analyzed the molecular evolution and phylogenetic reconstruction of this superfamily. These analyses permitted us to identify new players in antioxidant metabolism and to provide new insight on the evolutionary rise of the superfamily.

Phylogenetic reconstruction of the superfamily: identification of new members

For the phylogenetic analysis, 921 protein sequences representative of all superfamily enzymes were selected and manually inspected for ambiguous positions, which were subsequently removed. A total of 246 amino acid positions were included in the final data set used for phylogenetic tree reconstruction by Bayesian methods (see Glossary) [7]. Our analysis confirmed the superfamily categorization into three main classes, as first proposed by Wellinder in 1992 [1]. Furthermore, the phylogenetic topology (see Glossary) obtained for class II and class III agrees with most of the current literature. Class II comprises four strongly supported protein families of fungal secretory enzymes, and class III forms one large cluster (see Glossary) that contains all class III peroxidase sequences (Figure 1). The protein families with the most controversial phylogenetic classifications clustered with class I members in our analysis; we will thus focus our discussion on this class.

According to our results, class I proteins are subdivided into nine well-supported groups. In addition to the well-studied KatG, APx, CcP and APx-CcP families, two more members were identified (Figure 1). One of these new members is the Ascorbate Peroxidase-Related (APx-R) enzyme, first described by our group in 2011 [5]. This peroxidase was previously considered a member of the APx family; however, our group has shown that APx-R itself constitutes a distinct family of proteins that cluster as a separate class inside the superfamily [5]. By contrast, a recent study suggested that APx-R could be a class III protein [6]. Through our current analysis, which is based on a greater number of sequences and utilizes a more robust phylogenetic method, APx-R clustered with other class I members with high statistical significance. Here, we selected only conserved domains to perform a Bayesian inference, providing strong support for the inclusion of the APx-R cluster in class I.

The other new class I group identified here is composed of sequences previously described as APx family members. We propose to name this new group “Ascorbate Peroxidase-Like” (APx-L). The APx-L cluster, similarly to APx-R, is composed of sequences from organisms ranging from algae to plants that do not group with classic APx, despite their annotation in public databases as APx genes. The presence of this group inside class I is strongly supported (Figure 1), suggesting the existence of a new class I protein family that has not been described previously. The classification of these sequences as a family is also supported by other features, such as a conserved exon-intron structure and the existence of conserved singularities in protein domains, which will be discussed in detail in the next section.

The topology obtained for KatG and APx families agrees with that described in previous studies [4, 6], revealing the existence of branches inside each cluster in order to accommodate sequences from distinct groups of organisms or sequences encoding proteins targeted to distinct subcellular compartments, respectively (Figure 1). Class I also contains one cluster of CcP sequences and two smaller clusters of APx-CcP sequences (Hybrids A1 and A2). Outside class I, a cluster containing a subset of fungal APx-CcP sequences (called Hybrid B) can be distinguished, suggesting that APx-CcP sequences are probably evolving separately within these organisms. Despite the strong support for the existence of Hybrid B cluster, its localization inside superfamily classes remains uncertain. According to our results, the Hybrid B family did not group with any other class (Figure 1). By contrast, a recent study described Hybrid B sequences as class III members [6]. However, the obtained result was not well supported, suggesting that this matter requires further investigation.

The analysis here presented led to the identification of a new family of peroxidases, here addressed as APx-L, and to the description of two additional class I members, APx-L and APx-R. The clear separation of APx-L and APx-R from APx family reveals that these additional enzymes may play within the antioxidant metabolism of photosynthetic organisms, implying the existence of peroxidases probably dissimilar in function from the ones described until now. Some features of these new class I peroxidases will be discussed in more detail in the next section.

Expanding the antioxidant defense system in algae and plants

Although dissimilar in overall sequence, all superfamily members contain six separately positioned amino acids important for catalysis and protein structure that are strictly conserved among the three classes (see Figure S1 in the supplementary material online) [8-10]. Like all superfamily members described to date, Ascorbate Peroxidase-Related proteins harbor these key residues. Unlike other class I members, which contain a distal tryptophan (red asterisk), APx-R possesses a phenylalanine residue at the same position, resembling class II, III and a minority of class I members, such as APx sequences from *Mesembryanthemum crystallinum* and spinach [11, 12]. Despite their similarities, an interesting difference between APx-R and APx families is the absence of an extremely conserved arginine 172 in APx-R proteins (see Figure S1 in the supplementary material online). This residue is essential for ascorbate binding, and substitutions at this site completely abolish APx enzymatic activity toward this substrate [13]. In addition, a cysteine residue near distal histidine (Cys32), also implicated in ascorbate binding to APx, is missing in APx-R family members. Peroxidases in general are able to utilize other substrates, such as guaiacol or pyrogallol, as electron donors. Studies have shown that arginine 38 is an essential residue for the interaction of most peroxidases with these substrates [14]. As in other superfamily members, this residue is also highly conserved in the APx-R family, suggesting that these enzymes should be capable of acting on these substrates and perhaps others. In addition, a proline residue (Pro132), which has been implicated in the binding of aromatic molecules such as salicylic acid to peroxidases [11], is conserved in APx-R family members. Together, these observations indicate that APx-R most likely uses substrates other than ascorbate; however, this assumption remains to be experimentally investigated. A study published in 2014 has shown that *Arabidopsis thaliana* APx-R (there referred to as APx6) participates in seed antioxidant defense [15], suggesting enzymatic functionality of these molecules.

As mentioned above, our work has identified a new class I family which we have named APx-L (Figure 1). All sequence members of this cluster were retrieved from PeroxiBase [16] and are listed in Table S1 in the supplementary material online. An important feature of APx and APx-R families is the presence of a conserved exon-intron structure among members. A conserved gene structure was also observed in the APx-L gene family (see Figure S2 in the supplementary material online), which

strengthens the identity of this new family as a separate group. Interestingly, no differences in eudicot and monocot gene structure within the APx-L family were observed, in contrast to both APx and APx-R. However, the main difference between APx, APx-R and APx-L families is related to their active and substrate binding sites. This new family of peroxidases is characterized by the near total absence of residues known to be essential for catalytic activity, substrate and heme (see Glossary) binding in every previously annotated sequence (see Figure S1 in the supplementary material online). However, it has been shown that *Arabidopsis thaliana* APx-L (there referred to as APx4) is indeed functional and participates in seed antioxidant defense [17]. Despite the observed differences in key protein residues between APx-L and APx-R, there are some similarities between them: they are targeted to the chloroplast, participate in seed stress defense during development and are encoded by a single gene in most species [5, 15, 17]. Together, our results and those of previous studies revealed that both families are phylogenetically related to class I members of the non-animal peroxidase superfamily and that these proteins participate in plant stress defense. However, further functional studies must be designed to address the molecular mechanisms by which APx-R and APx-L act.

New insights into the origin and evolution of the superfamily

In recent years, the name of the superfamily has been the subject of debate. The non-animal peroxidase superfamily (its current name in PeroxiBase) was first referred to as the “plant, fungal and bacterial peroxidase superfamily” by Wellinder [1]. Since then, the identification of sequences in other groups of organisms has motivated name changes to “non-animal peroxidases superfamily”, based on the organisms encoding these enzymes, and to “peroxidase-catalase superfamily”, based exclusively on their catalytic activity [2, 18]. The identification of superfamily sequences in unexpected genomes, such as Metazoans, has been the main motivation for these name discussions as it has ultimately raised questions regarding the evolution of the superfamily. In order to understand how these peroxidases evolved, we searched for each superfamily enzyme over distinct groups of organisms and the results are summarized in Figure 2. All complete sequences deposited in PeroxiBase were categorized into seven groups: Bacteria, Archaea, Protozoa, Algae, Plantae, Fungi and Metazoa. Through this analysis, we verified that some groups of organisms inexplicably exhibited far fewer sequences

than other groups (denoted in Figure 2 by shaded boxes), and we understand that groups with few representatives should be carefully and individually analyzed. The existence of few reports on these groups could indicate a scarcity of sequencing data, but could also indicate contamination during sequencing procedures or even the existence of relics obtained through horizontal gene transfer over the course of evolution. The presence of plant-like proteins in Protozoa, Metazoa and Fungi has been previously reported and raised the hypothesis that these genes could have been acquired through ancient endosymbiosis events and horizontal gene transfer [19, 20]. This could explain the inconsistent prevalence of some gene families in members of the same kingdom.

There is not yet a consensus regarding the origin and evolution of the superfamily. To date, two hypotheses have been proposed to explain the origin of these proteins. The first hypothesis suggests that current catalase-peroxidase gene is the ancestors of both APx and CcP genes. Under this scenario, KatG would have been laterally transferred to the nucleus of an eukaryotic ancestor, and APx and CcP would be the product of an intron insertion between the amino and the carboxi-terminal regions of the KatG gene [21]. The second hypothesis proposes that ancestral bacteria possessed an ancestral peroxidase sequence from which APx, CcP, and KatG originated. According to this theory, eukaryotes would have acquired CcP during the first endosymbiosis event and APx during the second endosymbiosis event. KatG genes would be probably the result of a duplication and subsequent fusion of the ancestral peroxidase in bacteria [2]. According to the second hypothesis, APx and CcP genes would have evolved before the endosymbiosis events that resulted in the acquisition of mitochondria and chloroplasts. However, there are no records of APx and CcP sequences in Bacteria or Archaea genomes, suggesting that these proteins evolved more recently than KatG, which is present in both kingdoms. In fact, KatG is the only member of the non-animal peroxidase superfamily that is present in both Proteobacteria and Cyanobacteria, which seemed to gave rise to mitochondria and chloroplast, respectively [22]. Thus, it seems more likely that KatG is at the base of superfamily evolution, as proposed in the first hypothesis. However, we agree with the observation that connects the endosymbiosis events to CcP and APx acquisition, but we propose that divergence occurred during these events and not before. Therefore, we present here an evolutionary model that combines ideas from both hypotheses and is supported by the distribution of superfamily members across various organisms (Figure 3). Our model proposes that an ancestral KatG gene, present in ancient Bacteria, was transmitted to an

ancient eukaryotic cell in the first endosymbiosis event, which preceded the mitochondria acquisition. During this major cell transformation, a CcP sequence diverged from the ancient KatG encoding gene. In the second endosymbiosis event, the ancient eukaryote engulfed a Cyanobacterium, giving rise to the algae and plant lineage. The Cyanobacteria KatG gene was probably transferred to the ancient eukaryotic genome and diverged into an ancestral APx gene during the second endosymbiosis event. This ancestral APx gene then likely diverged into current APx, APx-R and APx-L genes. Plants evolved in the absence of CcP genes, and APx sequences duplicated and diverged repeatedly in these genomes. Class II peroxidases probably evolved from CcP genes in Fungi, as previously discussed [2]. The origin of class III genes is more difficult to explain, as these enzymes seem to have evolved more recently. However, class III is indeed phylogenetically related to classes I and II, suggesting that all of these proteins are likely to share a common origin. The evolution of a large and heterogeneous superfamily from one precursor gene reaffirms the complexity of oxidative stress in aerobic organisms and exemplifies how distinct organisms can respond and adapt to similar stimuli.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Felipe dos Santos Maraschin for critical comments on the manuscript. This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Reference list

1. Welinder, K. G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2, 388-393
2. Passardi, F. et al. (2007) Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* 89, 567–579
3. Zámocký, M. (2004) Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *Eur. J. Biochem.* 271, 3297–3309

4. Teixeira, F. K. et al. (2004) Analysis of the Molecular Evolutionary History of the Ascorbate Peroxidase Gene Family: Inferences from the Rice Genome. *J Mol Evol* 59, 761–770
5. Lazzarotto, F. et al. (2011) Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. *New Phytologist* 191, 234-50
6. Zámocký, M. et al. (2014) Turning points in the evolution of peroxidase-catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* 71(23), 4681-4696
7. Drummond, A. J. and Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7:214
8. D.J. Schuller, D. J. et al. (1996) The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4, 311–321
9. Gajhede, M. et al. (1997) Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct Biol.* 4, 1032-1038
10. Sharp, K. H. et al. (2003) The crystal structure of the ascorbate peroxidase/ascorbate complex, *Nat. Struct. Biol.* 10, 303-307
11. Sharp, K. H. et al. (2004) Crystal structure of the ascorbate peroxidase-salicylhydroxamic acid complex. *Biochemistry* 43, 8644-8651
12. Pipirou, Z. et al. (2009) Peroxide-Dependent Formation of a Covalent Link between Trp51 and the Heme in Cytochrome c Peroxidase. *Biochemistry* 48, 3593–3599
13. Kovacs, F. A. et al. (2013) Abolishing activity against ascorbate in a cytosolic ascorbate peroxidase from switchgrass. *Phytochemistry* 94, 45-52
14. Nokthai, P. et al. (2010) Molecular Modeling of Peroxidase and Polyphenol Oxidase: Substrate Specificity and Active Site Comparison. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 3266-3276
15. Chen, C. et al. (2014) ASCORBATE PEROXIDASE6 Protects Arabidopsis Desiccating and Germinating Seeds from Stress and Mediates Cross Talk between Reactive Oxygen Species, Abscisic Acid, and Auxin. *Plant Physiology* 166, 370–383
16. Fawal, N. et al. (2013) PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Res.* 41, 441-444

17. Wang, Y. et al. (2014) The APX4 locus regulates seed vigor and seedling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 239, 909–919
18. Zámocký, M. and Obinger, C. (2010) Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. In *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases* (E. Torres and M. Ayala, eds.), pp. 7-35, Springer
19. Doolittle, W. F. (1998) You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet.* 14(8), 307-311
20. Yuan, S. et al. (2008) Phylogenetic Analyses of Plastid-originated Proteins Imply Universal Endosymbiosis in Ancestors of Animals and Fungi. *Z. Naturforsch.*, 63: 903-908
21. Klotz, M. G. and Loewen, P.C. (2003) The molecular evolution of catalytic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol Biol Evol* 20, 1098–1112
22. Timmis, J. N. (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics* 5, 123-135

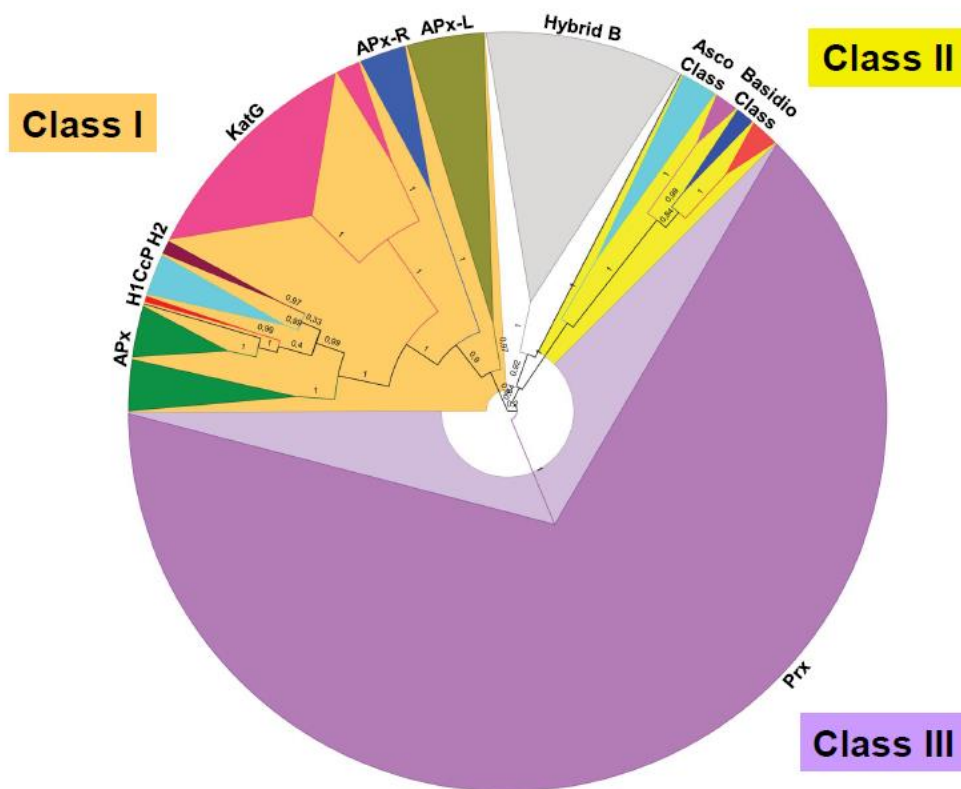


Figure 1. The phylogenetic relationship between non-animal peroxidase superfamily genes was reconstructed using the Bayesian method. A total of 921 protein sequences were included in the analyses, and ambiguous positions were removed from the alignment. Three well-supported main clusters corresponding to distinct superfamily classes formed; these are colored in orange (class I), yellow (class II) and purple (class III). The families of proteins belonging to the superfamily are represented by one colour each and these are designated as follows: ascorbate peroxidase (APx); hybrid A1 (H1); hybrid A2 (H2); cytochrome-c peroxidase (CcP); catalase-peroxidase (KatG); ascorbate peroxidase-related (APx-R); ascorbate peroxidase-like (APx-L); hybrid B; asco class type A (Asco Class). Versatile peroxidase (purple), manganese peroxidase (blue) and other class II peroxidases (red) are collectively referred as Basidio Class and class III peroxidases as Prx. The posterior probabilities are shown above each branch.

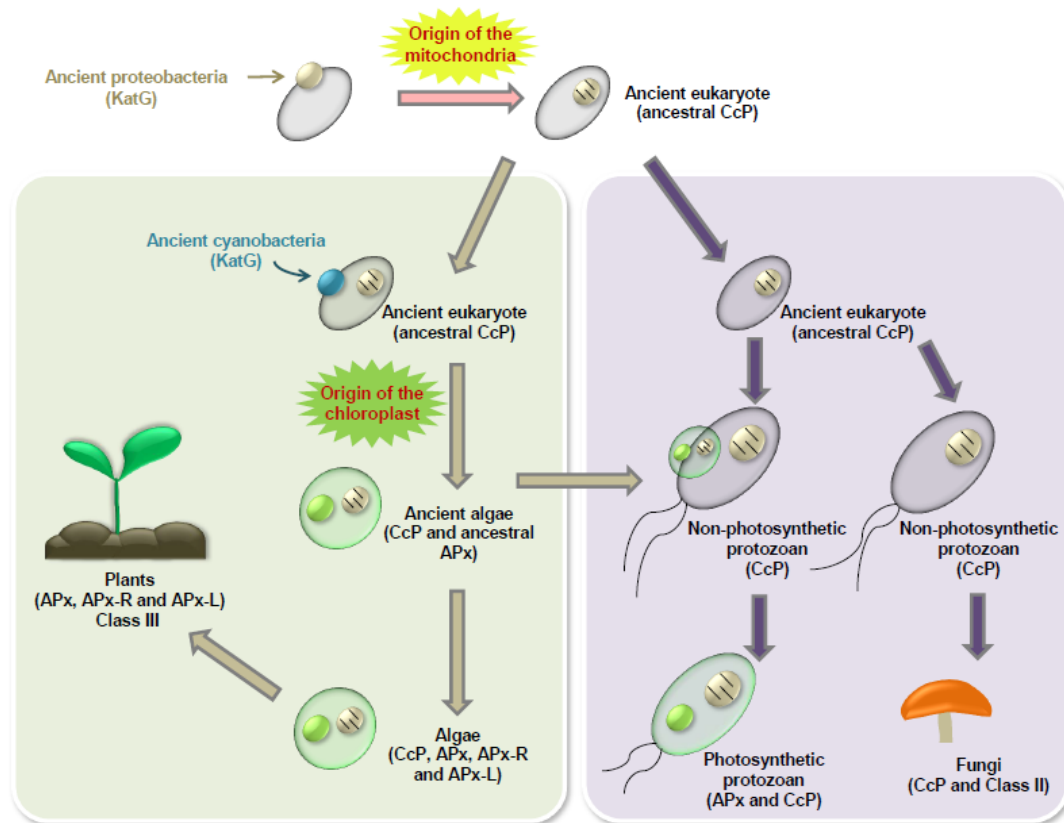


Figure 3. A proposed evolutionary model to explain the origin and evolution of the non-animal peroxidase superfamily. An ancestral catalase peroxidase (KatG) gene was transmitted to an ancient eukaryote in the first endosymbiosis event, giving rise to the mitochondria. During this process, a cytochrome-c peroxidase (CcP) sequence diverged from the ancient KatG. In the second endosymbiosis event, from which the chloroplast originates, the ancient eukaryote acquired another KatG gene from engulfed cyanobacteria. This gene diverged into the ancestral APx gene during the second endosymbiosis process, which probably diverged later into the current APx, APx-R and APx-L genes. Class II peroxidases presumably diverged from CcP genes in fungi, and Class III peroxidases only evolved later in plants (and in some green algae which predate land colonization).

TrendsBox

- The non-animal peroxidases superfamily was first described in 1992 by the name plant, fungal and bacterial peroxidases superfamily. Since then, the identification of members in other groups of organisms has motivated the first name change and divided opinions regarding the need for further name updates.
- In the past few years, phylogenetic analyses performed from increasingly larger datasets suggested that some superfamily groups should be further subdivided and reorganized inside the superfamily classes; however, most results were not well supported and, therefore, largely inconclusive.
- Apart from their scavenging activity, these proteins act as regulators of the hydrogen peroxide signaling. An accurate classification of each member should provide insights for functional studies aiming to understand the importance of these enzymes for defense and development.

Outstanding questions box

- The existence of non-animal peroxidases superfamily coding sequences in metazoan genomes remains questionable. For a comprehensive understanding of the superfamily evolution, future studies should address this question in detail. Is this family indeed present in metazoan genomes or these observations are the result of lateral gene transfers or even contaminated DNA samples?
- Our study highlighted the lack of ascorbate binding sites in both APx-R and APx-L and to the total absence of catalytic residues in APx-L. The involvement of these proteins with antioxidant metabolism has been showed in previous studies, but their enzymatic activity has not been demonstrated yet. Is APx-L able to catalyze the reduction of hydrogen peroxide, despite the absence of known catalytic residues? If so, what residues are implicated in its catalytic function? What substrates APx-R and APx-L are able to oxidize? The answers to these questions should provide new and critical information for understanding antioxidant metabolism in plants.

Glossary

Bayesian inference: is a general methodology of statistical inference used to perform phylogenetic analysis. Before the analysis of the data, parameters are assigned a prior

distribution, which is combined with the data (or likelihood) to generate the posterior distribution.

Cluster: A group of individuals or genes/sequences closely related in a tree.

Heme: Is an enzyme cofactor formed by a large heterocyclic organic ring (called porphyrin) which contains a ferrous ion in the centre.

Topology: The representation of the relationships among branches of a tree as a result of phylogenetic analysis.

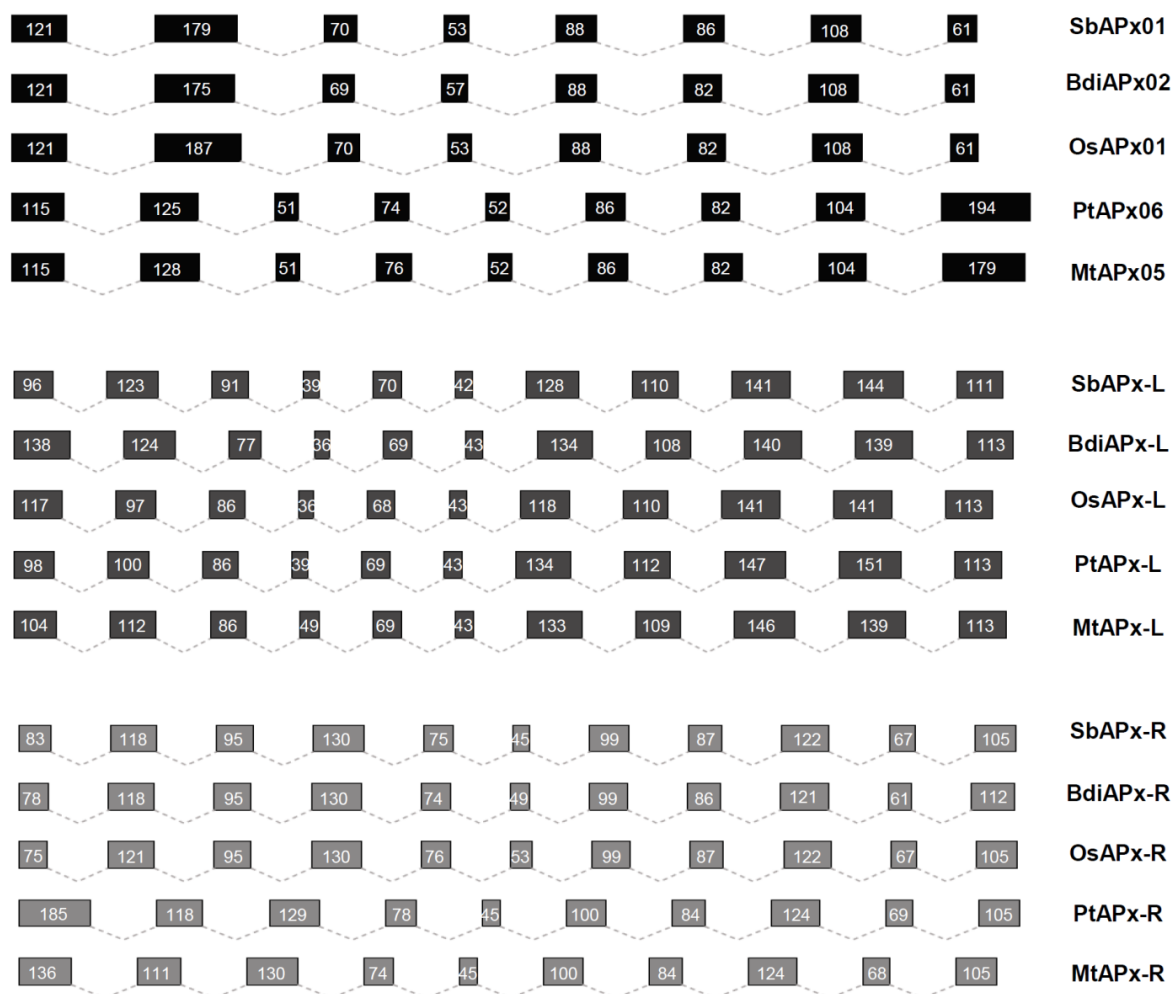


Figure S2. Structure of Ascorbate Peroxidase (APx), Ascorbate Peroxidase-Related (APx-R) and Ascorbate Peroxidase-Like (APx-L) genes. . Exon sequences are represented as simplified boxes. The size of each exon is given in bp inside boxes. Dashed lines represent introns (not in scale).

Table S1. List of Ascorbate Peroxidase-Like (APx-L) sequences deposited in PeroxiBase.

Name	PeroxiBase ID	Species name	ChloroP prediction*
AlyAPx-L	7514	<i>Arabidopsis lyrata</i>	Yes
AtAPx-L	3290	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Yes
BdiAPx-L	7925	<i>Brachypodium distachyon</i>	Yes
BprAPx-L	13010	<i>Bathycoccus prasinus</i>	-
CbraAPx-L	12967	<i>Chara braunii</i>	Yes
CclAPx-L	8804	<i>Citrus clementina</i>	Yes
CpslAPx-L	12940	<i>Closterium peracerosum-strigosum-littorale</i>	Yes
CreAPx-L	2805	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Yes
CsaAPx-L	8799	<i>Cucumis sativus</i>	Yes
EglAPx-L	8435	<i>Eucalyptus globulus</i>	Yes
EgrAPx-L	8024	<i>Eucalyptus grandis</i>	Yes
GbAPx-L	13085	<i>Ginkgo biloba</i>	Yes
GmAPx-L	8940	<i>Glycine max</i>	-
GnoAPx-L	2514	<i>Glaucocystis nostochinearum</i>	Yes
KflAPx-L	7731	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	Yes
LeAPx-L	3921	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Yes
LuAPx-La	12039	<i>Linum usitatissimum</i>	Yes
LuAPx-Lb	12041	<i>Linum usitatissimum</i>	Yes
MguAPx-L	9167	<i>Mimulus guttatus</i>	Yes
MpAPx-L	7344	<i>Marchantia polymorpha</i>	Yes
MtAPx-L	6447	<i>Medicago truncatula</i>	Yes
NtAPx-L	8211	<i>Nicotiana tabacum</i>	Yes
OsAPx-L	3966	<i>Oryza sativa</i>	Yes
PmargAPx-L	7766	<i>Penium margaritaceum</i>	Yes
PpeAPx-L	9264	<i>Prunus persica</i>	Yes
PtAPx-L	8470	<i>Populus trichocarpa</i>	Yes
SbAPx-L	7999	<i>Sorghum bicolor</i>	Yes
SiAPx-L	9433	<i>Setaria italica</i>	Yes
SsAPx-L	12582	<i>Spirogyra sp</i>	Yes
ThAPx-L	9809	<i>Thellungiella halophila</i>	Yes
TpsAPx-L	2560	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-
VcaAPx-L	8560	<i>Volvox carteri</i>	Yes
VvAPx-L	5174	<i>Vitis vinifera</i>	Yes
ZmAPx-L	6708	<i>Zea mays</i>	Yes

* Presence of chloroplast transit peptide according to ChloroP server prediction (see: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) [1]

Supplementary reference

1. Emanuelsson, O. et al. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8(5), 978-84

- Anexo -

- Alinhamento dos 246 resíduos pertencentes às 921 sequências utilizadas para execução da análise filogenética apresentada neste capítulo -

Capítulo III

- Caracterização funcional de ascorbato peroxidase-relacionada em *Arabidopsis thaliana* -

Artigo científico em preparação

***APX-R* is a single-copy chloroplast peroxidase encoding gene essential for seed maturation and germination**

Lazzarotto, F; Piovesana, M; Maraschin, F S; Margis-Pinheiro M

Introduction

Ascorbate peroxidases (APx, EC.1.11.1.11) participate on cell oxidative defense by reducing hydrogen peroxide toward ascorbate oxidation. These enzymes are participant of the ascorbate-glutathione cycle (Noctor & Foyer, 1998) and are widely distributed in ascorbate synthesizing organisms, which comprise algae, plants and some members of the protist kingdom (Shigeoka et al., 1980; Takeda et al., 1998; Sano et al., 2001). As in other plant genomes, *Arabidopsis thaliana* APx isoenzymes are encoded by a gene family. There are six genes encoding for APx in Arabidopsis and these can be divided in three pairs by the subcellular localization of their encoded proteins: cytosolic (At1g07890 and At3g09640) (Kubo et al., 1993; Koshiha, 1993), chloroplastic (At1g77490 and At4g08390) (Shigeoka et al, 2002; Giacomelli et al., 2007) and peroxisomal (At4g35000 and At4g35970) (Mullen et al., 1999; Lisenbee et al., 2003; Eastmond, 2007). There are two additional genes which are also currently annotated as APx family members, but recently their classification as APx has been under discussion. One of these genes encodes a chloroplast protein which is targeted to the thylakoid lumen (At4g09010) (Kieselbach et al., 1998). This protein was first named as TL29 (for thylakoid lumen 29kDa) but based on its overall homology with chloroplast ascorbate peroxidases, TL29 was later renamed to APx4 (Panchuck et al., 2002; Panchuck et al., 2005). The classification of this protein as an APx became controversial since Granlund et al. (2009) showed that TL29 (APx4) was not able to bind ascorbate or the heme moiety. However, this matter remains open and it has been poorly discussed in the literature.

The second gene in question is part of a gene family that was first characterized in rice by our group as a chloroplast peroxidase, which was named *Ascorbate Peroxidase-Related (APx-R)* (Lazzarotto et al., 2011). In this work, we have showed that rice APx-R is not an ascorbate peroxidase, despite the overall homology between both proteins. This affirmation relied on the fact that these proteins did not cluster in phylogenetic analysis and it was also based on the significant differences presented in gene structure and catalytic domains. We have also showed that *APx-R* remains as a single-copy gene in every analyzed genome even after repeatedly chromosomal duplications involving this locus during genomes evolution. In Arabidopsis, *APx-R* homolog is currently annotated as a cytosolic APx (*APx6*; At4g32320) in public databases. This gene was recently functionally characterized and the authors considered

the encoded protein to be a cytosolic APx (Chen et al., 2014), despite the results published by our group previously. They have shown that APx6 (APx-R) is important for protecting mature desiccating seeds as well as germinating seeds from oxidative stress and also for maintaining seed vigor under stressful conditions. Here, we show that this gene in fact encodes a chloroplast peroxidase which lacks classical ascorbate binding sites. Through *Arabidopsis* knockout and overexpressing lines we confirmed that APx-R participates on seed maturation and germination processes. In addition, the overexpression of *APx-R* caused a dramatic decrease in seed viability, what could explain why *APx-R* has been maintained as a single-copy gene in virtually every genome.

Results

The *Arabidopsis thaliana* ascorbate peroxidase family is encoded by six members, which are currently named differently in TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) and in PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>) databases. In order to avoid confusion, we have listed both members' denominations along with their respective loci in table 1. In addition to these six genes, two additional genes were highlighted in table 1 as their classification as *APx* has been under discussion: these two genes encode for TL29 (APx4) and APx-R (APx6). Although at some extent similar to APx, one of the major differences regarding APx-R is that these proteins do not present classical ascorbate binding residues, which are highly conserved in all APx (Figure 1). Similarly to thylakoid ascorbate peroxidase (tAPx) and stromal ascorbate peroxidase (sAPx), APx-R also presents an amino terminal extension (Figure 1). These two APx isoenzymes, tAPx and sAPx, have been extensively studied and it is known that these extensions encode for signal peptides, which allow these proteins to enter the chloroplasts (Kangasjärvi et al., 2008). Our group showed in a previous study that rice (*Oryza sativa*) APx-R is a chloroplast peroxidase (Lazzarotto et al., 2011), however, according to TAIR annotation and to a recent study which first characterized *A. thaliana* APx-R, this protein is classified as a cytosolic APx (Chen et al., 2014). To address this question, we performed a transient expression assay where two distinct constructs were used to transform *A. thaliana* mesophyll protoplasts. The first construct drove the expression of an AtAPx-R-YFP (yellow fluorescent protein) fusion protein under the control of 35S promoter (Figure 2a). In this case, YFP was linked to the

carboxy terminal end of APx-R and the recombinant protein was targeted to the chloroplasts (Figure 2a). To confirm the existence of an amino terminal transit peptide, a second construct was generated, which guided the expression of an YFP-AtAPx-R fusion protein. By blocking the amino terminal region of APx-R, the fusion protein was not able to enter the chloroplasts and was therefore kept in the cytosol (Figure 2b). Through this analysis it was possible to confirm that AtAPx-R is a chloroplast protein and that its targeting to this organelle is possible through the existence of an amino terminal transit peptide.

To address further APx-R role in plant development, T-DNA insertion lines were obtained from ABRC stocks and homozygous plants had their *APx-R* transcript levels quantified through quantitative PCR (RT-qPCR). This approach led to the identification of a knockdown line harboring a T-DNA insertion in the promoter region (CS859356, *apx-r 2*) and a knockout line, which was disrupted by a T-DNA insertion in the sixth intron (CS851165, *apx-r 1*) (Figure 3 a and b). As mutant plants developed properly, we decided to investigate if any other antioxidant enzyme from the chloroplast metabolism was compensating for the lack of APx-R. Interestingly, RT-qPCR showed that *glutathione peroxidase 7* gene (At4g31870) was more than four times induced in these plants, while ascorbate peroxidases did not respond to the absence of APx-R (Figure 3c). It has been shown previously that APx isoforms normally compensate the lack of family members in mutant plants through transcription induction. This result showed that APx and APx-R enzymes are probably involved in distinct functions or pathways in the chloroplast antioxidant metabolism. The stress defense was partially impaired in these mutants; the absence of APx-R sensitized plants to methyl viologen treatment during germination (Figure 4a) and caused hydrogen peroxide accumulation in *apx-r* 10 day-old plants, while this was not observed in wild type plants (Figure 4b).

In accordance with the results showed by Chen et al. (2014), we have also observed a delay in germination rate in *AtAPx-R* mutant lines, which could not be rescued after gibberellin treatment (Figure 5a and b). This phenotype was also observed in rice *APx-R* knockdown lines (Figure 5c), what indicates that the involvement of APx-R in germination should be conserved throughout plant species. Hydrogen peroxide (H₂O₂) has been described as an essential signaling molecule in seed germination (Lariguet et al., 2013). As chloroplasts are the major source for H₂O₂ formation in plants, the antioxidant metabolism present inside this organelle may play a part in the regulation of this developmental process. To analyze further the involvement of

chloroplast antioxidant enzymes in seed germination, transcript levels of *APx-R*, *Prx-Q*, *tAPx*, *sAPx*, *APx04* and *GPx07* were analyzed (Figure 6). While *PrxQ*, *tAPx*, *sAPx* and *APx04* genes were induced during the germination, probably in response to H₂O₂ formation triggered by light exposure, *APx-R* and *GPx07* transcript levels were reduced upon first light exposure (time 0h) and then gradually increased along time. This may indicate either that *APx-R* and *GPx07* display a positive late response to germination, or that these genes are negatively regulated during germination first steps, but this still need to be experimentally investigated.

Our group has previously shown that *APx-R* is maintained as a single-copy gene in virtually all genomes, even after repeatedly genomic duplications involving the chromosomal region which contains this gene (Lazzarotto et al., 2011; Dunand et al., 2011). To investigate whether a second copy and the following higher expression of *APx-R* could lead to a deleterious phenotype, overexpressing plants were produced and six lines were further analyzed. Four of those lines presented a dramatic decrease in germination rate (Figure 7), which correlated with darker seed sets (Figure 8a). Knockout mutants for *TL29* (*APx4*) also presented seed coat darkening phenotype and decreased seed vigor, what suggests that chloroplast antioxidant metabolism may be detrimental not just for germination but also for seed development (Wang et al., 2014). In order to investigate if the seed coat phenotype and germination rate were indicative for abnormal seed formation, a viability test was performed with wild-type and *APx-R* overexpressing plants. This analysis showed that the decrease in seed germination rate was due to unviability of those seeds, indicating that *APx-R* expression must be tightly controlled in order to produce healthy and viable seeds (Figure 8b).

Discussion

It is important to endorse that *APx-R* should no longer be classified as an *APx*. Our group has previously showed that *APx-R* proteins cluster separately from *APx* in phylogenetic analysis, and this result was later confirmed by other authors (Zámócký et al., 2014). *APx-R* also presents differences in gene structure and in catalytic domain residues (Lazzarotto et al., 2011), what reinforces the necessity to separate these proteins as distinct peroxidases. An accurate classification is valuable as it may lead to more precise conclusions when assessing a protein's function. The absence of classical ascorbate binding sites in *APx-R* suggests that other substrates must be oxidized in

order to enable hydrogen peroxide scavenging, but this still needs to be further investigated. Our results demonstrated that Arabidopsis APx-R is also a chloroplast protein as its homologous in rice. When Chen et al. (2014) described the importance of APx-R in seed maturation and germination, part of their discussion was hindered by the idea that APx-R should be cytosolic. Hydrogen peroxide production and accumulation have been highly correlated with germination along the past few years (Ogawa & Iwabuchi, 2001; Lariguet et al., 2013). Based on the data presented here, in accordance with the results obtained by Chen et al. (2014), and also based on the results presented by Wang et al. (2014), which correlates another chloroplast peroxidase with germination, we believe that reactive oxygen species generated inside chloroplasts display an essential role for regulating seed maturation and germination.

Residues described as essential for peroxidases catalytic activity (Lazzarotto et al., 2011) are highly conserved among APx-R family members (Figure 1), what suggests that APx-R should be able to oxidize substrates in order to cope with ROS; in fact, the absence of APx-R sensitized plants to methyl viologen treatment (Figure 4a) and caused hydrogen peroxide accumulation in leaves exposed to this stress elicitor (Figure 4b). However, enzymatic activity tests must be performed in order to evaluate APx-R catalytic capacity, probably using other substrates than ascorbate, such as guaiacol or pyrogallol. One interesting observation is that neither sAPx nor tAPx were compensating for the lack of APx-R in knockout plants, but GPx07 (Figure 3c). We have shown that *APx-R* and *GPx07* present a very similar transcript expression profile throughout germination (Figure 6) and based on these observations we hypothesized that these genes may share an upstream regulatory pathway.

We have previously shown that *APx-R* seems to systematically return to single-copy status after subsequent chromosomal duplications in most plant genomes. For instance, in *Medicago truncatula*, the chromosomal region which contains *APx-R* locus has been duplicated 10 times but only one *APx-R* gene could be identified in this genome (Lazzarotto et al., 2011). Duarte et al. (2010) showed that genes encoding proteins targeted to organelles are more commonly single copy than could be expected by chance. Most of these nucleus encoded proteins interact with organelle-encoded proteins, what could require nuclear genes to maintain an evolutionary stable copy number. The deleterious effect of higher *APx-R* expression was clear in mutant plants (Figure 7). The overexpression of *APx-R* affected severely seed viability (Figure 8), what could be the absence of *APx-R* extra copies in every analyzed genome, even after

most recent intra-genomic duplication events (Lazzarotto et al., 2011). It is not clear why *APx-R* overexpression led to unviable seed sets, but we hypothesized that disrupting hydrogen peroxide signaling during seed maturation may have caused this phenotype. Chen et al. (2014) have showed that *APx-R* knockout mutants present a 40% increase in abscisic acid (ABA) content, suggesting that APx-R may participate (direct or indirectly) in ABA signalling. ABA plays an essential role during late seed development, enabling embryos to survive desiccation (Rock & Quatrano, 1994; Young & Gallie, 2000). Therefore, it is possible that the overexpression of *APx-R* may have affected ABA accumulation and caused embryo death during seed desiccation; however, this still needs to be investigated.

One interesting observation is that both APx-R and TL29 (APx4) are chloroplast proteins related to seed maturation and germination (Wang et al., 2014; Chen et al., 2014). Despite their similarity with APx, both of them do not present ascorbate binding sites and TL29 does not present even catalytic residues. It seems plausible to claim that these genes may have diverged from *APx* genes in order to perform very specific roles in seed development, probably by regulating the amount of hydrogen peroxide inside chloroplasts throughout seed maturation and germination. Phylogenetic analyses are currently underway in our lab in order to test this hypothesis.

Material and methods

DNA constructs

For protoplasts assay, APx-R CDS was cloned into Gateway vectors pART7 (for YFP carboxi-terminal fusion) and p2YGW7 (for YFP amino-terminal fusion). Overexpression construct was obtained through APx-R CDS cloning into Gateway binary vector pEARLEYGATE100.

Arabidopsis protoplasts assay

Arabidopsis mesophyll protoplasts were obtained according to Wu et al. (2009) and cells transformation followed protocol established by Sheen (2002). Fluorescence microscopy was performed under an Olympus FluoView 1000 confocal laser scanning microscope and images were captured with a high-sensitivity photomultiplier tube detector.

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen). The cDNAs were obtained by reverse transcription (RT) using Superscript II (Invitrogen) and a 23-polyT-V primer. Quantitative PCR was performed using the following primers: APx-R (5' CGGATCATGCTTTAGTGCAG 3' and 5' CCAAATTATTCGGGCATGTT 3'); tAPx (5' CGTAGCTGCAAAGTATTCTACGG 3' and 5' ACCACCAAAGAGAGTGGACAA 3'); sAPx (5' ATTACGCTGTAGCCCATGC 3' and 5' GTACTCGCATGAAAAGTTCTCC 3'); APx-L (5' TGAAACCGTTGCCTATTAATTC 3' and 5' CTCTGTCTCATCACAAACCAGA 3'); PrxQ (5' CATTGGCATTAGTGGAGATGACT 3' and 5' AATGCTCCAAACAGGTCTCCA); GPx01 (5' GTC TCC GGT AAC CAA AAA TG 3' and 5' GAC GAG AAA GGT TGC TGA GG 3'); GPx07 (5' TCG GCC CAT CAT TGA GAT TC 3' and 5' CTG CAG CCC TTG CAT AGA C 3'). The following primers were used as internal controls to normalize the amount of mRNA in each sample: UBQ10 (5' GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG 3' and 5' ACTATGTTTCCGTTCTGTTATCTCTTT 3') and PP2A (5' TAACGTGGCCAAAATGATGC 3' and 5' ACCAAGCGGTTGTGGAGAAC 3') (Czechowski et al., 2005). Quantities of amplified products were compared by the 2^{-DDCt} method (Livak & Schmittgen, 2001) using an Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System.

Plant material

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) ecotype Columbia was used in this study. APx-R T-DNA insertion lines (CS851165, apx-r 1; CS859356, apx-r 2) were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (<https://abrc.osu.edu/>). Homozygous lines were PCR identified according to SIGnAL Laboratory recommendations (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Overexpressing lines were obtained through floral dip transformation protocol (Clough & Bent, 1998).

Seed germination and viability assay

Seeds were sterilized in 6 % hypochlorite with 0.01 % Tween-20 for 10 min and washed several times with sterile water. Imbibed seeds (4 °C for 2 days in the dark) were spread on the 0.5 MS plates (with B5 vitamins, 0.5 % phytoagar, pH 5.8). Sterilized seeds were incubated in a growth chamber at 22 °C with continuous 50 μ mol

m-2 s-1 irradiation. Germination was defined as 1 mm radical emergence. Seeds were imbibed in 1 % 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride solution according to Boisson et al. (2001) to determine seed viability.

Methyl viologen treatment and hydrogen peroxide staining

APx-R knockout, knockdown and wild-type plants were germinated on 0,5X MS plates with or without methyl viologen 0,5M in the media. Three independent experiments were analyzed, each one composed by fifty seeds from each genotype. Ten days old *APx-R* knockout and wild-type plants were transferred from 0,5X MS plates for 0,5X liquid MS and then submitted to 1M methyl viologen treatment for 12 hours. After this period, hydrogen peroxide accumulation was stained upon peroxide-sensitive fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate which is oxidized by H₂O₂ to the highly fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF). Fluorescence in plant leaves was observed in a CKX41 Olympus fluorescence microscope.

Tables and figures

Table 1. *Arabidopsis thaliana* ascorbate peroxidase isoforms according to TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) and PeroxiBase (peroxibase.toulouse.inra.fr) databases.

Locus	TAIR	PeroxiBase
At1g07890	APx1	APx1
At3g09640	APx2	APx2
At4g35000	APx3	APx3
At4g09010	APx4	APx7
At4g35970	APx5	APx4
At4g32320	APx6	APx-R
At1g77490	TAPx	APx6
At4g08390	SAPx	APx5


```

      *           20           *           40           *           60           *
AtApX-R : -MTTITASLVKTFLFRCDSFSSFKFKCKFESPAKTRLLSPATEKH-----VVRSSRAWRI RCLSDDPGSSSHVFV : 68
AtApX01 : ----- : -
AtApX02 : ----- : -
AtApX03 : ----- : -
AtApX04 : ----- : -
AtApX05 : MAERVSLTLNGTLLSPPTTTTTTMSSSLRSTTAASLLLRSSSSSSRSTLTLASASSLSFVRSLSVSSPRLSSSSS : 75
AtApX06 : -MSVSLSAASHLLC-----SSTRVSLSPAVTSSSSSPVVALSSSTSPHSLGVSASSSLFPHSSS : 58

      80           *           100           *           120           *           140           *
AtApX-R : ASRRKMVLLSTVQLLSHMLPQNGNAAEIYPVM--QNEIRKVVTKGKAAGVL-RLVFHDAGTFELDDHS---GG : 136
AtApX01 : -----MTKNYPTVSEDYKKAVEKCRRLRGLIAEKNCAPIMVRLAWHSAGTFDQCQRST---GG : 55
AtApX02 : -----MVKKSYPEVKEEYKKAQVQRCKRKLRLGLIAEKHCAPIVLRLAWHSAGTFDVKTKT---GG : 56
AtApX03 : -----MAAPIVDAEYLKEITKARRELRLSIANKNCAPIMLRLAWHDAGTYDAQSKT---GG : 53
AtApX04 : -----MAVNVDAEYLKEIEKTRRDLRALISSRNCAPIMLRLAWHDAGTYDAKKKT---GG : 52
AtApX05 : LSQKKYRIASVNRSPFNSTTAATKSSSDPDQLKNAREDIKELLSTKFCHPILVRLGWHHDAGTYNKNIKEWPQRGG : 150
AtApX06 : VLQKKHPINGT----STRMISPKCAASDAALQISAKEDIKVLRLTKFCHPILVRLGWHHDAGTYNKNIKEWPLRGG : 129
                                     6         64 66         c p66 RL 5H AGT5         GG

      160           *           180           *           200           *           220
AtApX-R : INGSIA Y--ELERPENIGLKKSLKVLAKAKVKVDEIQPVSWADMISVAGSEAVSICGGPTIPVVLGRLDLSA---Q : 206
AtApX01 : PFGTMRFD AEQAHGANSGLIHIALRLLDPIR---EQPPTISFADFHLQAGVAVVEVTGGPDI PFHPGREDK P---Q : 124
AtApX02 : PFGTIRHPQELAH DANNGLDIAVRLLDPIK---ELFPILSYADFYQLAGVVAVEITGGPEIPFHPGRLDKV---E : 125
AtApX03 : PNGSIRNEEETHGANSGLKIALDLCEGVK---AKHPKIT YADLYQLAGVVAVEVTGGPDI VFVPGRKDSN---V : 122
AtApX04 : ANGSIRFKEELNRPHNKGLEKAVAFCEEVK---AKHPRVSYADLYQLAGVVAVEVTGGPAIPFPTPGRKDA---D : 120
AtApX05 : ANGSLRFDIELKHAANAGLVNALNLIKDIK---EKYSGISYADLFQLASATAIEEAGGPKIPMKYGRVDASGPED : 222
AtApX06 : ANGSLRFEAELKHAANAGLLNALKLIQPLK---DKYPNISYADLFQLASATAIEEAGGPDIPMKYGRVDVVAPEQ : 201
      G36r E N G6 a6 4 635AD q6A A6e GGP Ip GR D

      *           240           *           260           *           280           *           300
AtApX-R : PDPEGKLP--ETLSASGLKECFKR--KGFSTQELVALSGAHTIG-----SKGF-----G : 252
AtApX01 : PPPEGRLPD--ATKGDHLRDVFAKQMGLSDKDIVALSGAHTLGRCHKDRSGF-----EGA-----WTS : 181
AtApX02 : PPPEGRLPQ--ATKGV DHLRDV FGR--MGLNDKDIVALSGGHTLGRCHKE RSGF-----EGA-----WTP : 181
AtApX03 : CPKEGRLPD--AKQGFQHLRDV FYR--MGLSDKDIVALSGGHTLGRAHPERSGF-----DGP-----WTQ : 178
AtApX04 : SADDGELPN--PNEGASHRLR TFSR--MGLLDRDIVALSGGHTLGRAHKE RSGF-----EGP-----WTQ : 176
AtApX05 : CPEEGRLPDAGPPSPATHLREVFYR--MGLDDKDIVALSGAHTLGRSRPERSGWGKPE TKYTKEGPGAGGGQSWTP : 296
AtApX06 : CPEEGRLPDAGPPSPADHLRDV FYR--MGLDDKEI VALSGAHTLGRARPDERSGWGKPE TKYTKTGPGEAGGQSWTV : 275
      eG LP hL4 F 4 mG1 d 6VALSG HT6Gr rsg5 g wt

      *           320           *           340           *           360           *
AtApX-R : DPTVFDNAYYKILEKPWTSTSKMTSMVGLP SDHALVQDDECLRWVKRYAEDQDKFFEDFTNAYIKLVNSGAKWN : 327
AtApX01 : NPLIFD NSYFKELLSG-----EKEGLLQLVSDKALLDDPVFRPLVEKYAADEDAFFADYAEAHMKLSELG--FA : 248
AtApX02 : NPLIFD NSYFKELLSG-----EKEGLLQLPTDKALLDDPLFPFVEKYAADEDAFFEDYTEAHLKLSLG--FA : 248
AtApX03 : EPLKFD NSYFVELLKG-----ESEGLLKLPTDKLLEDPEFRRLVELYAKDEDAFFRDYAEASHKLSLG--FN : 245
AtApX04 : DPLKFD NSYFVELLKG-----ETPGLLQLKTDKALLDDPKFHPFVKLYAKDEDMFFKAYAI SHKLSLG--FN : 243
AtApX05 : EWLKFD NSYFKELKEK-----RDEDLLVLP TDAATFEDSSPKVYAEKYAADQDAFFKDYAVAHAKLSNLGAEFN : 365
AtApX06 : KWLKFD NSYFKDIKEK-----RDDDLLVLP TDAALFEDPSPKNYAEKYAEDVA AAFKDYAEAHAKLSNLGAKFD : 344
      l FDNsY5 6 66 L 3D a6 D f YA D d FF d5 h Kls lG 5

      380           *           400           *           420           *           440           *
AtApX-R : ML----- : 329
AtApX01 : DA----- : 250
AtApX02 : DKE----- : 251
AtApX03 : PNSSAGK-----AVADSTILAQSAFGVAVAAAVVAFGYFYEIRKR : 285
AtApX04 : PRRRIPS-----AVTQQT L-----GIAVAAAVVIFTICYEASRR : 277
AtApX05 : PPEGIVI----- : 372
AtApX06 : PPEGIV IENVPEKFVA AKYSTGKKELSDSMKKIRAEYBAIGGSPDKPLPTNYFLNI I IAGVLLVLLSTLFGGNN : 419

```

Figure 1. Amino acid sequences of ascorbate peroxidase isoforms and ascorbate peroxidase-related. All sequences were aligned by MUSCLE toll in MEGA and important residues are highlighted. Amino-terminal extension is highlighted in yellow. Amino acids implicated in catalytic activity are showed in purple and in ascorbate binding, in green. Sequences were retrieved from PeroxiBase (peroxibase.toulouse.inra.fr) and are nominated according to this database.

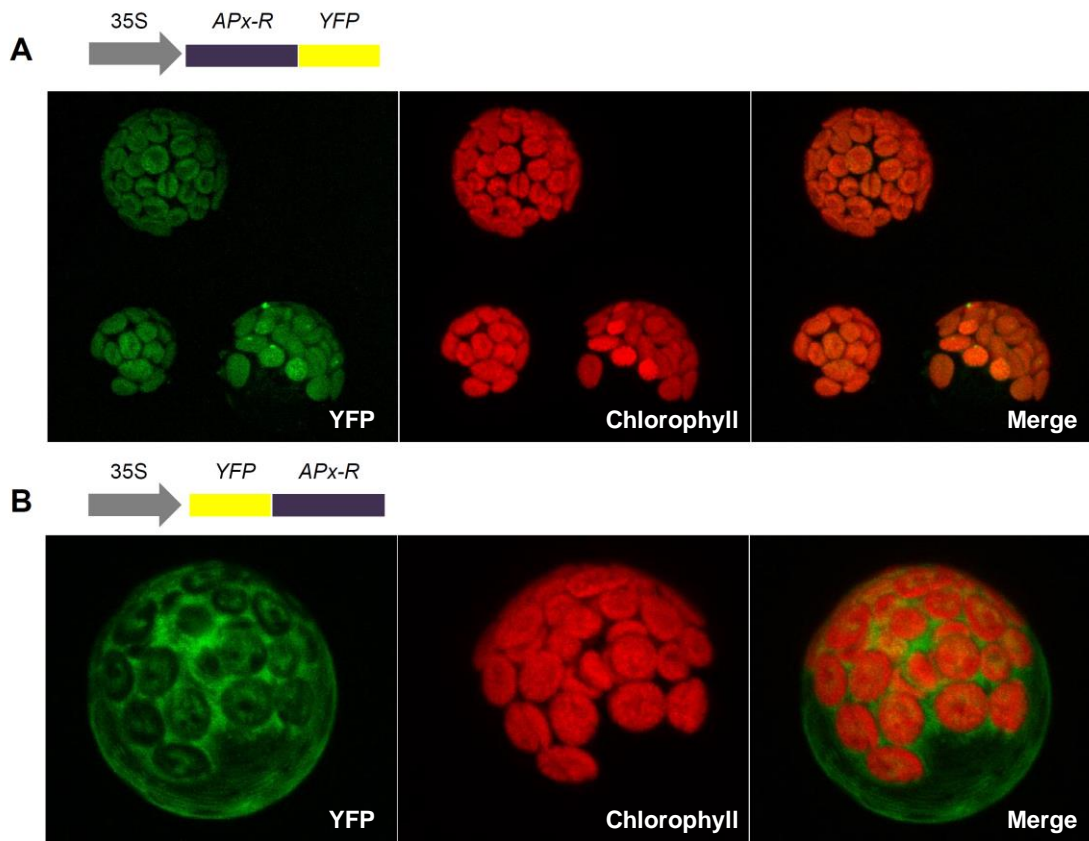


Figure 2. Transient AtAPx-R expression in Arabidopsis mesophyll protoplasts. Two distinct constructs were generated in order to verify APx-R subcellular localization in Arabidopsis protoplasts. One construct drove the expression of a recombinant AtAPx-R in carboxi-terminal frame with YFP (yellow fluorescent protein). This configuration allowed the amino-terminal transit peptide to be recognized in order to enable chloroplasts entrance (A). The other construct generated an AtAPx-R recombinant protein fused to YFP by its amino-terminal region, blocking the putative transit peptide. The resultant protein was not able to enter inside the chloroplasts, being therefore kept in the cytosol (B). Fluorescence microscopy was performed under an Olympus FluoView 1000 confocal laser scanning microscope.

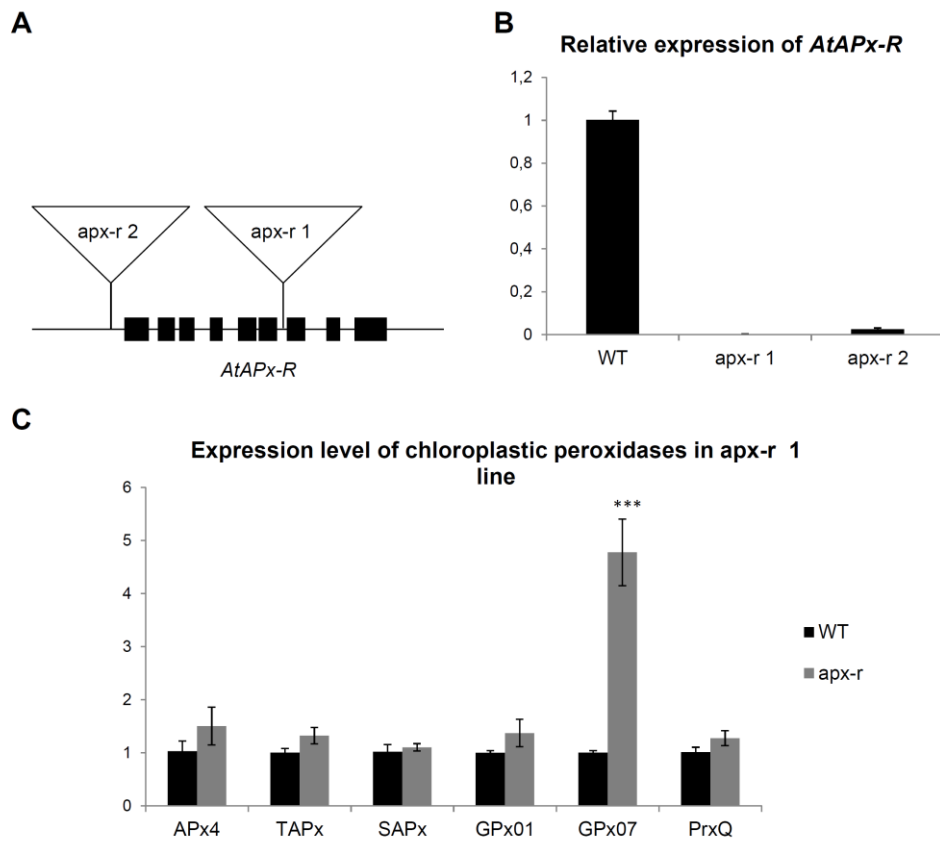


Figure 3. Identification of *AtAPx-R* loss of function lines from ABRC stocks. Two independent lines harboring T-DNA insertion in *AtAPx-R* gene were obtained analyzed. *apx-r 1* line is disrupted by the T-DNA in the sixth intron and *apx-r 2* line harbors the T-DNA in *AtAPx-R* promoter region (A). The *AtAPx-R* relative gene expression level was evaluated by qRT-PCR showing that *apx-r 1* is a knockout line meanwhile *apx-r 2* is still able to express APx-R at much lower levels (B). Expression level of chloroplast peroxidases genes were evaluated by qRT-PCR in 10 days old *apx-r* knockout and wild-type plants (C).

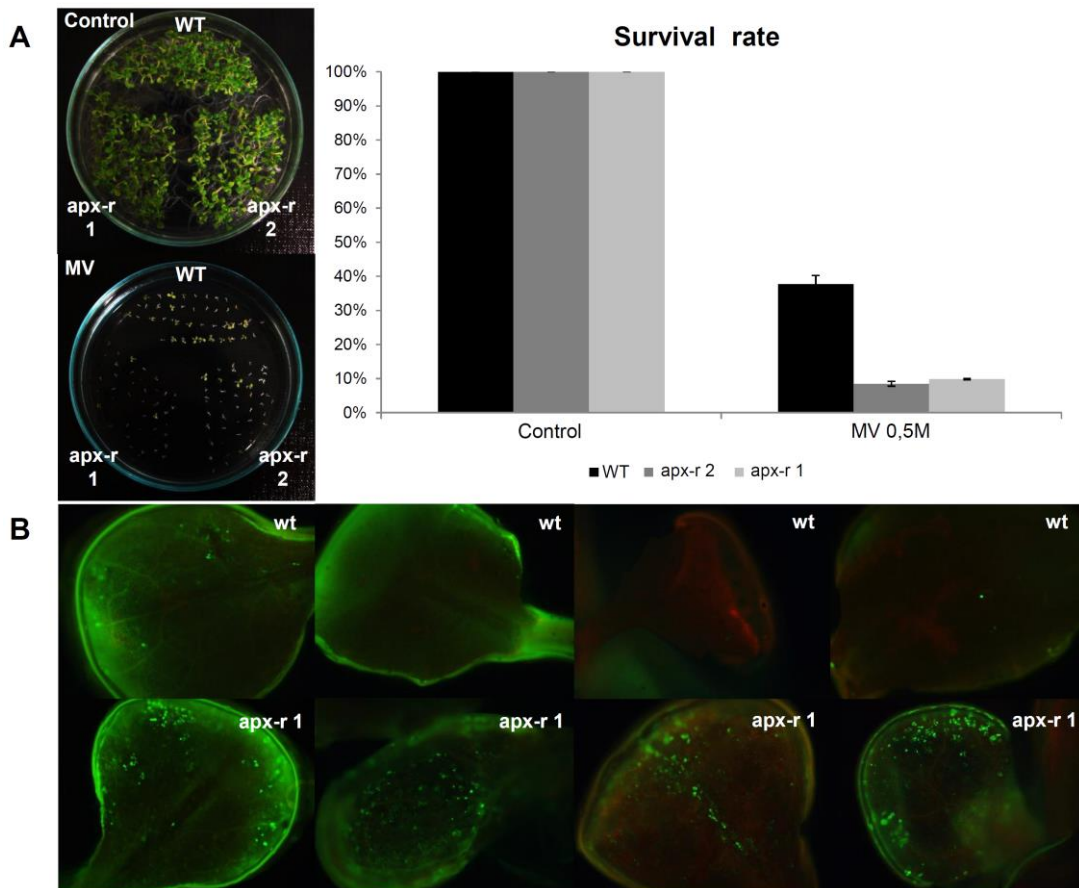


Figure 4. The lack of APx-R impairs chloroplast oxidative defense. *apx-r 1, 2* and wild-type plants were germinated on 0,5X MS plates containing methyl-viologen dichloride hydrate (Paraquat) 0,5M and the survival rate media was scored for each line according to three independent experiments (A). Ten days *apx-r 1* and wild-type plants were exposed to methyl-viologen 1M for twelve hours and hydrogen peroxide accumulation in leaves was observed upon incubation with fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) (B). Fluorescence was observed in CK41 Olympus fluorescence microscope.

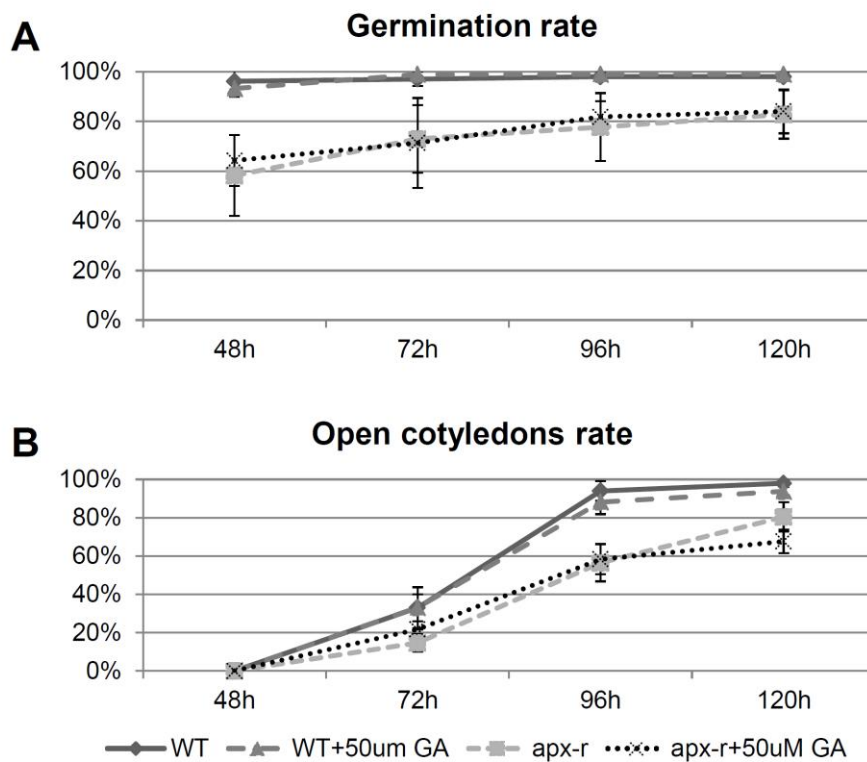


Figure 5. Plants with impaired expression of APx-R germinate slower than wild-type plants. Germination rate of *APx-R* knockout (*apx-r 1*) and wild-type plants was scored in three independent experiments, each one performed in triplicate. Seeds were germinated in 0,5X MS plants and were considered as germinated upon 1 mm radicle observance (A). As a consequence of this delay in germination, plants develop slower at first stages, as indicated by cotyledons opening rate lagging (B).

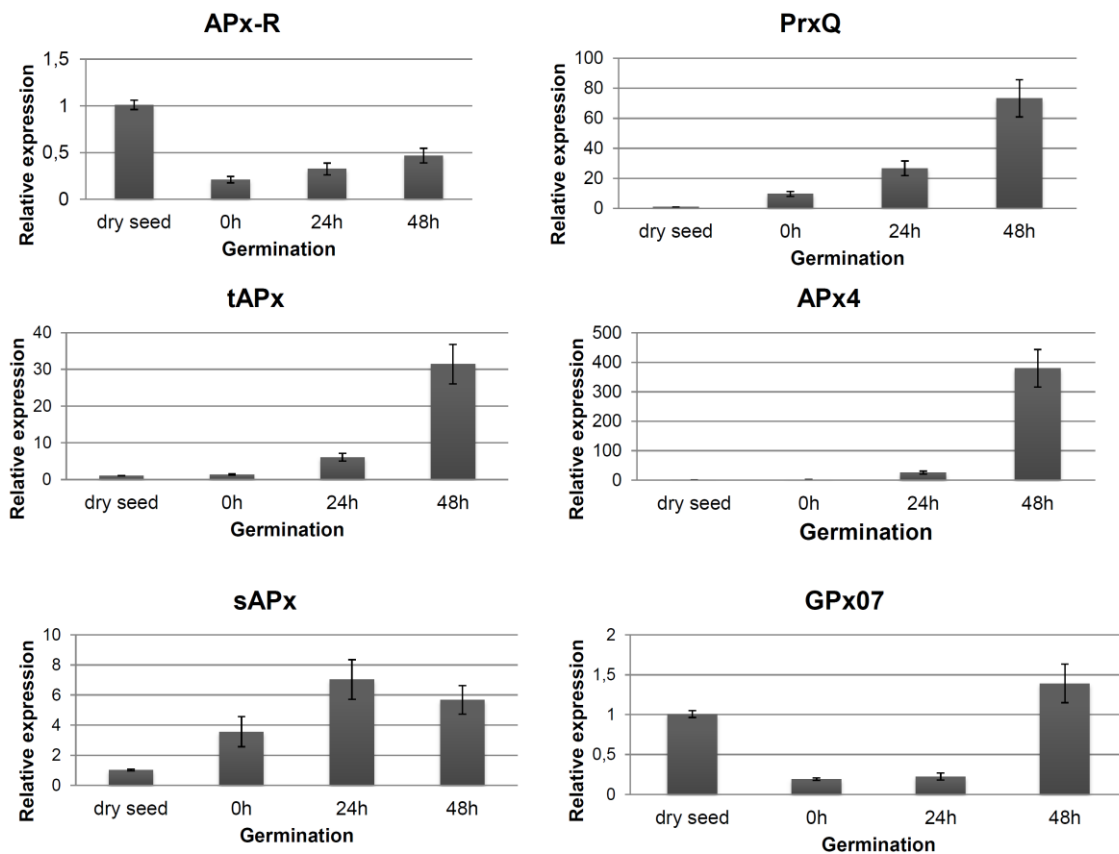


Figure 6. Relative expression of six genes encoding for chloroplast peroxidases throughout germination. The expression profile of each gene during germination was assessed by qRT-PCR. Four time points were analyzed: dry seed, 0h (after vernalization), 24h and 48h in growth chamber. Gene expression was normalized by two reference genes: *PP2A* (At1g13320) and *UBQ10* (At4g05320). Each time point consisted of three biological replicates and four technical replicates.

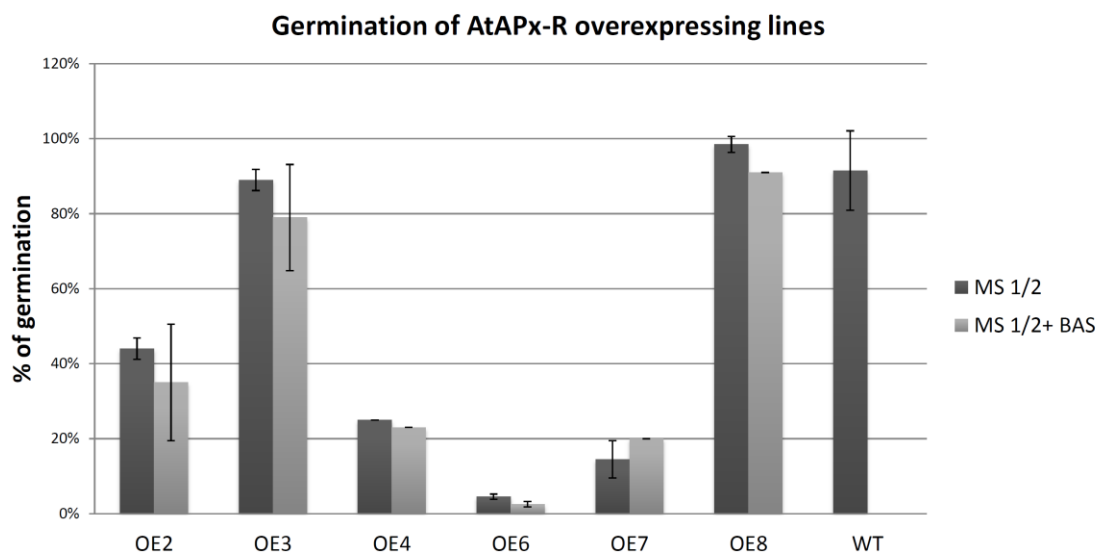


Figure 7. Six *Arabidopsis thaliana* *APx-R* independent overexpressing lines were obtained through floral dip transformation. The germination percentage of each line was analyzed on 0,5X MS plates with or without glufosinate-ammonium (Basta®, BAS) after five days in growth chamber. Means and standard deviations were scored after three independent experiments, fifty seeds per experiment. Wild-type germination percentage in the presence of glufosinate-ammonium was 0%.

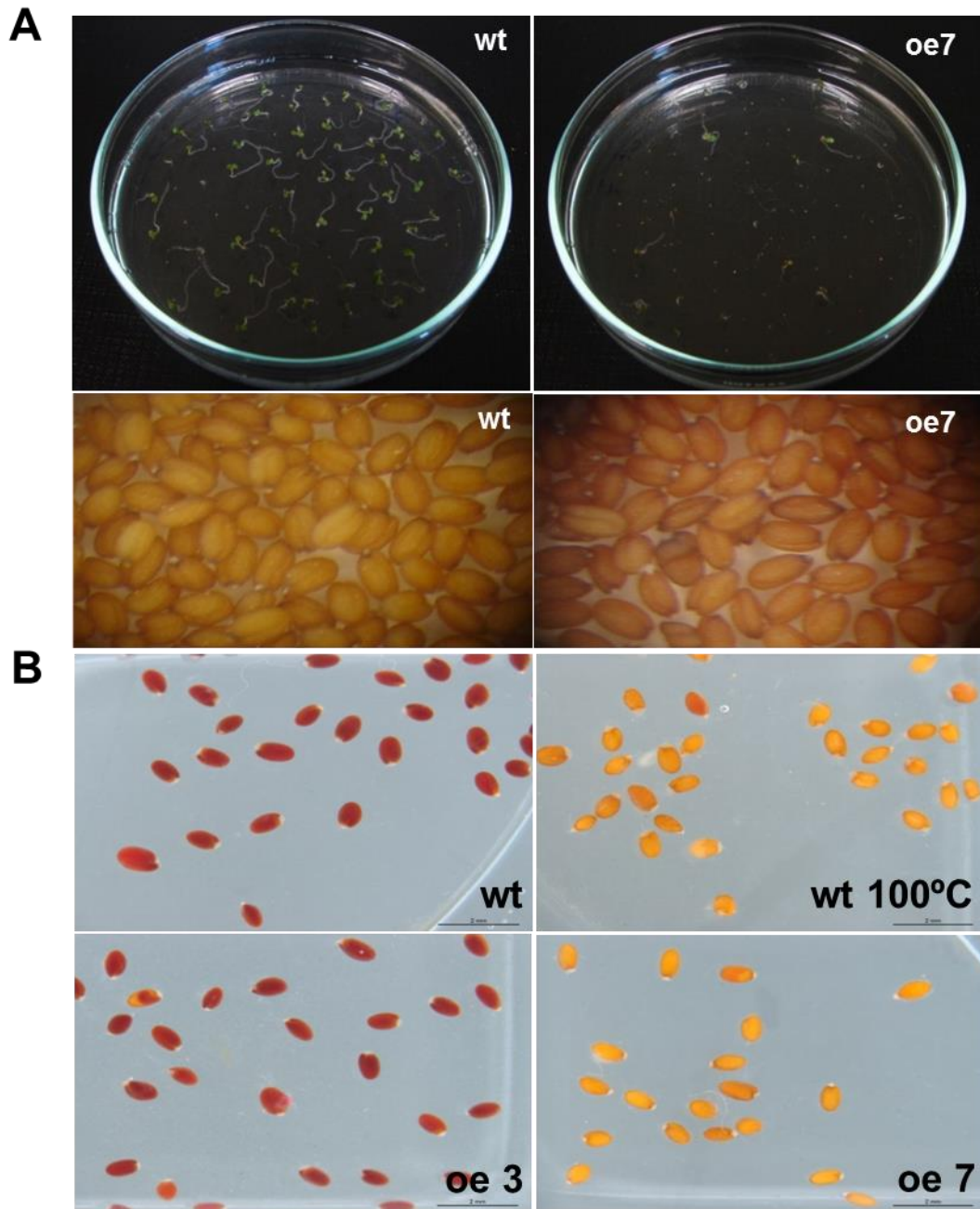


Figure 8. Small germination percentage of *APx-R* overexpressing lines (*oe*) is correlated with seed inviability and darker seed sets. T3 *oe* lines which present a dramatic decrease in germination exhibit dark (brownish) seed phenotype (A). Seed viability was assessed by seeds incubation in 1 % 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride solution. Viable seeds exhibit dark red coloring. For negative control, wild-type seeds were maintained at 100°C for 01 hour (B).

Reference list

- Boisson et al. (2001) Arabidopsis glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development. *EMBO J* 20, 1010
- Chen et al. (2014) ASCORBATE PEROXIDASE6 Protects Arabidopsis Desiccating and Germinating Seeds from Stress and Mediates Cross Talk between Reactive Oxygen Species, Abscisic Acid, and Auxin. *Plant Physiology* 166, 370
- Clough & Bent (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(6), 735
- Czechowski et al. (2005) Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139, 5
- Duarte et al. (2010) Identification of shared single copy nuclear genes in Arabidopsis, Populus, Vitis and Oryza and their phylogenetic utility across various taxonomic levels. *BMC Evolutionary Biology* 10, 61
- Dunand et al. (2011) Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is not a duplicable gene. *Plant Signal Behav.* 6(12), 1908
- Eastmond P.J. (2007). MONODEHYROASCORBATE REDUCTASE4 is required for seed storage oil hydrolysis and postgerminative growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.19, 1376
- Giacomelli et al. (2007) Arabidopsis thaliana deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Molecular Biology* 65(5), 627
- Granlund et al. (2009) The TL29 Protein is Lumen Located, Associated with PSII and Not an Ascorbate Peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 50(11), 1898
- Kangasjärvi et al. (2008) Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochem J.* 412(2), 275
- Kieselbach et al. (1998) The thylakoid lumen of chloroplasts. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 273, 6710
- Koshiba (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant and Cell Physiology* 34, 713

Kubo et al. (1993) Genomic DNA structure of a gene encoding cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters* 315, 313

Lariguet et al. (2013) Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. *Planta* 238(2), 381

Lazzarotto et al. (2011) Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. *New Phytol.* 191, 234

Lisenbee et al. (2003) Peroxisomal ascorbate peroxidase resides within a subdomain of rough endoplasmic reticulum in wild-type *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol.* 132(2), 870

Livak & Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), 402

Mullen et al. (1999) Peroxisomal membrane ascorbate peroxidase is sorted to a membranous network that resembles a subdomain of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 11, 2167

Noctor & Foyer (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 249

Ogawa & Iwabuchi (2001) A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol* 42, 286

Panchuk et al. (2002) Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 838

Panchuk et al. (2005) Expression of the APX gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 222, 926

Rock & Quatrano (1994) Insensitivity is in the genes. *Curr. Biol.* 4, 1013

Sano et al. (2001) Characterization of ascorbate peroxidases from unicellular red alga *Galdieria partita*. *Plant Cell Physiology* 42, 433

Sheen (2002) A transient expression assay using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>

Shigeoka et al. (1980) Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z by L-ascorbic acid peroxidase. *Biochem J.* 186, 377

- Shigeoka et al. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53, 1305
- Takeda et al. (1998) Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris*. *Biochimie*. 80, 295
- Wang et al. (2014) The APX4 locus regulates seed vigor and seedling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 239, 909
- Wu et al. (2009) Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods* 5, 16
- Young & Gallie DR (2000) Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Mol Biol* 42(2), 397
- Zamocký et al. (2014) Turning points in the evolution of peroxidase-catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases. *Cell Mol Life Sci*. 71(23), 4681

Capítulo IV
- Discussão -

3. Discussão

4.1. Aspectos evolutivos: APx-R e a superfamília de peroxidases não-animais

Ao longo da evolução, as plantas adquiriram diferentes mecanismos que lhes permitiram se proteger de eventuais condições adversas impostas pelo ambiente. Assim, estes organismos contam com um complexo sistema antioxidante, composto por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos, os quais são responsáveis por atenuar os níveis de espécies reativas de oxigênio, diminuindo o dano oxidativo e modulando a sinalização operada por estas moléculas. A identificação recente de um gene codificando um novo membro da superfamília de peroxidases não-animais, a enzima ascorbato peroxidase-relacionada, motivou o presente trabalho, o qual buscou avançar na caracterização desta peroxidase, tanto funcionalmente quanto em relação aos aspectos evolutivos da superfamília.

A relação filogenética entre APx-R e as demais peroxidases não-animais foi inferida através de uma robusta análise executada pelo método Bayesiano, descrita em detalhes no capítulo II desta tese. Esta análise confirmou os dados publicados anteriormente que mostravam que as APx-R de diferentes organismos formam um grupo distinto de peroxidases, o qual não faz parte da família APx, em contrapartida ao que foi descrito previamente (Lazzarotto et al., 2011). Na análise prévia, publicada em 2011, a relação filogenética entre APx-R e os demais membros da superfamília não pode ser completamente esclarecida. Esta análise inicial sugeria que APx-R não poderia ser classificada em nenhuma das três classes já descritas, configurando a necessidade da criação de uma quarta classe para acomodar esta recém-caracterizada peroxidase. A fim de investigar esta questão com maior precisão, novas análises foram executadas no presente trabalho a partir de um número significativamente maior de sequências (14 vezes maior) e de um método filogenético mais robusto. Por meio desta abordagem, verificamos que APx-R faz parte da classe I da superfamília de peroxidases não-animais, juntamente com KatG, APx, CcP, APx-CcP e APx-L (do inglês *ascorbate peroxidase-like*, nome provisório). A identificação desta nova peroxidase, nomeada APx-L, baseou-se na obtenção de um grupo isolado contendo algumas supostas isoformas de APx, as quais não agruparam com o grande grupo das ascorbato peroxidases, em situação idêntica à de APx-R. Em análises posteriores, verificamos que APx-R e APx-L não apresentam os resíduos altamente conservados nos membros da

família APx que são necessários para a interação com moléculas de ascorbato. Na verdade, APx-L não apresenta qualquer resíduo catalítico característico desta superfamília (histidina proximal, distal e arginina), os quais são essenciais para execução da função enzimática dos seus membros. No entanto, evidências da funcionalidade de APx-L foram reportadas recentemente em um estudo conduzido em *Arabidopsis* (Wang et al., 2014). Estes resultados, somados às diferenças encontradas na estrutura éxon-intron, abordadas no capítulo II, suportam a separação de APx-R e APx-L da família APx e, com isso, o estabelecimento de duas novas famílias de peroxidases não-animais de classe I. Cabe ressaltar aqui que as semelhanças entre APx-R e APx-L vão além das coincidências referentes à identificação destas novas famílias: ambas estão presentes como cópia-única nos genomas vegetais analisados, são proteínas cloroplastídicas e estão relacionadas com a defesa antioxidante de sementes (Lazzarotto et al., 2011; Chen et al., 2014; Wang et al., 2014). Estas observações permitem a especulação de um cenário onde APx-R e APx-L se originaram nos genomas de organismos fotossintetizantes a partir de um evento de duplicação de genes codificadores de APx cloroplastídicas, com posterior divergência gênica resultante em neofuncionalização. Novas análises deverão ser realizadas para testar esta hipótese.

A identificação de supostas peroxidases desta superfamília em metazoários tem levantado discussões acerca da origem e evolução dos seus membros. A fim de analisar a prevalência de cada membro da superfamília em diferentes grupos de organismos, uma compilação foi feita a partir dos dados disponibilizados no *PeroxiBase*. Para esta análise, utilizamos apenas sequências completas depositadas neste banco de dados, as quais foram classificadas de acordo com a enzima que codificam e com o organismo no qual foram identificadas. Os organismos em questão foram agrupados em sete categorias: bactérias, archaea, protistas, algas, plantas, fungos e metazoários. A partir desta análise, verificamos algumas inconsistências em relação à prevalência de determinadas enzimas. Apesar de muitas bactérias terem o seu genoma sequenciado, apenas uma sequência codificadora completa de CcP foi encontrada neste grupo de organismos, por exemplo. Dados aparentemente inconsistentes foram grifados na figura que sumariza esta análise, apresentada no capítulo II (Figura 2). Uma explicação possível para estas observações vem da origem destas sequências. Muitos depósitos feitos no *PeroxiBase* são oriundos de dados de transcriptômica de espécies que não possuem seu genoma sequenciado, os quais podem apresentar contaminação com material genético de outras espécies. Além disso, vários casos de transferência

horizontal de genes foram reportados, principalmente relacionados a eventos de endossimbiose, comuns em muitas espécies aqui analisadas (Yuan et al., 2008). Como pode ser observado na figura 2, há pouca evidência indicando uma prevalência significativa de membros desta superfamília em metazoários, de forma que uma nova mudança no nome da superfamília, como sugerido por alguns autores (Zamocký & Obinger, 2010), parece ser prematura. Para descartar eventuais problemas de anotação no *PeroxiBase*, análises utilizando a ferramenta de busca *blast* do banco de dados *Metazome* (<http://www.metazome.net/>) foram extensivamente realizadas. Nestas análises, não foi possível encontrar sequências similares a genes codificadores de peroxidases desta superfamília nos genomas dos organismos ali depositados. Assim, sugerimos que a existência de sequências da superfamília de peroxidases não-animais em metazoários, se real, representa casos isolados.

Alguns trabalhos apontam evidências de que a superfamília tenha surgido a partir de um único gene codificador de uma peroxidase ancestral em um organismo procariótico (Passardi et al., 2007). Durante o processo evolutivo, subsequentes eventos de duplicação gênica, divergência, neo e/ou subfuncionalização deram, então, origem a todos os membros hoje conhecidos. Como discutido no capítulo II, existe uma divergência de interpretações na literatura acerca do papel da enzima KatG neste processo. Algumas evidências sugerem que esta peroxidase é o membro mais antigo da superfamília, a qual estabelece uma ponte entre o gene da peroxidase ancestral e todos os demais membros (Klotz & Loewen, 2003). No entanto, outros trabalhos indicam que tanto KatG, quanto APx e CcP, originaram-se a partir do gene codificador da peroxidase ancestral de maneira independente: CcP teria sido adquirida durante o primeiro evento de endossimbiose, o qual deu origem à mitocôndria, e APx estaria relacionada ao segundo evento de endossimbiose, o qual deu origem ao cloroplasto. Já KatG seria o resultado de uma duplicação a partir do gene ancestral com posterior fusão dos genes duplicados, dando origem aos domínios amino e carboxi-terminais de KatG (Passardi et al., 2007). Como pode ser observado na figura 2, KatG é a única peroxidase de toda a superfamília que pode ser encontrada em organismos mais basais, como bactérias e archaea. Assim, essas observações sugerem fortemente que esta peroxidase esteja na base da evolução da superfamília, como postulado pela primeira teoria. No entanto, a observação feita por Passardi et al. mostrando que CcP está intimamente relacionada com organismos que possuem mitocôndria, enquanto que APx se encontra apenas em organismos fotossintetizantes, dá suporte à hipótese que liga o surgimento destas

peroxidases com os eventos de endossimbiose. Esse conjunto de observações nos permitiu sugerir uma hipótese para explicar o surgimento da superfamília de peroxidases não-animais, descrita no capítulo II, a qual combina características de ambas hipóteses acima citadas. Além disso, nossos dados nos permitem também creditar o surgimento de CcP e APx aos eventos que deram origem à mitocôndria e ao cloroplasto, respectivamente. Assim, os eventos de endossimbiose podem ter atuado como força motriz para uma grande transformação celular a partir de numerosas modificações nos genomas dos organismos envolvidos. Durante estes eventos, a inserção de um intron promoveu a perda da região carboxi-terminal de KatG, que, combinada com outras modificações, deu origem a CcP e APx. O domínio carboxi-terminal de KatG não tem, ainda hoje, sua função bem estabelecida em razão da ausência de resíduos funcionais nesta parte da proteína. O domínio amino-terminal, o qual possui grande homologia com as demais peroxidases de classe I, possui todos os resíduos necessários para execução de ambas as atividades enzimáticas de KatG, catalase e peroxidase (Zamocký et al., 2010).

4.2. Aspectos funcionais de APx-R

Os resultados descritos no capítulo III desta tese relacionam a função de APx-R com a regulação do metabolismo redox envolvido nos processos de maturação da semente e germinação. Estes resultados confirmam dados recentemente publicados acerca do envolvimento desta peroxidase com a proteção das estruturas da semente frente ao estresse oxidativo (Chen et al., 2014), apesar deste último incorretamente atribuir à APx-R a função de ascorbato peroxidase citosólica. Mostramos no capítulo III que *APx-R* codifica uma proteína direcionada ao cloroplasto e que plantas com perda de função para este gene germinam mais lentamente, enquanto que a superexpressão de *APx-R* acarreta em inviabilidade das sementes. O conteúdo de peróxido de hidrogênio na semente varia de acordo com o estágio de desenvolvimento. Durante a germinação, o conteúdo de ERO deve ser mantido sob controle: níveis muito baixos destas moléculas podem levar à supressão da germinação (dormência); enquanto que níveis excessivamente altos podem ocasionar dano oxidativo às estruturas da semente, levando à diminuição ou mesmo inibição deste processo (Bailly et al., 2008). Espécies reativas de oxigênio também estão envolvidas com o envelhecimento da semente e consequente perda da viabilidade. A hipótese formulada para explicar este mecanismo correlaciona o

envelhecimento da semente com um aumento gradativo de ERO e concomitante perda de função dos mecanismos antioxidantes, acarretando em um cenário de dano oxidativo acentuado frente à embebição desta semente em água (Bailly et al., 2008).

Alguns hormônios vegetais parecem estar envolvidos na regulação de vias de sinalização redox implicadas nestes processos. Alguns trabalhos sugerem que, para garantir a inibição da germinação, o hormônio vegetal ácido abscísico promove, entre outras ações, a redução do acúmulo de ERO na semente, sendo este acúmulo essencial para que a germinação ocorra. Em contrapartida, o ácido giberélico atua promovendo a germinação, inclusive através do aumento dos níveis de ERO na semente (Bailly et al., 2008; Lariguete et al., 2013). Chen et al. (2014) mostraram que o nocaute de *APx-R* levou a um aumento de 40% no conteúdo de ácido abscísico em sementes maduras, além de sensibilizar plântulas frente à exposição a este hormônio. Assim, parece que os processos de maturação da semente e germinação são regulados tanto por componentes do sistema antioxidante, como *APx-R*, quanto por hormônios vegetais, como o ácido abscísico, sendo que ambos parecem estar implicados também na regulação um do outro.

O envolvimento de peroxidases do cloroplasto na regulação do metabolismo redox da semente é um fato curioso, principalmente por esta não ser uma estrutura fotossintetizante. Não apenas *APx-R*, mas *APx-L* também parece participar da regulação destes processos, uma vez que resultados bastante similares foram obtidos em estudos que caracterizaram esta outra peroxidase cloroplastídica. Plantas com perda de função para *APx-L* germinam mais lentamente, além de gerarem sementes mais escuras e com menor vigor (Wang et al., 2014). Em conjunto esses dados sugerem que o estado redox desta organela possa ser um sinalizador importante nestes processos. Sendo a germinação um evento dependente de estímulo luminoso e de uma concentração ótima de ERO, é possível que o estado redox do cloroplasto deva estar preparado para permitir o acúmulo de ERO em uma concentração propícia para garantir a germinação. Em estudos anteriores, verificamos que cópias extras do gene codificador de *APx-R*, oriundas de eventos de duplicação do segmento cromossômico onde este se encontra, são sistematicamente perdidas (Lazarotto et al, 2011; Dunand et al., 2011). A partir destes resultados, especulamos que um aumento na expressão de *APx-R* pudesse conferir um fenótipo deletério para a planta, o que justificaria a perda repetida das cópias duplicadas deste gene. Conforme mostramos no capítulo III desta tese, a superexpressão de *APx-R* levou a uma diminuição drástica da viabilidade das sementes,

o que pode explicar porque este gene tem se mantido como cópia única nos genomas vegetais.

Diversas questões a respeito da origem e função de APx-R permanecem não respondidas. Qual substrato esta enzima utiliza para reduzir peróxido de hidrogênio? Como APx-R interfere na sinalização de ABA, e vice versa? Esta proteína pode ser encontrada também nas mitocôndrias ou sua localização é exclusivamente cloroplastídica? Qual a causa direta da inviabilidade das sementes que superexpressam APx-R? Estaria relacionada apenas ao conteúdo de peróxido de hidrogênio na semente ou seria consequência de malformação em estruturas da semente? Quais vias de sinalização regulam a expressão de *APx-R*? Teriam os genes codificadores de APx-R e APx-L se originado a partir de eventos de duplicação e posterior divergência de um gene codificador de APx? Estas são algumas das perguntas que esperamos poder responder em um futuro não tão distante.

- Referências -

- Bailly et al. (2008) From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology *C. R. Biologies* 331, 806
- Battistuzzi et al. (2010) Redox properties of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500, 21
- Blokhina et al. (2001) Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany* 52, 1179
- Chen et al. (2014) ASCORBATE PEROXIDASE6 Protects Arabidopsis Desiccating and Germinating Seeds from Stress and Mediates Cross Talk between Reactive Oxygen Species, Abscisic Acid, and Auxin. *Plant Physiology* 166, 370
- Conesa et al. (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications, *J. Biotechnol.* 93, 143
- Daum et al. (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria *J. Biol. Chem.* 257, 13028
- Dunand et al. (2011) Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is not a duplicable gene. *Plant Signal Behav.* 6(12), 1908
- Dunford (1999) *Heme Peroxidases*, John Wiley, Chichester
- Fawal et al. (2013) PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Res.* 41
- Foyer & Noctor (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119, 355
- Gibala, et al. (2009) The lack of mitochondrial AtFtsH4 protease alters Arabidopsis leaf morphology at the late stage of rosette development under short-day photoperiod, *Plant J.* 59, 685
- Jimenez et al. (1998) Role of the ascorbate glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves, *Plant Physiol.* 118, 1327

Karpinski et al. (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress. *The Plant Cell* 9, 627

Klotz & Loewen (2003) The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Molecular Biology and Evolution* 20(7), 1098

Kocsy et al. (2003) Redox control of plant growth and development. *Plant Science* 211, 77d

Kokkler et al. (2013) High resolution imaging of sub-cellular glutathione concentrations by quantitative immunoelectron microscopy in different leaf areas of Arabidopsis, *Micron* 45, 119

Lariguet et al. (2013) Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in Arabidopsis. *Planta* 238(2), 381

Lazzarotto et al. (2011) Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. *New Phytol.* 191, 234

Liszak et al. (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidases in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217, 658

Lopez et al. (1996) Ascorbate peroxidase activity, not the mRNA level, is enhanced in salt-stressed *Raphanus sativus* plants. *Plant Physiology* 97, 13

Mathé et al. (2010) Review Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500, 58

Matsui et al. (2003) Vesicular transport route of horseradish C1a peroxidase is regulated by N- and C-terminal propeptides in tobacco cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 517

Mittler (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9), 405

Mittler et al. (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16 (6), 300

Mittler & Zilinskas (1994) Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal* 5, 397

- Mittova et al. (2004a) Salinity upregulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany* 55, 1105
- Mittova et al. (2004b) Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, *L. pennellii* – role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. *Plant, Cell and Environment* 27, 237
- Neuhaus (1996) Protein targeting to the plant vacuole. *Plant Physiol. Biochem.*, 34, 217
- Passardi et al. (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants, *Phytochemistry* 65, 1879
- Passardi, F. et al. (2007) Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* 89, 567–579
- Pipirou et al. (2009) Peroxide-dependent formation of a covalent link between Trp51 and the heme in cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 48(16), 3593
- Poulos (2010) Thirty years of heme peroxidase structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500(1), 3
- Poulos et al. (1978) Crystallographic determination of the heme orientation and location of the cyanide binding site in yeast cytochrome c peroxidase *J. Biol. Chem.* 253, 3730
- Poulos et al. (1980) The crystal structure of cytochrome c peroxidase. *J. Biol. Chem.* 255, 575
- Rao et al. (1996) Ultraviolet-B- and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 110, 125
- Scandalios (2002) Oxidative stress responses - what have genome-scale studies taught us? *Genome Biology* 3, reviews 1019
- Sharp et al. (2003) Crystal structure of the ascorbate peroxidase–ascorbate complex. *Nature Structural & Molecular Biology* 10, 303
- Sun et al. (1994) Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. *Biochemistry and Cell Biology* 72 (7-8), 321

- Teixeira et al. (2004) Analysis of the Molecular Evolutionary History of the Ascorbate Peroxidase Gene Family: Inferences from the Rice Genome. *Journal of Molecular Evolution* 59, 761
- Tognolli et al. (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288, 129
- Vansuyt et al. (1997) Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. *Febs Letters* 410, 195
- Wang et al. (2014) The APX4 locus regulates seed vigor and seedling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 239, 909–919
- Welinder (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2, 388
- Welinder & Gajhede (1993) Structure and evolution of peroxidases, in: H. Greppin, S.K. Rasmussen, K.G. Welinder, C. Penel (Eds.), *Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology*, University of Copenhagen and University of Geneva, Geneva, pp. 35–42.
- Welinder et al. (2002) Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.*, 269, 6063
- Williams & Stewart (1976) The intramitochondrial location of cytochrome c peroxidase in wild-type and petite *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 107, 63
- Yoshimura et al. (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* 123, 223
- Yuan et al. (2008) Phylogenetic Analyses of Plastid-originated Proteins Imply Universal Endosymbiosis in Ancestors of Animals and Fungi. *Z. Naturforsch.*, 63: 903-908
- Xia et al. (2015) Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 66 (10), 2839
- Zámocký & Obinger (2010) Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. In *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases* (E. Torres and M. Ayala, eds.), pp. 7-35, Springer