

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

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES DO SISTEMA ISC EM**  
***EUCALYPTUS GRANDIS* E *AZOTOBACTER VINELANDII***

Tese de Doutorado

**Luisa Abruzzi de Oliveira**

Porto Alegre, 2012.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES DO SISTEMA ISC EM  
*EUCALYPTUS GRANDIS* E *AZOTOBACTER VINELANDII***

Tese de Doutorado

**Luisa Abruzzi de Oliveira**

**Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.**

**Orientação: Dr. Jeverson Frazzon**

**Dr. Giancarlo Pasquali**

Porto Alegre, Março de 2012.

## **INSTITUIÇÕES E FINANCIAMENTO**

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot) e Fralin Biotechnology Center da Virginia Polytechnic Institute and State University (Blacksburg, VA – Estados Unidos da América).

### **Agências Financiadoras:**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior (CAPES), Ministério da Educação
- Coordenação Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciência e Tecnologia
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)
- National Institutes of Health (NIH) Grant: GM59087

“Jamais considere seus estudos uma obrigação,  
mas uma oportunidade invejável...  
para aprender a conhecer a  
influência libertadora da beleza do reino do espírito,  
para seu próprio prazer pessoal e  
para proveito da comunidade a qual  
seu futuro trabalho pertencer.”

(Albert Einstein)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Jeverson Frazzon, pela valiosa transmissão de conhecimentos, discussões biológicas (ou não) e amizade sempre demonstrados no decorrer do trabalho. Por me acolher como “parte” de sua família no tempo em que estivemos nos Estados Unidos, pelas jantas....

Ao meu orientador Giancarlo Pasquali, pela paciência, sugestões e atenção.

Ao meu orientador do Doutorado-sanduíche, Dennis R. Dean, pela grande oportunidade!

À professora Ana Paula Frazzon, pelas sugestões, caminhadas e companhia!

À CAPES, agência financiadora da bolsa de doutorado e doutorado-sanduíche.

Aos meus colegas do LBMV, Rochele, Guilherme, Juliana, Gabriel, Camila, Michèle, Marta, Gustavo. Eduardo e Patricia, por tornar os momentos de estudo e trabalho mais divertidos.

Ao pessoal do Laboratório de Metaloenzimas da Virginia Tech, Valerie Cash, Weiya Xu, Kerri Martin, Coryne Hosmer e Jaim Oliveira pelo acolhimento e apoio.

À Maria de Lourdes, minha mãe, por ser exemplo de profissional, de amor, dedicação, por ter sido o contínuo apoio durante esses anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção de meus próprios valores.

Ao Fernando, meu pai, que mesmo não estando mais aqui, cuidou de mim.

À Gabriela, minha irmã, pelo carinho, conversas via skype...etc

Ao Carlos, meu noivo, pelo exemplo, companheirismo, apoio e incentivo. Pelas frequentes visitas no tempo do doutorado-sanduíche, etc...

## RESUMO

Os cofatores de ferro-enxofre [Fe-S] estão entre os mais versáteis e antigos cofatores enzimáticos encontrados na natureza. As células têm explorado as propriedades eletrônicas e estruturais destes cofatores inorgânicos para uma ampla variedade de atividades incluindo a transferência de elétrons, a catálise e a ativação de substratos. Um grande número de proteínas está envolvido na biogênese dos cofatores [Fe-S], e este processo pode ser dividido em três etapas principais: (i) formação do enxofre elementar, (ii) montagem do cofator [Fe-S], e (iii) inserção do cofator em apoproteínas. As plantas realizam fotossíntese e respiração, dois processos que requerem proteínas Fe-S, sendo os únicos organismos em que a biossíntese destas proteínas é compartimentalizada. Diversos fatores afetam o desenvolvimento das plantas, entre eles, a temperatura baixa, fator limitante à produtividade e à distribuição geográfica das plantas, incluindo *Eucalyptus grandis*, uma espécie com grande importância econômica. Devido a esse fato, foi realizada uma análise transcricional dos genes codificados pelo sistema ISC de biossíntese de cofatores [Fe-S] *NFS1*, *ISA1* e *ISU1* de *E. grandis* por meio de PCR quantitativa (RT-qPCR), após plântulas desta espécie serem submetidas ao tratamento de frio. O gene *NFS1* teve sua expressão reprimida nas primeiras 48 horas de tratamento, porém, após esse período observa-se um aumento da expressão gênica em relação à condição controle. O genes *ISU1* e *ISA1* apresentaram maior expressão gênica nas primeiras duas horas de tratamento, diminuindo drasticamente logo após este período. Foi verificado um aumento na quantidade relativa de Fe e S nos nas plântulas submetidas ao tratamento de frio, indicando um possível aumento na quantidade de cofatores [Fe-S] requeridos para o reestabelecimento da homeostase celular. As bactérias, por sua vez, desenvolveram pelo menos três sistemas de biossíntese, altamente conservados, que estão envolvidos na formação dos cofatores [Fe-S], sendo estes NIF, ISC e SUF. Em muitas proteobactérias, a regulação da produção de cofatores [Fe-S] pelos sistemas ISC e SUF é controlada por uma única proteína, IscR, pertencente à família de reguladores Rrf2. A proteína IscR possui um domínio de ligação ao DNA na região N-terminal e um segundo domínio de ligação de cofatores com três resíduos de cisteínas (Cys) altamente conservados. A ligação de um cofator do tipo [2Fe-2S] reprime a transcrição do seu próprio promotor *in vitro*. O genoma de *Azotobacter vinelandii* não inclui um sistema SUF completo e, portanto, permite o estudo dos efeitos da regulação de IscR não relacionada a SUF. No presente trabalho, objetivamos analisar a expressão do operon *isc* em linhagens selvagens e mutantes para IscR de *A. vinelandii* por meio das técnicas de sequenciamento do transcrito e RT-qPCR. As substituições das Cys<sup>92</sup>, Cys<sup>104</sup>, His<sup>107</sup> e a deleção de 120 pb da região codificadora do segundo domínio de IscR levaram à indução de um aumento da expressão de todo o operon *isc*. Notou-se também uma diferença fenotípica clara no tamanho das colônias portadoras das substituições de Cys e His, sendo estas menores em relação à linhagem selvagem. As substituições das Cys<sup>98</sup> e Cys<sup>111</sup>, ou ainda a dupla substituição Cys<sup>98/111</sup> não levaram a alteração da expressão do operon. A

ligação ou não do cofator [Fe-S] é, portanto, responsável pela regulação do operon *isc* em *A. vinelandii*, bem como, de outros operons codificadores de proteínas envolvidas em cadeias transportadoras de elétrons.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus grandis*, *Azotobacter vinelandii*, cofatores [Fe-S], RT-qPCR, estresse por frio e IscR.

## ABSTRACT

The iron-sulfur clusters [Fe-S] are among the oldest and most versatile enzyme cofactors found in nature. The cells have explored the structural and electronic properties of these inorganic clusters for a wide variety of activities including electron transfer, catalysis and activation of substrates. A large number of proteins is involved in the biogenesis of the [Fe-S] clusters, and this process can be divided into three main steps: (i) formation of elemental sulfur, (ii) assembly of the [Fe-S] cluster and (iii) insertion into apoproteins. Plants perform photosynthesis and respiration, two processes that require Fe-S protein, and in these organisms the synthesis of these proteins is compartmentalized. Several factors affect the development of plants, among them, the low temperature is a limiting factor to productivity and geographical distribution of plants, including *Eucalyptus grandis*, a specie with great economic importance. Due to this fact, we performed a transcriptional analysis by quantitative PCR (RT-qPCR) of the genes encoded by the *E. grandis* [Fe-S] cluster ISC system *NFS1*, *ISAI* and *ISUI* after seedlings were submitted to the chilling treatment. The *NFS1* gene expression is repressed in the first 48 hours of treatment, but after this period there was an increase in gene expression relating to the control condition. The genes *ISUI* and *ISAI* showed higher gene expression in the first two hours of treatment, followed by a sharp decrease. There was an increase in the relative amount of Fe and S in the seedlings subjected to cold treatment, indicating a possible increase in the amount of [Fe-S] clusters, required for the reestablishment of cellular homeostasis. Bacteria have developed at least three synthesis systems, highly conserved, which are involved in the formation of Fe-S proteins, NIF, ISC and SUF. In many proteobacteria, the regulation of clusters production by ISC and SUF is controlled by a single protein, IscR, belonging to the Rrf2 regulators family. The protein IscR has a DNA binding site at the N-terminal domain and second cofactors binding domain with three cysteine residues (Cys) highly conserved. The binding of a [2Fe-2S] cluster represses the transcription of its own promoter *in vitro*. The genome of *Azotobacter vinelandii* does not include a full SUF system and thus permits the study of the effects of IscR regulation unrelated to SUF. In this study, the aim was to analyze the expression of *isc* operon in wild type and mutant strains of *A. vinelandii* IscR by the techniques of the transcriptome sequencing and qRT-PCR. The replacement of Cys<sup>92</sup>, Cys<sup>104</sup>, His<sup>107</sup> and a deletion of 120 bp region encoding the second IscR domain led to an increased expression of the whole *isc* operon. It also showed a clear phenotypic difference in colonies size in the strains carrying the substitutions of His and Cys, it was smaller compared to the wild type strain. The replacement of Cys<sup>98</sup> and Cys<sup>111</sup>, or the double substitution Cys<sup>98/111</sup> not led to an altered operon expression. The [Fe-S] cluster binding or not, is therefore responsible for the regulation of the *isc* operon in *A. vinelandii* as well as of other operons encoding proteins involved in electron transport chains.

**Keywords:** *Eucalyptus grandis*, *Azotobacter vinelandii*, [Fe-S] cluster, RT-qPCR, cold stress and IscR.



## LISTA DE FIGURAS

### Referencial Teórico

<b>Figura 1:</b> Tipos, estruturas e estado de oxidação dos cofatores [Fe-S].....	19
<b>Figura 2:</b> Mecanismo de funcionamento da cisteína desulfurase NifS e de outras proteínas NifS-like.....	23
<b>Figura 3:</b> Estrutura da proteína NifU.....	24
<b>Figura 4:</b> Organização dos genes do sistema ISC em <i>Escherichia coli</i> e <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	26
<b>Figura 5:</b> Modelo para biogênese de proteínas Fe-S pelo sistema ISC em bactérias.....	27
<b>Figura 6:</b> Proposta de montagem <i>in vivo</i> do cofator [2Fe-2S] em <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	29
<b>Figura 7:</b> Modelo para a montagem de cofatores [Fe-S] na proteína arcabouço IscU e subsequente transferência para apoproteínas.....	31
<b>Figura 8:</b> Regulação do operon <i>isc</i> de <i>Azotobacter vinelandii</i> pela proteína IscR.....	34
<b>Figura 9:</b> Representação gráfica da organização gênica do operon <i>suf</i> em <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> .....	37
<b>Figura 10:</b> Modelo de montagem de cofatores [Fe-S] na mitocôndria de plantas.....	42

### Capítulo I: Transcriptional analysis of the *Eucalyptus grandis* NFS1, ISU1 and ISA1 genes under chilling stress

<b>Figure 1:</b> <i>In silico</i> analysis of microarray results comparing the relative gene expression profiles of <i>Eucalyptus grandis</i> leaves and xylem.....	52
<b>Figure 2:</b> <i>In silico</i> analysis of microarray results comparing the relative gene expression profiles in xylem of <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Eucalyptus globulus</i> .....	52
<b>Figure 3:</b> Quantitative RT-PCR analysis of <i>NFS1</i> gene expression from total RNA isolated from <i>Eucalyptus grandis</i> treated seedlings.....	53
<b>Figure 4:</b> Quantitative RT-PCR analysis of <i>ISA1</i> gene expression from total RNA isolated from <i>Eucalyptus grandis</i> treated seedlings.....	54
<b>Figure 5:</b> Quantitative RT-PCR analysis of <i>ISU1</i> gene expression from total RNA isolated from <i>Eucalyptus grandis</i> treated seedlings.....	55

<b>Figure 6:</b> Quantitative RT-PCR analysis of <i>Hsp70</i> gene expression from total RNA isolated from <i>Eucalyptus grandis</i> treated seedlings.....	56
<b>Figure 7:</b> Ion content quantification in chilling treatment and control samples.....	57
<b>Figura Suplementar 1:</b> <i>NFSI</i> phylogenetic tree.....	88
<b>Figura Suplementar 2:</b> <i>ISAI</i> phylogenetic tree .....	89
<b>Figura Suplementar 3:</b> <i>ISUI</i> phylogenetic tree .....	90

## Capítulo II: IscR como regulador transcricional em *Azotobacter vinelandii*

<b>Figura 1:</b> Fenótipo das colônias de <i>Azotobacter vinelandii</i> crescidas em meio de cultura Burk-glicose.....	100
<b>Figura 2:</b> Diagrama de Venn com o número de sequências diferencialmente expressas nas linhagens mutantes DJ1601 e DJ1696 de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	103
<b>Figura 3:</b> Organização gênica e região promotora dos operons <i>hox</i> e <i>hyp</i> .....	112
<b>Figura 4:</b> Alinhamento parcial das sequências promotoras do gene <i>iscR</i> de diferentes organismos, com indicação das regiões -35 e -10. ....	113
<b>Figura 5:</b> Representação das diversas etapas de purificação da proteína recombinante IscR.....	114

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I:

**Table 1:** Primer sequences (5'-3') employed in RT-qPCRs. Target genes and expected amplicon lengths (bp) are indicated.....91

### CAPÍTULO II:

**Tabela 1:** Plasmídeos e Linhagens mutantes/selvagem de *Azotobacter vinelandii* utilizadas no presente estudo.....95

**Tabela 2:** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.....97

**Tabela 3:** Valores de expressão absoluta e relativa obtidos a partir das análises dos transcritomas de *Azotobacter vinelandii* DJ1421 (WT), DJ1601 (deleção de 120 pb) e DJ1696 (substituição C92A).....102

**Tabela 4:** Lista dos genes diferencialmente expressos nas linhagens DJ1601 e DJ1696.....104

**Tabela 5:** Valores de expressão relativa normalizados com os genes *rpoD* e *gyrB*.....110

**Tabela 6:** Motivos de ligação putativos a proteína IscR encontrados nas regiões promotoras dos genes regulados negativamente, segundo a redução de transcritos observada nas amostras com o transcrito sequenciado.....111

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

° C = graus Celsius

ABA = ácido abscísico

Ala = alanina

Asp = aspartato

ATP = adenosina trifosfato

cDNA = DNA complementar (do inglês, *complementary DNA*)

CIA = *Cytosolic Iron-sulfur protein Assembly*

$C_T$  = *threshold cycles*

Cys = cisteína

dNTPs = Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EST = fragmentos de seqüências de genes expressos (*expressed sequence tags*)

Fdx = ferredoxina

Fe = ferro

Fe-S = ferro enxofre

g = grama (s)

Glu = glutamato

His = histidina

HTC = *helix-turn-helix*

ISC = Iron Sulfur Cluster

M = molaridade ou molar

Mb = megapar (es) de base (s)

mg = miligrama (s)

Mg = magnésio

mg = miligrama (s)

min = minuto(s)

min= minuto (s)

mL = mililitro(s)

mM = milimolar(es)

Mo = molibidênio

NADH = nicotinamida adenina dinucleótido hidreto

Ni = níquel

NIF = Nitrogen Fixation

nM = nanomolar (es)

nmol = nanomole (s)

OD = densidade ótica

pb ou bp = par (es) de base (s) (do inglês, *base pair*)

pH = potencial hidrogeniônico

PLP = piridoxal fosfato

Pro = prolina

qRT-PCR = PCR quantitativa em tempo real

RIN = Número de Integridade do DNA (do inglês, *RNA Integrity Number*)

rpm = rotações por minuto

S = enxofre

s= segundo (s)

SAM = S-adenosilmetionina

Ser = serina

SUF = Sulfur Utilization Factor

TRX = tioredoxina

U = unidade (s) de atividade enzimática

UV = ultravioleta

Va = vanádio

Val = valina

WT = *Wild-type*

Zn = zinco

µg = micrograma (s)

µL = microlitro (s)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>06</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>08</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>09</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>11</b>
<b>Lista de abreviaturas, símbolos e unidades .....</b>	<b>12</b>
<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
1. COFADORES FERRO-ENXOFRE .....	18
1.1 Caracterização geral.....	18
1.2 Sistemas de formação de Cofatores [Fe-S] em bactérias.....	21
1.2.1 Sistema NIF.....	21
1.2.1.1 NifS, uma cisteína desulfurase.....	23
1.2.1.2 NifU, uma proteína arcabouço.....	24
1.2.1.3 Complexo NifUS.....	25
1.2.2 Sistema ISC .....	26
1.2.2.1 IscS, uma cisteína desulfurase .....	27
1.2.2.2 IscU, uma proteína arcabouço .....	28
1.2.2.3 Ferredoxina .....	31
1.2.2.4 HscA e HscB, proteínas chaperonas .....	31

1.2.2.5	IscR, uma proteína reguladora da transcrição .....	32
1.2.2.6	IscA, uma ligadora de ferro .....	34
1.2.3	<b>Sistema SUF</b> .....	35
1.2.3.1	Proteínas arcabouço, complexo SufBCD .....	36
1.2.3.2	SufS e SufE .....	38
1.3	<b>Sistemas de formação de Cofatores [Fe-S] em Plantas</b> .....	38
1.3.1	<b>SUF, a maquinaria plastidial</b> .....	39
1.3.1.1	O complexo SufBCD .....	39
1.3.1.2	SufS-SufE .....	39
1.3.2	<b>ISC, a maquinaria mitocondrial</b> .....	41
2.	<b><i>EUCALYPTUS GRANDIS</i></b> .....	43
2.1	O gênero <i>Eucalyptus</i> e <i>Eucalyptus grandis</i> .....	43
2.2	O genoma de <i>Eucalyptus</i> .....	46
2.2.1	Dados obtidos no seqüenciamento do genoma .....	46
3.	<b>O FRIO COMO ESTRESSE ABIÓTICO ÀS PLANTAS</b> .....	47
4.	<b><i>AZOTOBACTER VINELANDII</i></b> .....	49

4.1 O genoma de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	50
<b>OBJETIVOS</b> .....	52
<b>CAPÍTULO I : Transcriptional analysis of the <i>Eucalyptus grandis</i> NFS1, ISU1 and ISA1 genes under chilling stress</b> .....	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO II: IscR como regulador transcricional em <i>Azotobacter vinelandii</i></b> .....	<b>92</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>93</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>94</b>
2.1 Linhagens de <i>Azotobacter vinelandii</i> e construções plasmidiais .....	94
2.2 Preparo de amostras e Extração de RNA.....	95
2.3 Sequenciamento do transcrito de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	96
2.4 Síntese de cDNA.....	96
2.5 Projeção de Oligonucleotídeos e Seleção dos Genes Constitutivos Para RT-qPCR .....	97
2.6 Experimentos de RT-qPCR .....	98
2.7 Análise das regiões promotoras de potenciais genes-alvo de IscR.....	99
2.8 Expressão e purificação da proteína recombinante IscR.....	99
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>100</b>
3.1 Análise fenotípica de mutantes <i>iscR</i> de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	100
3.2 Transcritoma. ....	101
3.3 Avaliação do Padrão de Expressão Gênica de <i>Azotobacter vinelandii</i> por RT-qPCR.....	109



3.4 Análise das regiões promotoras de operons e genes regulados por IscR .....	110
3.5 IscR recombinante .....	113
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>135</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>121</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS DO REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>142</b>
1. <b>Manuscrito publicado:</b> Reference Genes for the Normalization of Gene Expression in Eucalyptus Species .....	142
<b>CURRICULUM VITAE RESUMIDO .....</b>	<b>186</b>

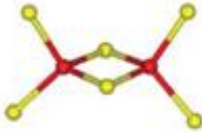
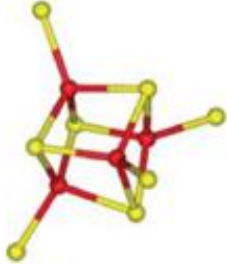

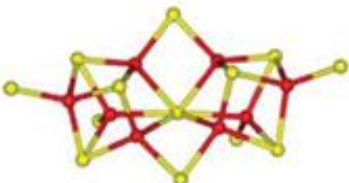
## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1. COFADORES FERRO-ENXOFRE

#### 1.1 Caracterização geral

Tem sido proposto que as formas iniciais de vida no planeta Terra teriam sido formadas na superfície de minerais de sulfeto de ferro, sugerindo um papel importante do ferro (Fe) e do enxofre (S) (Wächtershäuser 1992, Wächtershäuser and Huber 2007). A abundância dos elementos Fe e S na Terra pré-biótica, juntamente com a versatilidade estrutural e química dos cofatores Ferro-enxofre [Fe-S], facilitaram a seleção dos mesmos como grupos prostéticos para diversas proteínas, permitindo que essas adquirissem novas funções (Py and Barras 2011). A descoberta de novas proteínas Fe-S e cofatores [Fe-S] resultou na apreciação da sua ampla diversidade estrutural e funcional, que certamente são reflexos da versatilidade dos elementos formadores (Beinert *et al.* 1997).

Os cofatores [Fe-S] são grupamentos prostéticos funcionalmente versáteis e amplamente distribuídos, sendo encontrados em praticamente todas as formas vivas. A descoberta deste cofator foi realizada na década de 1960, sendo identificados e caracterizados por espectroscopia e métodos de química analítica como grupos prostéticos ácido-resistentes contidos em uma classe de proteínas carreadoras de elétrons denominadas ferredoxinas (Beinert *et al.* 1997). Esses cofatores podem conter os elementos ferro e enxofre em diferentes proporções molares. Os tipos mais comuns são o rômico [2Fe-2S] e o cubano [4Fe-4S], porém existem também do tipo [3Fe-4S], presentes em ferredoxinas bacterianas do tipo I, e os mais complexos [8Fe-7S] pertencentes ao cofator P (do inglês, *P cluster*) da enzima nitrogenase MoFe. O acoplamento de dois cofatores [2Fe-2S] permite a formação do cofator [4Fe-4S], e este pode dar origem aos tipos mais complexos [3Fe-4S] e [8Fe-7S] pela perda de um elemento Fe ou fusão dos cofatores (Figura 1) (Beinert *et al.* 1997, Johnson *et al.* 2005).

Tipo	Estrutura	Estado de Oxidação
[2Fe-2S]		[2Fe-2S] <sup>2+</sup> [2Fe-2S] <sup>+</sup>
[4Fe-4S]		[3Fe-4S] <sup>+</sup> [3Fe-4S] <sup>0</sup> [3Fe-4S] <sup>-</sup> [3Fe-4S] <sup>2-</sup>
[3Fe-4S]		[4Fe-4S] <sup>3+</sup> [4Fe-4S] <sup>2+</sup> [4Fe-4S] <sup>+</sup> [4Fe-4S] <sup>0</sup>
[8Fe-7S]		[8Fe-8S] <sup>5+</sup> [8Fe-8S] <sup>4+</sup> [8Fe-7S] <sup>3+</sup> [8Fe-7S] <sup>2+</sup>

**Figura 1: Tipos, estruturas e estado de oxidação dos cofatores [Fe-S]-** Formas mais comumente encontradas na natureza (Adaptado de Johnson *et al.* 2005).

A ligação dos cofatores [Fe-S] a cadeias polipeptídicas ocorre por meio da coordenação de íons de Fe, positivamente carregados por doadores de elétrons fornecidos por diversas cadeias laterais de aminoácidos. Os cofatores são coordenados às suas proteínas mais comumente por resíduos de cisteína (Cys), com ligação ao elemento Fe. Cofatores com maior nuclearidade, de uma maneira geral, não se apresentam complexados à suas proteínas por ligantes de cisteínas, podendo estes estar ligados aos resíduos de histidina (His), ácido aspártico (Asp), serina (Ser) ou cadeias protéicas com presença de grupamento lateral do tipo amida.

Existem proteínas Fe-S nas quais o cofator não contém somente Fe como metal. A proteína nitrogenase MoFe contém um agrupamento chamado de cofator FeMo, formado por [7Fe-9S-Mo] (Einsle *et al.* 2002). Esta proteína também serve de exemplo para proteínas que utilizam mais de um tipo de cofator. Apesar da aparente diversidade na estrutura global, reatividade e propriedades eletrônicas dos cofatores [Fe-S], os polinucleares partilham uma característica estrutural comum: são construídos a partir de [2Fe - 2S] (Frazzon and Dean, 2003). Apesar do grande número de proteínas Fe-S identificadas, não foi descrito um motivo consenso para predição de ligação de cofator [Fe-S]. Entretanto, algumas estruturas primárias são reconhecidas como prováveis ligadoras de cofatores [Fe-S]. Estes incluem o posicionamento conservado de resíduos de cisteína como o motivo CX<sub>4</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>30</sub>C para cofatores [2Fe-2S] de plantas e ferredoxinas de mamíferos, e o motivo consenso CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>20-40</sub>C para cofatores do tipo [4Fe-4S]. Usualmente um resíduo de prolina (Pro) ou glicina (Gly) flanqueiam uma das cisteínas conservadas (Lill *et al.* 2006).

Devido à sua ampla variedade funcional e estrutural, as proteínas Fe-S, estão envolvidas em diversos processos biológicos e possuem diversas funções. A mais comum é a transferência de elétrons (ferredoxinas), a qual se baseia na propensão do Fe alternar-se entre os estados oxidativos +2 (Fe<sup>2+</sup>, íon ferroso) e +3 (Fe<sup>3+</sup>, íon férrico). Em um ambiente proteico, os cofatores [Fe-S] podem adotar potenciais redox entre -500 mV a + 300 mV (Meyer 2008). Além da transferência de elétrons, os cofatores [Fe-S] estão envolvidos, na sinalização redox, ligação e ativação de substrato (p. ex., Acetil-CoA sintase, desidratases, enzimas com radical S-adenosilmetionina- SAM), regulação da expressão gênica (proteínas IscR, SoxR, FNR, IRP), reparo de DNA (helicase), regulação da atividade enzimática (ferroquelatase, glutamina fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) amidotransferase), doação de enxofre (biotina sintase), estrutural (endonuclease III, proteína MutY), estoque de Fe (ferredoxinas, poli-ferredoxinas), redução dissulfídica (ferredoxina:tiorredoxina redutase, heterodissulfido redutase), transferência de elétrons acoplados (Rieske, nitrogenase), modificação de uridinas de RNA transportadores (tRNAs) e síntese de 2-tiouridina e 4-tiouridina (Beinert 1996, Mulholland *et al.* 1998, Porello *et al.* 1998, Dai *et al.* 2000, Kiley and Beinert 2003, Lauhon 2002).

Os cofatores [Fe-S] constituem em grande parte o sítio de ligação de substrato de diversas enzimas redox e não-redox. Um sítio de ligação e ativação de substrato pode ser estabelecido de

três diferentes formas: (i) ligação não cisteínica em um único elemento Fe do cofator [4Fe-4S] pode facilitar a ligação e ativação do substrato (Beinert *et al.* 1996); (ii) a incorporação de um heterometal ao cofator [Fe-S] pode ser requerida para a ligação ou ativação do substrato (Dobbek *et al.* 2001); (iii) envolvendo a ligação de um sítio de ligação ao substrato metálico a um sítio de Fe de um cofator do tipo [4Fe-4S] via resíduo cisteinil (Doukov *et al.* 2002).

Sabe-se que certas apoformas de proteínas Fe-S que contêm cofatores dos tipos [2Fe-2S] e [4Fe-4S] podem ser ativadas *in vitro* pela simples adição de  $S^{2-}$  e  $Fe^{2+/3+}$ . Essa observação leva ao conceito de que cofatores [Fe-S] podem ser espontaneamente incorporados às suas proteínas correspondentes *in vivo*. Porém este ponto de vista não é compatível com a toxicidade fisiológica de Fe e S em níveis necessários para a maturação *in vitro*. Entretanto, como o Fe na forma férrica ou ferroso e o S na forma de sulfito são tóxicos *in vivo*, foi proposta a existência de uma ou mais maquinarias biossintéticas para a montagem dos cofatores [Fe-S] em células vivas. Após o trabalho pioneiro do grupo do Dr. Dennis R. Dean (*Fralin Biotechnology Center, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, EUA*) sobre a função da nitrogenase de *Azotobacter vinelandii*, diversas maquinarias biossintéticas foram descobertas baseadas em evidências bioquímicas e análises genéticas em bactérias e organismos eucarióticos. Entre as maquinarias descritas estão os sistemas NIF (Fixação de Nitrogênio, do inglês *Nitrogen Fixation*), ISC (Cofator Ferro-enxofre, do inglês *Iron Sulfur Cluster*) e SUF (fator de utilização do enxofre, do inglês *Sulfur Utilization Factor*) em bactérias e o CIA (Proteínas de associação citossólica do cofator Ferro-enxofre, do inglês *Cytosolic Iron-sulfur protein Assembly*) em leveduras (Lill and Muhlenhoff 2006, Takahashi and Tokumoto 2002).

## **1.2 Sistemas de Formação e associação de Cofatores [Fe-S] em Bactérias**

### **1.2.1 Sistema NIF**

NIF foi o primeiro sistema de biossíntese de cofatores [Fe-S] identificado e descrito sendo utilizado exclusivamente para a maturação da nitrogenase de *A. vinelandii* sob condições de fixação de nitrogênio. Entretanto existem algumas exceções em que alguns genes similares do sistema NIF foram identificados em organismos não fixadores de nitrogênio, como por

exemplo, o de *Helicobacter pylori* (Olson *et al.* 2000) e o de *Entamoeba histolytica* (Ali *et al.* 2004).

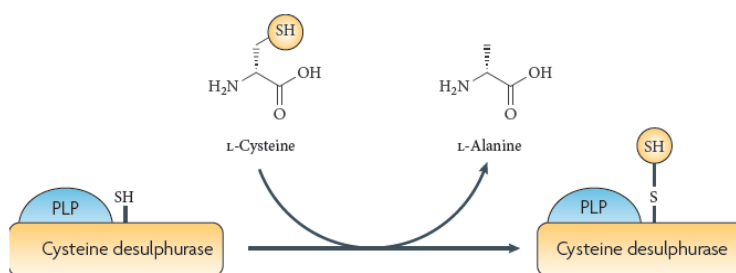
A partir de um estudo com *A. vinelandii* que visava analisar o cofator FeMo (Ferro e Molibdênio) da enzima nitrogenase, foi descrito o primeiro modelo para a formação biológica dos cofatores [Fe-S]. A nitrogenase é uma enzima cataliticamente inativa em condições não-nitrificantes e é produzida somente por organismos fixadores de nitrogênio (diazotróficos). Esta enzima é composta por duas proteínas, denominada de proteína MoFe e proteína Fe. A proteína MoFe contém os sítios de ligação ao substrato e o de redução, além de dois tipos de cofatores [Fe-S], um [Mo-7Fe-9S] e um cofator P [8Fe-7S]. As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  desta proteína são codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*, respectivamente e constitui um tetrâmero de 240 kDa. A Fe proteína é a fornecedora de elétrons para a redução do substrato e contém um único cofator do tipo [4Fe-4S]. Esta proteína é codificada pelo gene *nifH* e constitui um dímero de 60 kDa (Frazzon and Dean 2002, Rubio and Ludden 2008).

Com base em diversos outros estudos, foram estabelecidos os principais genes envolvidos na fixação do nitrogênio, sendo eles: *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*. Os genes *nif* HDK codificam a nitrogenase, enquanto os genes *nif* LA tem função regulatória. Todos os demais genes estão envolvidos na formação, associação e transferência dos cofatores para a nitrogenase (Frazzon and Dean 2002, Hu *et al.* 2007, Rubio and Ludden 2008). Diversos estudos demonstraram que a inativação de diferentes genes *nif* resulta em uma maturação defeituosa das proteínas MoFe ou Fe. Porém a deleção dos genes *nifS* e *nifU* acarreta em uma diminuição substancial, mas não definitiva da atividade da enzima nitrogenase. Com base nestas informações, foi formulado um modelo pelo qual as proteínas NifU e NifS produzem cofatores [Fe-S] destinados à maturação da nitrogenase. Quando estas proteínas são inativadas, outras proteínas poderiam restituir esta função, porém, em níveis muito baixos (Jacobson *et al.* 1989).

### 1.2.1.1 NifS, uma cisteína desulfurase

A purificação e os ensaios enzimáticos com a proteína NifS confirmaram o papel da mesma como sendo uma cisteína desulfurase, e sua expressão ocorre somente em condições de fixação de nitrogênio. A enzima purificada é um homodímero dependente da coenzima piridoxal fosfato (PLP, do inglês, *pyridoxal phosphate*) (Zheng *et al.* 1993). Devido ao fato das enzimas dependentes de PLP catalizarem diversas reações de eliminação e substituição envolvendo aminoácidos e seus derivados, foi observado no espectro ultravioleta (UV)-visível o efeito da adição de um aminoácido individual em NifS. Foi percebida uma perturbação exclusivamente associada à adição de L-cisteína. Também foi demonstrada a liberação de S da L-cisteína, rendendo L-alanina e S elementar ou sulfeto de hidrogênio, dependendo da presença ou não de um agente redutor na mistura da reação (Figura 2; Kaiser *et al.* 2000, Mihara *et al.* 2002).

Posteriormente foram descritas mais características da enzima NifS como: (i) a cisteína do sítio ativo, Cys<sup>325</sup>, é altamente reativa com agentes alquilantes; (ii) a proteína alquilada é inativa; (iii) a substituição da Cys<sup>325</sup> por Ala elimina a atividade da proteína; (iv) vinilglicina e L-alilglicina formam ligações covalentes com o sítio ativo da proteína, o que inibe sua atividade; e (v) a formação de persulfito pode ser percebida na posição do resíduo Cys<sup>325</sup> quando NifS é incubada com concentrações equimolares de L-cisteína e substrato (Zheng *et al.* 1994).

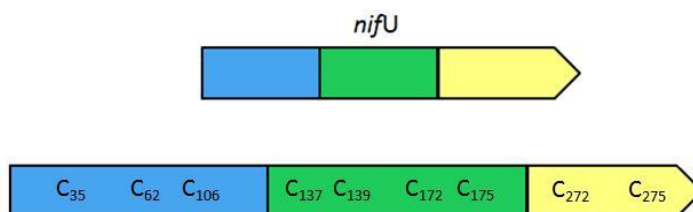


**Figura 2: Mecanismo de funcionamento da cisteína desulfurase NifS e de outras proteínas NifS-like:** (i) formação de uma base de *Shiff* entre a cisteína livre no sítio ativo da desulfurase (Cys<sup>325</sup>) e o PLP; (ii) formação de uma ligação persulfeto por meio de um ataque nucleofílico por um ânion tiolato do sítio ativo (Cys<sup>325</sup> para NifS, Cys<sup>328</sup> para IscS e Cys<sup>364</sup> para SufS) no S do substrato (L-cisteína) e posterior liberação de alanina; (iii) transferência do S para diferentes biomoléculas, tais como a proteína arcabouço Fe-S (Py and Barras 2010).

A enzima NifS representa uma ampla classe de cisteínas desulfurase que utilizam L-cisteína para a mobilização de S para formação de cofatores [Fe-S]. Estas proteínas podem ser classificadas em dois grupos distintos com base na composição das suas sequências: as do grupo I apresentam a sequência consenso SSGSACTS e as do grupo II a sequência consenso RXGHHCA (Mihara *et al.* 2002). O gene *cysE1* é co-transcrito com o gene *nifS* e codifica uma O-acetil serina sintase, a qual cataliza um passo limitante na biossíntese de cisteínas. Com base neste argumento é proposto que *cysE1* controla o *pool* de cisteína para a atividade de NifS (Evans *et al.* 2001, Zheng *et al.* 1998).

### 1.2.1.2 NifU, uma proteína arcabouço

A proteína NifU serve de arcabouço para a biossíntese de cofatores [Fe-S]. Quando purificada apresenta-se sob a forma de um homodímero e contém um cofator permanente do tipo [2Fe-2S] (Dos Santos *et al.* 2004, Agar *et al.* 2000). A análise da sequência primária de NifU permitiu a identificação de três domínios altamente conservados: (i) a região N-terminal com três resíduos de cisteína altamente conservados (Cys<sup>35</sup>, Cys<sup>62</sup> e Cys<sup>106</sup>); (ii) um domínio central contendo quatro resíduos de cisteína conservados (Cys<sup>137</sup>, Cys<sup>139</sup>, Cys<sup>173</sup> e Cys<sup>175</sup>), compatível com o motivo de ligação do cofator [2Fe-2S] onde se localiza o cofator permanente, e (iii) a região C-terminal com dois resíduos de cisteína altamente conservados (Cys<sup>272</sup> e Cys<sup>275</sup>) (Figura 3; Dos Santos *et al.* 2004).



**Figura 3: Estrutura da proteína NifU:** região N-terminal (azul), domínio central (verde) e região C-terminal (amarelo). Destacados estão os resíduos de cisteínas utilizados para ancoramentos dos cofatores [Fe-S].



Enquanto o domínio central de NifU possui um domínio de ligação ao cofator permanente do tipo [2Fe-2S], as regiões N e C-terminais possuem sítios para a formação de cofatores [Fe-S] transientes destinados à maturação da nitrogenase (Agar *et al.* 2000, Dos Santos *et al.* 2004). O cofator [2Fe-2S] permanente possui um papel redox relacionado à aquisição de Fe para a montagem do cofator, liberação do persulfeto de NifS, liberação do cofator [Fe-S] transiente de NifU ou provimento de elétrons para a redução de S elementar ( $S^0$ ) a  $S^2$  (Frazzon and Dean 2003). A confirmação da formação de cofatores transientes em NifU foi obtida pela combinação de dados analíticos, de ressonância de Raman de absorção, os quais permitiram demonstrar a formação de um cofator lábil do tipo  $[2Fe-2S]^{2+}$  na porção N-terminal, quando esta é incubada com  $Fe^{2+}$ , L-cisteína e quantidades catalíticas de NifS purificada (Yuvaniyama *et al.* 2000).

Aproximadamente um cofator [2Fe-2S] transiente é montado por cada homodímero de NifU e esses cofatores são lábeis e liberados rapidamente. O envolvimento da porção C-terminal de NifU na montagem dos cofatores [Fe-S] transientes foi sugerida com base na função de proteínas parálogas de cianobactérias, plantas e organismos superiores que suportam a formação de cofatores transientes dos tipos  $[2Fe-2S]^{2+}$  ou  $[4Fe-4S]^{2+}$  (Léon *et al.* 2003, Tong *et al.* 2003). Em resumo, NifU é capaz de suportar a formação de cofatores [Fe-S] transientes, o que sustenta a hipótese de que NifU é uma proteína arcabouço na formação de cofatores [Fe-S] para a maturação da nitrogenase.

### 1.2.1.3 Complexo NifUS

Foi demonstrado por Yuvaniyama *et al.* (2000) que NifU pode interagir com NifS formando um complexo transiente necessário à liberação do S elementar por NifS. Esse complexo não é mantido por uma ligação forte como demonstrado por duas estratégias: (i):, NifU não foi co-purificada com NifS quando esta foi isolada de extratos de *A. vinelandii* cultivadas em condições de fixação de nitrogênio; (ii) a imunoprecipitação específica de NifU ou NifS de extratos de *A. vinelandii* não resultou em co-precipitação. Entretanto, NifU e NifS podem formar um complexo transiente, pois a mistura equimolar de NifU e NifS resultou no aparecimento de um novo pico durante a cromatografia com coluna de exclusão por tamanho quando comparado com as amostras de NifU ou NifS resolvidas individualmente pela coluna

(Yuvaniyama *et al.* 2000). Em estudos *in vitro* foi verificado que NifS não é necessária para a transferência do cofator [Fe-S], porém é requerida para o carregamento do cofator em NifU. Isto demonstra que a ativação da proteína Fe da nitrogenase é realizada por NifU e NifS juntas (complexo NifUS). A biossíntese do cofator FeMo e do cofator P na proteína MoFe também envolve o complexo NifUS (Agar *et al.* 2000, Dos Santos *et al.* 2004, Yuvaniyama *et al.* 2000).

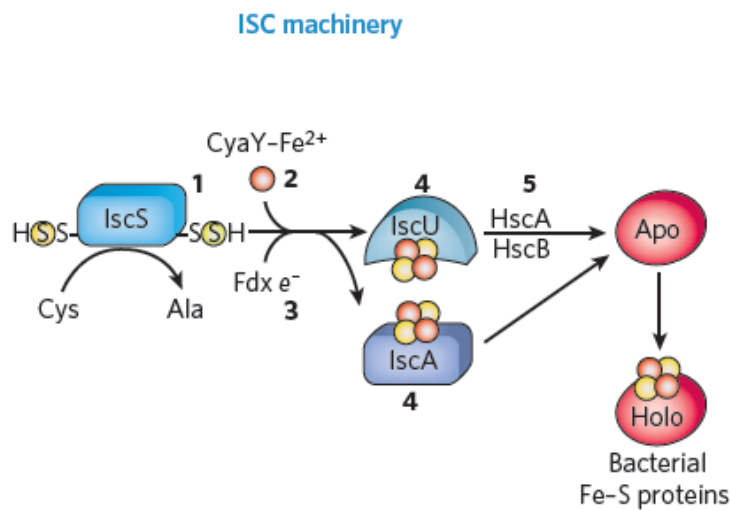
### 1.2.2 Sistema ISC

Com base na habilidade das linhagens duplo mutantes com deleção de NifS e NifU em produzir baixos níveis de nitrogenase ativa e de se multiplicarem lentamente em condições de fixação de nitrogênio, sugeriu-se que haveria uma maquinaria com expressão basal dedicada à formação de cofatores [Fe-S], independente destes genes e proteínas (Jacobson *et al.* 1989). A partir de células de *A. vinelandii* com atividade de cisteína desulfurase e cultivadas em condições de não fixação de nitrogênio, foram realizados ensaios bioquímicos como micro-sequenciamento de oligopeptídeos obtidos por digestão tríplica, e então foi isolada e analisada a sequência de DNA correspondente a região genômica de *A. vinelandii*. Desta análise, foram identificados nove genes com função relacionada à biossíntese de cofatores [Fe-S], designados: *cysE2*, *iscR* (proteína regulatória), *iscS* (cisteína desulfurase), *iscU* (proteína arcabouço), *iscA* (proteína arcabouço e/ou possível doadora de Fe), *hscB* (co-chaperona), *hscA* (chaperona), *fdx* (ferrodoxina) e *orf3/iscX* (Figura 4; Zheng *et al.* 1998). Desde então, foi estabelecido que o sistema ISC está presente em procariotos e eucariotos, e é o sistema endógeno fundamental de biossíntese de cofatores [Fe-S] em procariotos, incluindo *Escherichia coli* e *A. vinelandii* (Frazzon and Dean 2003).



**Figura 4:** Organização dos genes do sistema ISC em *Escherichia coli* e *Azotobacter vinelandii*.

A maquinaria de biossíntese ISC consiste basicamente de uma cisteína desulfurase (IscS) e proteínas arcabouço (IscU e/ou IscA) onde ocorre a montagem dos cofatores [Fe-S]. Uma ferredoxina (Fdx) com cofator do tipo [2Fe-2S] reduz o S da cisteína a sulfeto, e o cofator [Fe-S] ligado transientemente é transferido das proteínas arcabouço para apoproteínas (apo). A transferência a partir de IscU é realizada com o auxílio das chaperonas HscA e HscB (Figura 5; Lill *et al.* 2009).



**Figura 5: Modelo para biogênese de proteínas Fe-S pelo sistema ISC em bactérias-** Uma cisteína desulfurase (IscS), que libera S elementar (representado pelos círculos amarelos) e L-alanina a partir da L-cisteína. Ocorre a formação de um cofator [Fe-S] transiente nas proteínas arcabouço IscU e/ou IscA. A ferredoxina (Fdx) reduz o S da cisteína a sulfeto e o cofator [Fe-S] ligado transientemente é transferido das proteínas arcabouço para apoproteínas (apo) para que seja coordenado em resíduos específicos (Lill *et al.* 2009).

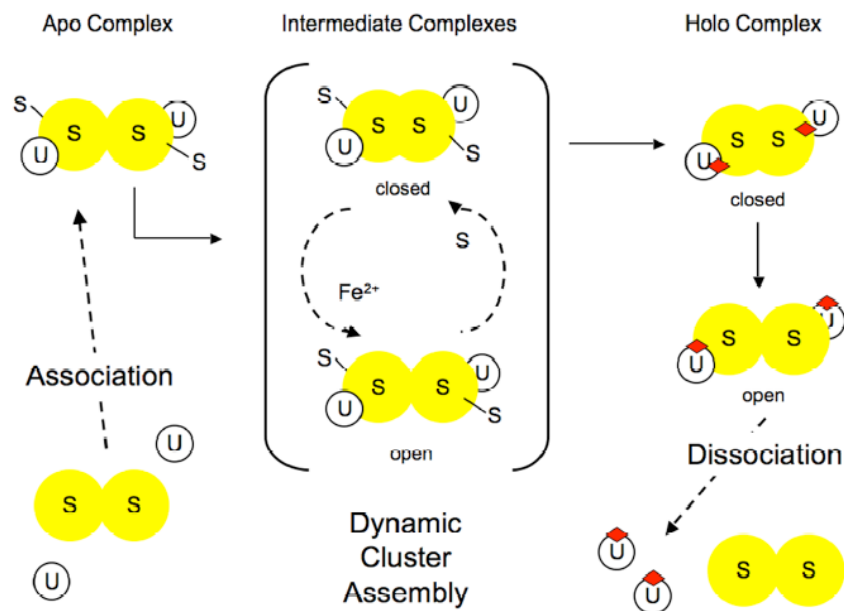
### 1.2.2.1 IscS, uma cisteína desulfurase

IscS, bem como NifS, pertence ao grupo I de cisteínas desulfurases, apresentando em sua sequência o motivo SSGSACTS. A proteína foi purificada de *E. coli* como um homodímero de 90 kDa e que contém PLP como cofator (Flint 1996). A estrutura cristalográfica desta proteína

foi resolvida com resolução de 2.1 Å, onde foi possível observar que mudanças conformacionais significativas devem ocorrer para que a Cys<sup>320</sup> do sítio ativo participe da catálise (Cupp-Vickery *et al.* 2003). Apesar da grande similaridade de sequência primária do sítio ativo com NifS, estas proteínas não são equivalentes *in vivo*, pois o fenótipo da deleção de *iscS* não é recuperado com a expressão de NifS, quando *A. vinelandii* é multiplicado em condições de fixação de nitrogênio. A proteína IscS é essencial para *A. vinelandii* pois sua deleção é letal (Zheng *et al.* 1998). Entretanto, em *E. coli*, a deleção de *iscS* causa defeitos severos no crescimento, mas estes não são letais para a bactéria (Lauhon and Kambampati 2000, Schwartz *et al.* 2000). A proteína IscS também fornece S para outras rotas metabólicas não relacionadas com a biossíntese de cofatores [Fe-S], como, por exemplo, a biossíntese de tiamina ou molibdopterina e modificações pós-traducionais de tRNAs (Mihara and Esaki 2002, Ikeuchi *et al.* 2006).

#### **1.2.2.2 IscU, uma proteína arcabouço**

A sequência primária de IscU é consideravelmente conservada com relação ao domínio N-terminal de NifU, incluindo os três resíduos conservados de cisteína, sugerindo que IscU é uma proteína arcabouço do sistema ISC. Experimentos *in vivo*, utilizando *A. vinelandii* como modelo, revelaram que apo-IscU e holo-IscU apresentam conformações distintas e que a montagem de cofatores [Fe-S] é um processo dinâmico que envolve a associação e a dissociação de IscU e IscS (Figura 6; Raulfs *et al.* 2008).



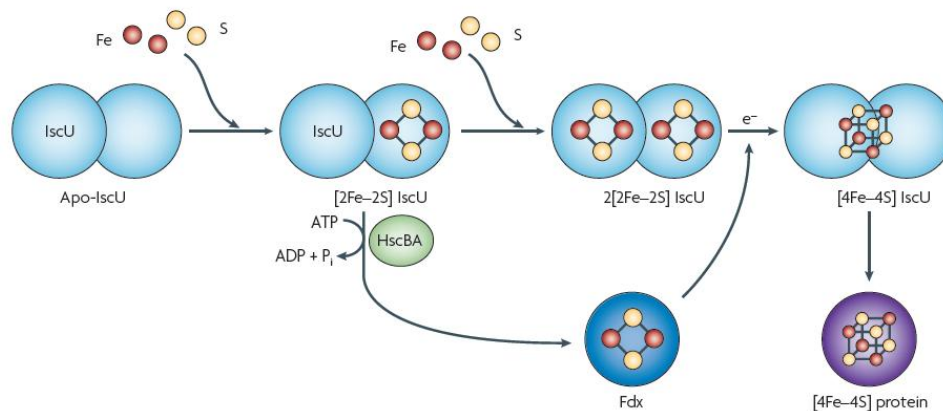
**Figura 6: Proposta de montagem *in vivo* do cofator [2Fe-2S] em *Azotobacter vinelandii*.** Representação do complexo formado por IscS e IscU no qual o cofator [Fe-S] é montado. Este complexo alterna entre os estados “protegido” e “exposto”, permitindo a entrada de Fe e sulfeto. Por fim, o complexo holo-IscU IscS é formado e se dissocia em holo-IscU e IscS (Adaptado de Raulfs 2009).

Os resíduos de maior importância para a coordenação do cofator [Fe-S] em IscU são: Cys<sup>37</sup>, Cys<sup>63</sup>, Cys<sup>106</sup> e His<sup>105</sup> (Johnson *et al.* 2006). Entretanto, foi relatado por Raulfs *et al.* (2008) que o resíduo (Asp<sup>39</sup> é importante para a transferência do cofator e, portanto, estaria envolvido na sua orientação juntamente com os resíduos de cisteína. A substituição desse resíduo por uma Ala acarreta na estabilização e consequente não-transferência do cofator pela proteína IscU (Raulfs *et al.* 2008). Em *E. coli*, IscU e IscS podem formar um complexo heterotetramérico com a formação de uma ponte de dissulfeto entre o resíduo Cys<sup>328</sup> de IscS e Cys<sup>63</sup> de IscU. Em *A. vinelandii* esse mesmo complexo é formado, porém a ponte de dissulfeto envolve qualquer um dos 3 resíduos Cys. (Kato *et al.* 2002, Nuth *et al.* 2002). IscU também possui um motivo conservado Leu-Pro-Pro-Val-Lys (LPPVK) que é crítico para a interação com as chaperonas HscA e HscB (Cupp-Vickery *et al.* 2003).

Foi demonstrado que apo-IscU em solução pode apresentar duas conformações distintas, uma porção desordenada e outra ordenada (exceto para os resíduos de ligação a metais) e os dois estados podem se interconverter em milissegundos. A conformação ordenada pode ser estabilizada pela adição de zinco (Zn), por mutação sítio-dirigida pela substituição do Asp39Ala e, além disso, por estrutura assimétrica trimérica do cofator [2Fe-2S] (Kim *et al.* 2009). Esses resultados concordam com dados obtidos por análises espectroscópicas de ressonância nuclear magnética (NMR, do inglês, *Nuclear Magnetic Resonance*) de IscU de *Thermatoga maritima*, onde IscU exibe uma estrutura terciária variável e diferentes arranjos conformacionais (Bertini *et al.* 2003).

Análises *in vivo* sobre a biossíntese de cofatores [Fe-S] em IscU feitas com *A. vinelandii* demonstraram uma produção serial de apo-IscU, um complexo IscU-IscS e uma forma lábil de IscU carregada com um cofator do tipo [2Fe-2S]. Entretanto, não foi observado o acúmulo de formas IscU carregadas com cofatores do tipo [4Fe-4S] (Raulfs *et al.* 2008). A provável razão é que estas formas são extremamente lábeis para purificação ou pelo curto tempo de meia-vida *in vivo*. Outra possível explicação é que a taxa de montagem de cofatores [4Fe-4S] *in vitro* é muito lenta e o processo requer diversas horas (Unciuleac *et al.* 2007). Resumidamente, a reconstrução de IscU de *A. vinelandii* pode ser feita com a adição de IscS, cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) e L-cisteína, e revela a formação sequencial de cofatores [Fe-S]: (i) um cofator do tipo [2Fe-2S] por dímero, dois cofatores [2Fe-2S] por dímero, e um cofator [4Fe-4S] por dímero (Figura 7; Agar *et al.* 2000).

Em conclusão: IscU *in vivo* serve como arcabouço para a formação de cofatores [Fe-S] destinados à maturação de proteínas Fe-S; ambas as formas de IscU (apo e carregada com cofator [Fe-S]) podem ser acumuladas *in vivo* e estas formas são conformacionalmente distintas. Finalmente, o processo de montagem de cofatores [Fe-S] é dinâmico e envolve a associação e a dissociação de IscS e IscU (Raulfs *et al.* 2008).



**Figura 7: Modelo para a montagem de cofatores [Fe-S] na proteína arcabouço IscU e subsequente transferência para apoproteínas** – A montagem de cofatores em IscU é feita a partir da formação de IscU contendo um cofator [2Fe-2S] por dímero, dois cofatores [2Fe-2S] por dímero e, por fim, um cofator [4Fe-4S] por dímero. Neste modelo, as chaperonas, HscA e HscB são utilizadas para a maturação das proteínas Fe-S com cofator do tipo [2Fe-2S] (como por exemplo, Fdx). A formação de IscU carregada com cofator [4Fe-4S] é dependente da atividade da proteína Fdx, e é especificamente envolvida na maturação de proteínas [4Fe-4S], o que inclui a maior parte das proteínas Fe-S de *E. coli* (Adaptado de Py and Barras 2010).

### 1.2.2.3 Ferrodoxina

Elétrons são necessários para a redução do S elementar liberado da cisteína a sulfeto. A ferrodoxina (Fdx) é uma proteína Fe-S que medeia a transferência de elétrons em diversas reações metabólicas, sendo responsável por esta transferência na biogênese de cofatores [Fe-S] pelo sistema ISC em *A. vinelandii* e *E. coli*. A Fdx recebe elétrons das ferrodoxinas redutases (Fdxr), e esses elétrons são obtidos de NADH ou NADPH (Barras *et al.* 2005).

### 1.2.2.4 HscA e HscB, proteínas chaperonas

Após a formação do cofator [Fe-S] em proteínas arcabouço, a transferência do cofator para apoproteínas é realizada com o auxílio de duas proteínas adicionais, HscA e HscB (também conhecidas como Hsc66 e Hsc20) que apresentam alto grau de similaridade com DnaK e DnaJ

respectivamente. São proteínas com atividade ATPase intrínseca. HscA é uma chaperona Hsp70 e HscB uma proteína J co-chaperona. O envolvimento destas proteínas na maturação de proteínas Fe-S foi primeiramente sugerido com base na proximidade e ligação destes genes com genes *isc* em bactérias.

Ensaio de ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês, *Surface Plasmon Resonance*), ATPase e calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês, *Isothermal Titration Calorimetry*) revelaram a interação entre IscU e HscA ou HscB. IscU parece ser um substrato nativo e as chaperonas regulam a transferência do cofator [Fe-S] para apoproteínas (Hoff *et al.* 2000). O motivo conservado LPPVK, localizado próximo ao terceiro resíduo de cisteína conservado é necessário para a interação das formas apo ou holo-IscU com HscA, e estimula a hidrólise de nucleotídeo em HscA (Cupp-Vickery *et al.* 2004). Esta interação é reforçada com HscB que se liga e estabiliza as formas ordenadas de IscU, entregando esta para HscA e estimulando a atividade ATPásica (de HscA). Esse complexo está relacionado somente com a entrega de cofatores do tipo [2Fe-2S] (Vickery and Cupp-Vickery 2007, Kim *et al.* 2009).

Dada a importância das proteínas Fe-S no metabolismo intermediário, é surpreendente o fato da inativação dos genes *iscS* e *iscU* de *E.coli* resultar em linhagens mutantes viáveis. Isso é interessante, pois, a manipulação genética dos componentes da maquinaria ISC em *A. vinelandii* é complicada devido ao fato dos genes *iscS*, *iscU*, *hscB*, *hscA* e *fdx* serem essenciais (Johnson *et al.* 2006). Essa discrepância foi resolvida quando outro sistema de biossíntese de cofatores [Fe-S], o sistema SUF foi descoberto em *E. coli*, que possui um conjunto completo de genes *suf* não codificados pelo genoma de *A. vinelandii* (ver adiante, sessão 1.2.3).

#### **1.2.2.5 IscR, uma proteína reguladora da transcrição**

Em diversas  $\beta$ - e  $\gamma$ - proteobactérias, a regulação da produção de cofatores [Fe-S] pelos sistemas ISC e SUF é controlada por uma única proteína, IscR, da família de reguladores Rrf2 (Giel *et al.* 2006, Schwartz *et al.* 2001). IscR contém uma região de ligação ao DNA na porção N-terminal formada por uma estrutura do tipo *helix-turn-helix* (HTH) e um segundo domínio altamente conservado com três resíduos de cisteína, um provável local de ligação do cofator [Fe-



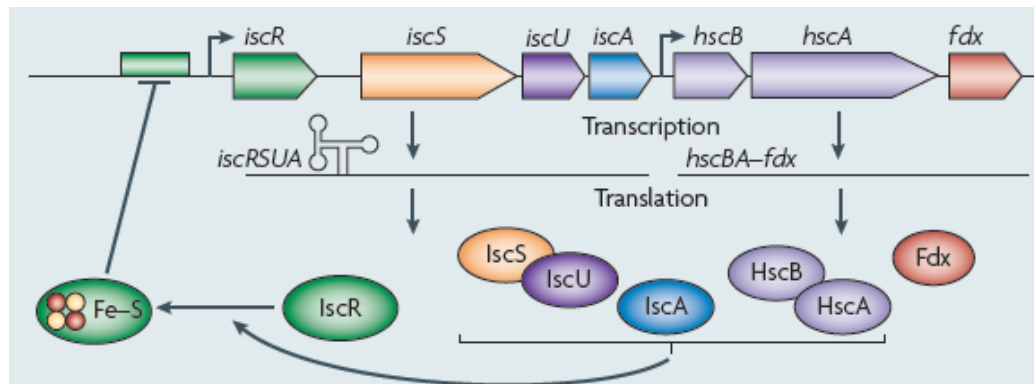
S]. Com base no contexto genômico e homologia de sequência, IscR foi descrita como reguladora do operon *iscRSUA* (Schwartz *et al.* 2001). IscR é um fator de transcrição que contém um cofator [2Fe-2S], e atua como repressor ou ativador na expressão de mais de 40 genes em 20 operons preditos em *E. coli* sob condições aeróbicas e anaeróbicas (Giel *et al.* 2006).

Enquanto o papel de IscR reprimindo a maquinaria ISC é claramente estabelecido, o modo pelo qual a atividade de IscR é regulada para manter a quantidade adequada de cofatores [Fe-S] não é bem entendido. A inativação da rota de biossíntese ISC diminui a repressão do promotor *iscR*, sugerindo que o cofator [2Fe-2S] é necessário para a função de repressor (Schwartz *et al.* 2001). Consistente com esta observação, a limitação de Fe ou S também desreprime o promotor IscR (Outten *et al.* 2004, Gyaneshwar *et al.* 2005). Com base nos dados expostos anteriormente, Schwartz *et al.* (2001) propuseram que esse é um mecanismo de retroalimentação (*feedback*). Quando está aumentada a concentração intracelular de proteínas Isc e Hsc, e de Fe<sup>+2</sup> e cisteína, IscR irá adquirir um cofator [2Fe-2S], sendo então capaz de se ligar ao DNA e reprimir a transcrição do operon *iscRSUA-hhscBA-fdx-IscX*.

A proteína IscR é uma proteína Fe-S e o cofator é necessário para a repressão da transcrição do operon *isc*, do qual faz parte (Schwartz *et al.* 2001). Nesbit *et al.* (2009) demonstraram que o cofator [2Fe-2S] não é necessário para IscR exercer sua função como regulador em alguns promotores alvo. A presença do cofator para a regulação parece depender do tipo de sequência de ligação a IscR (Giel *et al.* 2006). São descritos até hoje, duas sequências motivo, a do tipo 1, com 25 pares de bases (pb) (ATASYGACTRwwwYAGTCRRSTAT) e do tipo 2, com 26 pb (AWARCCCYTSnGTTTGMnGKKKTKWA); [M=A/C, R=A/G, S=G/C, W=A/T, Y=C/T]. Sequências do tipo 1 requerem [2Fe-2S]-IscR para sua repressão, já as sequências do tipo 2, por sua vez, não requerem cofator [Fe-S] para a sua ativação (Nesbit *et al.* 2009).

Estudos posteriores demonstraram que a proteína IscR, em sua forma apo, ativa a expressão dos genes do operon *suf* em *E. coli*. Quando o cofator está presente, a holo-IscR reprime a expressão do operon *isc*, quando está ausente, apo-IscR ativa a expressão dos genes *suf* (Figura 8). Desta maneira, a regulação IscR-dependente permite o aumento da expressão de dois

sistemas, ISC e SUF, sob condições de estresse oxidativo ou depleção de Fe, condições na qual IscR é encontrada mais comumente na sua forma apo (Giel *et al.*, 2006).



**Figura 8: Regulação do operon *isc* de *Azotobacter vinelandii* pela proteína IscR-** A apoproteína IscR (apo-IscR) é maturada pela rota ISC, e na sua holoforma (holo-IscR) reprime o promotor a montante de *iscR*. Os genes codificadores das chaperonas HscA, HscB e da Fdx podem ser transcritos separadamente dos demais genes (*iscRSUA*), por promotores a montante de *hscA* e *hscB*.

A função regulatória de IscR também está envolvida na virulência e na patogenicidade de diversos organismos como *Shigella flexneri*, na qual a máxima expressão dos genes *suf* está associada à virulência, e *Erwinia chrysanthemi* (Rincon-Enriquez *et al.* 2008, Runyen-Janecky *et al.* 2008). A deleção de IscR em *Pseudomonas aeruginosa* resultou em fenótipos sensíveis ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e, em *Burkholderia mallei*, a aumento da sensibilidade ao óxido nítrico (Choi *et al.* 2007, Jones-Carson *et al.* 2008).

### 1.2.2.6 IscA, uma ligadora de ferro

IscA é uma proteína capaz de ligar Fe e doar esse metal para a formação transiente de cofatores [Fe-S] em IscU na presença de IscS e L-cisteína (Ding and Clark 2004). Estudos genéticos em *Saccharomyces cerevisiae* confirmaram esta atividade já que a deleção de homólogos de *iscA* resultou em acúmulo de Fe na mitocôndria e em proteínas Fe-S deficientes.

As proteínas do tipo A canônicas possuem três resíduos de cisteína altamente conservados, dispostos em dois segmentos próximos à região terminal (X<sub>34</sub>CX<sub>63</sub>CGCX<sub>6</sub>). Esses

motivos são essenciais para a função *in vivo* (Jensen and Culotta 2000). A capacidade de IscA ligar Fe é consistente com modelos estruturais obtidos por cristalografia de raios-X, que permitiram revelar que a proteína funcional ocorre como um tetrâmero com um canal central, formado pela associação de quatro monômeros de IscA. É dentro deste canal que estão localizados os três resíduos de cisteína conservados de cada monômero, que são projetados formando um “bolso de cisteínas”. Esse bolso pode rapidamente acomodar o Fe mononuclear na proteína (Cupp-Vickery *et al.* 2004). A substituição de duas cisteínas em *E. coli* (Cys<sup>99</sup> e/ou Cys<sup>101</sup>) por Ser aboliu completamente a atividade de ligação ao Fe de IscA, sugerindo que estas cisteínas estão envolvidas na ligação do Fe à proteína (Yang *et al.* 2006).

IscA parece prevenir a formação de hidróxido férrico, um composto biologicamente inacessível, sob condições aeróbicas. A subsequente adição de L-cisteína mobiliza o centro de Fe em IscA e o Fe é transferido para a montagem do cofator [Fe-S] em IscU (Yang *et al.* 2006).

### 1.2.3 Sistema SUF

Mutações alterando diversos componentes do sistema ISC, em *A. vinelandii* são letais, sugerindo que este sistema é essencial para a bactéria. Em contraste, linhagens de *E. coli*, com deleção de todo o sistema ISC continuam viáveis, indicando a existência de um sistema acessório adicional de biossíntese de cofatores [Fe-S]. Esse sistema foi descoberto subsequentemente e denominado SUF, do inglês, *Sulfur Utilization Factor*.

O sistema SUF de *E. coli* consiste de seis genes organizados em um operon *suf*ABCDSE. O operon foi originalmente identificado em *E. coli* pela desestabilização da proteína FhuF (que contém um cofator do tipo [2Fe-2S]) em mutantes *sufS* ou *sufD*. FhuF é uma proteína com função de íon férrico redutase, a qual permite a utilização de ferrioxamina B ou ácido rodotorúlico com fonte de Fe. Os primeiros estudos genéticos permitiram mostrar que a expressão dos genes *suf* é regulada pelo repressor Fe-dependente Fur, e é induzida em condições de deficiência de Fe. Este operon também faz parte do regulon de estresse oxidativo OxyR-dependente, que é um regulador transcricional responsivo a peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Análises das sequências primárias das proteínas codificadas pelo operon *suf*, permitiram identificar SufS como uma cisteína desulfurase e SufA exibiu identidade significativa quando comparada com IscA, incluindo as três cisteínas conservadas. Com base nesses resultados, ficou evidente o papel do sistema SUF na biossíntese de cofatores [Fe-S]. Por outro lado, mutantes *suf* de *E. coli* não apresentaram fenótipo alterado em condições normais de cultura (Patzner and Hantke 1999, Zheng *et al.* 2001). Estudos do operon *suf* do patógeno vegetal *E. chrysanthemi*, também permitiram demonstrar que a expressão dos genes *suf* pode ser induzida sob condições de deficiência de Fe (Nachin *et al.* 2001). A função deste operon na formação de cofatores [Fe-S] foi estabelecida em *E. coli* por meio da combinação de mutantes para o sistema ISC e SUF. A inativação de um dos sistemas (ISC ou SUF) em *E. coli* não leva à letalidade. Porém quando os dois sistemas são inativados simultaneamente, o resultado é letal. Como as mutações nos genes *suf* não causam defeitos severos na atividade de proteínas Fe-S, o sistema SUF é considerado como um contribuinte menor na biossíntese dos cofatores [Fe-S]. Entretanto, trabalhos posteriores mostraram que SUF é um sistema vital de biossíntese de cofatores [Fe-S] sob condições de estresse, tais como estresse oxidativo ou falta de Fe (Barras *et al.* 2005, Fontecave *et al.* 2005, Riboldi *et al.* 2011). Com base nisso, é razoável que sistemas semelhantes ao SUF (SUF-like) formem a base de biossíntese de cofatores [Fe-S] em cloroplastos de plantas, que foram provavelmente herdados de uma cianobactéria ancestral (Balk and Lobreaux 2005).

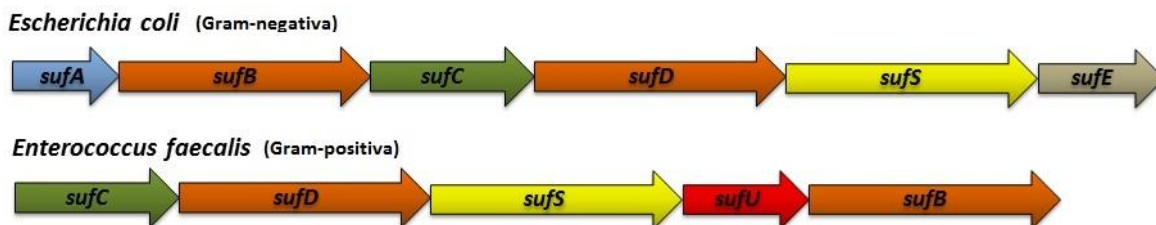
### **1.2.3.1 Proteínas arcabouço, complexo SufBCD**

Em 2003, dois grupos distintos descreveram a atuação das proteínas SufBCD formando um complexo compacto e, por meio de um trabalho sistemático, foi estabelecido que o complexo SufBCD atua como arcabouço para a montagem de cofatores [Fe-S]. SufB e SufD possuem homologia de sequência na região C-terminal, e é justamente essa a região envolvida na complexação com SufC, permitindo a formação do complexo SufBC<sub>2</sub>D. (Loiseau *et al.* 2003, Outten *et al.* 2003). Além do complexo SufBCD, foram também descobertos os complexos SufBC e SufCD, que podem existir nas formas: 2B-2C ou 2C-2D (Petrovic *et al.* 2008, Wada *et al.* 2009). A proteína SufC contém um motivo ATPase, e SufB pode acelerar a quebra de ATP em SufC (Rangachari *et al.* 2002). Análises de sequência mostram que SufB contém um motivo de ligação a cofator [Fe-S] do tipo C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>3</sub>-C, porém esse não é altamente conservado

(Ayala-Castro *et al.* 2008). Em *E. coli*, SufB possui 13 resíduos de cisteína na porção N-terminal, recebe sulfeto do complexo SufSE e ainda coordena um cofator do tipo  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ . Este cofator é transitente, caracterizando o complexo como uma proteína arcabouço alternativa. O complexo SufBCD contém quatro cisteínas altamente conservadas e seis parcialmente conservadas (Outten *et al.* 2003).

SufE, é a proteína que recebe o S de SufS, e interage com SufB para a transferência do S, e essa interação ocorre somente se SufC estiver presente. Utilizando a combinação de técnicas de interação proteína-proteínas e montagem de cofatores  $[\text{Fe-S}]$  *in vitro*, os papéis do complexo SufBCD e da proteína SufA durante a biossíntese de cofatores  $[\text{Fe-S}]$  foi caracterizado. Esses estudos permitiram revelar que SufA interage com o complexo SufBCD para receber o cofator formado *de novo* em SufBCD. Neste contexto, deve ser observado o fato de algumas bactérias e archaea apresentarem complexos homólogos a SufBCD ou SufBC, mas não proteínas arcabouço IscA/SufA ou IscU/SufU (Outten *et al.* 2004).

Embora o sistema SUF não apresente uma Fdx, foi relatada a presença de uma molécula de  $\text{FADH}_2$  ligada ao complexo SufBC<sub>2</sub>D, provavelmente envolvida na redução do cofator (Wollers *et al.* 2010). No sistema Suf presente em bactérias gram – a proteína SufU está ausente, por sua vez em bactérias gram + a presença de SufU foi observada. (Figura 9). Neste microorganismo a proteína SufU funciona como a proteína arcabouço do cofator  $[\text{Fe-S}]$ , pois em SufB apenas uma das 13 Cys presentes em *E. coli* é conservada (Riboldi *et al.* 2011).



**Figura 9:** Representação gráfica da organização gênica do operon *suf* em *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

### 1.2.3.2 SufS e SufE

SufS é uma cisteína desulfurase do tipo II, diferentemente de NifS e IscS, e sua atividade pode ser drasticamente incrementada pela presença de SufE (até 50 vezes). SufE é um homodímero que se liga fortemente a SufS, formando um complexo e recebendo S de SufS (Loiseau *et al.* 2003, Ollagnier-de-Choudens *et al.* 2003). A proteína SufS de *E. coli* corresponde a um homodímero, dependente de PLP, cujo sítio ativo apresenta um resíduo essencial, a Cys<sup>364</sup>. O sítio ativo de SufS possui um resíduo de cisteína (Cys<sup>51</sup>) orientado para o interior da proteína, o que não é observado em IscS, pois essa apresenta um *loop* acessível ao solvente. Essa diversidade estrutural pode estar envolvida na diferença de atividade entre as duas proteínas, já que SufS, sem ativador, apresenta uma atividade 20 vezes maior (Fuji *et al.* 2000).

### 1.3 Sistemas de Formação de Cofatores [Fe-S] em Plantas

Com a publicação dos primeiros genomas de plantas modelo e algas, ficou claro que diversas rotas de montagem de cofatores [Fe-S] estavam presentes. A maior parte dos genes de *Arabidopsis thaliana* foi caracterizada, revelando que plastídeos, mitocôndrias e citosol têm separadamente, mas não totalmente independentes, maquinarias de montagem de cofatores [Fe-S]. A distribuição espacial dos componentes de montagem reflete a história endossimbiótica das células vegetais (Balk and Lobréaux 2005). Grande parte destas proteínas é essencial para o desenvolvimento embrionário. Aproximadamente 100 classes de proteínas vegetais contêm cofatores [Fe-S] na sua estrutura, e infere-se que 2% do conteúdo de S encontrado nestes organismos seja proveniente dos cofatores [Fe-S], reforçando a importância destes para a manutenção da vida (Kessler and Papenbrock 2005). Em plantas são encontradas as seguintes maquinarias, SUF e ISC, que serão descritas nas próximas sessões.

### 1.3.1 SUF, a maquinaria plastidial

#### 1.3.1.1 O complexo SufBCD

Assim como em bactérias, as proteínas SufB, SufC e SufD formam um complexo funcional em plantas como proteínas arcabouço. Porém, nestes eucariotos, essas proteínas estão localizadas nos cloroplasto, devido a endossimbiose. As proteínas de *A. thaliana* SufB (AtNAP1), SufC (AtNAP7) e SufD (AtNAP6) têm localização celular confirmada em cloroplastos (Xu *et al.* 2005). As três proteínas são membros da superfamília de transportadores ABC de *A. thaliana* AtSufB ou AtSufC podem complementar mutantes *sufB* ou *sufC* de *E. coli*, indicando que esse complexo de ATPase está envolvido na biossíntese de cofatores [Fe-S] em *A. thaliana* (Xu and Moller 2004, Xu *et al.* 2005). ATP e NADPH são essenciais para a formação de cofatores [Fe-S], como já foi demonstrado na Fdx de espinafre (Takahashi *et al.* 2001). Entretanto, não existem evidências diretas demonstrando que elas são responsáveis pelo metabolismo Fe-S.

Geralmente, os genes semelhantes a *sufB*, *sufC* e *sufD* estão representados nos genomas vegetais por uma única cópia. Entretanto, duas cópias de *sufB* (At4g04770 e At5g44316) estão presentes em *A. thaliana*. Porém o RNA mensageiro de At5g44316 não foi detectado, indicando que este pode ser um pseudogene (Xu and Moller 2011).

#### 1.3.1.2 SufS-SufE

O genoma de *A. thaliana* codifica duas cisteínas desulfurases, uma mitocondrial, AtIscS (NFS1), e outra plastídica AtSufS (AtNFS2). As linhagens de plantas em que a expressão do gene AtNFS2 foi significativamente reduzida apresentaram cotilédones severamente cloróticos e as plantas morreram ainda no estágio de plântula. Em plantas com silenciamento induzido do gene AtNFS2, foi observado clorose, estrutura cloroplastídica desorganizada e atraso no crescimento, tratando-se de plantas eventualmente necróticas, morrendo antes de gerarem sementes. As linhagens silenciadas apresentaram redução da disponibilidade de todas as

proteínas Fe-S cloroplastídicas testadas. Estes resultados indicaram que a proteína AtNFS2 é necessária para a maturação de todas as proteínas Fe-S do cloroplasto (Xu and Moller 2011).

A proteína AtSufE1 possui um domínio semelhante a SufE (SufE-like) e outro semelhante a BolA (BolA-like), e esta estrutura é conservada em arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e álamo (*Populus trichocarpa*). Porém, tal estrutura não é encontrada em bactérias como *E. coli*, por exemplo, e em cianobactérias como *Synechocystis* ou *Chlamydomonas reinhardtii*. A razão pela qual os domínios SufE e BolA fundiram-se formando AtSufE1 em *A. thaliana* ainda não é clara. Entretanto, proteínas do tipo BolA são frequentemente encontradas adjacente a glutaredoxinas (Grxs) em diversos organismos procarióticos. A Grx é outro componente para a montagem de cofatores [Fe-S]. É discutida a possibilidade da interação Grx-BolA ser necessária para o controle do *status* de Fe em organismos em que estas duas proteínas estão presentes (Rouhier *et al.* 2010).

Além de SufE1, o genoma de *A. thaliana* codifica duas outras proteínas plastidiais com domínio SufE, SufE2 e SufE3. A proteína recombinante SufE2 purificada de *E. coli*, pode aumentar a atividade de cisteína desulfurase de AtNFS2 em até 40 vezes. A expressão de AtSufE2 em *A. thaliana* é flor-específica, com alta concentração em grãos de pólen. AtSufE3 contém dois domínios semelhantes a SufE (SufE-like), um similar ao bacteriano SufE e outro similar ao domínio de quinolinato sintase, NadA. O gene AtSufE3 é expresso em baixos níveis em todas as partes da planta (Murthy *et al.* 2007). Da mesma forma que SufE1, SufE3 é encontrada somente em vegetais superiores, entretanto estruturas semelhantes a NadA (NadA-like) são extremamente conservadas de bactérias a plantas superiores.

As plantas possuem três ativadores de mobilização de S por CpNifS (=AtNFS2, Cp é referente à localização cloroplastídica) e se espera que alguns desses possam se complementar mutuamente. Ainda assim, o fenótipo embrio-letal de mutantes de *A. thaliana knockouts* para *sufE1* e *sufE3* indica que eles não podem se complementar. O gene *sufE1* não pode complementar *sufE3* porque não tem atividade de quinolinato sintase. O gene *sufE2* não pode complementar a perda de *sufE1* nos tecidos vegetais porque é somente expresso no pólen (Murthy *et al.* 2007).

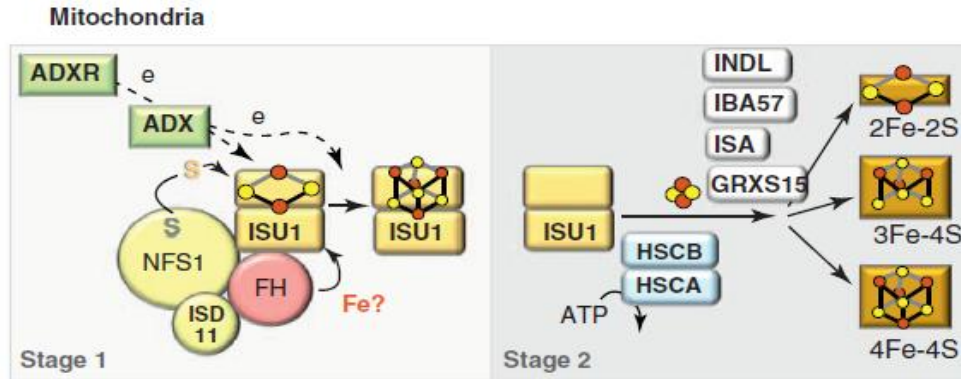


### 1.3.2 ISC, a maquinaria mitocondrial

Nas mitocôndrias vegetais, a maquinaria responsável pela montagem de cofatores [Fe-S] é a maquinaria ISC. As principais proteínas desta rota são uma cisteína desulfurase (NifS/NFS1) do tipo 1, e uma proteína arcabouço com um único domínio (IscU/ISU).

No primeiro passo para a montagem do cofator, o persulfeto é entregue à proteína ISU pela cisteína desulfurase NFS1. A proteína NFS1 de *A. thaliana* foi expressa em *E. coli*, fusionada à tioredoxina (TRX) e, desta forma, foi capaz de catalisar a liberação de 12 nmol sulfeto/min/mg. A proteína NFS1-TRX recombinante também foi capaz de mediar a montagem do cofator [2Fe-2S] na proteína arcabouço AtISU1 (Frazzon *et al.* 2007). NFS1 também interage com uma pequena proteína de aproximadamente 14 kDa, a Isd11/ISD11, que é necessária para a estabilidade da cisteína desulfurase (Adam *et al.* 2006). ISD11 é altamente conservada em todos os eucariotos, e um gene de cópia única é encontrado no genoma de *A. thaliana* (Richards and van der Giezen 2006). Estudos combinando experimentos de fluorescência biomolecular e duplo-híbrido em leveduras permitiram demonstrar que NFS1 também interage com SUFE1. Apesar da maior parte desta proteína (SUFE1) estar localizada em plastídeos, quando superexpressa na forma de uma proteína de fusão com a proteína de fluorescência amarela otimizada (EYFP, do inglês *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), a proteína também foi observada nas mitocôndrias (Xu and Moller 2006).

O segundo estágio para a montagem do cofator nas mitocôndrias vegetais envolve a transferência do cofator [Fe-S] de ISU1 e a inserção em uma apo-proteína alvo (Figura 10). Em leveduras e bactérias, essa transferência é mediada por uma chaperona Hsp70 (DNA-J-like ou Proteína tipo J). Por outro lado, em alguns fungos e células humanas, não foi descrito até o momento uma Hsp70 especializada e a proteína envolvida na importação e dobramento de outras proteínas trabalha em parceria com uma proteína tipo J para a montagem de cofatores [Fe-S] (Busi *et al.* 2006). Ensaios de fluorescência biomolecular e duplo-híbrido de leveduras permitiram mostrar que a proteína J de *A. thaliana*, denominada HSCB, interage com a proteína arcabouço AtISU1. O gene codificador de HSCB de *A. thaliana* também complementa leveduras mutantes  $\Delta jac1$ , deficientes na proteína J (Xu *et al.* 2009).



**Figura 10: Modelo de montagem de cofatores [Fe-S] na mitocôndria de plantas-** Estágio 1: mobilização de S e montagem do cofator [Fe-S] na proteína arcabouço; estágio 2: transferência do cofator [Fe-S] da proteína arcabouço para uma apo-proteína alvo (Balk and Pilon 2011).

Em *A. thaliana*, a família gênica ISU, AtISU1-3, codifica peptídeos muito semelhantes com seus homólogos em bactérias e outros eucariotos. Utilizando a técnica de fusão de IscU à proteína de fluorescência verde (GFP, do inglês, *Green Fluorescent Protein*), o gene de fusão foi expresso em protoplastos foliares e ensaios de imunodeteção foram realizados com extratos organelares, mostrando que ISU é uma proteína mitocondrial, reforçando a teoria de que outra maquinaria de montagem de cofatores [Fe-S], independente de ISU existe nos plastídeos (Leon *et al.* 2002). Analisando o genoma de arroz (*Oryza sativa*) dois genes IscU foram identificados. A expressão do gene OsIscU1 em células epidermais de cebola ocasionou a localização da proteína na mitocôndria. Análises de *northern blotting* permitiram demonstrar que o gene OsIscU1 é reprimido em raízes de arroz sob deficiência de Fe (Tsugama *et al.* 2009).

O fenótipo das plantas na qual os genes AtIscU1, AtIscU2, AtIscU3; ou AtIscS foram silenciados por interferência de RNA (RNAi), indicou que AtIscS e as três proteínas IscU são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento normal das plantas. Este fato não é surpreendente, visto que a maquinaria mitocondrial de montagem de cofatores [Fe-S] é necessária para a biossíntese de componentes da cadeia respiratória e compostos essenciais como, por exemplo, biotina, lipoato e Moco (Frazzon *et al.* 2007).

A proteína AtSufE1 também possui localização mitocondrial; ela interage com AtIscS para aumentar a atividade da cisteína desulfurase. O mutante *AtsufE1* de *A. thaliana* é

embrionário letal, e não é complementado pela produção da proteína contendo peptídeo sinal para plastídeo ou mitocôndria. Isso demonstra que o reestabelecimento organela específico de AtSufE1 não é suficiente, a ponto de permitir o progresso do embrião. Isso também revela que a mobilização de S mediada por AtSufE1 é crucial nas duas organelas. Por este motivo, AtSufE1 deve ser considerado um componente importante da maquinaria ISC de *A. thaliana* (Xu and Moller 2006).

Nas próximas sessões serão abordados os organismos escolhidos para realização deste trabalho. *Eucalyptus* foi o gênero selecionado para o estudo envolvendo as proteínas montadoras de cofatores [Fe-S] em vegetais, devido a sua importância econômica e ser objeto de estudo no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal (LBMV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O resfriamento também é introduzido, pois é um dos estresses abióticos que limitam a produtividade e distribuição geográfica de *Eucalyptus*. Este estresse foi o selecionado para as análises de transcrição gênica realizadas neste trabalho.

No capítulo II, são abordadas as proteínas bacterianas, e o organismo modelo empregado foi *A. vinelandii*, pois é uma bactéria de fácil manipulação genética e utilizado no Laboratório de Metaloenzimas da Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia Tech, Estados Unidos da América.

## **2. EUCALYPTUS GRANDIS**

### **2.1 O gênero *Eucalyptus* e *Eucalyptus grandis***

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e é composto por mais de 700 espécies. A última classificação taxonômica de *Eucalyptus* inclui *Corymbia* e *Angophora* como subgêneros de *Eucalyptus*, porém alguns taxonomistas ainda reconhecem esses como gêneros (Brooker 2000). O gênero *Eucalyptus* é originário da Austrália, composto por espécies de clima temperado e subtropical, mas de fácil adaptação a outras condições climáticas. O nome eucalipto deriva do grego: *eu* (bem) e *kalipto* (cobrir), referindo-se à estrutura globular arredondada de seu

fruto, caracterizando o opérculo que protege bem as suas sementes. A diversidade de espécies decorre, entre outros, ao hábito alógamo, da resposta à pressão de seleção causada pelas alterações do ambiente e do próprio processo de deriva e especiação.

A madeira de eucaliptos possui fibras delgadas, curtas, rígidas e de granulação reduzida. O número de fibras por grama é alto e as microfibrilas apresentam uma pequena angulação em torno do eixo da fibra. Todas essas características proporcionam uma estrutura adequada para a produção de papel de alta qualidade e alta opacidade, o que é de grande interesse comercial. Os eucaliptos são conhecidos por rápida taxa de crescimento, forma reta, capacidade de crescer em diversos climas e solos, e boa qualidade de madeira tanto para produtos sólidos como produção de celulose. Variações genéticas inter e intra-específicas são responsáveis pela diversidade fenotípica e a ampla adaptabilidade fez com que árvores do gênero *Eucalyptus* sejam plantadas em todo o mundo (Eldridge *et al.* 1994). O eucalipto é plantado na maioria das regiões de clima tropical e subtropical do mundo, entre as latitudes 40°N e 45°S (Gonzáles 2002). A maioria das espécies do gênero *Eucalyptus* são árvores típicas de floresta altas, atingindo alturas que variam entre 30 e 50 metros (Hall *et al.* 1970). Algumas espécies podem atingir excepcionalmente 100 metros de altura, sendo consideradas as árvores florestais latifoliadas mais altas do mundo.

O plantio comercial de *Eucalyptus* constitui uma das melhores alternativas para atender às diversas demandas da sociedade no que diz respeito ao consumo de produtos de base florestal, tanto para a produção de papel, celulose e derivados, como na área de siderurgia. Por outro lado, este consumo vem atrelado às exigências de sustentabilidade da produção de biomassa florestal (Santos 2005). Devido à característica de rápido crescimento e à qualidade de suas fibras, o *Eucalyptus* é a árvore mais comumente plantada no mundo, mais especificamente, para a fabricação de papel. Porém, apesar de amplamente distribuída, sua extensão é restrita a algumas áreas por apresentar sensibilidade ao congelamento (Kayal *et al.* 2006).

No Brasil, as espécies de *Eucalyptus* mais utilizadas na silvicultura são o *Eucalyptus grandis* (55%), *Eucalyptus saligna* (17%), *Eucalyptus urophylla* (9%), *Eucalyptus viminalis* (2%), híbridos de *E. grandis* e *E. urophylla* (11%) e outras espécies (6%; Silva 2005). A espécie *E. grandis* Hill ex-Maiden, pertence ao subgênero *Symphyomyrtus*, ocorre naturalmente na Austrália, entre as latitudes 25 e 33° S, e nas regiões central (latitude de 21°S) e norte (latitude 16 a 19°S) de Queensland, em altitudes desde o nível do mar até 600 metros, podendo chegar a

1.100 metros na região norte de Queensland. A temperatura máxima média nessas regiões varia de 24 a 30° C e a mínima média varia entre 3 e 8° C. É uma espécie que apresenta porte alto, atingindo de 45 a 55 metros de altura, podendo alcançar até 75 metros (Morais 1988). *E. grandis* é uma das espécies mais plantadas no mundo, considerada uma das espécies mais versáteis e indicadas para uso múltiplo. A madeira de *E. grandis* é leve e fácil de ser trabalhada, sendo utilizada intensivamente na Austrália e na África do Sul como madeira de construção, quando oriunda de plantações de ciclo longo. A madeira produzida em ciclos curtos é utilizada para a fabricação de caixas. Plantações convenientemente manejadas podem produzir madeira de excelente qualidade para serraria e laminação (Santos 2005). A madeira de *E. grandis* também é considerada de baixa estabilidade, mas de elevada permeabilidade. Esta espécie apresenta um bom desenvolvimento em regiões de clima tropical e subtropical, além de conter um ótimo teor de celulose (em torno de 48%) e possuir um bom crescimento volumétrico. É a principal fonte de matéria-prima para a produção de pasta de celulose e papel no Estado de São Paulo (Santos 2005). A maior restrição encontrada pelas indústrias está nos elevados índices de ligninas em sua madeira, sendo estes de cerca de 24% de lignina total (Colodette *et al.* 2004).

*E. grandis* é uma espécie suscetível ao cancro do eucalipto, causado pelo fungo *Cryphonectria cubensis* (Ferreira 1997). Entretanto, em virtude de suas características silviculturais e a qualidade de sua madeira, é a espécie mais explorada no Brasil para a geração de híbridos de alta produtividade. No Brasil, seu cultivo em escala econômica deu-se a partir de 1904, com o trabalho do agrônomo silvicultor Edmundo Navarro de Andrade, para atender à demanda da Companhia Paulista de Estradas de Ferro. Os programas de melhoramento genético começaram a surgir na década de 1970, com o objetivo de encontrar espécies mais adaptadas às condições ambientais e propiciar o aumento do conjunto genético e da qualidade das plantas (Brune and Zobel 1981).

Atualmente, o Brasil situa-se entre os 10 maiores países em áreas de florestas plantadas no mundo, contando com 6,4 milhões de hectares. Destes, cerca de 4,8 milhões estão florestados com espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*. Esses plantios estarão concentrados nos Estados de São Paulo, Bahia, Espírito Santo, Amapá, Minas Gerais, Pará, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (Revista da Madeira, número 125). As florestas plantadas no Brasil crescem em ritmo acelerado. As áreas cobertas com *Pinus* e *Eucalyptus* passaram dos

1.769.000 hectares em 1990 para 1.923.000 em 2010, e dos 2.964.000 para 4.913.800 hectares no mesmo período, respectivamente.

## **2.2 O Genoma de *Eucalyptus***

Para um futuro energético sustentável é necessário o entendimento das bases moleculares do crescimento e adaptação das plantas lenhosas para a produção adequada de biomassa. O gênero *Eucalyptus* está na lista do Departamento de Energia dos Estados Unidos como cultura produtora de energia, como por exemplo, para a síntese de biocombustíveis. O sequenciamento de genomas é essencial para a compreensão da base das propriedades e para a extensão destes atributos a outras espécies. A genômica também permite a adaptação de eucaliptos para a produção de energia verde em regiões que atualmente não podem ser cultivadas, como por exemplo, o sudeste dos Estados Unidos (JGI-Joint Genome Institute).

### **2.2.1 Dados obtidos no sequenciamento do genoma**

A cobertura do sequenciamento foi de 8 vezes e o genoma de *E. grandis* é composto por aproximadamente 691 Mb agrupados em 4952 *scaffolds*. Aproximadamente 641 Mb estão arranjados em 32.762 sequências contíguas (~ 7.3% de *gaps*). Mais de 300 scaffolds são maiores que 50 kb, representando 94.2% do genoma. Foram identificados 44.974 *loci* contendo transcritos codificadores de proteínas. Destes, 41.204 estão mapeados nos 11 principais grupos de ligação ou conjuntos de cromossomos (92%). Quanto à análise de transcritos, 9.961 transcritos apresentaram formas de *splicing* alternativo. Destes 9.763 estão mapeados nos 11 principais grupos de ligação/ conjuntos de cromossomos (98%). Todos estes dados obtidos pelo JGI (*Joint Genome Institute*) estão depositados no sítio do Phytozome (<http://www.phytozome.net/eucalyptus.php>). O Phytozome é um projeto conjunto do Departamento de Energia dos Estados Unidos (Joint Genome Institute e do Center for Integrative Genomics) para facilitar estudos genômicos comparativos entre espécies vegetais. Em 2011 foi lançada no Phytozome v. 7.0 a primeira montagem do genoma de *E. grandis* BRASUZ1 e a anotação preliminar.

### 3. O FRIO COMO ESTRESSE ABIÓTICO ÀS PLANTAS

O estresse causado pelo frio é fator ambiental que mais limita a produtividade agrícola. Baixas temperaturas têm um enorme impacto sobre a sobrevivência e a distribuição geográfica das plantas, e estas diferem em sua tolerância frente a temperaturas de resfriamento (0-15 °C) e congelamento (<0 °C). Diversas alterações fisiológicas e moleculares ocorrem durante a aclimatação ao frio. Entre elas, a transcrição, a ativação e a repressão de genes por baixas temperaturassão de importância central. A reprogramação da expressão gênica resulta na acumulação não só de proteínas protetoras, mas também de metabólitos, alguns dos quais tem efeito protetor (Thomashow 1999). O frio induz alterações nos componentes celulares, incluindo variações sobre taxas de ácidos graxos insaturados (Cossins 1994), composição de glicerol-lipídeos (Lynch and Thompson 1982), mudanças na composição de proteínas e carboidratos e ativação de canais de íons (Knight *et al.* 1996).

As temperaturas de resfriamento caracterizadas como estresse são aquelas demasiadamente baixas para o crescimento vegetal normal, mas não suficientes para a formação de gelo. Como consequência direta do resfriamento pode ocorrer danos que se caracterizam principalmente pela descoloração ou lesões nas folhas. Com o resfriamento de raízes, a planta reduz sua capacidade de captação de água e pode murchar (Taiz & Zeiger, 2004).

As baixas temperaturas afetam a absorção de água e nutrientes, bem como a fluidez da membrana, influenciando drasticamente o metabolismo celular, reduzindo as taxas de reações bioquímicas. As membranas das células vegetais são constituídas de uma bicamada lipídica entremeada com proteínas e esteróis. As propriedades físicas dos lipídeos têm grande influência sobre as atividades das proteínas integrais de membrana como, por exemplo, H<sup>+</sup>-ATPase, transportadores e proteínas formadoras de canais que regulam o transporte de íons e outros solutos, assim como o transporte de enzimas das quais depende o metabolismo. As membranas celulares são estruturas fluidas. Baixas temperaturas podem reduzir a sua fluidez, causando um aumento na rigidez. É também por meio de mudanças na fluidez da membrana, conformação de proteínas e ácidos nucleicos e/ou concentração de metabólitos (algum metabólico específico, ou o *status* redox) que células vegetais percebem o estresse causado pela baixa temperatura (Orvar *et al.* 2000). Resumidamente, a sensibilidade das células vegetais ao resfriamento tem sido

atribuída à transição de fases das membranas lipídicas (Wu *et al.* 1997), ao bloqueio das funções de tradução, à modificação nos plastídeos (Tokuhisa *et al.* 1998) e ao desbalanço metabólico (Levitt 1980).

Algumas proteínas são sintetizadas em plantas em resposta ao frio, bem como à desidratação. Como exemplo, podemos citar as proteínas de choque térmico (do inglês, *heat shock proteins* ou HSPs). Elas atuam como chaperonas protegendo as proteínas associadas durante os processos de desidratação e reidratação, mantendo suas estruturas terciárias e minimizando a agregação e degradação das proteínas (Feder and Hofmann 1999). Estudos com o gene *hsp70* de espinafre mostraram que esta proteína contribui significativamente para a tolerância ao congelamento por meio da estabilização de proteínas e contra a desnaturação induzida pelo frio (Anderson *et al.* 1994). A inserção de cofatores [Fe-S] em apoproteínas, como visto anteriormente, requer a interação entre uma proteína arcabouço, na qual o cofator é montado e uma sistema de chaperonas, usualmente formado por uma chaperona altamente especializada como a Hsp70 e sua co-chaperona J (Craig and Marszalek 2002).

Além de regulação da transcrição, a expressão gênica é regulada pos-transcricionalmente com o pre-processamento do mRNA, estabilidade do mRNA, a exportação do núcleo e de passos da tradução. Estudos revelaram que a regulação pos-transcricional desempenha um papel crítico durante a aclimatação ao frio (Chinnusamy *et al.* 2007). O *splicing* do pré-mRNA é um processo nuclear crucial para a síntese de mRNAs funcionais de genes que contém íntrons, e este processo é acoplado com a exportação nuclear dos mRNAs. Além disto, o *splicing* alternativo em resposta ao desenvolvimento e estímulos ambientais permite que as células sintetizem diferentes proteínas a partir de um único gene. Em trigo, foi demonstrado que dois genes *COR* podem reter íntrons em seus mRNAs maduros sob estresse pelo frio (Mastrangelo *et al.* 2005).

A família de RNA helicases DEAD-box está envolvida no metabolismo de RNA como, por exemplo, na transcrição, processamento, decaimento de RNA e transporte núcleo-citoplasma (Cole and Scarcelli 2006). O papel de uma helicase DEAD-box (LOS4) na exportação de mRNA e resposta a estresses abióticos em plantas, foi descrito a partir da análise de mutantes *los4* (do inglês, *low expression of osmotically responsive genes 4*) de *A. thaliana*, sensíveis ao resfriamento (Gong *et al.* 2002). O genoma de ervilha codifica duas helicases, PDH45 e PDH47, que são superexpressas sob diversos estresses abióticos, incluindo frio e ácido abscísico (ABA;



Vashisht *et al.* 2005). Estas observações sugerem que as RNA helicases DEAD-box são críticas para a exportação de mRNA e /ou outras funções importantes para a tolerância ao frio e outros estresses abióticos. Muito comumente presentes em enzimas envolvidas na síntese de ácido nucléicos, os cofatores [Fe-S] são componentes essenciais em diversas maquinarias de processamento de DNA em praticamente todos os aspectos do metabolismo de ácidos nucléicos, incluindo a replicação do DNA, reparo, recombinação e transcrição bem como na modificação e regulação da transcrição e tradução do RNA. Os cofatores [Fe-S] não espontaneamente associados à proteína-alvo, mas são inseridos por meio de vias biossintéticas (já descritas anteriormente), envolvendo proteínas transportadoras de cofatores [Fe-S] e compartimentos especializados, incluindo as mitocôndrias (Lill and Muhlenhoff 2006, Bandyopadhyay *et al.* 2008). Um aumento na expressão relativa dos genes NFS1 e ISD11 foi observado quando *Glycine max* foi exposta ao tratamento de frio. Esse aumento foi acompanhado da maior atividade das proteínas citosólicas dependentes de cofatores [Fe-S], aldeído oxidase (AO) e xantina desidrogenase (XD), denotando a relação direta entre a resposta ao frio e o aumento na expressão dos genes codificadores de proteínas envolvidas na biossíntese de cofatores [Fe-S] (Heis *et al.* 2011).

#### **4. AZOTOBACTER VINELANDII**

A família Pseudomonadaceae compreende o gênero *Azotobacter*, constituído por eubactérias Gram-negativas pertencentes ao grupo das  $\gamma$ -proteobactérias, as quais possuem um complexo de parede celular que consiste de uma membrana externa e uma camada interna peptidoglicano contendo ácido murâmico e mureína. Estas bactérias multiplicam-se por fissão binária, vivem no solo e em águas doces, e as células são grandes e ovóides com diâmetros de 1,5 a 2,0 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ; García *et al.* 2002).

As bactérias do gênero *Azotobacter* são quimio-organotróficas, usam açúcares, álcoois e sais inorgânicos para se multiplicar. Quando em vida livre, utilizam uma média de 10 mg de nitrogênio por grama de carboidrato (glicose) consumido e esta atividade exige de molibdênio

(Mo), que pode ser parcialmente substituído por vanádio (Va). O pH ótimo para o crescimento quando fixam nitrogênio é de 7,0-7,5. (Allman *et al.* 1990).

*A. vinelandii* é um microrganismo de vida livre, fixador de nitrogênio e pode ser encontrada em solos do mundo todo, possuindo características de metabolismo energético de nitrogênio relevante para a agricultura. *A. vinelandii* foi utilizado durante muito tempo como um modelo para estudos bioquímicos e genéticos da fixação biológica de nitrogênio, a conversão de nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>) em amônia (NH<sub>3</sub>) pela enzima nitrogenase. É capaz de adaptar seu metabolismo para diversas fontes de nutrientes além de carbono. Na falta deste, sofrerá um processo de diferenciação para formar cistos composto de alginato, o que lhe dá resistência à dessecação e a outros estresses químicos e físicos (Sadoff 1975). *A. vinelandii* foi citada como uma das bactérias conhecidas com maior taxa respiratória. O crescimento diazotrófico em condições aeróbias é possível, porque *A. vinelandii* pode ajustar as taxas de consumo de oxigênio (proteção respiratória) mantendo baixo o nível de oxigênio no citoplasma.

#### **4.1 O Genoma de *Azotobacter vinelandii***

Dentro da família Pseudomonadaceae dois dos principais gêneros, *Pseudomonas* e *Azotobacter*, tiveram seus genomas sequenciados. A sequência do genoma de *A. vinelandii* foi publicada em julho de 2009 por Setúbal e colaboradores. O cromossoma de *A. vinelandii* possui 5.365.318 pb, dos quais 86.4% (4.635.830 pb) é codificador de RNA. Trata-se de um genoma rico em GC (65.68%), e possui 5051 genes codificadores de proteínas. Apresenta 85 genes relacionados a RNA, sendo assim distribuídos: 18 para RNA ribossomal (rRNA) e 64 para RNA transportador (tRNA). Dentre os codificantes de rRNA, 6 para 5S rRNA, 6 para 16S rRNA e 6 para 23S rRNA. Dos genes codificadores de proteínas, 3547 (69.1%) possuem função predita e 1504 (29.30%) possuem função desconhecida. Os genes sem função predita, 1202 (23.42%) apresentam similaridade com genes de outras espécies, e 302 (5.88%) não apresentam qualquer similaridade (Setubal *et al.* 2009).

A partir de análises filogenéticas, foi verificado que na família Pseudomonadaceae, a espécie mais próxima geneticamente a *A. vinelandii* é *Pseudomonas stutzeri* A1501. A

comparação destes dois genomas permitiu mostrar que as duas espécies possuem complexos respiratórios similares e que a regulação destas maquinarias, especialmente no nível transcricional, é muito importante para o ajuste das taxas de consumo de oxigênio com o intuito de proteger processos sensíveis ao oxigênio (Setubal *et al.* 2009).

A fim de conciliar um estilo de vida aeróbico obrigatório com processos sensíveis ao oxigênio, *A. vinelandii* possui proteínas respiratórias especializadas. A análise do genoma reforçou a concepção de que esta bactéria possui um metabolismo aeróbio estrito, pois não foram encontrados genes que codificam proteínas de sistemas completos envolvidos na respiração anaeróbica (Setúbal *et al.* 2009).

## OBJETIVOS

### CAPÍTULO I

#### **Geral:**

Realizar uma análise transcricional dos genes *NFS1*, *ISAI* e *ISUI* de *E. grandis* após diferentes estímulos por meio de PCR quantitativa precedidos de transcrição reversa (RT-qPCR) e hibridizações de microarranjos de DNA, relacionando os níveis de expressão com o metabolismo de Fe e S.

#### **Específicos:**

- (i) Identificar os genes *NFS1*, *ISAI* e *ISUI* no genoma de *E. grandis*;
- (ii) Verificar a resposta transcricional dos genes quando plântulas de *E. grandis* são submetidas ao estresse por frio;
- (iii) Quantificar Fe e S nas amostras controle e tratada;
- (iv) Relacionar o padrão de expressão dos genes *NFS1*, *ISAI* e *ISUI* com a quantidade de Fe e S e a formação de cofatores [Fe-S] em plântulas de *E. grandis*.

## CAPÍTULO II

### **Geral:**

Verificar a expressão global e dos genes do operon ISC em linhagens controle e mutantes de *A. vinelandii* para as cisteínas da enzima IscR putativamente envolvidas na ligação do cofator [Fe-S] e determinar o papel das formas apo e holo desta proteína.

### **Específicos:**

- (i) Identificar os ligantes do cofator [Fe-S] na proteína IscR de *A. vinelandii*;
- (ii) Sequenciar transcritos de linhagens selvagens e mutantes *iscR* de *A. vinelandii*, e analisar o transcrito das mesmas;
- (iii) Descrever um possível mecanismo de regulação exercido por IscR em *A. vinelandii*.

## CAPÍTULO I

**Manuscrito de artigo a ser submetido ao periódico Applied Biochemistry and Biotechnology**

**Transcriptional analysis of the *Eucalyptus grandis* NFS1, ISUI and ISAI genes under chilling stress**

Authors:

Luisa Abruzzi de Oliveira<sup>1</sup>, Marta Dalpian Heis<sup>1</sup>, Ana Paula Frazzon<sup>2</sup>, Rogério Margis<sup>2</sup>,  
Giancarlo Pasquali<sup>2</sup> and Jeverson Frazzon<sup>3§</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Center (CBiot), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Food Sciences (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

**§Corresponding author**

Address: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ICTA, Avenida Bento Gonçalves, 9.500, Prédio 42.212, CEP 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone number: +55-51-3308-7115

Fax number: +55-51-3308-7048

E-mail address: jeverson.frazzon@ufrgs.br

## Abstract

Iron-sulfur [Fe-S] clusters are prosthetic groups required to maintain life processes including respiration, photosynthesis, metabolic reactions, signaling and gene regulation. Many environmental factors that affect plant development and consequently limit productivity are regulated by Fe-S proteins. *Eucalyptus grandis* (and its hybrids) is the most planted tropical tree for cellulose pulp and paper production which, under low temperatures, has its growth and productivity severely reduced. Here we describe a transcriptional analysis of the *E. grandis* *NFS1*, *ISU1* and *ISAI* genes involved in the biogenesis of [Fe-S] clusters. Microarray hybridization analyses were carried out and leaves from *E. grandis* demonstrated higher expression of these genes than vascular, xylem tissues. The response of these genes to chilling stress on *E. grandis* seedlings was evaluated by RT-qPCR. In the first 16 hours of treatment, the *NFS1* gene was temporarily repressed. The *ISA* and *ISU* genes exhibited peaks of transcript levels after 2 hours. These results suggest that these genes are related to cellular responses during chilling stress, in order to increase the iron and sulfur metabolism.

**Keywords:** [Fe-S] clusters; abiotic stress; *Eucalyptus grandis*, RT-qPCR; cold response.

## Introduction

Iron sulfur [Fe-S] clusters are versatile biological modules that can be found in nearly all living organisms (Muhlenhoff and Lill 2000). They are prosthetic groups required to maintain fundamental life processes, where they are involved in numerous enzymatic reactions including electron transfer during photosynthesis, respiration and nitrogen fixation, metabolic reactions of the Calvin and Krebs cycles, but also in sensing, signalling and regulating gene expression. Plant cells carry, through photosynthesis and respiration, two distinct processes that require significant amounts of Fe-S proteins (Balk and Lobreaux 2005). Plants are unique in the way Fe-S protein biogenesis is compartmentalized and adapted to specific needs of the eukaryotic and photosynthetic cell. The most prominent Fe-S proteins are those of complexes I, II and III of bacterial and mitochondrial respiratory chains; photosystem I and ferredoxin of photosynthesis; nitrogenase of azototrophic bacteria and aconitase of the Krebs cycle (see reviews (Balk and Lobreaux 2005; Lill and Muhlenhoff 2005, 2008)). Findings in yeast demonstrated that, mitochondria are the primary site of [Fe-S] cluster formation. Mitochondria not only produce their own set of Fe-S proteins but, most importantly, they are also required for the maturation of cytosolic Fe-S proteins (Kushnir et al. 2001). It was also reported that the downregulation of nonmitochondrial Fe-S protein biogenesis is sufficient to cause increased genomic instability in cells with intact mitochondrial function. The mitochondrial dysfunction stimulates nuclear genome instability by inhibiting the production of proteins that contain [Fe-S] clusters, which are essential for the maintenance of nuclear genome integrity (Veatch et al. 2009).



The primary function of mitochondria is cellular energy supply, but they also fulfill a variety of other metabolic tasks such as the urea cycle and the biosynthesis of heme and amino acids (Kushnir et al. 2001). Indeed, a new biosynthetic function of mitochondria has been added to this list, namely the maturation of extra-mitochondrial Fe-S proteins. As a result, the basic energy metabolic pathways and systems required for growth and development, the assimilation of nutrients, and the response to stress depend on Fe-S proteins (Frazzon et al. 2007). For the synthesis of [Fe-S] clusters, mitochondria use a complex protein toolbox which is termed “iron sulfur cluster (ISC) assembly machinery” primarily described in *Azotobacter vinelandii* (Zheng et al. 1998). The machinery of [Fe-S] cluster biogenesis is represented by at least three distinct, yet structurally and functionally related systems, designated NIF, ISC and SUF (Johnson et al. 2005). While the NIF system is required by nitrogen-fixing bacteria, the ISC system represents the housekeeping system for Fe-S protein maturation in most living cells. The SUF system is involved in sulfur mobilization, occurs in numerous bacteria, in archaea, and in plant chloroplasts, but is absent in fungi and metazoa (Loiseau et al. 2003). NFS and NifS-like enzymes are present in almost all organisms and fulfill their main functions during [Fe-S] cluster synthesis. Accordingly, they have a cysteine desulfurase activity that is required for the mobilization of sulfur from L-cysteine by the simultaneous release of L-alanine (Zheng and Dean 1994; Zheng et al. 1993). The ISC system also encodes ISU1 and ISA1 denominated as scaffold proteins and responsible for [Fe-S] cluster assembly and delivery to target proteins. IscU (ISU1) is a truncated version of NifU, containing only the N-terminal transient-cluster binding domain well known in NifU. The sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters was demonstrated to occur in the IscU scaffold protein. Both, the [2Fe-2S]<sup>2+</sup> and [4Fe-4S]<sup>2+</sup> clusters in this protein are reductively labile and degraded (Agar et al. 2000; Unciuleac et al. 2007). IscA-

type proteins provide an alternative scaffold for cluster assembly or/and are involved in Fe binding (Krebs et al. 2001). The existence of three conserved cysteine residues in all IscA proteins allowed the proposal that both cluster types are subunit bridging (Yang et al. 2006).

Plant growth and productivity is adversely affected by nature's wrath in the form of various abiotic and biotic stresses. Various anthropogenic activities have accentuated such existing stress factors. Abiotic stress in fact is the principal cause of crop failure worldwide, reducing average yields for most major crops by more than 50% (Mahajan and Tuteja 2005). The most crucial function of plant cell is to respond to stress by developing defense mechanisms. Proteins may play a role in signal transduction, anti-oxidative defense, anti-freezing, heat shock, metal binding, anti-pathogenesis or osmolyte synthesis (Qureshi et al. 2007). To overcome these limitations and improve production efficiency in the face of a burgeoning world population, more stress tolerant crops must be developed (Khush 1999). Cold, drought, and high salinity, which all cause dehydration damage to the plant cell, are the most common environmental stresses that influence plant growth and development, limiting productivity in cultivated areas worldwide (El Kayal et al. 2006). Among woody angiosperms, the most common strategy for surviving freezing is deciduousness, accompanied by winter dormancy (Cavender-Bares 2007).

Due to its fast growth and fiber quality, *Eucalyptus* is the most commonly planted hardwood in the world, in particular for paper industry. However, although widely distributed, its extension is mostly restricted to southern tropical areas because of freezing sensitivity (El Kayal et al. 2006). *Eucalyptus*, as well as many other plant species, develops increased freezing tolerance in response to low but nonfreezing temperatures. This adaptive response, known as cold acclimation, takes place on the time scale of days or weeks as a result of a combination of

physiological and metabolic changes depending on transcriptome modifications (Thomashow 1999).

Previous studies have shown that cold-acclimation involves a series of morphological and biochemical changes in leaves and other organs that increase freezing tolerance of plants adapted to temperate climates (Ball et al. 2004). The root chilling of *Eucalyptus regnans* changed the water potential gradient, indicating that root conductance was reduced by only the increased viscosity of water during chilling (Brodribb and Hill 2000). Cold-responsive genes encoding molecular chaperones including a spinach *hsp70* gene and a *Brassica napushsp90* gene (Krishna et al. 1995) may contribute to freezing tolerance by stabilizing proteins against freeze-induced denaturation. *In vivo* and *in organellar* experiments indicate that the *hsp70*, Ssq1 and the J-protein Jac1 function together to assist in the biogenesis of [Fe-S] cluster centers in the mitochondrial matrix (Dutkiewicz et al. 2003).

The aim of the present study was to determine the transcriptional regulation of the *E. grandis NFS1*, *ISU1* and *ISAI* genes under chilling stress, three key genes involved in the biogenesis of [Fe-S] clusters. Our results showed that ISC machinery genes could be related to responses to chilling stress, increasing the iron and sulfur metabolism for the assembly of [Fe-S], necessary to cell components repair.

## Material and methods

### *cDNA Library construction and sequencing*

Seeds of *E. grandis* were surface sterilized by sequentially soaking in 70% ethanol for 2 min, 1% (v/v) active chlorine solution for 15 min and five times in sterilized water. Seeds were then placed in culture flasks (5 cm in diameter, 8 cm high) containing the Murashige & Skoog (MS, Invitrogen) complete medium solidified by 0.7% (w/v) Phytoagar (Duchefa) and left to germinate in the dark for two days at 26 $\pm$ 2 °C. After germination, flasks were transferred to a culture room with a 16 h photoperiod at the same temperature. Total RNA was extracted from 60-days old *E. grandis* seedlings using Concert Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for multi RNA minipreps. Messenger RNA was extracted by the employment of the Oligotex mRNA Purification System (Qiagen). A total mRNA amount of 5  $\mu$ g was finally used for cDNA library construction by the Superscript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning Kit (Invitrogen).

Plasmid DNA preparation was carried out in 96-well microplates using standard methods based on alkaline lysis and filtration in Millipore filter plates. Plasmid samples were sequenced using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems). DNA templates (30 to 45 ng) were labeled with 3.2 pmol of primer GlyptsRev1 (5'-ATAGGGAAAGCTGGTACGC-3') or M13 -40 forward (5'-GTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3', Amersham Biosciences) and 2  $\mu$ L of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10  $\mu$ L. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

thermocycler with an initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for 10 sec, 55 °C for 5 sec and 60 °C for 4 min. Labeled samples were purified by isopropanol precipitation followed by 70% ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10 µL formamide, denatured at 95 °C for 5 min, ice-cooled for 5 min and electroinjected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using the software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems). Data generated were processed by a suite of programs available at the Universidade Católica de Brasília (<http://genoma.embrapa.br/genoma/genolyptus>) prior to assembly with the PHRED (Ewing and Green 1998; Ewing et al. 1998) and PHRAP (<http://phrap.org/>) algorithms. Accepted ESTs were selected based on a minimal length of 250 bp with every base having a quality of PHRED higher than 20.

### ***Plant material and treatment***

Culture flasks containing four *E. grandis* surface-sterilized seeds each were prepared. After germination, plants were grown *in vitro* for 4 months at 25 °C under a 16 h photoperiod. Plants of three flasks were submitted to chilling by leaving them at 4 °C for 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 and 96 h. A 24 h recovery period at 25°C was followed for 3 points (24, 48 and 96 h). Control plants were maintained at 25 °C in the incubator until harvesting. After the simultaneous overnight cultures at 25 °C, all plants were harvested and immediately frozen and stored in liquid nitrogen. Therefore, three biological samples represented by three flasks, each one containing four plants, were processed and evaluated independently for each treatment: chilling and control.

## ***Bioinformatics analysis***

Clustered DNA sequences of the *Genolyptus* Project Database, derived from expressed sequence tags (ESTs) obtained from cDNAs generated from different *Eucalyptus* tissues, organs or growth conditions, were the primary data source for this work [GenBank accession numbers from HO763666 to HO769458 and from HS047685 to HS075494. Putative *ISAI*, *ISUI* and *NFSI* cDNAs were identified by sequence homology. BLASTx and BLASTn programs available at The National Center for Biotechnology Information (NCBI) homepage were used to confirm the identity of the ESTs. Proteins from other species were extracted from the NCBI RefSeq database. The species and their respective access numbers are as follows (*NFSI* / *ISUI* / *ISAI*, respectively): *Eucalyptus grandis* (bankit1099050 / bankit1099030 / bankit1099047), *Oryza sativa japonica* (NP\_001062914 /NP\_001043783 /BAD44876), *Populus trichocarpa* (estExt\_Genewise1\_v1.C\_LG\_VII0255 /eugene3.00150565 /estExt\_Genewise1\_v1.C\_LG\_X3413), *Vitis vinifera* (CAO22685 /CAO66090 /CAO15918), *Arabidopsis thaliana* (At5g65720 /At4g22220 /At2g16710), *Mus musculus* (CAA10916 /NP\_079802 /NP\_081197), *Gallus gallus* (NP\_001026018 / XP\_417318 / -), *Ostreococcus tauri* (CAL52881 / - /CAL55019), *Physcomitrella patens* (XP\_001773635 /XP\_001785718 / -), *Pongo pygmaeus* (Q5RDE7 / - / -), *Homo sapiens* (NP\_066923 /Q9H1K1 /AAG59854), *Escherichia coli* (ACB18360 /NP\_289086 /YP\_541841), *Azotobacter vinelandii* (AAC24472 /ZP\_00418131 /ZP\_00418130), *Canis lupus familiaris* (- / XP\_534722 / -), *Picea sitchensis* (- / ABK21226 / -), *Equus caballus* (XP\_001501842 / - / -) and *Chlamydomonas reinhardtii* (- / - / XP\_001697636).

Protein sequence alignments were carried out using ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) with default parameters. Phylogenetic analysis was performed with the Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) Package Version 4.0

(Tamura et al. 2007) with the Neighbour-Joining method. All gap and missing data in the alignments were analyzed using a pairwise deletion. The molecular distances of the aligned sequences were calculated with MEGA 4.0 according to the *p*-distance parameter and complete deletion. The bootstrap test was performed with 1.000 replications. The parsimony analysis were implemented in the PAUP 4.0 software package (Swofford 1993). Maximum-parsimony trees were obtained by 100 random addition heuristic search replicates and the tree bisection-reconnection (TBR) branch-swapping option.

### ***Microarray Analysis***

Oligonucleotide microarray hybridization experiments were carried out by Roche NimbleGen and were previously described by (de Oliveira et al. 2011). In total, 21.432 unigenes were selected from the *Genolyptus* EST dataset to compose a basic chip. Ten cDNAs encoding known human proteins were also included in chips as negative controls. Nine oligonucleotides, 50 bp long, distributed throughout each sequence and with close melting temperatures were designed and synthesized for each sequence consensus or singleton. Probes were randomly distributed on two blocks of each chip in duplicated form, adding up to 385.856 features per chip. Therefore, each chip was composed of two blocks (technical replicate) containing the same collection of randomly distributed probes, and 18 hybridization values were collected for each gene from every chip. A total of ten identical chips were produced. Two chips were hybridized with cDNA samples from *E. grandis* mature leaves, four chips were destined to *E. grandis* xylem, and four chips were hybridized with cDNA samples from *E. globulus* xylem. After submission of total RNA samples to NimbleGen, prepared as described above, cDNAs were

labeled with Cy3 and hybridizations, washing, scanning, data collection and initial data normalization were performed according to NimbleGen's standard protocols. Microarray results are available at the Gene Expression Omnibus (GEO) under accessions from GSM786737 to GSM786746. Final analyses were performed using MultiExperiment Viewer (MEV; [www.tm4.org/mev](http://www.tm4.org/mev)) developed at The Institute for Genomic Research (TIGR). Data normalization was performed using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen 2000) and *t-test* was performed using SSPS15. Relative expression of the genes in *E. grandis* leaves or xylem was calibrated with the *EgrNFS1* xylem fluorescence values, and relative expression between xylems was calibrated with *E. grandis* fluorescence values.

#### ***Reverse transcription-quantitative (real-time) polymerase chain reaction (RT-qPCR)***

Total RNA was extracted with the PureLink Plant RNA Purification Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for multi RNA minipreps. About one  $\mu\text{g}$  of total RNA was used for cDNA synthesis with an oligo(dT)<sub>18</sub> primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega). PCR amplification was carried out using specific primer pairs designed with the employment of the IDT Integrated DNA Technologies Real-Time PCR Primer Design tool (<http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>). Primer sequences employed in RT-qPCRs are listed in Table 1. RT-qPCR was carried out in an Applied Biosystem 7500 Real-time Cycler. Histone H2B (Maroufi et al 2010) and ribonucleoprotein L23A (Czechowski et al. 2005) gene sequences were used as internal controls to normalize the amount of mRNA present in each sample, using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen 2001). Three internal replications per experiment were performed. ANOVA and Duncan analysis were performed using SSPS15.



### ***Ion content determination***

In order to determine mineral concentrations in the seedlings, a temperature digestion of control and treated plants was performed (Zarcinas et al. 1987). These samples were prepared in pyrex tubes with HNO<sub>3</sub> and heated up to 140 °C. Elemental analysis was carried out by Inductively Coupled Plasma (ICP) atomic absorption with the Vista MPX CDC optical emission spectrometer (OES). Samples were diluted to 5% HNO<sub>3</sub>. Peach leaves were used as standard reference material (SRM 1547 from The National Institute of Standards & Technology). The representation of these data was done using the Genesis software (Sturn et al. 2002).

## **Results**

### ***Phylogenetic analysis of Eucalyptus grandis NFS1, ISU1 and ISA1***

A comparative amino acid analysis of the three *E. grandis* [Fe-S] assembly proteins showed that the similarity of *E. grandis* sequences varied from 47 to 97% when compared with different plant, animal and bacterial encoding sequences. ISU1 presented a higher amino acid similarity than ISA1, independently of the pairwise comparison that had been made between protein sequences derived from monocots or dicots, animals or plants, and plants or bacteria.

Phylogenetic analyses were conducted with each Fe-S protein in separate. In the NFS1 phylogenetic analysis, bacteria, Vertebrata and Viridiplantae produced three independent clusters, supported by high bootstrap values. The analysis showed that *E. grandis* NFS1 (*EgrNFS1*) clustered within the group of dicot sequences formed by those derived from *Arabidopsis*, *Ricinus*, *Populus*, *Carica* and *Vitis* (Supplementary data 1).

The ISA1 phylogenetic tree presented three main clusters of sequences, one corresponding to Viridiplantae proteins, one with mammal-derived sequences and a third one where sequences from gram-negative bacteria were placed, in a basal position. ISA1 from Viridiplantae formed a main cluster, where Chlorophyta has a basal position in respect to the Tracheophyta branch, where monocots and dicots form two separated clusters, but without distinction among the dicot members (Supplementary data 2).

The ISU1 phylogenetic tree, as observed for NFS1 and ISA1, has three distinct main branches corresponding to gram-negative bacteria, in a basal position, mammals and Viridiplantae. As expected, *EgrISU1* clustered with the Viridiplantae group, where dicot and monocot sequences were not effectively discriminated (Supplementary data 3).

### ***Microarray analysis of [Fe-S] cluster assembly genes in Eucalyptus***

In order to achieve a better understanding of the genes coding for [Fe-S] cluster assembly proteins in *E. grandis*, total RNA was extracted from mature leaves and xylem tissues of field-grown trees. Total RNA was converted into cDNA and submitted to microarray analysis with 50-mer oligonucleotide chips containing 21,432 unique sequences from *Eucalyptus* (and 10 human, control sequences). Our microarray results allowed us to observe that leaves from *E. grandis* exhibited higher expression of *NFS1* and *SufA* than xylem from the same species (Figure 1). The expression of *SufA*, a plastidic gene, showed a differential expression as expected, due to the higher activity of chloroplasts in leaf tissues. As can be observed in Figure 1, steady-state mRNA levels for *EgrISU1* and *EgrISA1* were not statistically different between leaves and xylem.

Another set of microarray analysis was conducted to evaluate possible differences in steady-state mRNA levels between xylems from *E. grandis* and *E. globulus*, one of the *Eucalyptus* species with the best standards of wood for cellulose pulping. As shown in Figure 2, the *EgrISU1* and *EgrISAI* genes exhibited significant higher mRNA levels in xylem tissues from *E. grandis*. Both *EgrNFS1* and *EgrSufA* exhibited similar levels of expression in the xylems of both tree species.

### ***RT-qPCR analysis of [Fe-S] assembly genes in Eucalyptus grandis***

Considering the importance of Fe-S proteins in so many physiological responses and processes in plant cells, we evaluated the pattern of mRNA accumulation in *E. grandis* seedlings after chilling treatment. A quantitative approach based on RT-qPCR was employed to estimate the mRNA levels for *E. grandisNFS1*, *ISU1* and *ISAI* in comparison with two generally-assumed constitutive genes: histone H2B (Hays and Skinner 2001; Sterky et al. 2004) and ribonucleoprotein L23A (Mrusek et al. 2005). *EgrNFS1* showed a decrease in steady-state mRNA levels in the first 16 hours, increasing them after 48 hours. During the recovery period (24 h) at 25 °C, mRNA accumulation was maintained (Figure 3). *EgrISAI* exhibited a peak of mRNA levels after 2 hours of cold treatment, but decreased the accumulation later (Figure 4). *EgrISU1* was also more expressed in the first two hours and later shown a repression pattern (Figure 5). Furthermore, the mRNA level was analysed for *EgHsp70* and it was higher than in after 24 hours treatment and a recovery time until 48 hours (Figure 6).

### ***Ion content determination***

Using ICP-OES analysis was verified that the treatment increased the amount of iron and sulfur in *Eucalyptus* plants. In control conditions, the concentration of iron was 180.25 $\mu$ g/g while during stress condition such chilling it was increased to 268.8 $\mu$ g/g. Besides that, the total quantity of sulfur in control plants was 2.53mg/g, and slightly increased to 2.71mg/g after chilling treatment. Magnesium and manganese were also quantified during analysis (Figure 7).

### **Discussion**

Temperature is a physical parameter that influences protein, DNA, membranes, and chromosomes structures through thermodynamic properties. Generally these changes are rapid, however, for a molecule or structure to be considered a sensor, any modification induced should be upstream of a signaling cascade leading to a reply. Changes in temperature are perceived and then transduced to the nucleus altering the transcriptome (Zeller et al. 2009). Chilling can lead to reduced enzymatic activity, rigidification of membranes, destabilization of protein complexes, stabilization of RNA secondary structure, accumulation of reactive oxygen species and impairment of photosynthesis (Ruelland et al. 2009). One kind of response is the gene induction and in our chilling experiment we observed for *EgISU1* and *EgISA1* a fast response (2 hours).

The primary metabolism, such as metabolism of carbon, nitrogen, sulfur or energy, need to be modulated to establish a new homeostasis under chilling stress. The present results suggest that the *EgrNFS1*, *EgrISU1* and *EgrISA1* genes maybe related to the *E. grandis* cellular response to chilling stress, probably due to increases in the sulfur metabolism. Sulfur-containing defense compounds (SDCs) are crucial for the survival of plants under biotic and abiotic stress (Rausch

and Wachter 2005). It has been shown that sulfur metabolism mediate the modulation of plant response to various abiotic stress factors (Biswal et al. 2008). Moreover, oxidative, pathogen infection and heavy metal stresses appear to increase the sulfur demand, as these stresses enhance the expression of sulfate transporters and enzymes of the assimilatory pathway (Hawkesford and De Kok 2006). All together about 100 plant proteins contain [Fe-S] clusters and it was estimated that about 2% of the bound sulfur can be found in [Fe-S] clusters (Kessler and Papenbrock 2005). Observations of several plant species have led to the addition of elemental sulfur,  $S^0$ , to the list of SDCs (Williams and Cooper 2004). Possibly the supplying of this compound is regulated by the catalytic activity of *EgrNFS1*.

While we cannot prove that the observed higher accumulation of the mRNAs was entirely due to increases in the respective gene transcriptions, the up-regulation of the *EgrNFS1*, *EgrISA1* and *EgrISU1* genes could be directly correlated to increases in [Fe-S] cluster biosynthesis and, hence, many other Fe-S proteins possibly related to the chilling stress response or to plant recovery including the synthesis of repair enzymes. The expression of the *A. thaliana* NFS1 gene was shown to be required for the activity of aldehyde oxidase (AO)enzymes that depend on two [2Fe–2S] clusters, FAD and MoCo. A link between *At*NFS1 and phytohormone biosynthesis was shown through the strongly diminished activities of AOs in antisense NFS1 lines of *Arabidopsis* (Frazzon et al. 2007). The accumulation of Soybean AO and XDH were higher in plants submitted to chilling treatment than in control. XDH activities were clearly enhanced upon cold treatment while AO activities increased only moderately under these conditions (Heis et al. 2011).

Many enzymes related to such primary metabolisms were shown to be induced by abiotic stresses like chilling. For instance, cysteine synthase 1 is the enzyme responsible for the final

step in cysteine biosynthesis, which is a key limiting step in the production of glutathione, a thiol implicated in resistance to biotic and abiotic stresses (May et al. 1998). MS analysis in rice roots observed the up-regulation of cysteine synthase 24 and 72 hours after chilling stress (Fold change 1.38 and 1.59 respectively) (Lee et al. 2009). Two sulfur metabolism-related enzymes, putative plastidic cysteine synthase 1 and S-adenosylmethionine synthetase were up-regulated during chilling stress in another rice proteomic study (Yan et al. 2006). S-adenosylmethionine synthetase 2 catalyzes the biosynthesis of S-adenosylmethionine (SAM), a precursor of ethylene and polyamines (Yan et al. 2005). It has also been reported that there is a close correlation between chilling tolerance and polyamine accumulation level in rice under chilling stress. The energy metabolism in plant cells is well documented and also altered under chilling stress (Lee et al. 1995). The ATP synthase  $\alpha$  and  $\beta$  chains are for instance degraded in rice under chilling stress, which unavoidably resulted in decreased ATP production through photophosphorylation and thus affecting the Calvin cycle in photosynthesis (Yan et al. 2005). It is possible that APS reductase (Fe-S protein), which has glutaredoxin-like domain, can sense the redox condition. Therefore, it is also possible that slight induction of APS reductase under stress condition can regulate cysteine desulfurase activity of NFS1 (Kim et al. 2004).

In addition to a sulfur donor and scaffold proteins, the *isc* gene cluster encodes a ferredoxin and two chaperones, the Hsp70-like HscA and its co-chaperone HscB. HscA and HscB proteins are likely to serve as molecular chaperones that specifically assist in the maturation of Fe/S proteins and these genes were shown to be crucial for [Fe-S] cluster biosynthesis in *Escherichia coli* (Tapley and Vickery 2004). In a proteomic analysis of rice seedlings during cold stress, Hsp70 was identified by MS/MS as a low temperature stress-responsive protein (Hashimoto and Komatsu 2007). Another study with rice roots, identified in a

two-dimension gel by MS and ESI-MS/MS three spots of chilling stress induced up-regulated proteins corresponding to Hsp70 after 24 and 72 hours. The higher expression was also confirmed by mRNA quantification (Lee et al. 2009). Moreover, the expression of one Hsp70 mRNA was increased during cold acclimation in spinach (Marshall et al. 1990).

Our inductively coupled plasma results concur with qRT-PCR findings, since the higher expression of *EgrISA1* observed in chilling stress agree with the higher total iron content in the same sample. In addition was reported that ISA1 was an iron binding protein and possibly is the iron donor for [Fe-S] cluster formation, as deletion of ISA1 homologues resulted in the accumulation of iron in mitochondria and a deficiency of iron–sulfur proteins (Balasubramanian et al. 2006; Ding et al. 2004; Lill et al. 1999). This way, ISA1 might play a role in sensing the iron condition and oxidative stress in cells, since the labile [Fe-S] cluster centers associated with these proteins sense the capacity of cells to produce [Fe-S] clusters and thus pass on the information as an intact [Fe-S] cluster to a regulatory protein (Kim et al. 2004).

One potential justification for such higher expression of *EgrNFS1* in leaves is the importance in yielding sulfur for plant defence, since leaves are much more exposed to stresses than the internal, vascular tissues of the trunk. Many plant anti-pathogen compounds are sulfur containing and known to accumulate in higher concentrations in leaves, including thionins (Thomma et al. 2002), alliins (Jones et al. 2004) and glucosinolates (Griffiths et al. 1998). The biosynthetic pathway for elemental sulfur production could therefore involve *EgrNFS1*. Thus, this family of proteins (NifS/NFS/IscS/SufS) appears to play a broader role in the mobilization of sulfur (Frazzon et al. 2007) and selenium (Tamaoki et al. 2008; Van Hoewyk et al. 2005).

We also checked in our microarray the expression pattern of *EgSufA* (plastid ISA1 ortholog) and, data's shown that the expression is more increased in leaves than in xylem as expected, due to higher activity of chloroplasts in leaf tissues (data not shown). Accumulated evidence indicates that genomic homology and locus ordering between *E. grandis* and *E. globulus* is very high (Marques et al. 2002). Nevertheless, regulatory regions could be responsible for the differential patterns of gene expression which would result in phenotypic variation (Grattapaglia 2004). Transcript levels measured by our microarrays could account for genetic sources of variation associated with dominance and epistasis as well as for nongenetic sources of variation, such as developmental and environmental variation (Kirst et al. 2005). Differences were observed in the relative expression profiles of all four genes encoding [Fe-S] cluster assembly proteins when comparing the xylems from two *Eucalyptus* species, suggesting that these genes could be involved in part of the contrasting phenotypic characteristics of the woods (differentiating xylems) from *E. globulus* and *E. grandis*. The up-regulation of the heat shock proteins and cysteine synthase during cold stress, suggests that plants deal with the stress through a complex defense mechanism and antioxidants could have a crucial role (Lee et al. 2009). Our data indicated that Fe-S proteins maybe involved in the plant recovery response after chilling stress.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Brazilian Ministry of Science and Technology (MCT) and National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). J.F. (CNPq 302471/2009-0 and 470388/2009-9), G.P (CNPq 311361/2009-9) and R.M (CNPq, 302684/2005-0) are research awardees from CNPq and L.A.O. is a PhD Degree fellow from CAPES. Special thanks for Dr. Paulo Celso (Lanagro-RS) for conducting the ICP-OS analysis.



## References

- Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R. and Johnson, M.K. (2000) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: Sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* 39: 7856-7862.
- Balasubramanian, R., Shen, G.Z., Bryant, D.A. and Golbeck, J.H. (2006) Regulatory roles for IscA and SufA in iron homeostasis and redox stress responses in the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC 7002. *Journal of Bacteriology* 188: 3182-3191.
- Balk, J. and Lobreaux, S. (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends in Plant Science* 10: 324-331.
- Ball, M.C., Canny, M.J., Huang, C.X. and Heady, R.D. (2004) Structural changes in acclimated and unacclimated leaves during freezing and thawing. *Functional Plant Biology* 31: 29-40.
- Biswal, B., Raval, M., Biswal, U. and Joshi, P. (2008) Response of Photosynthetic Organelles to Abiotic Stress: Modulation by Sulfur Metabolism. In *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. Edited by Springer pp. 167-191, Berlin Heidelberg.
- Brodribb, T.J. and Hill, R.S. (2000) Increases in water potential gradient reduce xylem conductivity in whole plants. Evidence from a low-pressure conductivity method. *Plant Physiol* 123: 1021-1027.
- Cavender-Bares, J. (2007) Chilling and freezing stress in live oaks (*Quercus* section *Virentes*): intra- and inter-specific variation in PS II sensitivity corresponds to latitude of origin. *Photosynth Res* 94: 437-453.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T. and Udvardi, M.K. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization. *Plant Physiology* 139:5-17
- de Oliveira, L.A., Breton, M.C., Bastolla, F.M., da Silva Camargo, S., Margis, R., Frazzon, J. and Pasquali, G. (2011) Reference Genes for the Normalization of Gene Expression in *Eucalyptus* Species. *Plant Cell Physiol.* 53(2):405-22.

- Ding, H., Clark, R.J. and Ding, B. (2004) IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions. *J Biol Chem* 279: 37499-37504.
- Dutkiewicz, R., Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E.A. and Marszalek, J. (2003) Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J Biol Chem* 278: 29719-29727.
- El Kayal, W., Navarro, M., Marque, G., Keller, G., Marque, C. and Teulieres, C. (2006) Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from Eucalyptus in response to cold. *Journal of Experimental Botany* 57: 2455-2469.
- Ewing, B. and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8: 175-185.
- Frazzon, A.P., Ramirez, M.V., Warek, U., Balk, J., Frazzon, J., Dean, D.R. and Winkel, B.S. (2007) Functional analysis of Arabidopsis genes involved in mitochondrial iron-sulfur cluster assembly. *Plant Mol Biol* 64: 225-240.
- Grattapaglia, D. (2004) Integrating genomics into Eucalyptus breeding. *Genet Mol Res* 3: 369-379.
- Griffiths, D.W., Birch, A.N.E. and Hillman, J.R. (1998) Antinutritional compounds in the Brassicaceae: Analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 73: 1-18.
- Hashimoto, M. and Komatsu, S. (2007) Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics* 7: 1293-1302.
- Hawkesford, M.J. and De Kok, L.J. (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell Environ* 29: 382-395.
- Hays, D.B. and Skinner, D.Z. (2001) Development of an expressed sequence tag (EST) library for *Medicago sativa*. *Plant Science* 161: 517-526.

- Heis, M.D., Ditmer, E.M., de Oliveira, L.A., Frazzon, A.P., Margis, R. and Frazzon, J. (2011) Differential expression of cysteine desulfurases in soybean. *BMC Plant Biol* 11: 166.
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D. and Johnson, M.K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* 74: 247-281.
- Jones, M.G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A.B. and Collin, H.A. (2004) Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany* 55: 1903-1918.
- Kessler, D. and Papenbrock, J. (2005) Iron-sulfur cluster biosynthesis in photosynthetic organisms. *Photosynthesis Research* 86: 391-407.
- Khush, G.S. (1999) Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome* 42: 646-655.
- Kim, S.K., Rahman, A., Bick, J.A., Conover, R.C., Johnson, M.K., Mason, J.T., Hirasawa, M., Leustek, T. and Knaff, D.B. (2004) Properties of the cysteine residues and iron-sulfur cluster of the assimilatory 5'-adenylyl sulfate reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 43: 13478-13486.
- Kirst, M., Basten, C.J., Myburg, A.A., Zeng, Z.B. and Sederoff, R.R. (2005) Genetic architecture of transcript-level variation in differentiating xylem of a eucalyptus hybrid. *Genetics* 169: 2295-2303.
- Krebs, C., Agar, J.N., Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H. and Johnson, M.K. (2001) IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* 40: 14069-14080.
- Krishna, P., Sacco, M., Cherutti, J.F. and Hill, S. (1995) Cold-Induced Accumulation of Hsp90 Transcripts in *Brassica-Napus*. *Plant Physiology* 107: 915-923.
- Kushnir, S., Babiychuk, E., Storozhenko, S., Davey, M.W., Papenbrock, J., et al. (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Sta1* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *Plant Cell* 13: 89-100.
- Lee, D.G., Ahsan, N., Lee, S.H., Lee, J.J., Bahk, J.D., Kang, K.Y. and Lee, B.H. (2009) Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *Journal of Plant Physiology* 166: 1-11.

- Lee, T.M., Lur, H.S. and Chu, C. (1995) Abscisic-Acid and Putrescine Accumulation in Chilling-Tolerant Rice Cultivars. *Crop Science* 35: 502-508.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C. and Kispal, G. (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biological Chemistry* 380: 1157-1166.
- Lill, R. and Muhlenhoff, U. (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* 30: 133-141.
- Lill, R. and Muhlenhoff, U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: Mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual Review of Biochemistry* 77: 669-700.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25: 402-408.
- Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M. and Barras, F. (2003) Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial SUF system - SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *Journal of Biological Chemistry* 278: 38352-38359.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.
- Maroufi, A., Van Bockstaele, E., De Loose, M. (2010) Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Molecular Biology*. 11:15.
- Marques, M., Brondani, V., Grattapaglia, D. and Sederoff, R. (2002) Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four Eucalyptus species. *Theor Appl Genet* 105: 474-478.
- Marshall, J.S., Derocher, A.E., Keegstra, K. and Vierling, E. (1990) Identification of Heat-Shock Protein Hsp70 Homologs in Chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 374-378.

- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M. and Inze, D. (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* 49: 649-667.
- Mrusek, S., Classen-Linke, I., Vloet, A., Beier, H.M. and Krusche, C.A. (2005) Estradiol and medroxyprogesterone acetate regulated genes in T47D breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 235: 39-50.
- Muhlenhoff, U. and Lill, R. (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1459: 370-382.
- Qureshi, M.I., Qadir, S. and Zolla, L. (2007) Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *J Plant Physiol* 164: 1239-1260.
- Rausch, T. and Wachter, A. (2005) Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci* 10: 503-509.
- Ruelland, E., Vaultier, M.N., Zachowski, A. and Hurry, V. (2009) Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. *Advances in Botanical Research, Vol 49* 49: 35-150.
- Sterky, F., Bhalerao, R.R., Unneberg, P., Segerman, B., Nilsson, P., et al. (2004) A Populus EST resource for plant functional genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13951-13956.
- Sturn, A., Quackenbush, J. and Trajanoski, Z. (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 207-208.
- Swofford, D.L. (1993) Paup - a Computer-Program for Phylogenetic Inference Using Maximum Parsimony. *Journal of General Physiology* 102: A9-A9.
- Tamaoki, M., Freeman, J.L. and Pilon-Smits, E.A. (2008) Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146: 1219-1230.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

- Tapley, T.L. and Vickery, L.E. (2004) Preferential substrate binding orientation by the molecular chaperone HscA. *J Biol Chem* 279: 28435-28442.
- Thomashow, M.F. (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 571-599.
- Thomma, B.P., Cammue, B.P. and Thevissen, K. (2002) Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.
- Unciuleac, M.C., Chandramouli, K., Naik, S., Mayer, S., Huynh, B.H., Johnson, M.K. and Dean, D.R. (2007) Vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry* 46: 6812-6821.
- Van Hoewyk, D., Garifullina, G.F., Ackley, A.R., Abdel-Ghany, S.E., Marcus, M.A., Fakra, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Pilon, M., Takahashi, H. and Pilon-Smits, E.A.H. (2005) Overexpression of AtCpNifS enhances selenium tolerance and accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 1518-1528.
- Veatch, J.R., McMurray, M.A., Nelson, Z.W. and Gottschling, D.E. (2009) Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell* 137: 1247-1258.
- Williams, J.S. and Cooper, R.M. (2004) The oldest fungicide and newest phytoalexin - a reappraisal of the fungitoxicity of elemental sulphur. *Plant Pathology* 53: 263-279.
- Yan, S., Tang, Z., Su, W. and Sun, W. (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* 5: 235-244.
- Yan, S.P., Zhang, Q.Y., Tang, Z.C., Su, W.A. and Sun, W.N. (2006) Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol Cell Proteomics* 5: 484-496.
- Yang, J.J., Bitoun, J.P. and Ding, H.G. (2006) Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters. *Journal of Biological Chemistry* 281: 27956-27963.

Zarcinas, B.A., Cartwright, B. and Spouncer, L.R. (1987) Nitric-Acid Digestion and Multielement Analysis of Plant-Material by Inductively Coupled Plasma Spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 18: 131-146.

Zeller, G., Henz, S.R., Widmer, C.K., Sachsenberg, T., Ratsch, G., Weigel, D. and Laubinger, S. (2009) Stress-induced changes in the *Arabidopsis thaliana* transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. *Plant J* 58: 1068-1082.

Zheng, L.M., Cash, V.L., Flint, D.H. and Dean, D.R. (1998) Assembly of iron-sulfur clusters - Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 13264-13272.

Zheng, L.M. and Dean, D.R. (1994) Catalytic Formation of a Nitrogenase Iron-Sulfur Cluster. *Journal of Biological Chemistry* 269: 18723-18726.

Zheng, L.M., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F. and Dean, D.R. (1993) Cysteine Desulfurase Activity Indicates a Role for Nifs in Metallocluster Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 2754-2758.

## LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: *In silico* analysis of microarray results comparing the relative gene expression profiles of *Eucalyptus grandis* leaves and xylem. Expression observed for each [Fe-S] cluster encoding genes was calibrated with *NFS1* xylem fluorescence value.

Figure 2: *In silico* analysis of microarray results comparing the relative gene expression profiles in xylem of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus globulus*. Expression observed for each [Fe-S] cluster encoding genes was calibrated with *Eucalyptus grandis* fluorescence values.

Figure 3: Quantitative RT-PCR analysis of *NFS1* gene expression from total RNA isolated from *Eucalyptus grandis* treated seedlings. Results are expressed as the relative quantification of amplification products using two internal controls, histone H2B (His) and ribonucleoprotein L23A (Rib). Dark bars represent the samples with 24 hours recovery time at 25°C after chilling.

Figure 4: Quantitative RT-PCR analysis of *ISA1* gene expression from total RNA isolated from *Eucalyptus grandis* treated seedlings. Results are expressed as the relative quantification of amplification products using two internal controls, histone H2B (His) and ribonucleoprotein L23A (Rib). Dark bars represent the samples with 24 hours recovery time at 25°C after chilling.



Figure 5: Quantitative RT-PCR analysis of *ISU1* gene expression from total RNA isolated from *Eucalyptus grandis* treated seedlings. Results are expressed as the relative quantification of amplification products using two internal controls, histone H2B (His) and ribonucleoprotein L23A (Rib). Dark bars represent the samples with 24 hours recovery time at 25°C after chilling.

Figure 6: Quantitative RT-PCR analysis of *Hsp70* gene expression from total RNA isolated from *Eucalyptus grandis* treated seedlings. Results are expressed as the relative quantification of amplification products using two internal controls, histone H2B (His) and ribonucleoprotein L23A (Rib). Dark bars represent the samples with 24 hours recovery time at 25°C after chilling.

Figure 7: Ion content quantification in chilling treatment and control samples.

## FIGURES

Figure 1

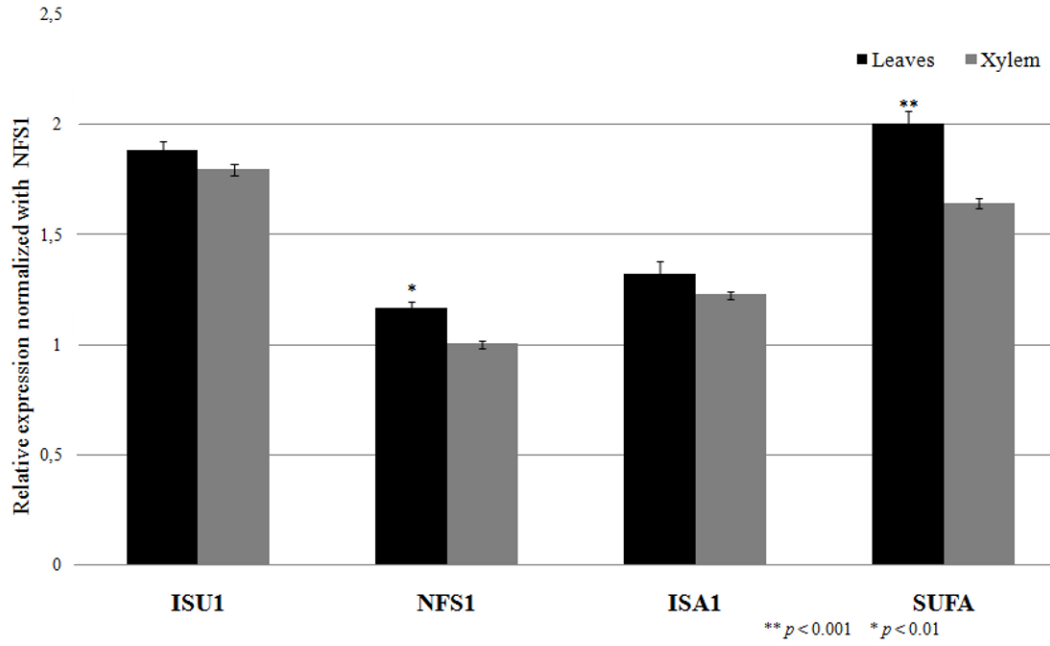
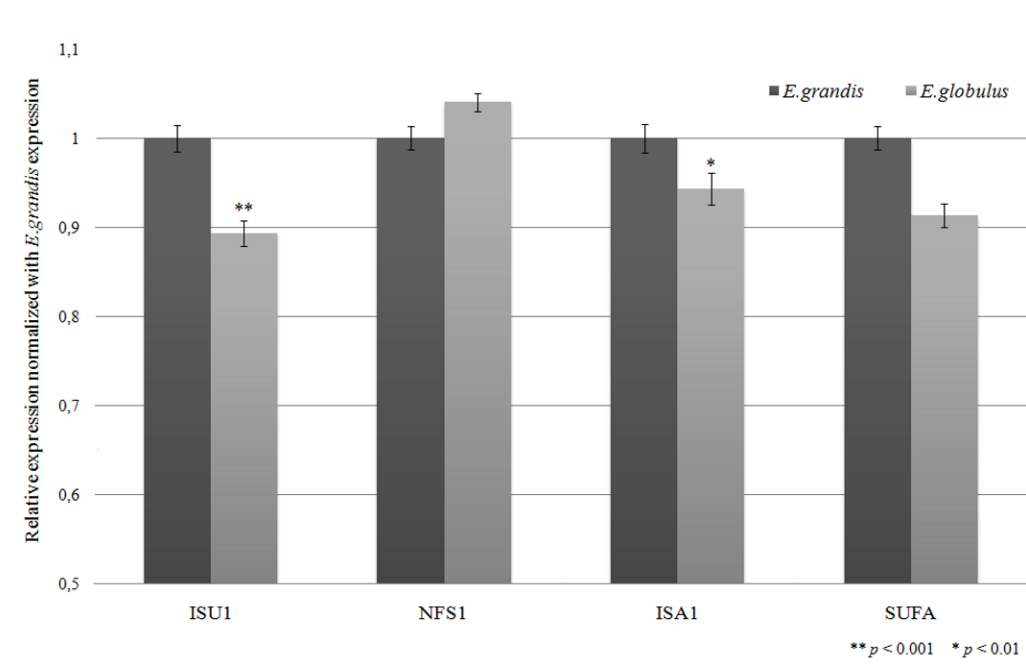
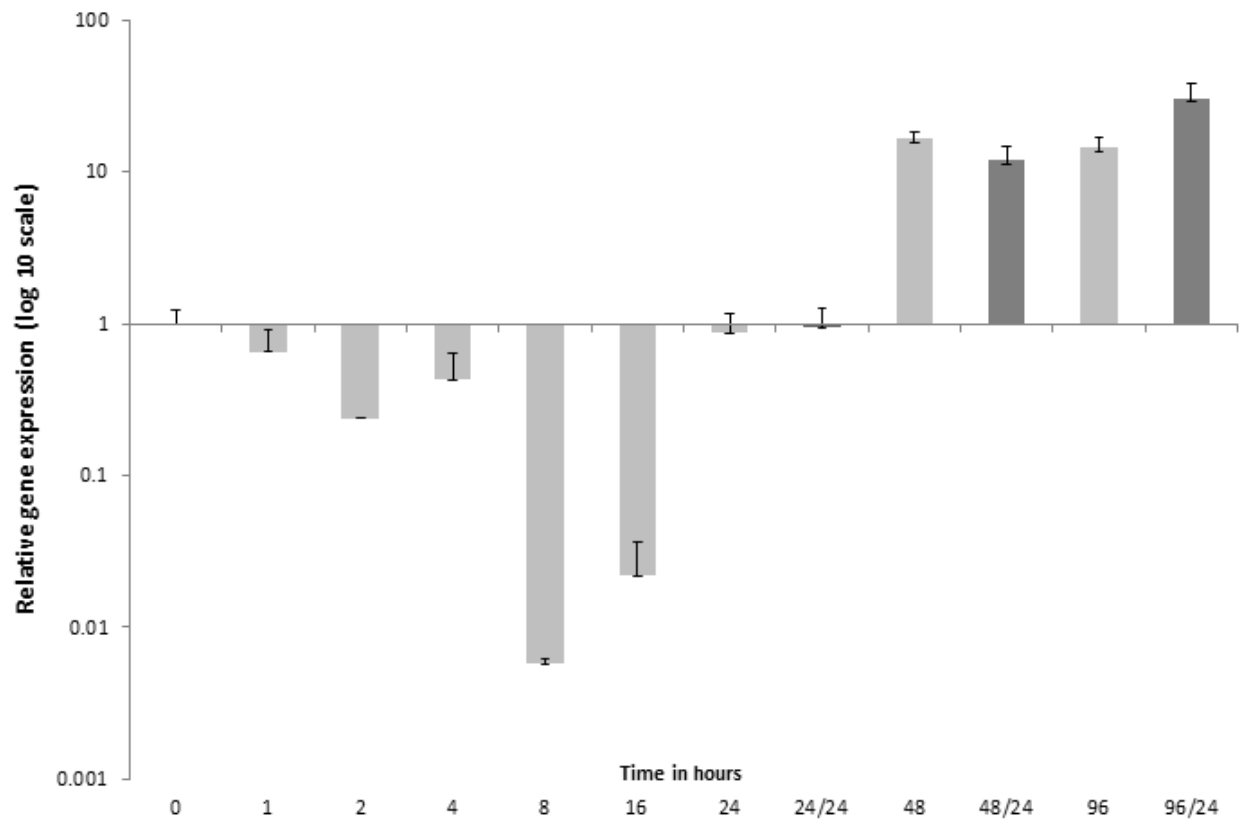


Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

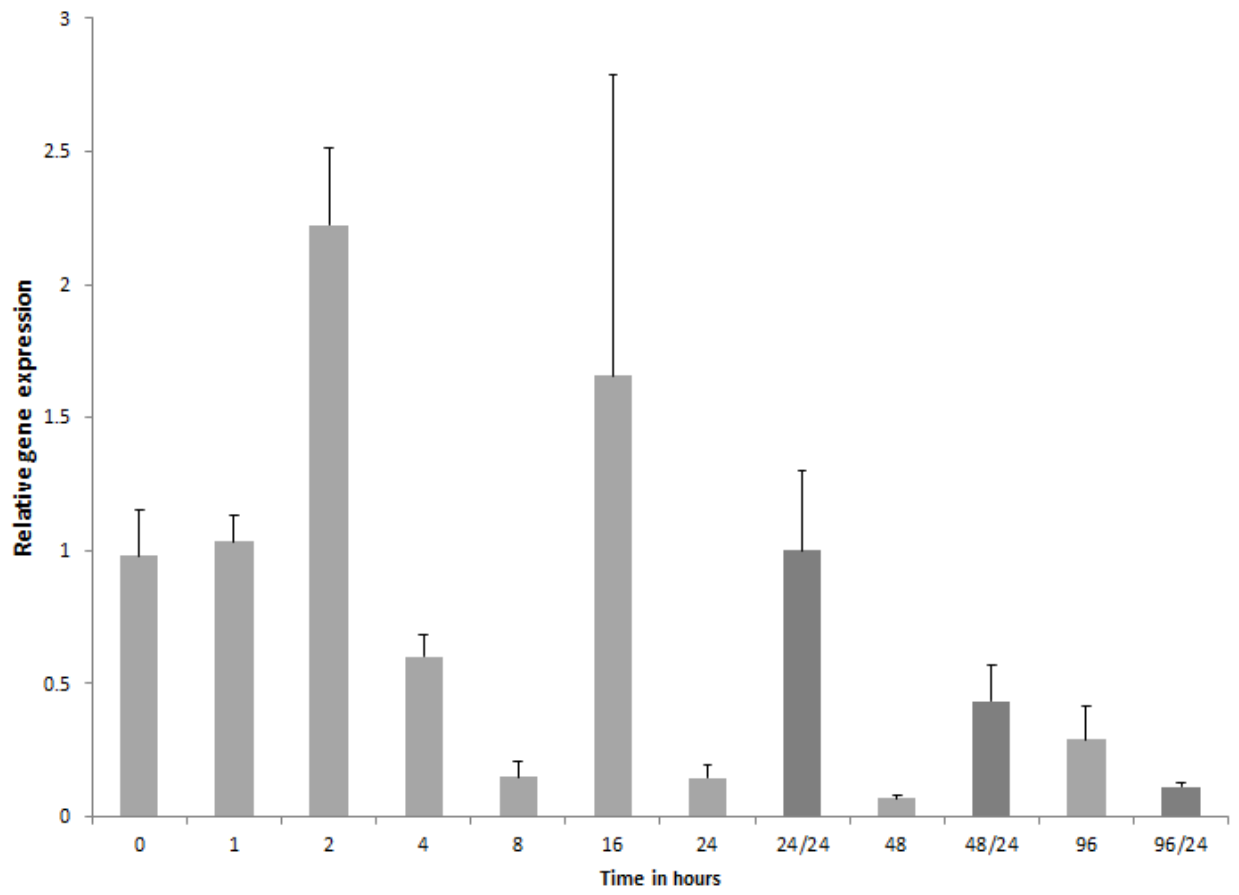
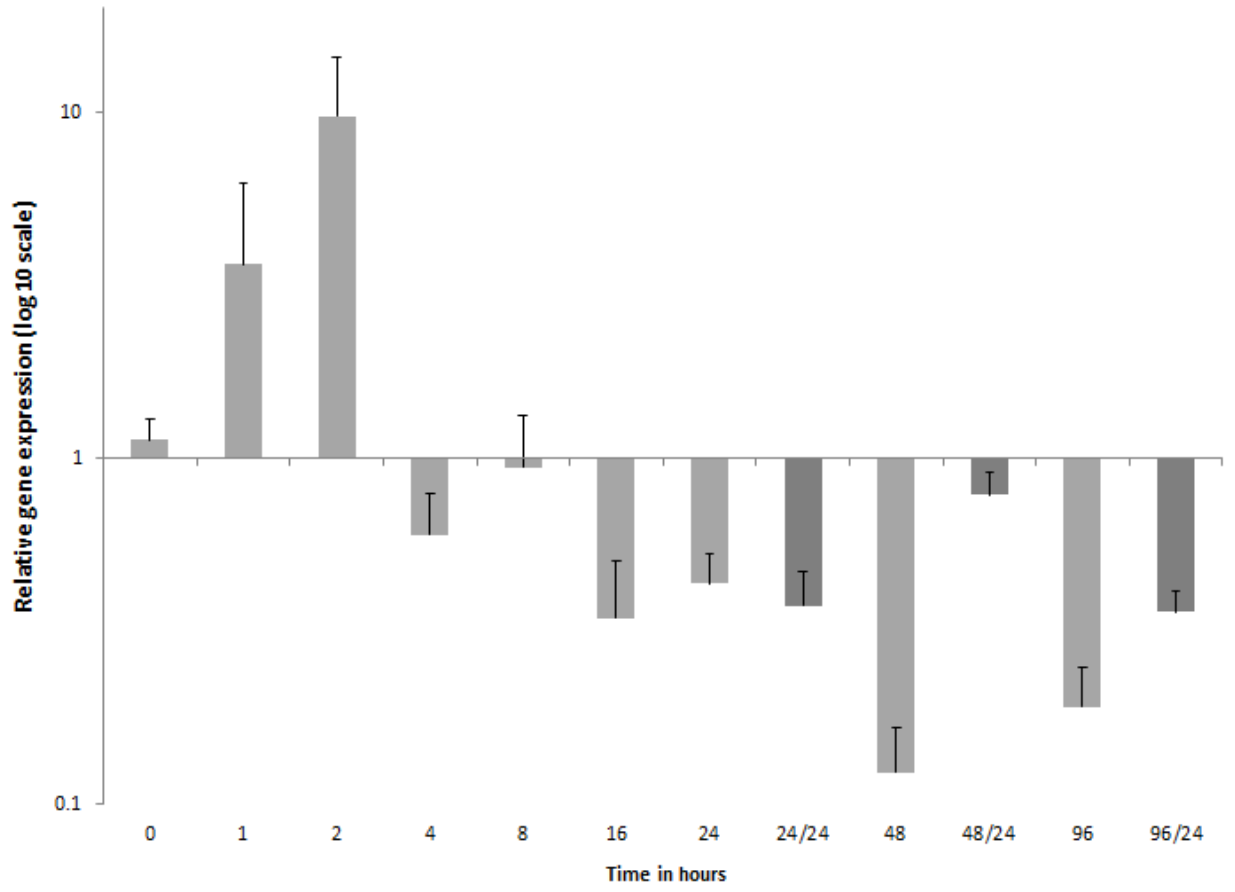


Figure 5



**Figure 6**

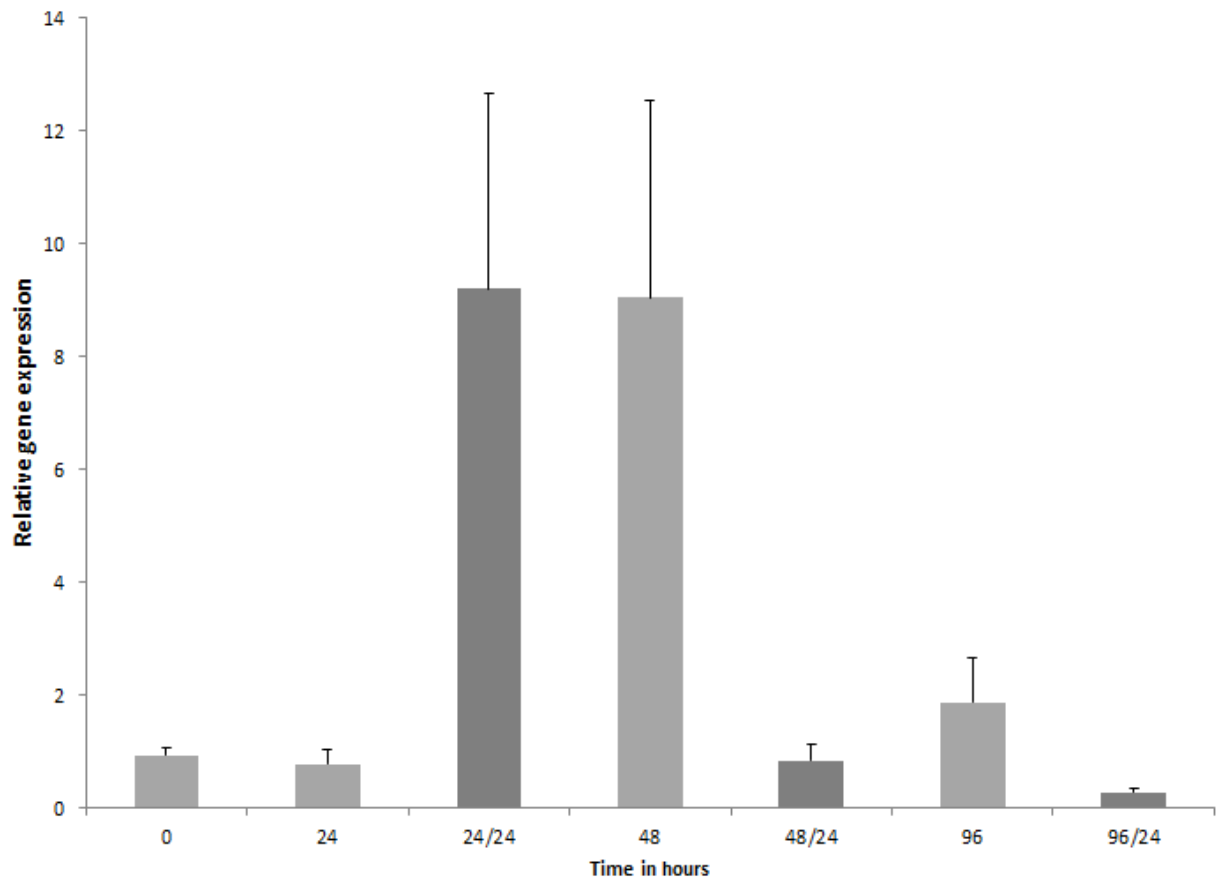
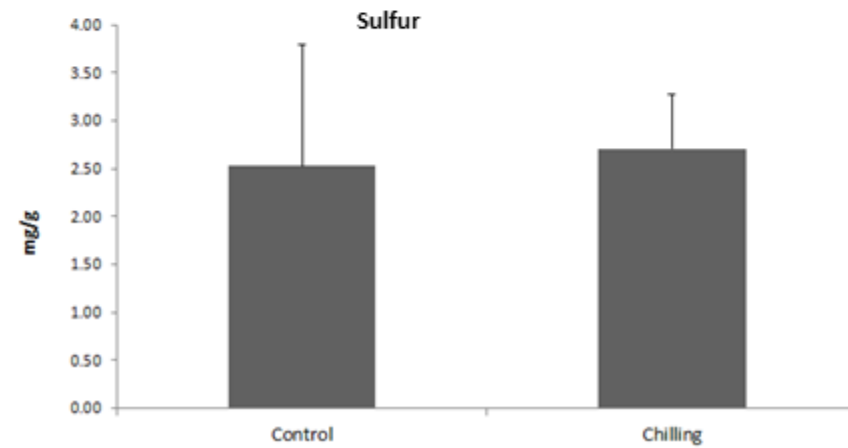
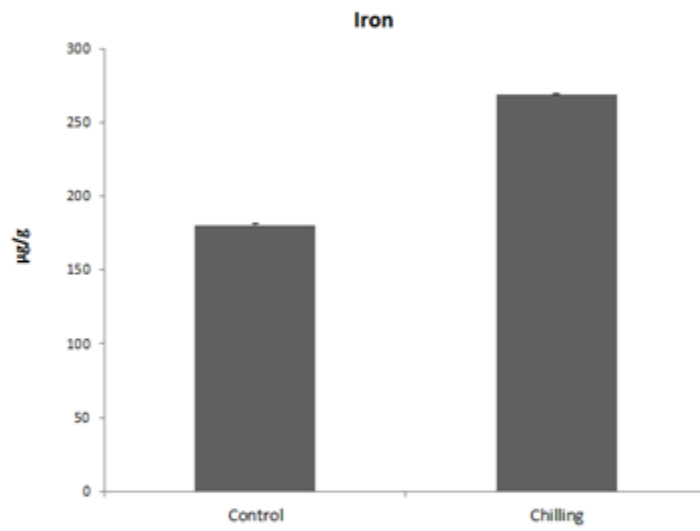
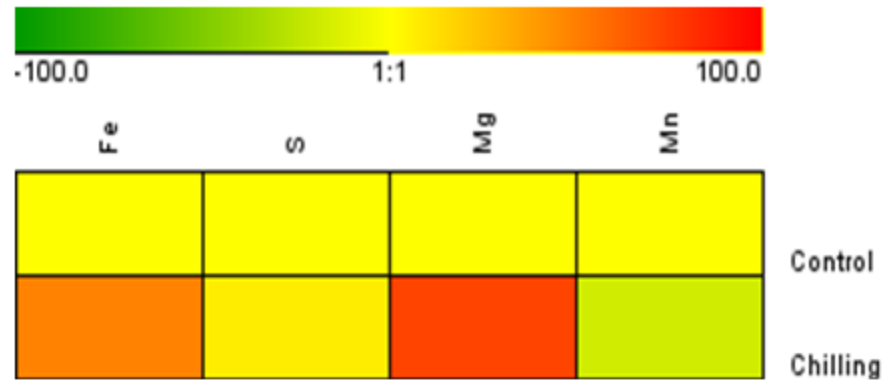
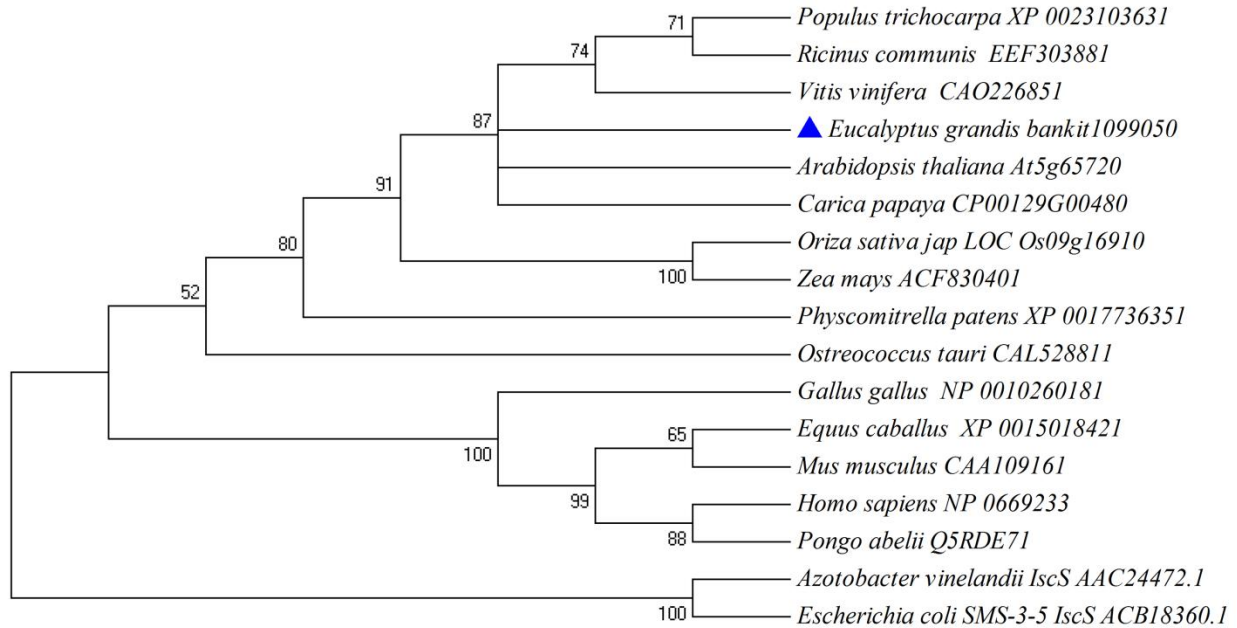


Figure 7



# SUPPLEMENTARY DATA

## Supplementary data 1



```

*          300          *          320          *          340          *          360          *          380          *          400          *          420
A. vinelan: SCHRIVGPKGIGALVYRRKFRVRIEQQGGGERRGRLSCTLPTPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 344
E. coli : SCHRIVGPKGIGALVYRRKFRVRIEQQGGGERRGRLSCTLPTPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 344
G. gallus : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 345
M. musculus : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 349
E. caballus : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 397
H. sapiens : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 397
P. abelii : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 397
O. taurii : SCHRIVGPKGIGALVYRRKFRVRLBQLGGGERRGRLSCTLPTPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 419
P. pattens : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 344
A. thalian : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 353
O. sativa : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 396
Z. mays : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 391
R. comunis : SCHRIVGPKGIGALVYRRKFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 393
P. trichoc : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 392
C. papaya : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 395
E. grandis : -----SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 123
V. vinifer : SCHRIVGPKGVGAIYVRRFRVRLBQLGGGERRGRLSCTVETPLVVGGAACEVAEEMVMDRIRISGSRIRIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 394
s hk ygpkg ga y rr p6R6E GGGERRGERSGT ptpl VG GaAc EA E6 d r L R 6 6 ENG y g 6NG6FaYVEGES66M L4 6A6SSGSACTSASLEPSYVIRALG

```

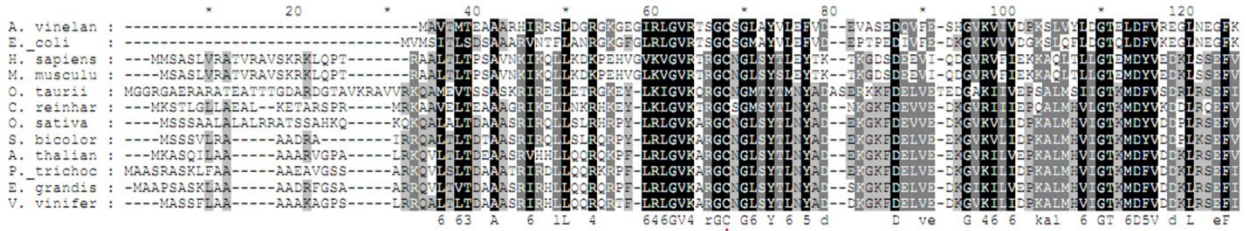
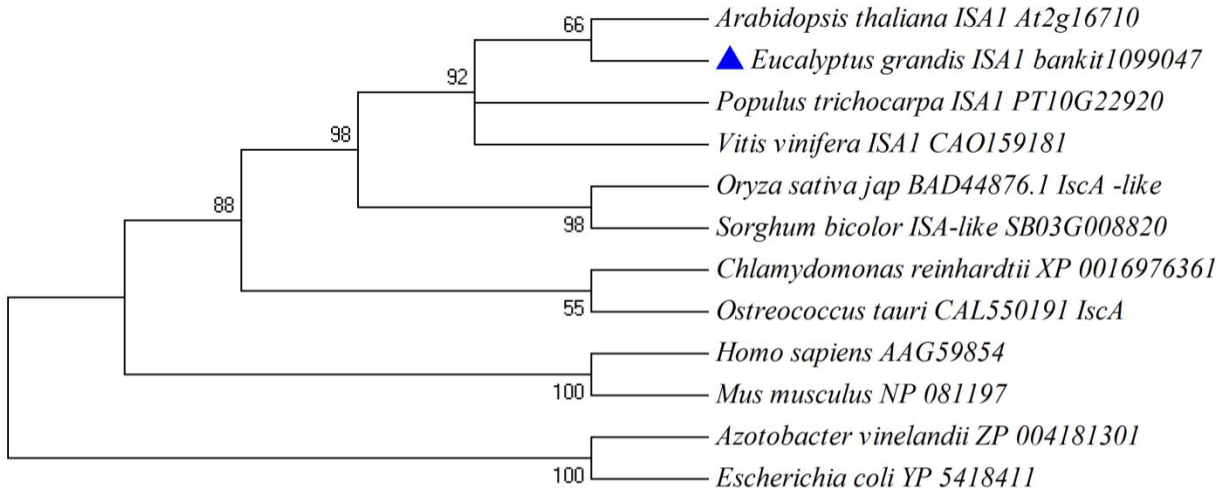
```

*          440          *          460          *          480
A. vinelan: NEDLAHSSIRFVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 404
E. coli : NEDLAHSSIRFVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 404
G. gallus : NEDLAHSSIRFVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 445
M. musculus : NEDLAHSSIRFVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 459
E. caballus : NEDLAHSSIRFVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 457
H. sapiens : NEDLAHSSIRFVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 457
P. abelii : NEDLAHSSIRFVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 457
O. taurii : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 479
P. pattens : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 404
A. thalian : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 453
O. sativa : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 456
Z. mays : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 451
R. comunis : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 453
P. trichoc : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 452
C. papaya : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 455
E. grandis : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 193
V. vinifer : NEDMAHTSIRYVIGRETTTEEVDFVARKVCEAQRIRLISPLWEMVKGVDLSEIQQKGGIDVWVNGEERRVAGLNLSFRAYVVEGESLMLLRLGAVSSGSACTSASLEPSYVIRALG : 454
ed6AH3SIR5g GRFTTeeE6D 6 41R 6SPL5eM G6D6k I W qh

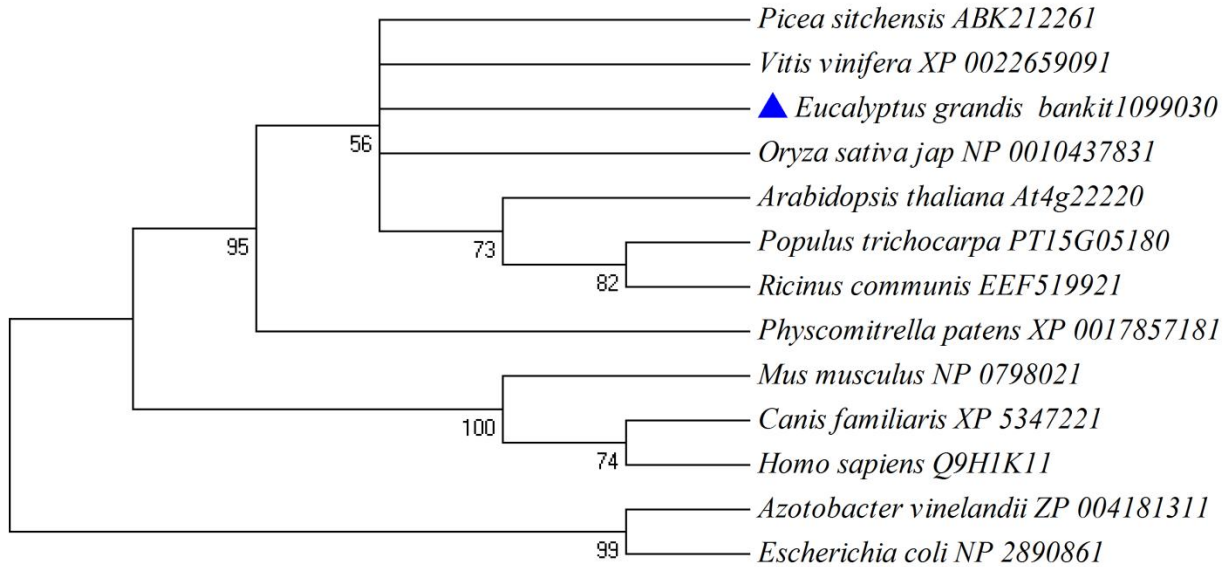
```



Supplementary data 2



Supplementary data 3



```

P. patens : M...S...F...S...C...G...P...I...A...---V...V...R...Q...L...R...G...C...G...K...L...V...S...P...R...T...V...E...M...V...V...E...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 113
A. thalian : M...L...Q...A...K...K...A...L...G...L...---T...S...R...Q...S...T...P...W...S...V...G...I...L...R...T...V...E...M...V...I...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 111
O. sativa : M...L...R...A...G...G...R...L...L...A...P...L...R...R...V...L...-G...G...G...A...A...P...V...V...G...G...A...R...A...V...E...R...V...V...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 116
P. sitchens : M...L...R...Q...A...G...I...S...I...T...S...A...---A...R...A...H...A...S...A...M...G...G...V...R...A...V...E...R...V...V...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 109
V. vinifera : M...L...R...S...G...C...S...R...I...L...G...L...---G...Q...Q...K...Q...A...Q...S...Q...A...L...L...R...F...V...E...R...V...V...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 110
E. grandis : M...L...R...L...G...A...K...K...I...A...G...L...A...---G...A...A...G...P...A...R...V...P...P...L...R...V...E...R...V...V...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 111
R. communis : M...L...R...L...V...S...K...R...I...L...G...---Q...V...S...P...R...V...Q...I...L...Q...C...V...E...R...V...I...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 107
P. trichoc : M...L...L...L...A...S...E...R...L...L...L...---S...Q...R...T...R...I...L...P...R...F...V...E...R...V...I...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 105
M. musculus : M...A...A...T...G...A...G...R...I...R...R...A...S...A...L...L...R...S...P...R...L...P...A...R...E...L...S...A...P...A...R...L...V...E...R...V...V...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 117
C. familiaris : M...A...A...A...G...A...G...R...I...R...R...A...S...A...L...L...R...S...P...R...L...P...A...R...E...L...S...A...P...A...R...L...V...E...R...V...V...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 116
H. sapiens : M...A...A...A...G...A...G...R...I...R...R...V...A...S...A...L...L...R...S...P...R...L...P...A...R...E...L...S...A...P...A...R...L...V...E...R...V...V...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...L...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...D...E...K...G...I...E...S...C...F...K...T...F...G...C...G...S...A...I...A...S...S...V...M...T...E...W...I...K...G...R...P...E...K...E... : 116
A. vinelandii : M...A...V...S...D...K...V...I...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...M...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...N...D...E...K...G...I...E...D...A...R...F...K...T...Y...G...C...G...S...A...I...A...S...S...L...T...E...W...M...K...G...R...P...E...K...E... : 84
E. coli : M...A...V...S...D...K...V...I...D...H...V...N...P...R...N...V...G...S...D...K...D...N...P...V...G...T...G...M...V...G...A...P...A...C...G...D...V...M...K...L...Q...I...V...N...D...E...K...G...I...E...D...A...R...F...K...T...Y...G...C...G...S...A...I...A...S...S...L...T...E...W...M...K...G...R...P...E...K...E... : 84
Yh V6dH5 NPRNVGs dk VG3G6VGAPACGDVM4LQI V1 G I Da FKT5GCGSAIASSS6aTEW6KG4 ee

```

```

P. patens : V...L...S...I...K...N...S...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...D...Y...Q...S...R...Q...I...L...V...I...T...M...V...L...K...I...E...I...I...M...V...H...F...I...N...T... : 178
A. thalian : V...L...I...K...N...T...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...E...K...R...V...K...T...N...G...A...A...A...G...---E...T...T...Q...A...--- : 167
O. sativa : V...W...I...K...N...T...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...E...K...R...K...L...A...Q...K...G...E...E...---A...E...A...--- : 171
P. sitchens : V...V...S...I...K...N...S...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...E...K...R...K...R...A...N...T...D...V...K...Q...E...E...---K...V...A...E...A... : 165
V. vinifera : V...L...S...I...K...N...T...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...E...K...R...A...K...T...E...--- : 155
E. grandis : V...L...S...I...K...N...T...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...E...K...R...A...K...L...D...G...S...S...D...S...A...K...D...A...P...L...E...K...A...A...D... : 173
R. communis : V...L...I...K...N...T...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...Q...K...R...K...L...N...G...S...D...A...R...---S...A...E...Q...A...R...E...V... : 166
P. trichoc : V...W...I...K...N...T...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...Q...K...R...A...K...L...S...G...V...S...E...T...E...---P...V...E...Q...A...Q...A... : 164
M. musculus : A...L...I...K...N...T...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...K...L...Q...E...S...K...E...P...E...R...K...--- : 168
C. familiaris : A...L...I...K...N...T...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...K...L...Q...E...P...K...E...E...A...E...K...K...--- : 167
H. sapiens : A...L...I...K...N...T...I...A...K...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...M...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...K...L...Q...E...P...K...G...E...A...E...K...K...--- : 167
A. vinelandii : A...E...L...I...K...N...T...I...A...E...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...V...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...K...R...K...G...L...V...--- : 128
E. coli : A...Q...A...I...K...N...T...I...A...E...L...L...P...P...V...K...L...H...C...S...L...A...E...D...A...I...K...A...A...V...D...Y...K...K...R...E...A...K...--- : 128
IKN3 IAK L LPPVK6HCS6LAEDAIAKA6 DY K

```

**TABLE****Table 1:** Primer sequences (5'-3') employed in RT-qPCRs. Target genes and expected amplicon lengths (bp) are indicated.

<b>Gene name</b>	<b>Amplicon length</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<i>ISAI</i>	130	GTAGATGACAAGCTCAGGTCTG	AACATCCTCAACTGCCTCC
<i>ISUI</i>	89	GAAAGGGAAGCAGATGGAGG	TGCAGTGTAACCTAACAGGTGG
<i>NFS1</i>	109	CATGGCTCATACTCAATTCG	CATCTCCCTTAGCTTCTCCAC
<i>RibL23a</i>	128	AAGGACCCTGAAGAAGGACA	CCTCAATCTTCTTCATCGCA
<i>His</i>	127	GAGCGTGGAGACGTACAAGA	GGCGAGTTTCTCGAAGATGT

## **CAPÍTULO II**

### **IscR COMO REGULADOR TRANSCRICIONAL EM *AZOTOBACTER VINELANDII***

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos pioneiros envolvendo a caracterização da proteína IscR foram inicialmente coordenados pela pesquisadora Patrícia Kiley da Universidade de Wisconsin, Madison-WI USA utilizando como modelo o microrganismo *E. coli*. Nestes trabalhos, IscR é descrita como um regulador transcricional que atua como repressor ou ativador da expressão gênica em mais de 40 genes. Entre os genes regulados neste organismo, estão genes com promotores induzidos anaerobicamente (como por exemplo, *dmsA*, *fdnG*, *frdA*, *hyaA*, *hybO*, *napF* e *narG*), relacionados a biossíntese de cofatores [Fe-S] (*iscR*, *sufA*, *yadR*, *yhgI*), responsivos a estresse oxidativo (*sodA* e *soxS*) e alguns com função desconhecida (*ydiU*, *yjiH* e *yqiI*; Giel *et. al.* 2006).

Schwartz *et al.* (2001) descreveram que a proteína codificada por *iscR* atua como um regulador negativo da maquinaria ISC de biossíntese de cofatores [Fe-S]. Diversas evidências suportam esta sugestão. Primeiramente, uma porção isolada de IscR contém um cofator do tipo [2Fe-2S]. Segundo, a proteína IscR possui similaridade de sequência primária com um família de reguladores transcricionais. Terceiro, a deleção de *iscR* resulta na expressão elevada de genes de montagem de cofatores [Fe-S] *in vivo*. Por fim, a inativação de *iscS* ou *hscA*, ambos necessários para a completa formação dos cofatores [Fe-S], também resulta na elevação dos transcritos dos genes de montagem dos cofatores. Estas observações reforçam o modelo de regulação por retroalimentação, onde a demanda para a maturação de proteínas Fe-S controla a expressão de genes cujos produtos são necessários para a formação dos cofatores [Fe-S].

Este modelo sugere também que o *pool* celular de proteínas Fe-S imaturas é mais eficaz no seqüestro de cofatores [Fe-S] produzidos pela maquinaria biossintética do que a proteína IscR imatura. A maneira como este processo é realizado é desconhecida, porém pode ser significativo o fato de que apenas três resíduos de cisteína estão localizados na sequência primária de *E. coli*, enquanto a maior parte das proteínas Fe-S possui quatro resíduos envolvidos na coordenação de cofatores [2Fe-2S].

Neste capítulo, será abordada a regulação exercida por IscR em *A. vinelandii*, tanto no seu próprio operon (*isc*) como em outros operons. Também serão analisadas as sequências promotoras dos genes regulados por IscR, bem como o requisito de ligação do cofator [Fe-S] em IscR para que ocorra a regulação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Linhagens de *Azotobacter vinelandii* e construções plasmidiais

As linhagens de *A. vinelandii* utilizadas neste trabalho, bem como os plasmídeos utilizados na construção de mutantes e a respectiva descrição dos genótipos estão listados na Tabela 1. As diferentes linhagens foram construídas por meio da técnica de “*Congression*”, que é definida como a transferência de dois marcadores genéticos simultaneamente. O procedimento envolve a co-transformação de células de *A. vinelandii* competentes com duas fontes diferentes de DNA, uma carregando a alteração desejada e outra um marcador seletivo, como por exemplo, resistência a antibióticos.

As linhagens DJ1421, DJ1601 e DJ1696 estavam previamente presentes no banco de linhagens do Laboratório do Dr. Dennis Dean, e as demais linhagens foram construídas neste trabalho. DJ1601 possui um deleção *in frame* de 120 pb no gene *iscR*, o que acarreta na perda dos resíduos de aminoácidos da posição 21 a 60 da proteína IscR.

As demais substituições foram produzidas por meio da técnica de mutagênese sítio dirigida. Para tal fim, foram realizadas reações de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para a mutação pontual desejada e um plasmídeo contendo o fragmento de DNA de interesse. A reação é tratada com a enzima *DpnI*, que digere o DNA parental metilado, e posteriormente analisada por restrição enzimática. Todos os plasmídeos tiveram suas sequências confirmadas também por meio de sequenciamento.

**Tabela 1:** Plasmídeos e Linhagens mutantes/selvagem de *Azotobacter vinelandii* utilizadas no presente estudo.

<b>Linhagem</b>	<b>Plasmídeo</b>	<b>Substituições de aminoácidos</b>	<b>Origem</b>
<b>DJ1421</b>	pDB1316	None	Laboratório Dennis R. Dean, Virginia Tech
<b>DJ1601</b>	pDB1490	$\Delta R$ , contém uma deleção em <i>iscR</i> de 120 pb <i>in-frame</i> (remove os aa 21-60)	Laboratório Dennis R. Dean, Virginia Tech
<b>DJ1696</b>	pDB1507	IscR C92A	Laboratório Dennis R. Dean, Virginia Tech
<b>DJ1950</b>	pDB1212	IscR C98A	Este estudo
<b>DJ1969</b>	pDB1518	IscR C104A	Este estudo
<b>DJ1973</b>	pDB1879	IscR H107A	Este estudo
<b>DJ1693</b>	pDB1523	IscR C111A	Este estudo
<b>DJ1971</b>	pDB1846	IscR C98/111A	Este estudo

## 2.2 Preparo de amostras e Extração de RNA

Células de *A. vinelandii* foram cultivadas em meio Burk a 32°C sob agitação de 300 rpm, utilizando-se glicose 2% como fonte de carbono. As células foram coletadas por centrifugação a 14000 rpm durante 5 minutos quando a cultura atingiu uma densidade ótica (OD) em 600nm igual a 0,8. Posteriormente o sedimento celular resultante foi ressuscitado em 2 volumes do reagente RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen) e novamente centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos. Os *pellets* foram estocados no freezer -20 °C para subsequente extração do RNA. O RNA total foi isolado utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen) segundo instruções do fabricante.

### 2.3 Sequenciamento do Transcritoma de *Azotobacter vinelandii*

O sequenciamento das amostras de RNA de *A. vinelandii* foi realizado pelo Virginia Bioinformatics Institute (VBI) da *Virginia Polytechnic Institute and State University* (Blacksburg, VA, EUA, utilizando-se a plataforma Illumina GA IIx (Illumina). A qualidade das amostras de RNA foi verificada com o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent), e foi considerado um *score* mínimo de 8 para *RNA Integrity Number* (RIN). Um total de 10 µg de RNA total para cada amostra, foi utilizado para a síntese de cDNA, conforme protocolo da Illumina. No sequenciamento, empregou-se uma réplica biológica. A normalização dos dados foi realizada pela equipe de bioinformatas do VBI, coordenada pelo professor Roderick Jensen.

Para complementar as análises e definirmos genes com diferença significativa no número de transcritos, foi calculado o logaritmo na base 2 ( $\log_2$ ) dos valores das diferenças de expressão, e foram considerados relevantes os genes que obtiveram valores menores que -2 ou maiores que +2.

### 2.4 Síntese de cDNA

Para fins de análises por RT-qPCR, 2 µg do RNA total das amostras de RNA de *A. vinelandii* foram tratadas com DNase I (Fermentas), conforme instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA total e utilizando-se oligo d(T<sub>18</sub>) como oligonucleotídeo iniciador. Antes de iniciar a transcrição reversa, RNA e oligonucleotídeo foram diluídos em água livre de RNase até um volume de 10µL e incubados a 70 °C por 5 minutos. Após este período, as amostras foram incubadas no gelo. A reação de transcrição reversa foi feita com a transcritase reversa do vírus Moloney da leucemia murina (M-MLV, do inglês, *Moloney Murine Leukemia Virus* - Promega) segundo instruções do fabricante, utilizando-se o termociclador RoboCycler Gradient 96 (Stratagene). O cDNA foi diluído 50 vezes antes de ser utilizado como molde nos experimentos de RT-qPCR.



## 2.5 Projeção de Oligonucleotídeos e Seleção dos Genes Constitutivos para RT-qPCR

Para acurada normalização da quantidade de transcritos após a qPCR, o programa NormFinder (Andersen *et al.* 2004) foi utilizado para auxiliar na seleção de dois genes mais estáveis entre quatro frequentemente utilizados como constitutivos em bactérias. Com base em trabalhos publicados, foram projetados primers para os seguintes genes: *gyrB*, *rpoB*, *rpoD* e 16S (Pyla *et al.* 2009). Os oligonucleotídeos foram projetados com base nas sequências destes genes conforme presentes no genoma de *A. vinelandii* e disponíveis no sítio do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Foi utilizado o software Integrated (IDT) SciTools Real Time PCR (<http://www.idtdna.com/order/predesignedassay.aspx?source=scitools>). Os oligonucleotídeos para 16S foram escolhidos com base no manuscrito publicado por Pyla *et al.* (2009). As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.

Gene	<i>Forward Primer (5'-3')</i>	<i>Reverse Primer (5'-3')</i>
<i>trmH</i>	CACATTCCCTCGGATCCTTC	GTGGTTTCCAGCTTTTCCTG
<i>cysE2</i>	TTGCTCGACCATCTGCAG	TCCTTGGCATGATAATCGCTG
<i>iscR</i>	TGCGACTGACAACCAAAGG	AGGTAGGAAAGGGAAATGCC
<i>iscS</i>	CTTCACTTTCGGTCGTTTAC	GACCCCATCCTTGTACATGTC
<i>iscU</i>	TGCAGATCAAGGTCAACGAG	GTTCTTGATGGTTTCGGCTTC
<i>iscA</i>	GTCGATCCCAAGAGCCTG	GTTGAACTTGAAGCCTTCGTTG
<i>hscB</i>	CCTACCAGACGCTGAAAAGTC	TCTTCACGCAACTCCATCTG
<i>hscA</i>	GTACCTTCGACATCTCCATCC	CCTGCTCGACAATCCAGTTG
<i>fdx</i>	ACCTGCCATGTGATAGTGC	CACCAGATCCTCAGTGCC
<i>iscX</i>	CCTGAAATGGACCGACGTAC	TGCAGGTTCGAGGAAATTGAG
<i>rpoB</i>	CCTGGAATACGTTGGCTACC	TGTCCTTGATCGCCTTGTTT
<i>rpoD</i>	GTTACCTGACCTATGCCGAG	AATACGTTGATCCCCATGTTCG
<i>gyrB</i>	CAGGAGCAGTACATCAAGGAC	CAGCTTTTCCAACGCAGC
16S	CACCTGGACCGATACTGACAC	CGAAGGCACCCATCAATCT
<i>fixA</i>	TCATCCGCAAGATCATGGAAG	CATAGGTGAGCAACTGGTAGTC
<i>petA</i>	GCTACTTCTGTCCCTGTCATG	TCCACGCCGACAATGATC

## 2.6 Experimentos de RT-qPCR

A abundância relativa de transcritos durante as qPCRs foi detectada com o emprego do corante intercalador SYBR Green I (Invitrogen) e as qPCRs foram realizadas em um volume final de 20  $\mu$ L no equipamento *7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando-se microplacas de 96 poços. As misturas de reação foram compostas de 10 $\mu$ L de cDNA (50 vezes diluído em água ultrapura), 0,025 mM de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs), 1 X tampão de reação, 0,25 U da *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0,1 X SYBR Green I e 200 nM de cada *primer*. As condições de reação utilizadas no experimento foram as seguintes: 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 seg (desnaturação), 10 seg de anelamento a 60°C e 15 seg de extensão a 72 °C. Ao término da PCR, análises de curvas de dissociação foram conduzidas para comprovação da especificidade de cada amplificação, utilizando-se o software que acompanha o equipamento da Applied Biosystems.

Quatro réplicas biológicas para cada cDNA amplificado foram analisadas e, para cada uma destas amostras, foram realizadas quatro réplicas experimentais. A expressão relativa dos genes foi calculada utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen 2001) e os genes referência foram selecionados com base nos valores de estabilidade determinados nas análises com o software NormFinder (Andersen *et al.* 2004).

Primeiramente, foi realizado um *screening* testando-se todos os genes do operon *isc* (*iscRSUA*, *hscBA*, *fdx* e *iscX*) e dois genes localizados a montante do mesmo (*trmH* e *cysE2*), com as linhagens mutantes para as cisteínas ligantes previamente descritas em *E. coli* (Cys<sup>92</sup>, Cys<sup>98</sup>, Cys<sup>104</sup>) e a deleção.

## 2.7 Análise das regiões promotoras de potenciais genes-alvo de IscR

As sequências a montante dos genes *nfuA*, *dsbA*, *cycB*, *cycA*, *hupB* e *parB* de *A. vinelandii* ou dos operons *hox*, *hyp*, *isc*, *fix* e *pet* regulados negativamente por IscR foram analisadas com a utilização da ferramenta BPROM (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) para a busca dos elementos conservados -35 e -10. Em cada uma das sequências, foi também localizada sequências similares às de *E. coli* descritas como sítios de ligação da proteína IscR (Giel *et al.* 2006).

## 2.8 Expressão e purificação da proteína recombinante IscR

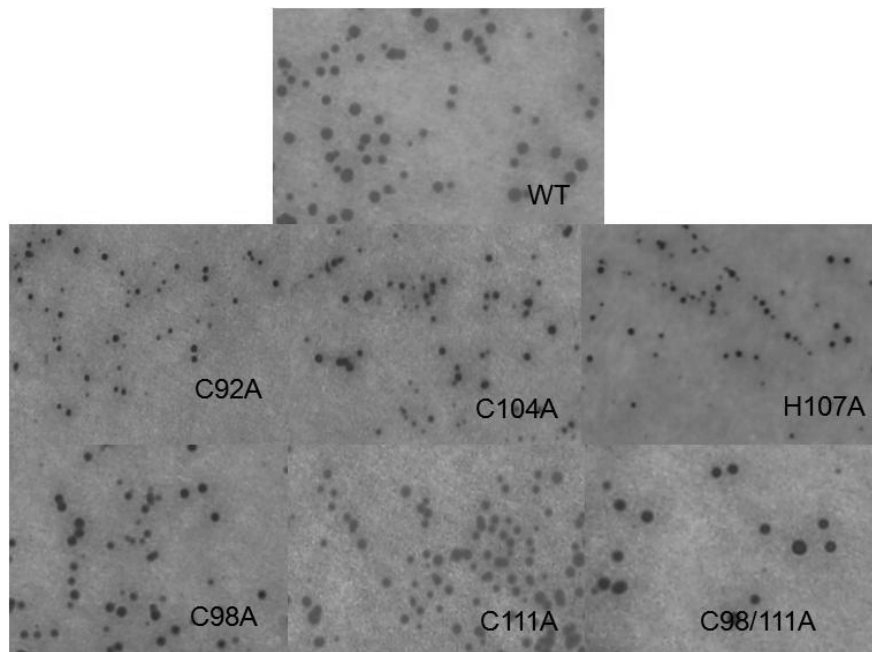
O plasmídeo pDB1037 (pET5A+::iscR) foi transformado em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3). Uma colônia foi utilizado para o pré-inóculo e o crescimento em frasco de 2 L contendo 500 mL de meio de cultura LB mais 100 µg/mL do antibiótico Ampicilina a 37 °C. A indução da expressão foi feita com lactose 1% quando as células atingiram uma OD<sub>600</sub> igual a 0.7. Quatro horas após a indução as células foram coletadas, centrifugadas e estocadas a -20°C para posterior análise.

O procedimento para a purificação se deu em condições de anaerobiose onde foram utilizados 20 gramas de células dissolvidas em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1M NaCl e os inibidores de protease PMSF (0.173g/mL) e pepstatina A (0.14mg/L). As células foram lisadas utilizando-se o equipamento Nano DeBEE (BEE International) O lisado foi centrifugado em tubos Ti 45, por 50 minutos a 35000 rpm. O sobrenadante foi coletado e aplicado em uma coluna de afinidade HisTrap FF 1mL. A lavagem da coluna foi realizada com 0.1M de imidazole e a proteína foi eluída com tampão contendo 50 mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.3M imidazole e pH 8. A eluição foi feita dentro de cuvetas de quartzo previamente degaseificadas. As frações coletadas foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie blue.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análise fenotípica de mutantes *iscR* de *Azotobacter vinelandii*

O fenótipo de cada uma das linhagens de *A. vinelandii* mutadas no gene *iscR* conforme Tabela 1 foi observado em placas de Petri contendo meio de cultura de Burk acrescido de glicose. As colônias foram fotografadas e seus tamanhos comparados às colônias formadas pela linhagem selvagem (DJ1421; Figura 1). As substituições C98A (DJ1950), C111A (DJ1693) e C98/111A (DJ1971) não produziram alteração fenotípica na morfologia de colônias, sendo que as mesmas apresentam coloração verde saudável. Por outro lado, as substituições C92A (DJ1696), C104A (DJ1969), H107A (DJ1973) e a deleção de 120 pb ( $\Delta R$ , DJ1601), levaram ao desenvolvimento de colônias pequenas e a coloração das mesmas foi marrom. Quando a multiplicação bacteriana foi monitorada em meio de cultura líquido, as linhagens com colônias menores (DJ1696, DJ1969, DJ1973 e DJ1601) apresentam um crescimento muito lento em relação ao tipo selvagem e as demais substituições.



**Figura 1:** Fenótipo das colônias em meio de cultura Burk-glicose

### 3.2 Transcritoma

Para a análise dos transcritomas de *A. vinelandii*, foram selecionadas três linhagens, a selvagem (DJ1421), a mutante contendo a deleção de 120 pb ( $\Delta R$ , DJ1601) e a mutante contendo a substituição C92A (DJ 1696). Amostras de RNA total foram preparadas a partir das culturas de cada linhagem e sequenciadas segundo protocolos e instrumentos Illumina. As sequências resultantes foram normalizadas e os principais genes regulados por IscR foram analisados. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3. Nesta Tabela, são mostrados valores de expressão absoluta e relativa. O dado de expressão absoluta representa o número de transcritos por contagem (*reads/counts*) normalizado pelo tamanho do gene. Esta normalização é importante, pois genes com maior extensão (pb) tendem a apresentar maior número de transcritos (*reads*). A expressão relativa é a razão do número de transcritos da amostra analisada frente ao tipo selvagem, e mostra quantas vezes o gene é mais expresso na linhagem com deleção ou substituição em relação à linhagem selvagem.

Os genes do operon *isc* são super expressos nas duas amostras mutantes testadas (DJ1601 e DJ1696), e variam de 14,78 a 4,47 vezes mais em relação à linhagem selvagem. A linhagem DJ1601 apresenta valores um pouco maiores que a linhagem DJ1696. Estes resultados são esperados, pois IscR é um regulador negativo do seu próprio operon, e a deleção de 120 pb do gene (DJ1601) exerce um efeito mais drástico sobre a atividade da proteína codificada do que a substituição C92A (DJ1696). Como pode ser observado na Tabela 3, o gene *nfuA* também teve sua expressão aumentada em ambas as amostras derivadas dos mutantes de *A. vinelandii*.

Os operons *petABC* e *fixABCX*, apresentaram padrão de expressão reduzida nas versões mutadas em relação à linhagem selvagem. Na linhagem DJ1601, os genes *pet* apresentaram uma diferença (*fold-change*) de 0,62 a 0,76 em relação aos seus equivalentes na linhagem selvagem, enquanto os genes *fix* exibiram diferenças de 0,32 a 0,35. Interessantemente, os genes *pet* e *fix* da linhagem DJ1696 apresentaram uma redução

ainda mais drástica, com valores de 0,08 a 0,07 e 0,02 a 0,04 respectivamente, em relação à selvagem (DJ1421)

Os genes dos operons *hox* (*hox*KGZMLOQRTV) e *hyp* (*hyp*ABFCDE) não apresentaram expressão significativamente reduzida na linhagem DJ1601. Porém, a linhagem DJ1696 exibiu reduções de quantidade de transcritos na ordem de 0,09 a 0,16 para os genes *hox* e de 0,24 a 0,67 para os genes *hyp*.

**Tabela 3:** Valores de expressão absoluta e relativa obtidos a partir das análises dos transcritomas de *Azotobacter vinelandii* DJ1421 (WT), DJ1601 (deleção de 120 pb) e DJ1696 (substituição C92A).

Genes		Linhagens				
		WT (DJ1421)	ΔR (DJ1601)		IscRC92A (DJ1696)	
			Expressão absoluta	Razão ΔR/WT	Expressão absoluta	Razão C92A/WT
<i>isc</i>	<i>iscR</i>	206,06	3046,10	14,78	2679,10	13,00
	<i>iscS</i>	421,79	9149,10	21,69	7109,53	16,86
	<i>iscU</i>	517,13	7074,84	13,68	5182,90	10,02
	<i>iscA</i>	401,82	4430,96	11,03	3671,02	9,14
	<i>hscB</i>	324,50	3884,33	11,97	3036,33	9,36
	<i>hscA</i>	258,73	2616,40	10,11	2393,93	9,25
	<i>fdx</i>	348,29	2829,63	8,12	2199,07	6,31
	<i>iscX</i>	245,62	1588,69	6,47	1097,75	4,47
<i>nfuA</i>		532,84	3600,95	6,76	3493,17	6,56
<i>pet</i>	<i>petA</i>	1349,32	832,37	0,62	100,94	0,07
	<i>petB</i>	1548,07	1072,26	0,69	103,64	0,07
	<i>petC</i>	1333,41	1012,78	0,76	104,04	0,08
<i>fix</i>	<i>fixA</i>	873,85	280,83	0,32	24,59	0,03
	<i>fixB</i>	790,34	275,78	0,35	31,84	0,04
	<i>fixC</i>	858,62	300,21	0,35	23,98	0,03
	<i>fixX</i>	1026,35	319,06	0,31	15,65	0,02

<i>hox</i>	<i>hoxK</i>	358,65	272,62	0,76	41,79	0,12
	<i>hoxG</i>	356,62	300,12	0,84	40,19	0,11
	<i>hoxZ</i>	266,53	226,07	0,85	28,66	0,11
	<i>hoxM</i>	147,71	115,99	0,79	15,51	0,10
	<i>hoxL</i>	78,63	51,10	0,65	12,02	0,15
	<i>hoxO</i>	153,28	117,30	0,77	22,81	0,15
	<i>hoxQ</i>	217,05	187,59	0,86	24,01	0,11
	<i>hoxR</i>	203,04	224,19	1,10	18,82	0,09
	<i>hoxT</i>	130,10	125,10	0,96	20,77	0,16
	<i>hoxV</i>	93,87	79,79	0,85	12,10	0,13
<i>hyp</i>	<i>hypA</i>	143,16	125,87	0,88	35,02	0,24
	<i>hypB</i>	148,44	124,87	0,84	35,66	0,24
	<i>hypF</i>	61,18	53,10	0,87	23,36	0,38
	<i>hypC</i>	63,73	69,05	1,08	42,41	0,67
	<i>hypD</i>	90,00	75,55	0,84	40,68	0,45
	<i>hypE</i>	110,69	85,85	0,78	41,79	0,38

A partir dos valores de  $\log_2$ , foram encontrados 48 genes com expressão alterada na linhagem DJ1601 e 89 genes na linhagem DJ1696. Destes, 23 apresentaram expressão alterada nas duas linhagens em relação a linhagem selvagem (Figura 2). A listagem completa dos genes seleccionados nesta análise está descrita na Tabela 4.



**Figura 2:** Diagrama de Venn com o número de sequências diferencialmente expressas nas linhagens mutantes DJ1601 e DJ1696 de *Azotobacter vinelandii*.

**Tabela 4:** Lista dos genes diferencialmente expressos nas linhagens DJ1601 e DJ1696

Locus tag	Anotação	Razão $\Delta R/WT$	Razão C92A/WT
<b>Genes com expressão diferencial nas duas linhagens mutantes DJ1601 e DJ1696</b>			
Avin13940	TonB-dependent receptor - transcription and binding proteins/ other	0.21	0.07
Avin40370	Co-chaperone Hsc20 HscB	11.97	9.35
Avin40340	hypothetical protein	6.46	4.46
Avin04800	hypothetical protein	0.15	0.04
Avin17040	ParB protein	0.23	0.24
Avin22980	Cobalamin synthesis protein	0.22	0.07
Avin01580	ABC transporter ATP-binding protein	5.10	6.68
Avin29210	hypothetical protein	0.20	0.11
Avin15360	hypothetical protein	0.20	0.19
Avin40390	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	13.68	10.02
Avin04210	hypothetical protein	8.38	14.39
Avin40350	Isc ferredoxin	8.12	6.31
Avin29180	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase	0.16	0.10
Avin29190	hypothetical protein	0.21	0.16
Avin13930	hypothetical protein	0.21	0.06
Avin40360	Fe-S protein assembly chaperone HscA	10.11	9.25
Avin29200	Trimeric LpxA-like superfamily protein	0.20	0.11
Avin23010	hypothetical protein	0.12	0.06
Avin40410	Iron-sulphur cluster assembly transcription factor IscR	14.78	13.00



Avin40380	Iron-sulfur biogenesis protein IscA	11.02	9.13
Avin06650	hypothetical protein	0.20	0.18
Avin28760	NfuA protein	6.75	6.55
Avin40400	Cysteine desulfurase IscS	21.69	16.85
<b>Genes com expressão diferencial somente na linhagem 1601</b>			
Avin01520	nitrogen fixation [2Fe-2S] ferredoxin, FeSII	4.623 E-05	0
Avin10760	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	4.09	2.45
Avin03910	esterase, poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	4.25	2.84
Avin07980	Iron-containing alcohol dehydrogenase	5.58	1.06
Avin12190	fructose-specific multiphosphoryl transfer protein	4.12	2.13
Avin24890	4-alpha-glucanotransferase	4.32	3.10
Avin24900	malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	5.29	2.91
Avin24910	glycogen synthase	4.12	2.23
Avin39700	2Fe-2S ferredoxin	0.17	0.26
Avin43320	glycolate oxidase FAD binding subunit , glcE	4.50	1.90
Avin38140	Bacterial outer membrane porin, OprD-family	0.23	0.31
Avin40090	outer membrane copper transport protein	0.21	0.33
Avin22830	TonB-dependent receptor	0.14	0.25
Avin25770	heat shock Hsp20 protein	4.16	2.09
Avin05680	Cytochrome c Catalase, CCC	4.02	1.99
Avin25630	MtbH-like protein	4.44	0.29
Avin04290	hypothetical protein	31.24	1.60
Avin33240	hypothetical protein	4.74	2.14
Avin00380	Flavoprotein, WrbA family	4.32	2.29
Avin29170	hypothetical protein	0.23	0.26

Avin01530	hypothetical protein	0.0002	0
Avin25640	Diaminobutyrate-2-oxoglutarate aminotransferase	4.70	1.51
Avin01570	hypothetical protein	2.61247 E-05	0
Avin22820	hypothetical protein	0.24	0.41
Avin27060	hypothetical protein	0.12	1.66
<b>Genes com expressão diferencial somente na linhagem 1696</b>			
Avin02000	Cytochrome c4	0.66	0.23
Avin10510	4Fe-4S ferredoxin, FixP	0.36	0.034
Avin10520	electron transfer flavoprotein beta-subunit, FixA	0.32	0.028
Avin10530	electron transfer flavoprotein, alpha subunit, FixB	0.34	0.04
Avin10550	FixX ferredoxin-like protein	0.31	0.015
Avin13060	ubiquinol-cytochrome c reductases, PetA	0.61	0.07
Avin13070	Cytochrome b/b6, PetB	0.69	0.06
Avin13080	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome c1, PetC	0.75	0.07
Avin47940	cytochrome c5 protein	0.67	0.11
Avin50480	hydrogenase nickel incorporation protein HypB	0.84	0.24
Avin50490	hydrogenase nickel incorporation protein HypA	0.87	0.24
Avin50500	hydrogenase expression/formation protein HoxV	0.84	0.12
Avin50510	hydrogenase expression/formation protein HoxT	0.96	0.15
Avin50520	rubredoxin-type Fe(Cys) <sub>4</sub> protein, HoxR	1.10	0.09
Avin50530	hydrogenase expression/formation protein HoxQ	0.86	0.11
Avin50540	hydrogenase expression/formation protein, HoxO	0.76	0.14

Avin50550	hydrogenase assembly chaperone HoxL	0.64	0.15
Avin50560	hydrogenase expression/formation protein, HoxM	0.78	0.10
Avin50570	Ni/Fe-hydrogenase, b-type cytochrome subunit, HoxZ	0.84	0.10
Avin50580	Membrane bound nickel-dependent hydrogenase, large subunit, HoxG	0.84	0.11
Avin50590	Uptake hydrogenase small subunit [Precursor], HoxK	0.76	0.11
Avin10540	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase, FixC	0.34	0.027
Avin04570	Dimethylmenaquinone methyltransferase	0.30	0.24
Avin43920	histone-like bacterial DNA-binding protein, hupB family	0.52	0.10
Avin24480	Type III restriction enzyme, res subunit - DNA metabolism	0.95	22.10
Avin23000	TatD-related deoxyribonuclease protein	0.26	0.13
Avin33460	general glycosylation protein	0.46	0.21
Avin10560	ferritin-like protein	0.34	0.031
Avin22970	RNA polymerase-binding DksA like protein	0.27	0.0831
Avin34440	carbon storage regulator, CsrA	0.66	0.21
Avin41840	Bacterial regulatory protein, LysR family	0.79	0.24
Avin24470	adinene-specific DNA-methyltransferase	0.92	29.56
Avin24510	cation efflux protein	1.72	4.77
Avin28680	hypothetical protein	0.58	0.23
Avin30180	hypothetical protein	0.26	0.06
Avin11740	hypothetical protein	0.81	0.076
Avin29570	hypothetical protein	0.35	0.24

Avin48810	conserved hypothetical protein		
Avin22990	conserved hypothetical protein		
Avin09722	DSBA oxidoreductase		
Avin35260	hypothetical protein		
Avin32010	hypothetical protein		
Avin32200	hypothetical protein		
Avin18080	hypothetical protein		
Avin31470	hypothetical protein		
Avin40900	hypothetical protein		
Avin08190	hypothetical protein		
Avin01250	hypothetical protein		
Avin43790	hypothetical protein		
Avin04810	hypothetical protein		
Avin43270	hypothetical protein		
Avin10400	conserved hypothetical protein		
Avin24950	hypothetical protein		
Avin30310	hypothetical protein		
Avin11730	conserved hypothetical protein		
Avin03250	YceI-like protein		
Avin07210	hypothetical protein		
Avin10450	hypothetical protein		
Avin23900	hypothetical protein		
Avin17070	hypothetical protein		
Avin11720	hypothetical protein		
Avin24460	hypothetical protein		

Avin23270	hypothetical protein		
Avin22920	hypothetical protein		
Avin45810	conserved hypothetical protein		
Avin15320	conserved hypothetical protein		
Avin22830	TonB-dependent receptor		
Avin25770	heat shock Hsp20 protein		
Avin05680	Cytochrome c Catalase, CCC		
Avin25630	MtbH-like protein		
Avin04290	hypothetical protein		
Avin33240	hypothetical protein		
Avin00380	Flavoprotein, WrbA family		
Avin29170	hypothetical protein		
Avin01530	hypothetical protein		
Avin25640	Diaminobutyrate-2-oxoglutarate aminotransferase		
Avin01570	hypothetical protein		
Avin22820	hypothetical protein		
Avin27060	hypothetical protein		

### 3.3 Avaliação do Padrão de Expressão Gênica de *Azotobacter vinelandii* por RT-qPCR

Previamente ao sequenciamento do transcrito das diferentes linhagens de *A. vinelandii*, um *screening* por RT-qPCR, analisando-se os genes do operon *isc* e dois genes localizados a montante deste operon, *trmH* e *cysE2*, foi realizado. Para a confirmação dos dados obtidos no sequenciamento do transcrito e verificação das demais linhagens, a técnica de RT-qPCR foi empregada. Os genes escolhidos para tal análise foram *iscS* e *fixA*. Os genes *gyrB* e *rpoD* foram selecionados para a normalização das amostras devido

aos baixos valores de variação da expressão obtidos na análise segundo o *software* NormFinder, os quais foram de 0,01928 e 0,01163 respectivamente.

Não foram observadas alterações nas quantidades momentâneas de mRNA para *iscS* nas amostras obtidas a partir das linhagens mutantes DJ1950 (C98A), DJ1693 (C111A) e DJ1971 (C98/111A). Nas linhagens DJ1696 (C92A), DJ1969 (C104A), DJ1973 (H107A) e DJ1601 ( $\Delta$ R), a expressão relativa de *iscS* aumentou em torno de 4,05, 9,82, 10,24 e 13,40 vezes, respectivamente.

Transcritos derivados do gene *fixA* foram amplificados a partir das amostras de RNA de todas as linhagens. Os níveis de mRNA para *fixA* apresentaram redução nas linhagens com expressão aumentada do gene *iscS*. A diferença observada foi de 0,03 em DJ1696 (C92A), 0,07 em DJ1969 (C104A), 0,04 em DJ1973 (H107A) e 0,55 vezes na linhagem DJ1601 ( $\Delta$ R) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Valores de expressão relativa normalizados com os genes *rpoD* e *gyrB*.

Gene Linhagem	<i>iscS</i>	<i>fixA</i>
DJ1421 (WT)	1,01 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,08
DJ1969 (C104A)	9,82 $\pm$ 1,97	0,07 $\pm$ 0,02
DJ1973 (H107A)	10,24 $\pm$ 1,05	0,04 $\pm$ 0,00
DJ1696 (C92A)	4,05 $\pm$ 0,97	0,03 $\pm$ 0,01
DJ1601 ( $\Delta$ R)	13,40 $\pm$ 1,54	0,55 $\pm$ 0,15
DJ1950 (C98A)	1,07 $\pm$ 0,17	1,07 $\pm$ 0,16
DJ1693 (C111A)	0,92 $\pm$ 0,07	0,82 $\pm$ 0,18
DJ1971 (C98/111A)	1,35 $\pm$ 0,41	1,22 $\pm$ 0,16

### 3.4 Análise das regiões promotoras de operons e genes regulados por *IscR*

Os genes regulados por IscR (dados obtidos no sequenciamento do transcrito) tiveram sua região promotora analisada, para a busca das sequências promotoras -10 e -35, e comparada com as sequências consenso dos motivos de ligação à proteína IscR descritos para *E. coli* (tipo I: ATASYYGACTR<sub>www</sub>YAGTCRRSTAT e tipo II: AWARCCCYTSnGTTTGMnGKKKTKWA). Os principais resultados obtidos para aqueles onde foi encontrado o motivo de ligação, estão descritos na Tabela 6. Com exceção dos genes *fixP* e *cycB*, todos os outros possuem domínios de ligação do tipo I e sequências -10 e -35 preditas.

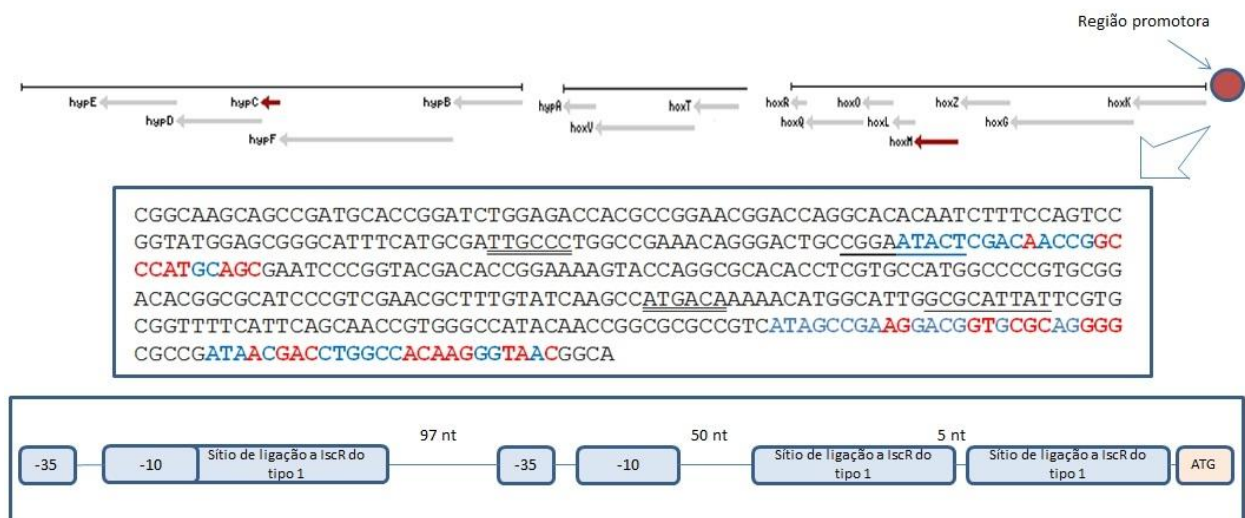
O gene *hoxK*, é parte do operon *hox* composto por 10 genes e este, por sua vez, fica a montante do operon *hyp*, composto por 6 genes. Na região promotora de *hox*, foram encontradas três sequências similares ao motivo de ligação a IscR do tipo I, bem como duas sequências -10 e -35. O segundo e o terceiro motivo estão separados por apenas 5 nucleotídeos (Figura 3).

**Tabela 6:** Motivos de ligação putativos a proteína IscR encontrados nas regiões promotoras dos genes regulados negativamente, segundo a redução de transcritos observada nas amostras com o transcrito sequenciado.

Região promotora	Sequência -10	Sequência -35	Motivo putativo de ligação a IscR	Tipo	nt para ATG/GTG/ATT*
<i>Ec. iscR</i>	CAGACT	TTGACC	<b>ATASYYGACTR<sub>www</sub>YAGTCRRSTAT</b>	I	83
<i>iscR</i>	TTGCATACT	TTGATC	ATAGTTGATCCTGTTTGTCTGGGTAT ATACTCGACGTACATCAGCGATTCC	I	~5
<i>fixP</i>	TTTTATATT	TTATCT	AAAAATCCTCTGTTTCGGGTGTGGTA	II	57
<i>nfuA</i>	GCGTACACT	TTTATC	ATACTAGGACTTTATCCCAAGGGGG	I	39
<i>hoxK</i>	CGGAATACT	TTGCCC	ATACTCGACAACCGGCCCATGCAGC	I	234
	GCGCATTAT	ATGACA	ATAGCCGAGGACGGTGCGCAGGGG		33
			ATAACGACCTGGCCACAAGGGTAAC		3
<i>dsbA</i>	GAATATAAT	TTAATT	ATAGTCTGCTTGTCTGATGCTATAA	I	229
<i>cycB</i>	GGTTATACT	TTTCAG	AAAACCCGTGGCCGCGGGCGCACGTA	II	40

\* a contagem inicia-se após o motivo

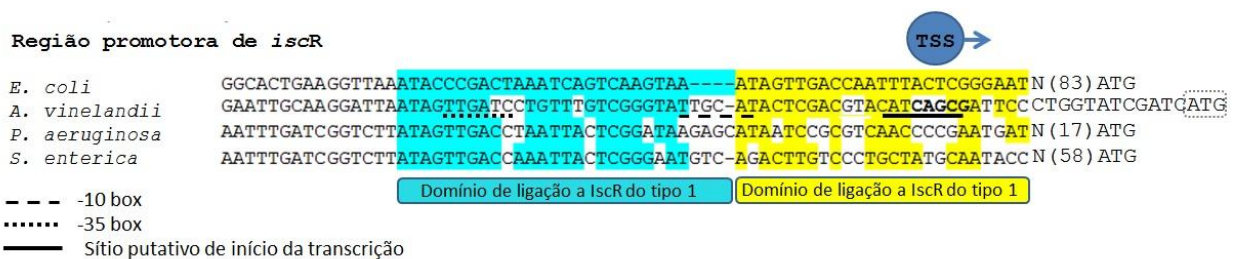
(i) As cores representam a relação com o motivo de *E. coli*: Verde (conservado), Vermelho (não conservado) e Roxo (não existe); (ii) S=G/T, Y=C/T, R=A/G.



**Figura 3:** Organização gênica e região promotora dos operons *hox* e *hyp*. Sublinhado duplo representa a sequência -35, e sublinhado simples a sequência -10 do promotor. A cor azul representa nucleotídeos conservados com o motive de *Escherichia coli*, enquanto vermelho representa os não conservados.

O gene *iscR* possui uma região promotora similar a de *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica*, pois também possui dois domínios de ligação a IscR (Figura 4). Esses dois domínios são do tipo I, estão espaçados em *A. vinelandii* por 3 nucleotídeos e sobrepõem a sequência característica de promotores -10. Neste mesmo organismo, o códon de início da proteína é um ATG e se localiza próximo (aproximadamente 5 nucleotídeos) ao segundo domínio putativo de ligação à proteína IscR.

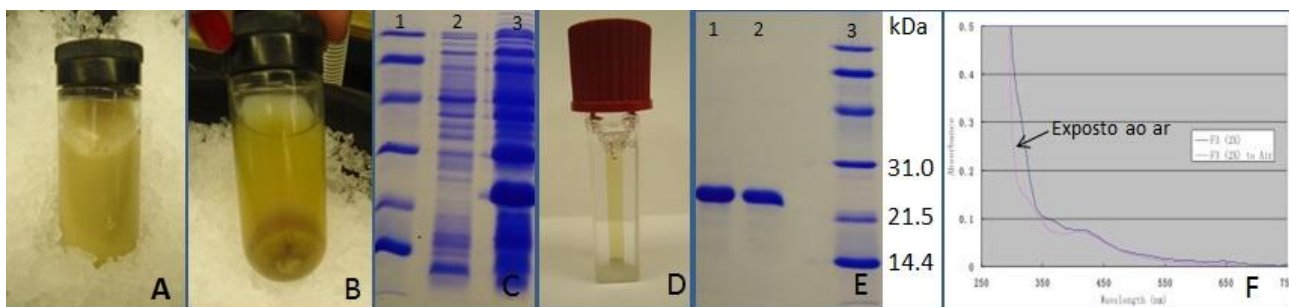




**Figura 4:** Alinhamento parcial das sequências promotoras do gene *iscR* de diferentes organismos, com indicação das regiões -35 e -10 de *A. vinelandii*.

### 3.5 A proteína recombinante IscR

Os *pellets* de células de *E. coli* na qual foi superexpressa a proteína IscR de *A. vinelandii*, apresentavam cor mais escura em relação ao *pellet* obtido de culturas não induzidas com lactose (controle negativo da expressão) condizente com a presença do cofator [2Fe-2S]. O extrato bruto obtido após a lise das células foi analisado em SDS PAGE 12% e IscR apresentou uma superexpressão consistente na fração solúvel (Figuras 5A, B e C). Posteriormente procedeu-se com a purificação da proteína. O sobrenadante do lisado inicial, ainda apresentava coloração escura e foi submetido a uma coluna de afinidade sendo a proteína IscR eluída com 300mM de imidazol. A mesma apresentava coloração amarelada e o peso molecular esperado (~25 kDa; Figuras 5D e E). A coloração observada desaparece gradualmente quando a proteína é exposta ao



oxigênio. O espectro UV permitiu observar que após a purificação, a ocupância do cofator é baixa, indicando que este é extremamente lábil (Figura 5F) .

**Figura 5:** Representação das diversas etapas de purificação da proteína recombinante IscR. (A) Lisado; (B) Extrato cru e *pellet*; (C) 1- Marcador de peso molecular, 2-cultura controle não induzida e, 3- cultura induzida; (D) Proteína eluída com 300 mM de imidazol apresentando coloração amarela; (E) Gel SDS-PAGE 12%, 1 e 2- Proteína IscR, 3- Marcador de peso molecular; (F) Espectro UV logo após a purificação da proteína IscR (linha azul) e após ser exposta ao oxigênio (linha rosa).

#### 4. DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, foi demonstrado que IscR atua como proteína reguladora por mecanismo de retroalimentação da expressão do operon *isc* em *E. coli* (Schwartz *et al.* 2001, Giel *et al.* 2006, Nesbit *et al.* 2009). Com o intuito de determinar se o mesmo modelo de regulação IscR-dependente é válido para *A. vinelandii*, foram geradas e analisadas linhagens mutantes desta bactéria contendo substituições ou deleção de parte da proteína.

De acordo com os dados obtidos nos experimentos de RT-qPCR e a análise fenotípica das colônias selvagem e mutantes de *A. vinelandii* em meio de cultura de Burk-glicose, foi possível verificar que os resíduos de ligação do cofator [Fe-S] a IscR são Cys<sup>92</sup>, Cys<sup>104</sup> e o resíduo Hys<sup>107</sup>. As colônias das linhagens mutantes com substituição nestes aminoácidos apresentaram-se muito menores do que as colônias da linhagem selvagem ou mesmo das com substituições Cys<sup>98</sup>, Cys<sup>111</sup> ou Cys<sup>98/111</sup>, além de apresentarem uma coloração mais marrom. Devido ao fato do fenótipo das colônias ser visível somente em meio sólido e não em meio líquido, optamos por utilizar a terminologia “menor” ao invés de “lento crescimento”. O fenótipo alterado dos mutantes de *A. vinelandii*, por tamanho de colônias e pela coloração das mesmas, pode ser atribuído ao fato de que a super produção de proteínas Fe-S leva à produção de níveis tóxicos de Fe e sulfeto que só podem ser diminuídos com a inativação da maquinaria de montagem de cofatores [Fe-S].

Nos experimentos de RT-qPCR, a expressão relativa dos genes do operon *isc* se mostrou aumentada para as substituições Cys<sup>92</sup>, Cys<sup>104</sup> e His<sup>107</sup>, bem como para a deleção parcial de *iscR* ( $\Delta R$ ). Por outro lado, não foram observadas diferenças entre a linhagem selvagem e as mutantes com as demais substituições. Isto indica que quando qualquer um dos resíduos de ligação ao cofator [Fe-S] é substituído, o mesmo não é capaz de ser ligado, e a atividade repressora de IscR sobre o operon *isc* é perdida. Em *E. coli*, o cofator [2Fe-2S] é ligado pelos resíduos Cys<sup>92</sup>, Cys<sup>98</sup>, Cys<sup>104</sup> (Nesbit *et al.* 2009). Em *Acidithiobacillus ferrooxidans* IscR possui um quarto aminoácido ligante, o resíduo Glu43, devido a falta de Fe ligado à proteína no mutante IscR-Glu43Ala (Zeng *et al.* 2008). Entretanto, Glu 43 não é ligante em *E. coli*, pois a proteína IscR purificada e com a mesma substituição possui 25% de ocupância do cofator [2Fe-2S]. Concordando com os dados obtidos neste trabalho, a proteína de *E. coli* com a substituição H107A quando purificada não possui cofator [Fe-S] ligado (dados não publicados de Angela Fleischhacker, Patricia Kiley's Lab, University of Wisconsin - Madison, Estados Unidos). Portanto, para *E. coli*, a His<sup>107</sup> pode ser um ligante adicional às três cisteínas já anteriormente descritas.

Os dados do transcrito permitiram indicar que a deleção ( $\Delta R$ ) ou substituição C92A de IscR não causam grandes alterações na expressão gênica de vários genes-alvo em *A. vinelandii*.

Os principais genes que tiveram sua expressão significativamente alterada foram *iscRSUAX*, *hscBA*, *fdx*, *nfuA*, *petABC*, *fixPABCX*, *hoxKGZMLOQRTV* e *hypABFCDE*.

Para os genes do operon *isc*, a alteração  $\Delta R$  (DJ1601) teve maior efeito do que a substituição C92A (DJ1696), pois os valores da razão entre o nível de transcritos da linhagem deletéria e a linhagem selvagem, foram maiores do que os valores encontrados para a amostra com a substituição. A deleção de IscR representa a perda de função das duas formas de IscR, apo e holo, enquanto a substituição C92A (DJ1696) representa somente a perda de função da holo-proteína. Experimentos de ressonância paramagnética mostraram que a proteína IscR contém um cofator [2Fe-2S] que, assim como a grande maioria dos cofatores [Fe-S], pode ser reversivelmente oxidado e reduzido. Além disso, a inativação da maquinaria ISC de biossíntese de cofatores, diminui a repressão do promotor de *iscR*, sugerindo que o cofator [2Fe-2S] é necessário para a função repressora de IscR (Schwartz *et al.* 2001). Consistente com esta observação são os dados experimentais que sob limitação de Fe ou S o promotor de *iscR* deixa de ser reprimido (Outten *et al.* 2004, Gyaneshwar *et al.* 2005). Com base nos dados anteriormente expostos, Schwartz *et al.* (2001) propuseram um mecanismo de regulação exercido por IscR. Quando as proteínas do sistema ISC (IscSUAX, HscBA e Fdx), Fe<sup>+2</sup> e cisteína têm suas concentrações intra-celulares aumentadas, a proteína IscR adquire um cofator [Fe-S] e, assim, pode reprimir a transcrição do seu próprio operon e de outros genes (*iscRSUA-hscBA-fdx-iscX*).

O genoma de *A. vinelandii* contém genes que codificam para duas hidrogenases [NiFe]. Por outro lado, não possui genes preditos capazes de codificar os tipos [FeFe] ou [Fe] (Setubal *et al.* 2009). As hidrogenases catalisam a oxidação de hidrogênio molecular (H<sub>2</sub>), e os elétrons liberados são transportados na cadeia transportadora de elétrons até moléculas de oxigênio (O<sub>2</sub>). Os genes estruturais da hidrogenase [NiFe] são *hoxKG*, os quais estão localizados num grande operon denominado *hox* (do inglês, *hydrogen oxidation*) juntamente com *hoxZMLOQRTV* e *hypABFCDE*, que codificam proteínas acessórias, componentes da cadeia transportadora de elétrons e proteínas para a biossíntese de cofatores [Fe-S] e maturação da hidrogenase (Menon *et al.* 1992, Setubal *et al.* 2009). O nível de transcritos dos genes do *hoxKGZMLOQRTV* aumentou em torno de 5 vezes quando *A. vinelandii* foi cultivado em condições de fixação de nitrogênio.

Esta hidrogenase ligada à membrana provavelmente recicla o hidrogênio produzido pela nitrogenase na redução do nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>) (Hamilton *et al.* 2011).

Diversos genomas microbianos foram sequenciados e muitos genes que codificam proteína Fe-S do tipo Rieske (que são subunidades do complexo do citocromo tipo *bc* ou oxigenases) foram anotadas. Por esse motivo, é sugerido que a existência de múltiplas proteínas Rieske em procariotos permite que estes organismos adaptem suas cadeias de transferência de elétrons durante as mudanças nas condições ambientais (Schneider and Schmidt 2005). Na maioria das bactérias, o complexo *bc1* é constituído por três subunidades, uma proteína Fe-S, o citocromo *b* e o citocromo *c*, que são codificados por três genes estruturais denominados *petA*, *petB* e *petC* respectivamente. Estes genes estão localizados no mesmo operon *petABC* (Daldal *et al.* 1987). O complexo *bc1* e seu homólogo, o complexo *b6f*, são componentes chaves das cadeias transportadoras de elétrons respiratória e fotossintética, devido ao fato de contribuírem para a geração de um gradiente eletroquímico utilizado pela ATP sintase na produção de ATP. O complexo *bc1* possui dois domínios catalíticos, um de oxidação da ubihidroquinona (Q<sub>o</sub>) e outro de redução da ubiquinone (Q<sub>i</sub>). Foi proposto que o domínio extrínscico da subunidade Fe-S, que contém um cofator [2Fe-2S] move-se durante a catalize. (Darrouzet *et al.* 2000).

Os maiores avanços nessa área têm sido direcionados ao entendimento da estrutura e da função do complexo *bc1*, especialmente, devido à resolução das estruturas tridimensionais. A comparação de diversas estruturas no qual o domínio [2Fe-2S] da subunidade Fe-S ocupa diferentes posições, e diversos dados biofísicos e bioquímicos permitiram a descoberta da função da subunidade Fe-S do complexo *bc1*, o transporte de elétrons (ou, em inglês, *electron shuttle*; Kim *et al.* 1998, Iwata *et al.* 1998, Valkova-Valchanova *et al.* 1998, Zhang *et al.* 1998, Darrouzet *et al.* 2000). Por outro lado, a relação entre o sistema de biossíntese de cofatores [Fe-S] e esse complexo transportador de elétrons ainda não foi elucidada.

Os genes do operon *fix* codificam proteínas constituintes dos sistemas transportadores de elétrons e provavelmente fornecem equivalentes redutores para a nitrogenase (Keminski *et al.* 1988). O promotor deste operon possui sítios de ligação para um fator sigma 54 ( $\sigma^{54}$ ), representados pelas sequências TGGTAC (-24) e TTGCA (-12). Nesta mesma região, também foi encontrado um motivo putativo de ligação a IscR do tipo II. Porém a relação entre o fator  $\sigma^{54}$  e a regulação exercida pela proteína IscR não é clara. Em *Rhizobium meliloti*, foi sugerido que as

proteínas Fix atuam conjuntamente para a transferência de elétrons da fonte de carbono para a nitrogenase, e que os genes *fixA*, *fixB* e *fixC* estão envolvidos diretamente no processo de fixação do nitrogênio e não somente requeridos para a manutenção da nodulação ou maturação (Earl *et al.* 1987). O gene *fixX* possui função predita de ferredoxina, pois possui alto grau de homologia com a ferredoxina I de *A. vinelandii*. O operon *fix* codifica proteínas que formam um complexo de transferência de elétrons necessário para o suporte da fixação de nitrogênio em alguns organismos diazotróficos (Kaminski *et al.* 1988). Durante o crescimento diazotrófico, Hamilton *et al.* (2011) observaram um grande aumento no nível de transcritos dos genes *fixPABCX*, de aproximadamente 231 vezes. No crescimento diazotrófico de *A. vinelandii* dependente de molibdênio (Mo), foi observado um aumento de 40 vezes no número de transcritos deste operon .

Em nosso estudo, tanto nos dados de sequenciamento quanto nos experimentos de RT-qPCR, os genes dos operons *fix*, *pet*, *hox* e *hyp* apresentaram moderada redução na transcrição quando parte de IscR foi deletada (mutante  $\Delta R$ ). Porém uma drástica diminuição foi observada quando a Cys92 foi substituída por Ala. A partir destes resultados, podemos concluir que IscR na sua apo-forma atua como repressor destes operons.

Em *E. coli*, além das maquinarias ISC e SUF, existem duas proteínas envolvidas na biossíntese de cofatores [Fe-S] cujos genes são regulados por IscR, *erpA* e *nfuA*. ErpA é uma proteína carreadora do tipo A, que apresenta similaridade de sequência com as proteínas IscA e SufA, porém somente a porção N-terminal de NfuA é similar a proteínas carreadoras do tipo A. A porção C-terminal da proteína NfuA de *E. coli* apresenta similaridade com o domínio Nfu da proteína NifU de *A. vinelandii*. NfuA representa uma nova classe de proteínas arcabouço envolvida na maturação de proteínas Fe-S (como por exemplo, a aconitase), capaz de ligar cofatores do tipo  $[4Fe-4S]^{+2}$ . Esta proteína é também essencial para *E. coli* sobreviver a limitação de Fe e ao estresse oxidativo (Angelini *et al.* 2008). A expressão do gene *nfuA* em *E. coli* é menor em condições anaeróbicas de cultura (Giel *et al.* 2006). A adição de paraquat e 2,2'-dipiridila em culturas de *E. coli*, faz com que *nfuA* tenha sua expressão aumentada em torno de duas vezes, e essa resposta é mediada e dependente de IscR. O estresse oxidativo e a limitação de Fe, diminuem a concentração intracelular de holo-IscR, favorecendo a forma apo-IscR, que não se liga ao promotor de *nfuA* (Angelini *et al.* 2008).

Em *A. vinelandii*, a atividade da aconitase, uma enzima que contém o cofator do tipo [4Fe-4S], é diminuída nas linhagens com inativação do gene *nfuA* (Bandyopadhyay *et al.* 2008). Neste mesmo organismo, verificamos que a expressão de *nfuA* também é regulada por IscR (dados do transcriptoma), pois foi observado um aumento na expressão deste gene na linhagem com DJ1601 e na linhagem com a substituição C92A. Porém, esse aumento parece não ter relação com a apo-forma de IscR e sim ser dependente da ligação do cofator [Fe-S], bem como ocorre na regulação do operon *isc*.

Estudos preliminares sugerem que a ligação do cofator [2Fe-2S] em IscR é necessária para a repressão do promotor de seu próprio gene codificador, o qual contém um sítio de ligação do tipo I (Schwartz *et al.* 2001, Giel *et al.* 2006). Porém foi identificado um segundo motivo de ligação ao qual IscR pode se ligar, e este é chamado de tipo II. Para o motivo tipo II, Nesbit *et al.* (2009) descreveram que a ligação do cofator [2Fe-2S] não é necessária para a regulação dos promotores dos genes *sufA*, *ydiU*, *hyaA*, *napF* e *hybO* de *E. coli*. Os motivos de ligação de IscR nos promotores foram encontrados em outros genomas e, como esperado, especialmente na região a montante do operon *iscRSUA* de diversos organismos (Giel *et al.* 2006).

Como mencionado anteriormente, além do promotor *PiscR*, o operon *isc* possui um segundo promotor interno, localizado a montante dos genes *hscBA fdxiscX*. É sabido, e foi mostrado nos dados do transcriptoma e de RT-qPCR que IscR também regula este promotor interno, porém não é clara a maneira como isto ocorre e como esta regulação é relacionada com a regulação do restante do operon *isc*. De acordo com outros dados do nosso grupo de pesquisa, podemos concluir que a expressão primária de *hscBA fdx* e *iscX* é controlada pelo promotor *PiscR*, e a expressão secundária é controlada por IscR e outros fatores regulatórios para modular a expressão desses genes em resposta as demandas do crescimento celular.

Conforme os dados obtidos neste trabalho, não existe uma clara relação entre a regulação transcricional por IscR e o tipo de motivo de ligação em promotores de genes alvo em *A. vinelandii*. Tanto operons com sequência do tipo I (*pet*, *hox*, *hyp* e *isc*), assim como aqueles que apresentam motivos do tipo II são regulados da mesma forma. Em *E. coli*, parece haver uma relação entre o tipo de sequência do motivo de ligação de IscR e a forma (apo ou holo) da proteína que será ligada. Neste organismo, a proteína IscR não requer o cofator [2Fe-2S] para

regular promotores que contém o sítio de ligação do tipo II, e provavelmente, a ligação é dificultada pois ocorre na forma de dois dímeros (Nesbit *et al.* 2009).

A região a montante do operon *hox* possui 3 domínios putativos de ligação a IscR, todos pertencentes ao tipo I. O operon *hyp*, que codifica proteínas acessórias para a hidrogenase [NiFe], utiliza o mesmo promotor que os genes *hox*, e é possível que estes três sítios estejam envolvidos na regulação diferencial dos genes *hox* e *hyp*. Porém até o momento não existem evidências experimentais para comprovar esta hipótese.

## 5. CONCLUSÕES

Concluindo, este trabalho permitiu-nos enriquecer o entendimento do papel de IscR na regulação da biossíntese de cofatores [Fe-S] e de outros operons em *A.vinelandii*, bem como a importância do cofator [Fe-S] para que tal regulação. Os operons *fix*, *pet*, *hox* e *hyp*, aparentemente não possuem relação com a biossíntese de cofatores [Fe-S], porém são regulados por IscR e possuem uma característica em comum, codificam proteínas envolvidas nas cadeias transportadoras de elétrons que dependem de uma ou mais proteínas Fe-S. A apo-forma de IscR é repressora dos operons *pet*, *fix*, *hox* e *hyp*, porém a relação entre as IscR e as proteínas destes operons não é clara.

Os aminoácidos ligantes do cofator [2Fe-2S] na proteína IscR de *A.vinelandii* diferem daqueles encontrados em *E.coli*, são Cys<sup>92</sup>, Cys<sup>104</sup> e His<sup>107</sup>. A substituição de qualquer um dos resíduos ligantes ocasiona alterações fenotípicas das colônias de *A. vinelandii* como a perda da coloração característica e diminuição dos tamanhos quando cultivadas em meio sólido.

Como trabalho futuro, deverão ser realizados experimentos de *gel-shift* para a determinação experimental dos sítios de início de transcrição, bem como, a validação das sequências de ligação da proteína IscR na região promotora dos operons estudados. Para fins de comprovação bioquímica da perda do cofator perante as substituições dos resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do cofator [2Fe-2S] a IscR, deverão ser purificadas versões recombinantes das proteínas com as substituições, e seus espectros UV comparados ao espectro da proteína selvagem.



## 6. REFERÊNCIAS

Andersen, C.L. ; Jensen J.L.; Orntoft, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 64:5245-5250, 2004.

Angelini, S.; Gerez, C.; Ollagnier-de-Choudens, S.; Sanakis, Y.; Fontecave, M.; Barras, F.; Py, B. NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in *Escherichia coli* under oxidative stress and iron starvation conditions. *J. Biol. Chem.*, 283 (20):14084-14091, 2008.

Bandyopadhyay, S.; Naik, S.G.; O'Carroll, I.P.; Huynh, B.H.; Dean, D.R.; Johnson, M.K.; Dos Santos, P.C. A proposed role for the *Azotobacter vinelandii* NfuA protein as an intermediate iron-sulfur cluster carrier. *J. Biol. Chem.*, 283 (20):14092-14099, 2008.

Daldal, F.; Davidson, E.; Cheng, S. Isolation of the structural genes for the Rieske Fe-S protein, cytochrome b and cytochrome c1 all components of the ubiquinol: cytochrome c2 oxidoreductase complex of *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Mol. Biol.*, 195:1-12, 1987.

Darrouzet, E.; Valkova-Valchanova, M.; Moser, C.C.; Dutton, P.L.; Daldal, F. Uncovering the [2Fe2S] domain movement in cytochrome bc1 and its implications for energy conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:4567-4572, 2000.

Earl, C.D.; Ronson, C.W.; Ausubel, F.M. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* fixA, fixB, fixC and fixX genes. *J. Bacteriol.*, 169:1127–1136, 1987.

Giel, J.L.; Rodionov, D.; Liu, M.; Blattner, F.R.; Kiley, P.J. IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O<sub>2</sub>-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 60 (4):1058–1075, 2006.

Gyaneshwar, P.; Paliy, O.; McAuliffe, J.; Popham, D.L.; Jordan, M.I.; Kustu, S. Sulfur and nitrogen limitation in *Escherichia coli* K-12: specific homeostatic responses. *J. Bacteriol.*, 187:1074–1090, 2005.

Hamilton, T.L. ; Ludwig, M. ; Dixon, R. ; Boyd, E.S. ; Dos Santos, P.C. ; Setubal, J.C. ; Bryant, D.A.; Dean, D.R.; Peters, J.W. Transcriptional Profiling of Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 193:4477-4486, 2011.

Iwata, S.; Lee, J.W.; Okada, K.; Lee, J.K.; Iwata, M.; Rasmussen, B.; Link, T.A.; Ramaswamy, S.; Jap, B.K. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Science*, 281:64–71, 1998.

Kaminski, P.A.; Norel, F.; Desnoues, N.; Kush, A.; Salzano, G.; Elmerich, C. Characterization of the *fixABC* region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 and identification of a new nitrogen fixation gene. *Mol. Gen. Genet.*, 214:496-502, 1988.

Kim, H.; Xia, D.; Yu, C-A.; Xia, J-Z.; Kachurin, A.M.; Zhang, L.; Yu, L.; Deisenhofer, J. Inhibitor binding changes domain mobility in the iron–sulfur protein of the mitochondrial bc<sub>1</sub> complex from bovine heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:8026-8033, 1998.

Menon, A.L.; Mortenson, L.E.; Robson, R.L. Nucleotide sequences and genetic analysis of hydrogen oxidation (hox) genes in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 174:4549-4557, 1992.

Outten, F.W.; Djaman, O.; Storz, G. A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 52:861–872, 2004.

Pyla, R.; Kim, T J.; Silva, J.L.; Jung, Y.S. Overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA ArrF. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84(4):717-24, 2009.

Schneider, D. and Schmidt, C.L. Multiple Rieske proteins in prokaryotes: Where and why? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1710 (1):1-12, 2005.

Schwartz, C.J.; Giel, J.L.; Patschkowski, T.; Luther, C.; Ruzicka, F.J.; Beinert, H.; Kiley, P. J. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:14895–14900, 2001.

Setubal, J. C.; Dos Santos, P.C.; Goldman, B.S., Ertesvåg, H.; Espin, G.; Rubio, L.M. *et al.* Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized to Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *J. Bacteriol.*, 191 (14):4534–4545, 2009.

Valkova-Valchanova, M.B.; Saribas, A.S.; Gibney, B.R.; Dutton, P.L.; Daldal, F. Isolation and characterization of a two-subunit cytochrome b-c1 subcomplex from *Rhodobacter capsulatus* and reconstitution of its ubihydroquinone oxidation (Qo) site with purified Fe-S protein subunit. *Biochemistry*, 37:16242–16251, 1998.

Zeng, J.; Zhang, X.; Wang, Y.; Ai, C.; Liu, Q.; Qiu, C. Glu43 is an essential residue for coordinating the [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] cluster of IscR from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEBS Lett.*, 582 (28):3889-3892, 2008.

Zhang, Z.; Huang, L.; Shulmeister, V.M.; Chi, Y.I.; Kim, K.K.; Hung, L.W.; Crofts, A.R.; Berry, E.A.; Kim, S.H. Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature*, 392:677–684, 1998.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- (i) Os genes *NFS1* e *ISA1* de *E. grandis* tem sua expressão alterada quando plântulas desta espécie são submetidas ao estresse por frio, podendo estes, estar relacionados à resposta celular ao estresse causado;
- (ii) Os aumentos na expressão gênica devem-se, provavelmente, a diferenças no metabolismo de enxofre e à indução de enzimas de reparo que utilizam cofatores [Fe-S] como, por exemplo, glicosilases, DNA helicases, endonucleases e DNA e RNA primases;
- (iii) Os operons *fix*, *pet*, *hox* e *hyp* de *A. vinelandii*, aparentemente não possuem relação com a biossíntese de cofatores [Fe-S], porém são regulados por IscR;
- (iv) Os genes dos operons *fix*, *pet*, *hox* e *hyp*, codificam proteínas para cadeias transportadoras de elétrons que dependem de uma ou mais proteínas Fe-S;
- (v) A apo-forma de IscR é repressora dos operons *pet*, *fix*, *hox* e *hyp*.

- (vi) Os ligantes do cofator [2Fe-2S] na proteína IscR de *A.vinelandii* são as cisteínas 92, 104 e a histidina 107;
  
- (vii) A substituição de qualquer um dos resíduos ligantes acarreta alterações fenotípicas, como por exemplo, a perda da coloração característica de *A. vinelandii* e leva a diminuição no tamanho de suas colônias, quando cultivadas em meio sólido;
  
- (viii) Apesar das plantas apresentarem no seu genoma genes do sistema ISC de biossíntese de cofatores [Fe-S], não foram encontradas sequências similares a de IscR no genoma de *E.grandis* e *A. thaliana*, portanto a regulação do sistema ISC deve ocorrer por outra maneira, ainda desconhecida.

## REFERÊNCIAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

Adam, A.C.; Bornhövd, C.; Prokisch, H.; Neupert, W.; Hell, K. The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J.*, 25:174–183, 2006.

Agar, J.N.; Yuvaniyama, P.; Jack, R.F.; Cash, V.L.; Smith, A.D.; Dean, D.R.; Johnson, M.K. Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 5:167–177, 2000.

Ali, V.; Shigeta, Y.; Tokumoto, U.; Takahashi, Y.; Nozaki, T. An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.*, 279:16863–16874, 2004.

Allman, R.; Hann, A.C.; Phillips, A.P., Martin, K.L.; Lloyd, D. Growth of *Azotobacter vinelandii* with correlation of Coulter size flow cytometric parameters, and ultrastructure. *Cytometry*, 11(7): 822- 831, 1990.

Anderson, J.V.; Li, Q-B.; Haskell, D.W.; Guy, C.L. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luninal 70-kilodalton heatshock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol.*, 104:1359–1370, 1994.

Ayala-Castro, C.; Saini, A.; Outten, F.W. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72:110–125, 2008.

Balk, J. and Pilon, M. Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci.*, 16:218-26, 2011.

Balk, J. and Lobreaux, S. Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci.*, 10:324–331, 2005.

Bandyopadhyay, S.; Chandramouli, K.; Johnson, M.K. Iron–sulfur cluster biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.*, 36:1112-1119, 2008.

Barras, F.; Loiseau, L.; Py, B. How *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* build Fe=S proteins. *Adv. Microb. Physiol.*, 50:41–101, 2005.

Beinert, H.; Holm, R.H.; Münck, E. Iron–sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science*, 277:653–659, 1997

Beinert, H.; Kennedy, M.C.; Stout, C.D. Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chem. Rev.*, 96 (7): 2335-2373, 1996.

Bertini, I.; Cowan, J.A.; Del Bianco, C.; Luchinat, C.; Mansy, S. S. *Thermotoga maritima* IscU. Structural characterization and dynamics of a new class of metallochaperone. *J. Mol. Biol.*, 331: 907–924, 2003.

Brooker, M.I.H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her.(Myrtaceae). *Aust. Syst. Bot.*, 13:79–148, 2000.

Brune, A. and Zobel, B. Genetic base populations, gene pools and breeding populations for *Eucalyptus* in Brazil. *Silvae Genetica*, 30 (4/5):146-149, 1981.

Busi, M.V.; Maliandi, M.V.; Valdez, H.; Clemente, M.; Zabaleta, E.J.; Araya, A.; Gomez-Casati, D.F. Deficiency of *Arabidopsis thaliana* frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress. *Plant J.*, 48:873–882, 2006.

Choi, Y.S.; Shin, D.H.; Chung, I.Y.; Kim, S.H.; Heo, Y.J.; Cho, Y.H. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes crucial for hydrogen peroxide resistance. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17:1344-1352, 2007.

Cole, C.N. and Scarcelli, J.J. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 18:299–306, 2006.

Colodette, J.L.; Mokfienski, A.; Gomide, J.L.; Oliveira, R.C. Relative importance of wood density and carbohydrate content on pulping yield and product quality. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 19 (4):71-80, 2004.

Cossins, A.R. Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional significance. In: Cossins, A. R. (ed.). *Temperature Adaptation of Biological Membranes*. London: Portland Press, p. 63–76, 1994.

Craig, E.A. and Marszalek, J. A specialized mitochondrial molecular chaperone system: A role in formation of Fe/S centers. *Cell Mol. Life Sci.*, 59:1658–1665, 2002.

Cupp-Vickery, J.R. Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 330:1049–1059, 2003.

Cupp-Vickery, J.R.; Silberg, J.J.; Ta, D.T.; and Vickery, L.E. Crystal structure of IscA, an iron-sulfur cluster assembly protein from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 338:127–137, 2004.

Dai, S.; Schwendtmayer, C.; Schürmann, P.; Ramaswamy, S.; Eklund, H. Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. *Science*, 287(5453):655-658, 2000.



Dobbek, H.; Svetlitchnyi, V.; Gremer, L.; Huber, R.; Meyer, O. Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science*, 293:1281–85, 2001.

Dos Santos, P.C.; Smith, A.D.; Frazzon, J.; Cash, V.L.; Johnson, M.K.; Dean, D.R. Iron-sulfur cluster assembly: NifU directed activation of the nitrogenase Fe protein. *J. Biol. Chem*, 279: 19705–19711, 2004.

Doukov, T.I.; Iverson, T.M.; Seravalli, J.; Ragsdale, S.W.; Drennan, C.L. A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science*, 298:567-72, 2002.

Einsle, O.; Tezcan, F.A.; Andrade, S.L.A.; Schmid, B.; Yoshida, M.; Howard, J.B.; Rees, D.C. Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å Resolution: A Central Ligand in the FeMo-Cofactor. *Science*, 297:1696-1700, 2002.

Eldridge, K.; Davidson, J.; Hardwiid, C.; Wyk, G.V. *Eucalypt domestication and breeding*. Oxford: Clarendon, 1994.

Evans, D.J.; Jones, R.; Woodley, P.R.; Wilborn, J.R.; Robson, R.L. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum* nifUSVWZM gene cluster, including a new gene (nifP) which encodes a serine acetyltransferase. *J. Bacteriol.*, 173:5457–5469, 1991.

Feder, M.E. and Hofmann, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. of Physiology*, 61:243–282, 1999.

Ferreira, F.A. Enfermidades do eucalipto no Brasil. *Informe Agropecuário*, 18: 186, 1997.

Flint, D.H. *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the nifS gene of *Azotobacter vinelandii* and that can

participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J. Biol. Chem.*, 271:16068–16074, 1996.

Fontecave, M.; Choudens, S.O.; Py, B.; Barras, F. Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 10:713–721, 2005.

Frazzon, J. and Dean, D.R. Biosynthesis of the nitrogenase iron-molybdenum-cofactor from *Azotobacter vinelandii*. *Met. Ions Biol. Syst.*, 39:163-86, 2002.

Frazzon, J. and Dean, D.R. Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr. Opin. in Chem. Biol.*, 7:166-173, 2003.

Fujii, T.; Maeda, M.; Mihara, H.; Kurihara, T.; Esaki, N.; Hata, Y. Structure of a NifS homologue: X-ray structure analysis of CsdB, an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *Biochemistry*, 39 (6):1263-1273, 2000.

García, M.C.V.; López, M.J.; Elorrieta, M.A.; Suárez, F.; Moreno, J. Physiology of exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* from 4-hydroxybenzoic acid. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29 (3):129-133, 2002.

Giel, J.L.; Rodionov, D.; Liu, M.; Blattner, F.R.; Kiley, P.J. IscR-dependent gene expression links iron–sulphur cluster assembly to the control of O<sub>2</sub>-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 60:1058–1075, 2006.

Gong, Z.; Lee, H.; Xiong, L.; Jagendorf, A.; Stevenson, B.; Zhu, J-K. RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:11507–11512, 2002.

González, E.R. *Transformação genética de Eucalyptus grandis e do híbrido E. grandis x E. urophylla via Agrobacterium*. São Paulo: USP, 2002. Dissertação (Mestrado) – Programa de

Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

Gyaneshwar, P.; Paliy, O.; McAuliffe, J.; Popham, D.L.; Jordan, M.I.; Kustu, S. Sulfur and nitrogen limitation in *Escherichia coli* K-12: specific homeostatic responses. *J Bacteriol.*, 187: 1074–1090, 2005.

Hall, N.; Johnston, R.D.; Chippendale, G.M. *Forest trees of Australia*. Canberra: Australian Government Publishing Service, 1970.

Heis, M.D; Ditmer, E.; De Oliveira, L.A.; Frazzon, A.P.G.; Margis, R.; Frazzon, J. Differential expression of cysteine desulfurases in soybean. *BMC Plant Biol.*, 11: 166, 2011.

Hoff, K.G.; Silberg, J.J.; Vickery, L.E. Interaction of the iron sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:7790–7795, 2000.

Hu, Y.; Fay, A.W.; Lee, C.C.; Ribbe, M.W. P-cluster maturation on nitrogenase MoFe protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:10424-10429, 2007.

Ikeuchi, Y.; Shigi, N.; Kato, J.; Nishimura, A.; Suzuki, T. Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions. *Mol. Cell.*, 21: 97–108, 2006.

Jacobson, M.R.; Cash, V.L.; Weiss, M.C.; Laird, N.F.; Newton, W.E.; Dean, D.R. Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.*, 219:49–57, 1989.

Jensen, L.T. and Culotta, V.C. Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol. Cell Biol.*, 20:3918-3927, 2000.

Johnson, D.C.; Dean, D.R.; Smith, A.D.; Johnson, M.K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.*, 74:247–281, 2005.

Johnson, D.C.; Unciuleac, M-C.; Dean, D.R. Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 188 (21):7551-7561, 2006.

Jones-Carson, J.; Laughlin, J.; Hamad, M.A.; Stewart, A.L.; Voskuil, M.I.; Vazquez-Torres, A. Inactivation of [Fe-S] metalloproteins mediates nitric oxide-dependent killing of *Burkholderia mallei*. *PLoS One*, 3:1976, 2008.

Kaiser, J.T.; Clausen, T.; Bourenkow, G.P.; Bartunik, H.D.; Steinbacher, S.; Huber, R. Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly. *J. Mol. Biol.*, 297:451–64, 2000.

Kato, S.; Mihara, H.; Kurihara, T.; Takahashi, Y.; Tokumoto, U.; Yoshimura, T.; Esaki, N. Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS=IscU complex: implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:5948–5952, 2002.

Kayal, W.; Navarro, M.; Marque, G.; Keller, G.; Marque, C.; Teulieres, C. Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. *J. Exp. Bot.*, 57 (10):2455–2469, 2006.

Kessler, D. and Papenbrock, J. Iron-sulfur cluster biosynthesis in photosynthetic organisms. *Photosynth. Res.*, 86:391-407, 2005.

Kiley, P.J. and Beinert, H. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6 (2):181-185, 2003.

Kim, J. H.; Fuzery, A.K.; Tonelli, M.; Ta, D.T.; Westler, W.M.; Vickery, L.E.; Markley, J.L. Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB. *Biochemistry*, 48:6062–6071, 2009.

Knight, H.; Trewavas, A.J.; Knight, M.R. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell*, 8:489–503, 1996.

Lauhon, C.T. and Kambampati, R. The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD. *J. Biol. Chem.*, 275:20096–20103, 2000.

Lauhon, C.T. Requirement for IscS in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 184 (24):6820-6829, 2002.

Léon, S.; Touraine, B.; Briat, J.F.; Lobreaux, S. The AtNFS2 gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochem. J.*, 366:557–564, 2002

Léon, S.; Touraine, B.; Ribot, C.; Briat, J.F.; Lobreaux, S. Iron–sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.*, 371:823– 830, 2003.

Levitt, J. *Responses of plants to environmental stresses*. 2.ed. New York: Academic Press, 1980.

Lill, R. and Muhlenhoff, U. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22:457–486, 2006.

Lill, R.; Dutkiewicz, R.; Elsasser, H.P.; Hausmann, A.; Netz, D.J.; Pierik, A.J.; Stehling, O.; Urzica, E.; Muhlenhoff, U. Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1763: 652–667, 2006.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25:402-408, 2001.

Loiseau, L.; Ollagnier-de-Choudens, S.; Nachin, L.; Fontecave, M.; Barras, F. Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J. Biol. Chem.*, 278:38352–38359, 2003.

Lynch, D.V. and Thompson, G.A. Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membrane of *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.*, 69:1369–1375, 1982.

Mastrangelo, A.M.; Belloni, S.; Barilli, S.; Ruperti, B.; Di Fonzo, N.; Stanca, A M.; Cattivelli, L. Low temperature promotes intron retention in two e-cor genes of durum wheat. *Planta*, 221:705–715, 2005.

Meyer, J. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13:157–170, 2008.

Mihara, H. & Esaki, N. Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60:12–23, 2002.

Mihara, H.; Fujii, T.; Kato, S.; Kurihara, T.; Hata, Y.; Esaki N. Structure of external aldimine of *Escherichia coli* CsdB, anIscS=NifS homolog: implications for its specificity towardselenocysteine. *J. Biochem.*, 131:679–685, 2002.

Morais, E. J. *Crescimento e eficiência nutricional de espécies de eucalipto em duas regiões bioclimáticas de Minas Gerais*. Viçosa: UFV, 1988. 56 p.

Mulholland, S.E.; Gibney, B.R.; Rabanal, F.; Dutton, P.L. Characterization of the fundamental protein ligand requirements of 4Fe-4S (2+/+) clusters with sixteen amino acid maquettes. *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (40):10296-10302, 1998.

Murthy, N.; Ollagnier-de-Choudens, S.; Sanakis, Y.; Abdel-Ghany, S.E.; Rousset, C.; Ye, H.; Fontecave, M.; Pilon-Smits, E.A.H.; Pilon, M.. Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3: Functions in Chloroplast Iron-Sulfur Cluster Assembly and NAD Synthesis. *The Journal of Biol. Chem.*, 282:18254–18264, 2007.

Nachin, L.; El Hassouni, M.; Loiseau, L.; Expert, D.; Barras, F. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol. Microbiol.*, 39:960–972, 2001.

Nesbit, A.D.; Giel, J.L.; Rose, J.C.; Kiley, P.J. Sequence-specific binding to a subset of IscR-regulated promoters does not require IscR Fe–S cluster ligation. *J. Mol. Biol.*, 387:28–41, 2009.

Nuth, M.; Yoon, T.; Cowan, J. A. Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of iron nucleation sites for assembly of the [2Fe-2S]<sub>2</sub> cluster core in IscU proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:8774–8775, 2002.

Ollagnier-de-Choudens, S.; Lascoux, D.; Loiseau, L.; Barras, F. Forest, E.; Fontecave, M. Mechanistic studies of the SufSSufE cysteine desulfurase: evidence for sulfur transfer from SufS to SufE. *FEBS Lett.*, 555:263–267, 2003.

Olson, J.W.; Agar, J.N.; Johnson, M.K.; Maier, R.J. Characterization of the NifU and NifS Fe-S cluster formation proteins essential for viability in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry*, 39: 16213–16219, 2000.

Orvar, B.L.; Sangwan, V.; Omann, F.; Dhindsa, R.S. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.*, 23: 785–794, 2000.

Outten, F.W.; Wood, M.J.; Munoz, F.M.; Storz, G. The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 278:45713–45719, 2003.

Outten, F.W.; Djaman, O.; Storz, G. A. suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 52:861–872, 2004.

Patzer, S.I. and Hantke, K.J. SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *Bacteriol.*, 181:3307–3309, 1999.

Petrovic, A.; Davis, C.T.; Rangachari, K.; Clough, B.; Wilson, R.J.; Eccleston, J.F. Hydrodynamic characterization of the SufBC and SufCD complexes and their interaction with fluorescent adenosine nucleotides. *Protein Sci.*, 17:1264–1274, 2008.

Porello, S.L.; Cannon, M.J.; David, S.S. A substrate recognition role for the 4Fe-4S (2+) cluster of the DNA repair glycosylase MutY. *Biochemistry*, 37 (18):6465-6475, 1998.

Rangachari, K.; Davis, C.T.; Eccleston, J.F.; Hirst, E M.; Saldanha, J.W.; Strath, M.; Wilson, R. J. SufC hydrolyzes ATP and interacts with SufB from *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett.*, 514: 225–228, 2002.

Raulfs, E.C. Isolation of in vivo intermediates in iron sulfur cluster biogenesis. PhD Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA 2009.

Raulfs, E.C.; O'Carroll, I.P.; Dos Santos, P.C.; Unciuleac, M.C.; Dean, D.R. In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A.*, 105:8591–8596, 2008.

Revista da Madeira, Curitiba, REMADE - Portal Nacional da Madeira, n. 126, fev. 2012. Disponível em:<[http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira\\_materia.php?num=1510&subject=Cen%Elrio](http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1510&subject=Cen%Elrio)



%20Florestal&title=Florestas%20no%20mundo%20chegam%204%20bilh%F5es%20de%20hectares  
>. Acesso: 24 jan. 2012.

Revista da Madeira, Curitiba, REMADE - Portal Nacional da Madeira, n. 125, nov. 2011. Disponível em:<[http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira\\_materia.php?num=1492&subject=Gen%E9tica&title=Melhoramento%20gen%E9tico%20de%20esp%E9cies%20florestais](http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1492&subject=Gen%E9tica&title=Melhoramento%20gen%E9tico%20de%20esp%E9cies%20florestais)>. Acesso: 24 jan. 2012.

Riboldi, G.P.; Larson, T.J.; Frazzon, J. Enterococcus faecalis sufCDSUB complements Escherichia coli sufABCDS. *FEMS Microbiol Lett.* 320(1):15-24, 2011.

Richards, T.A. and van der Giezen, M. Evolution of the Isd11- IscS complex reveals a single alpha-proteobacterial endosymbiosis for all eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, 23:1341–1344, 2006.

Rincon-Enriquez, G.; Crete, P.; Barras, F.; Py, B. Biogenesis of Fe/S proteins and pathogenicity: IscR plays a key role in allowing *Erwinia chrysanthemi* to adapt to hostile conditions. *Mol. Microbiol.*, 67:1257-73, 2008.

Rouhier, N.; Couturier, J.; Johnson, M.K; Jacquot, J.P. Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.*, 35:43–52, 2010.

Rubio, L.M. and Ludden, P.W. Biosynthesis of the iron molybdenum cofactor of nitrogenase. *Ann. Rev. Microbiol.*, 62:93-111, 2008.

Runyen-Janecky, L.; Daugherty, A.; Lloyd, B.; Wellington, C.; Eskandarian, H.; Sgransky, M. Role and regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis genes in *Shigella flexneri* virulence. *Infect Immun.*, 76:1083-1092, 2008.

Sadoff, H.L. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.*, 39:516–539, 1975.

Santos, S.N. *Genes de lignificação de Eucalyptus: estrutura e diversidade genética dos genes 4cl e ccoaomt*. Brasília: UCB, 208 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2005.

Schwartz, C.J.; Djaman, O.; Imlay, J.A.; Kiley, P.J. The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:9009–9014, 2000.

Schwartz, C.J.; Giel, J.L.; Patschkowski, T.; Luther, C.; Ruzicka, F.J. *et al.* IscR, an Fe–S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe–S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:14895–14900, 2001.

Setubal, J.C., Dos Santos, P.C.; Goldman, B.S.; Ertesvåg, H.; Espin, G.; Rubio, L M. *et al.* Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized to Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *J. Bacteriol.*, 191 (14):4534–4545, 2009.

Silva, J.C. Cresce a presença do eucalipto no Brasil. *Revista da Madeira*, 92: 66, 2005

Taiz, L. and Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

Takahashi, Y. and Tokumoto, U. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.*, 277:28380–28383, 2002.

Takahashi, Y.; Mitsui, A.; Fujita, Y.; Matsubara, H. Roles of ATP and NADPH in formation of the Fe-S cluster of spinach ferredoxin. *Plant Physiol.*, 95:104–110, 1991.

Thomashow, M.F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50:571–599, 1999.

Tokuhsa, J.G.; Vijayan, P.; Feldmann, K.A.; Browse, J.A. Chloroplast development at low temperatures requires a homolog of DIM1, a yeast gene encoding the 18S rRNA dimethylase. *The Plant Cell*, 10:699–711, 1998.

Tong, W.H.; Jameson, G.N.; Huynh, B.H.; Rouault, T.A. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron–sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe–4S] cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:9762–9767, 2003.

Tsugama, D.; Liu, S.; Takano, T. Stage and tissue-specific expression of rice OsIsu1 gene encoding a scaffold protein for mitochondrial iron-sulfur-cluster biogenesis. *Biotechnol. Lett.*, 31:1305–1310, 2009.

Unciuleac M.C.; Chandramouli K.; Naik S.; Mayer S.; Huynh, B.H; Johnson M.K.; Dean, D.R. In vitro activation of apoconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry*, 46:6812– 6821, 2007.

Vashisht, A.A.; Pradhan, A.; Tuteja, R.; Tuteja, N. Cold- and salinity stress-induced bipolar pea DNA helicase 47 is involved in protein synthesis and stimulated by phosphorylation with protein kinase C. *Plant J.*, 44: 76–87, 2005.

Vickery, L.E. and Cupp-Vickery, J.R. Molecular chaperones HscA=Ssq1 and HscB=Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 42:95–111, 2007.

Viswanathan, C.; Zhu, J.; Zhu, J-K. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12 (10):444-451,2007.

Wächtershäuser, G. Groundworks for an evolutionary biochemistry: The iron-sulphur world. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 58:85-201, 1992.

Wächtershäuser, G. and Huber, C. Debating evidence for the origin of life on Earth - Response. *Science*, 315(5814):938–939, 2007.

Wada, K.; Sumi, N.; Nagai, R.; Iwasaki, K.; Sato, T.; Suzuki, K. *et al.* Molecular dynamism of Fe-S cluster biosynthesis implicated by the structure of the SufC(2)-SufD(2) complex. *J. Mol. Biol.*, 387:245–258, 2009.

Wollers, S.; Layer, G.; Garcia-Serres, R.; Signor, L.; Clemancey, M.; Latour, J.; Fontecave, M.; Ollagnier de Choudens, S. Iron-sulfur (Fe-S) Cluster Assembly: the SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor. *J. Biol. Chem.*, 285 (30):23329-23339, 2010.

Wu, J.; Lightner, J.; Warwick, N.; Browse, J.A. Low-Temperature Damage and Subsequent Recovery of *fab1* Mutant *Arabidopsis* Exposed to 2°C. *Plant Physiol.* 113:347–356, 1997.

Xu, X.M. and Moller, S.G. AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for *Arabidopsis* embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101:9143–9148, 2004.

Xu, X.M.; Adams, S.; Chua, N.H.; Moller, S.G. AtNAP1 represents an atypical SufB protein in *Arabidopsis* plastids. *J. Biol. Chem.*, 280:6648–6654, 2005.

Xu, X.M.; Lin, H.; Latijnhouwers, M.; Moller, S.G. Dual localized AtHscB involved in iron sulfur protein biogenesis in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 4:7662, 2009.

Xu, X.M. and Moller, S.G. AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, 25:900–909, 2006.

Xu, X.M. and Moller, S.G. Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance. *Antioxid. Redox Signal.*, 15(1):271-307, 2011.

Yang, J.; Bitoun, J.P.; Ding, H. Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters. *J. Biol. Chem.*, 281(38):27956-27963, 2006.

Yuvaniyama, P.; Agar, J.N.; Cash, V.L.; Johnson, M.K.; Dean, D.R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:599–604, 2000.

Zheng, L.; Cash, V.L.; Flint, D.H.; Dean, D.R. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, 273:13264–13272, 1998.

Zheng, M.; Wang, X.; Doan, B.; Lewis, K.A.; Schneider, T.D.; Storz, G. Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 183:4571–4579, 2001.

Zheng, L.; White, R.H.; Cash, V.L.; Jack, R.F.; Dean, D.R. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:2754–2758, 1993.

Zheng, L.; White, R.H.; Cash, V.L.; Dean, D.R. Mechanism for the Desulfurization of L-Cysteine Catalyzed by the nifS Gene Product. *Biochemistry*, 33:4714–4720, 1994.

## ANEXOS

### Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species

Luisa A de Oliveira<sup>1\*</sup>, Michèle C Breton<sup>1\*</sup>, Fernanda M Bastolla<sup>1\*</sup>, Sandro S Camargo<sup>2</sup>, Rogério Margis<sup>1</sup>, Jeverson Frazzon<sup>1,3</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Cell and Molecular Biology, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pampa, Campus Bagé, Travessa 45, 1650, sala 2107, Bairro Malafaia, CEP 96413-170, Bagé, RS, Brazil

<sup>4</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

\*These authors contributed equally to this work

<sup>§</sup>Corresponding author: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale/UFRGS, Cx.P.: 15005, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Email addresses:

LAO: lu\_abruzzo@yahoo.com.br

MCB: mbreton@uol.com.br

FMB: [nandabastolla@yahoo.com.br](mailto:nandabastolla@yahoo.com.br)

SSC: [sandro.camargo@unipampa.edu.br](mailto:sandro.camargo@unipampa.edu.br)

RM: [rogerio.margis@ufrgs.br](mailto:rogerio.margis@ufrgs.br)

JF: [jeverson.frazzon@ufrgs.br](mailto:jeverson.frazzon@ufrgs.br)

GP: [pasquali@cbiot.ufrgs.br](mailto:pasquali@cbiot.ufrgs.br)

## Abstract

## Background

The genus *Eucalyptus* is one of the main sources of wood worldwide and is the most widely used tree species in industrial plantations. Gene expression analysis is increasingly important in biological research, with reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) becoming the method of choice for high-throughput and accurate expression profiling of selected genes. Considering the increased sensitivity, reproducibility and large dynamic range of this methodology, the requirements for proper internal reference gene(s) for relative expression normalization have become increasingly stringent. Given the increasing interest in the functional genomics of *Eucalyptus* species, we sought to identify and experimentally verify suitable reference genes for the normalization of gene expression studies associated with flower, leaf and xylem of six species of *Eucalyptus*.

## Results

To provide reliable reference genes for *Eucalyptus*, we selected 50 genes that exhibited the least variation in gene expression in microarray studies of *E. grandis* leaves and stem vascular tissue (xylem), and *E. globulus* xylem, using the statistical algorithms Standard Deviation Microarray Analysis and the Significance Analysis of Microarrays. We focused on the most constitutive genes determined by *in silico* analysis of microarray data and further performed the experimental analysis using RT-qPCR for six *Eucalyptus* species and three different organs/tissues. Employing algorithms *geNorm* and *NormFinder*, we assessed the gene expression stability of eight candidate new reference genes. Classic housekeeping, reference genes like those encoding GAPDH, histone H2B, ribosomal protein L23A, and tubulin were also included in the analysis. The stability profiles of these genes determined with the two different algorithms were in very good agreement.



## Conclusions

Based on *geNorm* and *NormFinder* analysis of RT-qPCR results, the expressions of the novel *Eucons04*, *Eucons08* and *Eucons21* genes were the most stable through all *Eucalyptus* organs/tissues and species studied. We showed that the combination of these genes as references when measuring the expression of a test gene (*dxr*, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase) results in more reliable patterns of expression than the employment of traditional housekeeping reference genes. Hence novel *Eucons04*, *Eucons08* and *Eucons21* genes are the best suitable references for the normalization of expression studies in the *Eucalyptus* genus.

## Background

The genus *Eucalyptus*, with more than 700 species, is one of the main sources of hardwood worldwide and the most widely employed tree in industrial-oriented plantations. Many *Eucalyptus* species are renowned for their fast growth rate, the straight shape of trunks, valuable wood properties, wide adaptability to soils and climates, resistance to biotic stresses, and ease of management through coppicing, seed or clonal propagation. Especially in Brazil, Chile, South Africa, Portugal and India, *Eucalyptus* timber is widely used for cellulose pulp and paper production. Despite the high wood productivity of *Eucalyptus* plantations, reaching 45-60 m<sup>3</sup>.ha<sup>-1</sup>.year<sup>-1</sup>, the increasing demand for cellulose pulp has resulted in wood shortages in recent years [1-3]. Hence efforts in many fields of research are being made to improve forest productivity including molecular approaches like whole genome sequencing and high-throughput analysis of gene expression. With such objectives in mind, The Eucalyptus Genome Network (EUCAGEN) was created (<http://www.ieugc.up.ac.za>), representing one example of a valuable database platform for genome research in *E. grandis* and other species [4].

With the recent availability of *Eucalyptus* genome and transcriptome data, many efforts are and will be done to assess *Eucalyptus* gene expression with conventional or high-throughput techniques. Independently of the method employed, it is absolutely essential the use of reference

genes as internal controls for gene expression measurements. The availability of such validated reference genes for *Eucalyptus* is still scarce.

DNA macro and microarray hybridizations, partial or whole transcriptome sequencing linked to digital transcript counting (RNA-Seq), among other techniques allow the expression analysis of thousands of genes simultaneously, employing differentially labelled RNA or cDNA populations. These techniques have the advantage of speed, high-throughput and a high degree of potential automation compared to conventional quantification methods such as northern blot analysis, ribonuclease protection assays, or competitive RT-PCR [5-7]. Reverse-transcription followed by real-time, quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the most sensitive and specific technique commonly used to assess gene expression levels [8]. It allows performing more in-depth studies of smaller sets of genes across many individuals, treatments or cell/tissue types. RT-qPCR is the technique of choice to validate gene expression results derived from the mentioned high-throughput methods [5-7].

As referred previously, only good internal reference genes will allow confident comparison of gene expression results. Internal control genes are used to normalize mRNA fractions and are often referred to as housekeeping genes which should not vary their expressions during development, among tissues or cells under investigation, or in response to experimental treatments. Most common housekeeping genes employed in plant gene expression studies are those encoding actin [9, 10], tubulin [11, 12], glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [13, 14], ribosomal RNA [11, 12, 15], polyubiquitin [9, 16], and elongation factor 1- $\alpha$  [13, 17]. Many studies make use of these housekeeping genes without proper validation of their presumed stability, based on the assumption that they would be constitutively expressed due to their role in basic cellular processes. Considerable amounts of data show that most studied housekeeping genes have expressions that can vary considerably depending on the cell type or experimental condition [18, 19]. With the increased sensitivity, reproducibility and large dynamic range of the RT-qPCR methods, the requirements for proper internal control genes have become increasingly stringent.

In recent years, a large number of reference gene validation attempts have been reported for plants, most of them covering model, crop or ornamental species like rice [20, 21], *Arabidopsis thaliana* [22, 23], tobacco [11], sugarcane [24], potato [25], *Brachypodium* sp. [26], soybean [16, 27, 28], tomato [29-31], *Brachiaria* sp. [17], coffee [9], peach [13], wheat [32], chicory [14], cotton [33], cucumber [34], *Lolium* sp. [35], *Orobancha* sp. [36], and *Cyclamen* sp. [37]. Few studies have focused on woody plants such as poplar [38, 39], grape [40], and longan tree [41]. Reference genes for gene expression studies in *Eucalyptus* have been recently presented. Almeida *et al.* [42], working with *E. globulus* microcuttings rooted *in vitro*, have indicated histone H2B and  $\alpha$ -tubulin the most suited reference genes during *in vitro* adventitious rooting, in the presence or absence of auxin. Boava *et al.* [43], working with clonal seedlings of the hybrid plant (*E. grandis* x *E. urophylla*) exposed to biotic (*Puccinia psidii*) or abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses, concluded that genes encoding the eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) and ubiquitin were the most stable, and ideal as internal controls. Both works tested a small number of genes (11 and 13, respectively) selected according to literature data concerning other plant systems and experimental conditions.

Given the increasing interest in the functional genomics of *Eucalyptus* and the need of validated reference genes for a broader set of species and experimental conditions, we sought to identify the most stably expressed genes in a set of 21,442 genes assayed by microarray developed to compare stem vascular (xylem) and leaf tissues of *E. grandis* and *E. globulus* adult trees. Best candidate genes were then validated by RT-qPCR in assays with RNAs from xylem and leaves of six *Eucalyptus* species and flowers of *E. grandis*. Seven traditional housekeeping genes most employed in expression studies in plants were also included in our analysis. As a result, genes selected as the least variable among all conditions tested were not yet described in literature. These genes may represent an important molecular tool to accurately analyze the expression of *Eucalyptus* genes in different tissues/organs and in different species via array hybridization or RT-qPCR.

## Results

### Selection of *Eucalyptus* reference genes via microarray analysis

Data from microarray hybridizations conducted within Project "*Genolyptus*: The Brazilian Research Network on the *Eucalyptus* Genome" (<http://genoma.embrapa.br/genoma/genolyptus>) were analyzed for selecting the most stably expressed *Eucalyptus* genes. The microarray study was conceived with nine 50mer-oligoprobes covering the length of each one of the 21,442 unique sequences derived from the *Genolyptus* EST dataset (GenBank accession Nos. HO763666–HO769458 and HS047685–HS075494). Oligoprobes were synthesized “on-chip” in duplicate, randomly distributed in two blocks of ten identical slides. Leaf blades and vascular (xylem) tissue samples were taken from two *E. grandis* clonal trees, i.e., derived from the same matrix tree and harboring the same genotype. Two additional xylem samples were collected from two other *E. grandis* clonal trees of a different genotype and from two *E. globulus* clonal trees. Therefore, ten Cy3-labeled cDNA samples and ten identical chips were produced at Roche NimbleGen for the microarray assays, with a total number of 385,956 features per slide[microarray results were submitted to Gene 35 Expression Omnibus (GEO) under accession Nos. GSM786737–GSM786746].

Most stably expressed genes were mined in the microarray data with the employment of two statistical algorithms named Significance Analysis of Microarrays (SAM; [44] and Standard Deviation Microarray Analysis (SDMA; see Methods), that allows the representation of results in three dimensional (3D) graphs.

The input data to SAM were gene expression measurements from the set of microarray experiments, as well as the response variable from each experiment. According to Tusher et al. [44], SAM computes a statistic  $d(i)$  for each gene “ $i$ ”, measuring the strength of the relationship between gene expression and the response variable. It uses repeated permutations of the data to determine if the expression of any gene is significantly related to the response. The cutoff for significance is determined by a tuning parameter  $\delta$ , chosen by the user based on the false positive rate. One can also choose a fold change parameter, to ensure that called genes change at

least a pre-specified amount. In the present study, the value of *delta* was set to 0.2 so that we could mine the genes whose expressions exhibited the lowest variation among the three conditions assessed in the microarrays, i.e., *E. grandis* leaves and xylem and *E. globulus* xylem (Figure 1A). A ranking of 50 genes whose fold change values were approximately equal to one were selected as reference candidate genes, since they presented the lowest variation of expression among leaves and xylems of *E. grandis* and xylem of *E. globulus* (Table 1).

SDMA is a novel and simpler algorithm based on the comparison of average gene expressions in relation to the global average of expressed genes in microarrays and the overall standard deviation, allowing the presentation of results in graphical mode (see Methods). SDMA allowed us to generate a 3D graph that evidenced genes expressed in a position equivalent to their overall average expression among the three conditions analyzed in the microarrays (Figure 1B). The average value of gene expression by SDMA should be as similar as possible to the global average of expression, and the overall standard deviation should tend to zero when the scope of the analysis is the selection of genes whose expressions are stable. Using the same criteria applied in SAM, we selected 50 genes whose standard deviations were close to zero, indicating the similarity between the values of mean and mean global gene expression (Table 1). A SDMA 3D graphic is presented in Figure 1C where the mean expressions of the 50 most stable genes selected under the conditions studied are plotted. Note that points representing selected genes tend to form a straight line, indicating that their means of expression when compared with the global average have a standard deviation tending to zero.

We were pleased to note that the employment of either SDMA or SAM allowed us to identify the same group of 50 genes as the most stably expressed, confirming the robustness of the analysis performed by both algorithms. Nevertheless the ranking of the two methods differed, as presented in Table 1. Since none of the sequences selected presented molecular or biochemical identities similar to previously described *Eucalyptus* genes or proteins, we named them *Eucons01* to *Eucons50*, according to the ranking generated by SDMA, as stated in the first column of Table 1.

Selected sequences were annotated using BLASTx [45] against the available non-redundant protein sequences (*nr*) and their functional categories were determined by the Blast2GO software [46]. Although some sequences exhibited Expected (E) values too high for a confident annotation, approximately half of them (48%) showed similarity to known proteins. The other half of the sequences corresponded to hypothetical proteins (10%) or returned a “no hit” (42%) result (Table 1). The gene ontology analysis of the 50 selected genes by Blast2GO allowed the functional classification of 35 (70%) of the sequences, as represented in Figure 2. Most of the sequences were classified in functions related to cellular (12) or metabolic (12) processes, among six other functional categories. The remaining 15 (30%) sequences were classified as “no hit”, and were not represented in Figure 2.

In order to further validate results by RT-qPCR, we selected ten candidate genes with the littlest variation in expression and whose annotation matched a known plant protein according to SDMA (*Eucons01, 04, 06, 07* and *08*) and SAM (*Eucons15, 21, 27, 32* and *43*). Selected genes are highlighted in gray in Table 1.

### Validation of *Eucalyptus* reference genes by RT-qPCR

In order to check their true stability in expression, primers for RT-qPCR validation of the ten *Eucalyptus* sequences elected as potential reference genes were designed and are presented in Table 2. Besides them, we also designed primers for five genes traditionally employed as references, based on their housekeeping function, including a SAND family protein [22], glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [47], histone H2B, ribosomal protein L23A (RibL23A), and tubulin (TUA2) [5], as presented in Table 2. Reference genes previously recommended for the analysis of gene expression during *E. globulus* rooting *in vitro* and named *Euc10* and *Euc12* [42] were also evaluated and primers employed in RT-qPCR are also presented in Table 2.

Total RNA samples were prepared from six *Eucalyptus* species, distributed as follows: flower, leaf and xylem of *E. grandis*, leaf and xylem of *E. dunnii*, *E. pellita*, *E. saligna* and *E. urophylla*, and xylem of *E. globulus*. RT-qPCR evaluations were conducted with biological

duplicates and experimental quadruplicates. Results were analyzed using softwares *geNorm* 3.5 [48] and *NormFinder* [49] in order to generate comparable rankings of genes based on their stability of expression. The Cq data collected for all samples were transformed to relative quantities using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method developed by Livak and Schmittgen [50]. We did not succeed in obtaining satisfactory dissociation curves after RT-qPCR with primers designed for *Eucons01* and *Eucons15* (data not show) and both candidate genes were discarded from the analysis.

With *geNorm*, the average expression stability (*M* value) of all genes was first calculated. *M* values are defined as the mean variation of a certain gene related to all of the others. The *geNorm* software recommends an *M* value below the threshold of 1.5 in order to identify genes with stable expression, although 0.5 has been used as threshold limit by many authors [42, 51-54]. As shown in Figure 3A, all 15 candidate genes examined showed a very high stability of expression with thresholds lower than 0.12, independently of tissues/organs evaluated. According to the *geNorm* analysis, *Eucons04*, *Eucons08* and *Eucons21* were the most stably expressed ones and should be considered as best reference genes for RT-qPCR normalizations.

In order to evaluate the optimal number of reference genes for reliable normalization, *geNorm* allows to calculate the pairwise variation  $V_n/V_{n+1}$  between the sequential ranked normalization factors  $NFn$  and  $NFn+1$  to determine the effect of adding the next reference gene in normalization. The normalization factor is calculated based on the geometric average among the two most stable gene relative quantities and the stepwise inclusion of the other genes in the order of their expression stability. A large pairwise variation implies that the added reference gene has a significant effect on normalization and should be included for calculation of a reliable normalization factor. Considering the cut-off value of 0.15, below which the inclusion of an additional reference gene is not necessary [48], the use of the two most stably expressed genes *Eucons08* and *Eucons21* was sufficient for accurate normalization ( $V_{2/3} = 0.006$ ) in all organs studied (flower, leaves and xylem) from the six *Eucalyptus* species (Figure 3B). The same applies when analyzing xylem and leaves separately, with a  $V_{2/3} = 0.006$  for *Eucons04* and *RibL23A* genes (leaves) and  $V_{2/3} = 0.004$  for *Eucons06* and *Eucons08* genes (xylem; data not show).

In addition to *geNorm*, the expression stability of candidate reference genes assayed by RT-qPCR was also analyzed with the *NormFinder* software. This program takes into account the intra- and inter-group variations for normalization factor calculation and the results are not affected by occasionally co-regulated genes. The best candidate will be the one with the inter-group variation as close to zero as possible and, at the same time, having the smallest error bar possible. Hence values are inversely correlated to gene expression stability, which avoids artificial selection of co-regulated genes [49].

According to the *NormFinder* analysis of gene expressions in leaves, xylem tissues and among species, the stability values of the 15 genes studied were lower than 0.138, with error bars no greater than 0.044 (Figure 3C; Table 3). When we analyzed the gene expressions in all tissues/organs and species, the stability value was in the range between 0.017 and 0.106, proving again that all genes elected are good references for RT-qPCRs studies in *Eucalyptus*. The ranking of the genes and their respective stability values are shown in Table 3. According to the *NormFinder* analysis and in agreement with the results of *geNorm*, the three most stable genes were *Eucons04*, *Eucons08* and *Eucons21* when considering all tissues/organs and species. When the expressions in leaves are separately considered, the stability values were in the range between 0.008 and 0.086, and the three most stable genes in these organs were *Eucons04*, *Eucons08* and *Eucons32*. In xylem vascular tissues, the stability values were in the range of 0.01 to 0.138, and genes *Eucons27*, *Eucons07* and *Eucons06* were the most stable (Table 3). The algorithm ranked *Eucons04* as the most stably expressed gene in all samples regardless of whether the samples were collected into one main group or divided in two groups. Nonetheless, just one housekeeping gene is determined to all samples using *NormFinder* when no groups are defined. So, a different group was created to analyze the most stably couple (Table 3). When leaves and xylem were tested as different groups, the stability values were in the range between 0.011 and 0.094. *Eucons04* exhibited the lowest stability value. *NormFinder* identified *Eucons04* and *Eucons08* as the most appropriate combination of genes, showing a stability value of 0.009.



## Confirming the stability of *Eucalyptus* reference genes via *dxr* differential gene expression

Terpenoids are all derived from two common precursors, isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In higher plants, IPP and DMAPP are synthesized through two distinct pathways in separate cellular compartments, the cytosolic mevalonate (MVA) pathway and the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway that takes place in plastids. The MEP pathway, through which diterpenes are synthesized, has two important initial steps: (i) the formation of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate through the action of the DXP synthase (DXS), followed by the conversion of DXP into MEP by the action of the DXP reductoisomerase (DXR). As DXS and DXR are key enzymes catalyzing the two committed steps for isoprenoid biosynthesis, genes coding for DXS and DXR may play important roles in controlling the plastidic synthesis of isoprenoids and the downstream diterpene products [55-58].

It is known that the expression patterns of the DXR enzyme and its encoding gene vary quite consistently according to the plant and organ being assessed. This enzyme and encoding mRNA show increased expression in inflorescences and leaves of *A. thaliana* [56] and *Salvia miltiorrhiza* [58], but decreased levels were reported in stems and roots. In *Rauvolfia veticillata*, on the other hand, higher levels of *dxr* mRNA were reported in fruits and roots, with lowest levels in flowers [57]. In order to confirm the constitutive expression of the three best *Eucalyptus* genes selected as references (*Eucons04*, *Eucons08* and *Eucons21*), we tested them by normalizing the patterns of *dxr* gene expression in *Eucalyptus* and compared the results with those normalized by the traditional reference genes RibL23A and GAPDH. Therefore the *dxr* and reference gene expressions were measured by RT-qPCR in the same set of tissues/organs and *Eucalyptus* species previously tested. *Dxr* expression values were then normalized against the expression values of two reference genes, as shown in Figure 4.

In order to allow comparisons among reference genes, the average value of the pairwise reference gene relative expressions in the different organs/tissues tested was set to one (1) and taken to normalize the *dxr* relative expression. As expected, steady-state mRNA levels for the *dxr* gene were much higher in leaves followed by flowers, with lower values observed in xylem

tissues of *E. grandis* (Figure 4A). As shown in Figure 4, the pairwise combination of *Eucons04*, *Eucons08* or *Eucons21* allowed more confident results than the RibL23A/GAPDH pair. The relative expression of the *dxr* gene was much less variable when normalized with *Eucons* genes and, most importantly, much more concordant if compared to results normalized by the RibL23A/GAPDH pair. This is more evident in Figure 4B where no statistical difference was observed in *dxr* relative expression values among xylems from *E. grandis*, *E. globulus* and *E. pellita* when RibL23A/GAPDH were used as references, but was quite different when normalized with any two of the *Eucons* genes. Essentially the same conclusions were assumed by the analysis of *dxr* relative expression obtained with leaves and xylem tissues from *E. dunnii*, *E. pellita*, *E. saligna* and *E. urophylla* (results not shown).

## Discussion

Real-time, quantitative PCR (qPCR) and cDNA microarray measurements are highly reproducible techniques to assess gene expression at the steady-state mRNA level [59-61]. However, in comparison to classical reverse transcription-PCR (RT-PCR), the main advantages of RT-qPCR are its higher sensitivity, specificity of measurements, and broad quantification range of up to seven orders of magnitude [62, 63], besides being a great aid to study expression in genes whose transcript levels are known to be very low [64]. The analysis by RT-qPCR has become the most common method for validating whole-genome microarray data or of a smaller set of genes, and molecular diagnostics [65-66].

Accurate normalization is an absolute prerequisite for correct measurement of gene expression, and the most commonly used normalization strategy involves standardization to a single constitutively expressed control gene. Therefore, the ideal reference gene should exhibit invariable expression levels among all different cell types, tissues, organs, developmental stages or treatments that are submitted to the test organism [48, 49]. However, it has become clear that no single gene is constitutively expressed in all cell types and under all experimental conditions. It has extensively been shown that the expression of the so called “housekeeping” genes, although constant under some experimental conditions, can vary quite considerably in other cases, implying that the expression stability of the intended control gene has to be verified before

each experiment [5, 15, 18, 19, 67, 68]. Normalization with multiple reference genes is becoming the golden standard for the technique, but reports that identify such genes in plant research are limited, especially for woody species [9, 11-14, 16, 17, 21-43].

In the present work, we evaluated the results of microarray data concerning 21,442 *Eucalyptus* genes and selected the 50 most stably expressed ones in leaves of *E. grandis* and xylems of *E. grandis* and *E. globulus*. To do so, two statistical algorithms were employed, SAM and SDMA, and the same 50 candidate genes were pointed out as the most invariably expressed ones in microarrays, although the ranking of the genes was different (Table 1).

While SAM is a well established and popular program to analyze microarray data, with almost 6,500 citations in the PubMed [44], SDMA is here presented as a novel algorithm developed to better represent, in 3D graphs, the results of most stably expressed genes in microarrays. It is based on the principle that gene expression values with lower standard deviations are supposed to be the most similarly expressed among samples being tested.

By RT-qPCR, the expression stability of eight of the 50 best candidate genes selected by SAM and SDMA was addressed in different organs (leaves and flowers) and vascular tissues (xylem) derived from six species of *Eucalyptus*. Besides these eight novel genes, seven other genes previously tested as references in *Eucalyptus* or other plants were also evaluated, including classic housekeeping genes like those encoding tubulin (TUA2), histone H2B, GAPDH and the ribosomal protein L23A (RibL23A).

Genes encoding TUA2, GAPDH, histones and ribosomal proteins and RNAs are the most employed and tested housekeeping genes in plants [5, 7, 9, 14, 19, 24, 41, 42, 68]. According to our RT-qPCR results and data analysis by *geNorm* and *NormFinder*, all these housekeeping genes showed quite consistent stability in expression in *Eucalyptus*, especially RibL23A (Figure 3 and Table 3). Nevertheless, the employment of the pair GAPDH/RibL23A to normalize the expression of the isoprenoid biosynthetic gene *dxr* proved that, at least together, these genes are not suited as references for *Eucalyptus* gene expression studies. Indeed, the combination of any pair of the three best reference genes here presented, *Eucons04*, *08* and *21*, to normalize the

results of *dxr* gene expression was intrinsically consistent, leading to a quite different interpretation of the *dxr* gene expression in xylem tissues of three *Eucalyptus* species, as shown in Figure 4B.

The stability of the TUA2 gene has been often used to normalize RT-qPCR expression data [36, 38, 42]. Analysis of the *Eucalyptus* microarray and RT-qPCR data revealed that, indeed, it has a quite stable expression. Nevertheless, this gene is far from being the best reference for *Eucalyptus* among those tested (Figure 3 and Table 3). TUA2 has been shown to be a suitable normalization gene during plant development in *Orobanche ramosa* [36], for comparison of gene expressions among species of *Populus* [38], and during *E. globulus* adventitious rooting *in vitro* [42], but it was unstable during seedling development in *A. thaliana* [23, 68, 69], in different tissues or under biotic and abiotic stresses in potato [25] and cucumber [34]. Similar results were also obtained by Artico *et al.* [33], Silveira *et al.* [17], and Expósito-Rodríguez *et al.* [30], respectively working with cotton, *Brachyariabrizantha* and tomato.

Like TUA2, the GAPDH gene proved to reach stability values consistent enough to be considered a reference in our studies with *Eucalyptus* (Figure 3 and Table 3), although much better candidates were pointed out. According to Kim *et al.* [21], the relative expression of GAPDH in rice varied up to two-fold. In *Brachypodium distachyon*, results of RT-qPCR showed that the GAPDH gene was stably expressed under various abiotic stresses, without considerable variation in response to growth hormones, although it exhibited less stability according to the tissue type being evaluated [26]. In tomato, GAPDH was poorly ranked as a good reference gene based in the analysis of EST data [29] and RT-qPCR assays during plant development [30] or under abiotic stress [31]. Similar results were obtained with peach, where GAPDH was not among the best reference genes in the experimental groups [13]. According to Tong *et al.* [13], reasons for the observed discrepancies may be that GAPDH not only acts as a component of the glycolytic pathway but also takes part in other processes. Therefore, the expression profile of GAPDH might fluctuate according to the corresponding experimental conditions.

The gene encoding histone H2B also exhibited levels of steady-state mRNA quite constant in the different *Eucalyptus* organs/tissues evaluated in this study (Figure 3 and Table 3).

However, like the other traditional housekeeping genes, its stability was overcome by the novel *Eucons* genes discussed later. During *E. globulus* adventitious rooting *in vitro*, H2B, along with TUA2, was among the most stably expressed genes [42]. The gene encoding histone H3 in chicory was also indicated as good reference for RT-qPCR assay normalization [14]. Nevertheless, Czechowski *et al.* [5], based on the analysis of large amount of data derived from microarray studies, showed that genes encoding histones were not among the best reference genes for *A. thaliana*. Similar results were obtained by Lin & Lai [41] when studying synchronized longan tree embryogenic cultures at different developmental stages and temperatures.

Genes encoding ribosomal proteins and rRNAs are often viewed as a homogeneous collection of housekeeping genes and were employed as references in many works [9, 19, 24, 42, 68]. Nevertheless, members of this gene family were shown to have extraribosomal functions with strong variations in the pattern of their expressions [70, 71]. For instance, these genes were proved to be specifically induced or repressed in particular tissues during different stages like tuber [72] and root [73] developments; or in response to stresses like genotoxicity [74] and cold [75, 76]. Volkov *et al.* [68] specifically evaluated the tissue-specific changes in the RibL23A mRNA levels in different organs of *A. thaliana*. Compared to leaves, the level of RibL23A mRNA was increased in flowers and reduced in stems and siliques. These observations are in accordance with the idea that ribosomal protein genes in plants are transcriptionally up-regulated in actively growing tissues and down-regulated in metabolically inactive tissues [77, 78]. Interestingly, among the traditional housekeeping genes tested in the present work, RibL23A was the most stable, only outperformed by the *Eucons* genes discussed later.

The At2g28390.1 sequence tested in the present work was originally identified as one of the best reference genes for *A. thaliana* gene expression analysis by Czechowski *et al.* [5] both by microarray and RT-qPCR analysis. The orthologous *Eucalyptus* sequence was tested by Almeida *et al.* [42] during *in vitro* adventitious rooting, proving it to be one of the best reference genes for RT-qPCR under the conditions assayed. The At2g28390.1 sequence putatively encodes a SAND family protein member, a membrane protein related with vesicle traffic [5, 79].

Considering *Eucalyptus* leaves, xylems and flowers tested in the present work, the At2g28390.1 gene was among the least stable ones (Figure 3 and Table 3).

Similar results were obtained for *Euc10* and *EuC12* genes. Both sequences were previously identified as strong reference gene candidates for *E. grandis* vs *E. globulus* xylem and leaf gene expression studies (unpublished results). Almeida *et al.* [42] proved that *Euc12* is, indeed, a good reference gene for RT-qPCR studies during *E. globulus* *in vitro* rooting. In the present work, both genes exhibited acceptable stability values (Figure 3 and Table 3), but being outperformed by the *Eucons* genes. *E. grandis* sequences for *Euc10* and *Euc12* were derived from At3g07640.1 (encoding an unknown protein) and At1g32790.1 (encoding a putative RNA-binding protein) from *A. thaliana*, also pointed out by Czechowski *et al.* [5] as best reference genes based both in microarrays and RT-qPCR.

The analysis of the *Eucalyptus* microarray data allowed us to identify the 50 most stable genes in xylems of *E. grandis* and *E. globulus* and leaves of *E. grandis* (Table 1). We named these potential reference genes *Eucons* after “*Eucalyptus* constitutives”. RT-qPCR analysis of eight of the selected genes proved that these genes were indeed very reliable references for the normalization of gene expression in different *Eucalyptus* organs and tissues, especially those named *Eucons04*, *08* and *21*. Analysis of the function of the putative encoded proteins revealed that these genes may also belong to the so called housekeeping class of genes.

*Eucons04* putatively encodes a protein highly similar to cyclin-dependent protein kinases (CDK) such as *R. communis* CDK8 and CDKs from *A. thaliana* [80]. These types of proteins are able to phosphorylate protein-target amino acids in different metabolic pathways and, most notably, in cell cycle control [81].

*Eucons08* is similar to *R. communis* and *A. thaliana* genes possibly encoding the transcription elongation factor SII (TFIIS). SII is considered one of the numerous elongation factors that enable RNA polymerase II to transcribe faster and/or more efficiently. It engages transcribing RNA polymerase II and assists it in bypassing blocks to elongation by stimulating a cryptic, nascent RNA cleavage activity intrinsic to RNA polymerase [82].

*Eucons21* encodes a protein with significant sequence similarity to a putative *R. communis* aspartyl-tRNA synthetase. Aminoacyl-tRNA synthetases catalyze the addition of amino acids to their cognate tRNAs. In the case of aspartyl-tRNA synthetase, the amino acid bound to tRNAs is aspartate. In plants, all aminoacyl-tRNA synthetases are nuclear-encoded and are post-translationally targeted to the compartments where protein synthesis takes place, i.e. cytoplasm, mitochondria or plastids [83].

According to the analysis of the RT-qPCR data performed with software NormFinder, *Eucons04* and *Eucons08* are the best reference genes pairwise when assessing test gene expression exclusively in leaves, or in leaves along with xylem tissues. If xylem tissues are solely analyzed, *Eucons07* and *Eucons27* would be best references (Table 3). *Eucons07* encodes a protein similar to a member of the ABC transporter family from *Arabidopsis lyrata* while *Eucons27* putatively encodes a factor related to peroxisome biogenesis. Interestingly, an ABC transporter ATPase-encoding gene was indicated as one of the best reference genes for RT-qPCR analysis of embryogenic cell cultures of *Cyclamen persicum* [37]. Kamada *et al.* [84], analyzing expression profiles of genes encoding peroxisomal proteins in *A. thaliana* showed that these genes are expressed in all plant organs, suggesting that they play a role in metabolic pathways of unidentified plant peroxisomes and may have a constitutive expression in plants.

It is important to mention that, when considering all organs/tissues of all *Eucalyptus* species evaluated by RT-qPCR, the stability values of *Eucons04*, *08* and *21* are not statistically different from those observed for H2B, RibL23A and *Eucons06* according to the NormFinder analysis, as can be observed in Figure 3C and Table 3. Nevertheless, the algorithm *geNorm* also pointed *Eucons04*, *08* and *21* as the best reference genes for the group of variables evaluated.

Although outperformed by *Eucons04* and *08* as reference genes, the remaining *Eucons06*, *32* and *43* genes also presented consistently constant stability values in our analysis. *Eucons06* putatively encodes a plastidic ATP/ADP-transporter, while *Eucons32* and *43* respectively encode a nitrogen regulatory protein and a serine/threonine-protein kinase. As far as we are concerned, none of these sequences was previously indicated as potential references to normalize studies of gene expression by RT-qPCR.

## Conclusions

Based on the microarray expression analysis of more than 21,000 *Eucalyptus* genes we identified the 50 most stably expressed genes in leaves (*E. grandis*) and xylem tissues (*E. grandis* and *E. globulus*). We proved by RT-qPCR that a sample of eight representatives of these reference genes are indeed very stable in different organs/tissues and species of *Eucalyptus*, outperforming traditional housekeeping genes. Considering that two statistical programs allowed us to reach similar interpretations of the microarray results, and that potential discrepancies should be expected, the good agreement of our results with the independent approaches strongly suggested that *Eucons04*, *Eucons08* and *Eucons21* should be regarded as best suitable reference genes for normalization of gene expression studies in *Eucalyptus* species. In summary, these findings provide useful tools for the normalization of RT-qPCR experiments and will enable more accurate and reliable gene expression studies related to functional genomics in *Eucalyptus*.

## Methods

### Plant Material

For microarray studies, xylem tissues were collected from four-year-old, field-grown *E. grandis* and *E. globulus* trees located at Hortoflorestal Barba Negra (Aracruz Celulose S.A., today's Fibria) in Barra do Ribeiro, RS, Brazil. Xylem was collected by scraping the exposed vascular tissue after the removal of the 0.5-1 cm-thick stem bark. Two lines of genetically unrelated matrixes were chosen and each line was represented by two clones (biological duplicates), therefore completing eight xylem samples. From both clones of one of the *E. grandis* lines, mature leaves were also collected. To minimize the proportion of primary xylem mainly located in the main veins of leaves, only leaf blades without the central vein were used for this study. Tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

For RT-qPCR studies, the same *E. grandis* and *E. globulus* trees were sampled, along with xylem and leaves of field grown *E. dunnii*, *E. pellita*, *E. saligna* and *E. urophylla*. *E.*



*grandis* flowers were also collected under the same conditions. Harvested organs/tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further analysis.

### RNA extraction

Total RNA was extracted using the PureLink Plant RNA Purification (Invitrogen) reagent according to the manufacturer's instructions for small scale RNA isolation. About 20 µg of total RNA was sent to NimbleGen Systems Inc. (Reykjavik, Island) for cDNA synthesis and microarray hybridizations.

### Oligonucleotide microarray hybridization

Microarray experiments were carried out by Roche NimbleGen. In total, 21,442 unigenes were selected from the *Genolyptus* EST dataset to compose a basic chip. Nine oligonucleotides, 50 bp long, distributed throughout each sequence and with close melting temperatures were designed and synthesized for each sequence consensus or singleton. Probes were randomly distributed on two blocks of each chip in duplicated form, adding up to 385,856 features per chip. Therefore, each chip was composed of two blocks (technical replicate) containing the same collection of randomly distributed probes, and 18 hybridization values were collected for each gene from every chip. A total of ten identical chips were produced. Two chips were hybridized with cDNA samples from *E. grandis* mature leaves, and eight chips were destined to xylem cDNA hybridizations. After submission of total RNA samples to NimbleGen, prepared as described above, cDNAs were labeled with Cy3 and hybridizations, washing, scanning, data collection and initial data normalization were performed according to NimbleGen's standard protocols.

### Data processing and statistical analysis

Microarray expression data were normalized into log<sub>2</sub> intensity values. Afterwards, we have done three distinct analyses. In the first one, we have compared hybridizations from *E. grandis* leaf and xylem. In the second one, we have compared *E. grandis* xylem and *E. globulus* xylem.

In both previous analyses, the aim was to find the most similarly and the most differentially expressed genes. In the third analysis, we have looked for the most similarly expressed genes in hybridizations from the three organs/tissues.

In each analysis, data was mean-centered as follows. A reference set was generated by averaging the expression of each gene over all hybridizations. Each hybridization data was subtracted from the reference data set, generating new mean-centered data. In the next step, the “relative difference” in gene expression was computed. The relative difference score was used to identify the most similarly and the most differentially expressed genes. We have performed the Two Class Unpaired Significance Analysis of Microarrays (SAM; [44]) when comparing two tissues, and a Multiclass SAM when comparing the three organs/tissues. In order to perform the experiments we have used SAM Version 3.09 and R 2.9.2 tools and the SDMA V1.0 tool as described next.

### Standard Deviation Microarray Analysis (SDMA)

In this paper we propose a new approach, called SDMA, for finding the most similarly expressed genes in microarray studies. SDMA is the acronym for Standard Deviation Microarray Analysis. The formal statement of SDMA can be defined as follows: Let  $G = \{g_1, g_2, g_3, \dots, g_m\}$  be a set of genes. Let  $H = \{h_1, h_2, h_3, \dots, h_o\}$  be a set of hybridizations, where  $o \geq 2$ . Let  $M = \{T_1, T_2, T_3, \dots, T_n\}$  be a set of tissues, where  $n \geq 2$  and each element  $T$  contains a set of hybridizations such that  $T \subset H$ , and  $T_x \cap T_y = \emptyset$  for any  $x \neq y$ . Let  $E_{hp} = \{E_{hp\_g1}, E_{hp\_g2}, E_{hp\_g3}, \dots, E_{hp\_gm}\}$  be a set of expressions levels of  $m$  genes in  $hp$  hybridization, where  $p \leq o$ . Let  $Avg(T_p g_q)$  be the average of expression levels of gene  $q$  over all hybridizations from tissue  $p$ . Let  $Sd(g_q)$  be the standard deviation of gene  $q$  considering  $Avg(T_1 g_q), Avg(T_2 g_q), Avg(T_3 g_q), \dots$  and  $Avg(T_n g_q)$ .  $Sd_g$  can assume any value from 0 until  $\infty$ .  $Sd_{gq}$  is equals to zero when  $Avg(T_1 g_q) = Avg(T_2 g_q) = Avg(T_3 g_q) = \dots = Avg(T_n g_q)$ , that is, the gene  $q$  has exactly the same expression level in all tissues. The value of  $Sd_{gq}$  increases proportionally to growth of difference among  $Avg(T_1 g_q), Avg(T_2 g_q), Avg(T_3 g_q), \dots$  and  $Avg(T_n g_q)$ . So, SDMA can rank the  $n$  most similarly expressed, that is, those  $n$  genes which  $Sd_g$  is closer to zero.

When viewing SDMA graphs, a main diagonal line is supposed to exist since it contains every possible data points where  $Avg(T_1g) = Avg(T_2g) = Avg(T_3g) = \dots = Avg(T_n g)$ . Although it is rare to find a gene obeying this restriction when comparing similar tissues, it is supposed to exist a concentration of data points around the main diagonal line. Otherwise, when comparing very dissimilar tissues, data points are supposed to be dispersed in space.

Regarding the *Eucalyptus* microarray analysis, a set of 21,442 genes was considered, that is,  $G = \{g_1, g_2, g_3, \dots, g_{21,442}\}$ . There were 3 tissues evaluated, that is,  $M = \{T_1, T_2, T_3\}$ , where  $T_1$  represents *E. grandis* leaf,  $T_2$  represents *E. grandis* xylem and  $T_3$  represents *E. globulus* xylem. There was a set of 20 hybridizations, that is,  $H = \{h_1, h_2, h_3, \dots, h_{20}\}$ , where  $T_1 = \{h_1, h_2, h_3, h_4\}$ ,  $T_2 = \{h_5, h_6, \dots, h_{12}\}$  and  $T_3 = \{h_{13}, h_{14}, \dots, h_{20}\}$ . We also considered  $SD_g$  as the standard deviation of expression levels of a gene  $g$  in  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$ . Moreover, microarray expression data were scaled into  $\log_{10}$  intensity values. It resulted in values for expression levels from 4.66 to 5.20. The SDMA approach ranked the genes according to their similarities in expression levels in the three distinct tissues. So, genes with minor standard deviation are supposed to be the most similarly expressed ones. Otherwise, genes with higher standard deviation are supposed to be the most differentially expressed ones.

## RT-qPCR

Primer pairs for RT-qPCR were designed using program PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>) and are listed in Table 2. The relative transcript abundance was detected by SYBR Green and PCRs were carried out in a total volume of 20  $\mu$ L using thermocycler StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reaction conditions included one initial cycle of denaturation at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 sec (denaturation) and 60 °C for 15 sec (annealing and elongation). PCRs were followed by a melting curve program (60 to 95 °C with a heating rate of 0.1 °C per sec and a continuous fluorescence measurement). A negative control was run without cDNA template in all assays to assess the overall amplification specificity.

## Nucleotide sequence annotation

The Gene Ontology Functional Annotation Tool Blast2GO [46] was used to assign GO identities and enzyme commission numbers. This tool also enabled statistical analysis related to over representation of functional categories based on a Fisher Exact statistic methodology.

## Authors' contributions

LAO, MCB and FMB participated in the preparation of biological samples, RT-qPCR analysis, statistical analysis, annotation data and helped to draft the manuscript. SSC performed microarray and statistical analysis, construction of graphs and tables. RM helped performing the RT-qPCR analysis. JF conceived and participated in the coordination of the study. GP conceived the study, participated in its design, helped performing the microarray study and the preparation of biological samples. All authors read and approved the final paper.

## Acknowledgements

We acknowledge M.Sc. Marta Dalpian Heis for her guidance and review of the statistical tests. We are grateful to the staff of Aracruz Celulose S.A. (today's Fibria) for providing the biological material and *Genolyptus* Project members that selected the *Eucalyptus* material. This work was financially supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Brazilian Ministry of Science and Technology) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Brazilian Ministry of Education).

## References

1. Foucart C, Paux E, Ladouce N, San-Clemente H, Grima-Pettenati J, Sivadon P: **Transcript profiling of a xylem vs phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xylogenesis in *Eucalyptus*.** *New Phytol* 2006, **170**:739-752.
2. Grattapaglia D, Kirst M: ***Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools.** *New Phytol* 2008, **179**:911-929.
3. Steane DA, Nicolle D, McKinnon GE, Vaillancourt RE, Potts BM: **Higher-level relationships among the eucalypts are resolved by ITS-sequence data.** *Aust Syst Bot* 2002, **15**:49-62.
4. Rengel D, San Clemente H, Servant F, Ladouce N, Paux E, Wincker P, Couloux A, Sivadon P, Grima-Pettenati J: **A new genomic resource dedicated to wood formation in *Eucalyptus*.** *BMC Plant Biol* 2009, **9**:36.
5. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK: **Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization.** *Plant Phys* 2005, **139**:5-17.
6. Kim S, Kim T: **Selection of optimal internal controls for gene expression profiling of liver disease.** *BioTechniques* 2003, **35**:456-460.
7. Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER: **Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR.** *J Mol Diagn* 2001, **3**:26-31.
8. Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL: **Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR.** *BioTechniques* 2004, **36**:84-91.
9. Barsalobres-Cavallari CF, Severino FE, Maluf MP, Maia IG: **Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions.** *BMC Mol Biol* 2009, **10**:1.
10. Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström M-L: **Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes.** *Scand J Immunol* 2004, **59**:566-573.

11. Schmidt GW, Delaney SK: **Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress.** *Mol Gen Genom* 2010, **283**:233-241.
12. Yang Y, Hou S, Cui G, Chen S, Wei J, Huang L: **Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza*.** *Mol Biol Rep* 2010, **37**:507-513.
13. Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z: **Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR.** *BMC Mol Biol* 2009, **10**:71.
14. Maroufi A, Van Bockstaele E, De Loose M: **Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR.** *BMC Mol Biol* 2010, **11**:15.
15. Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L: **Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references.** *J Exp Bot* 2009, **60**:487-493.
16. Libault M, Thibivilliers S, Bilgin DD, Radwan O, Benitez M, Clough SJ, Stacey G: **Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization.** *Plant Genome* 2008, **1**:44-54.
17. Silveira ED, Alves-Ferreira M, Guimarães LA, Silva FR da, Carneiro VTDC: **Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*.** *BMC Plant Biol* 2009, **9**:84.
18. Hruz T, Wyss M, Docquier M, Pfaffl MW, Masanetz S, Borghi L, Verbrugghe P, Kalaydjieva L, Bleuler S, Laule O, Descombes P, Gruissem W, Zimmermann P: **RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization.** *BMC Genomics* 2011, **12**:156.
19. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E: **Housekeeping genes as internal standards: use and limits.** *J Biotechnol* 1999, **75**:291-295.
20. Kim B-R, Nam H-Y, Kim S-U, Kim S-I, Chang Y-J: **Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice.** *Biotechnol Lett* 2003, **25**:1869-1872.
21. Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP: **Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **345**:646-651.

22. Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijsen D, Vangronsveld J, Cuypers A: **Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations.** *Planta* 2008, **227**:1343-1349.
23. Hong SM, Bahn SC, Lyu A, Jung HS, Ahn JH: **Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in *Arabidopsis*.** *Plant Cell Physiol* 2010, **51**:1694-1706.
24. Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Manners JM: **Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane.** *Plant Mol Biol Rep* 2004, **22**:325-337.
25. Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D: **Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress.** *J Exp Bot* 2005, **56**:2907-2914.
26. Hong S-Y, Seo PJ, Yang M-S, Xiang F, Park C-M: **Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR.** *BMC Plant Biol* 2008, **8**:112.
27. Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q, Fu Y-F: **Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR.** *BMC Mol Biol* 2009, **10**:93.
28. Jian B, Liu B, Bi Y, Hou W, Wu C, Han T: **Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:59.
29. Coker JS, Davies E: **Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data.** *BioTechniques* 2003, **35**:740-742, 744, 746 passim.
30. Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA: **Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process.** *BMC Plant Biol* 2008, **8**:131.
31. Løvdaal T, Lillo C: **Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress.** *Anal Biochem* 2009, **387**:238-242.
32. Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M: **Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat.** *BMC Mol Biol* 2009, **10**:11.

33. Artico S, Nardeli SM, Brilhante O, Grossi-de-Sa MF, Alves-Ferreira M: **Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data.***BMC Plant Biol* 2010, **10**:49.
34. Wan H, Zhao Z, Qian C, Sui Y, Malik AA, Chen J: **Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber.** *Anal Biochem* 2010, **399**:257-261.
35. Martin RC, Hollenbeck VG, Dombrowski JE: **Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lolium perenne*.** *Crop Sci* 2008, **48**:1881-1887.
36. González-Verdejo CI, Die JV, Nadal S, et al. **Selection of housekeeping genes for normalization by real-time RT-PCR: analysis of Or-MYB1 gene expression in *Orobanche ramosa* development.** *Anal Biochem* 2008, **379**:176-181.
37. Hoenemann C, Hohe A: **Selection of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in cell cultures of *Cyclamen persicum*.** *Elect J Biotechnol* 2011, **14**.
38. Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH: **Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies.** *BMC Plant Biol* 2004, **4**:14.
39. Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, Van Wuytswinkel O: **The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants.***Plant Biotechnol J* 2008, **6**:609-618.
40. Reid K, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund S: **An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development.** *BMC Plant Biol* 2006, **6**:27.
41. Lin YL, Lai ZX: **Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree.** *Plant Sci* 2010, **178**:359-365.
42. Almeida MR de, Ruedell CM, Ricachenevsky FK, Sperotto RA, Pasquali G, Fett-Neto AG: **Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill.***BMC Mol Biol* 2010, **11**:73.
43. Boava LP, Laia ML, Jacob TR, Dabbas KM, Gonçalves JF, Ferro JA, Ferro MIT, Furtado EL: **Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR.** *BMC Res Notes* 2010, **3**:43.



44. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.***Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:5116-5121.
45. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
46. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M: **Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.** *Bioinformatics* 2005, **21**:3674-3676.
47. Dambrauskas G, Aves SJ, Bryant JA, Francis D, Rogers HJ: **Genes encoding two essential DNA replication activation proteins, Cdc6 and Mcm3, exhibit very different patterns of expression in the tobacco BY-2 cell cycle.***J Exp Bot* 2003, **54**:699-706.
48. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**:research0034.1-0034.11.
49. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF: **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.***Cancer Res* 2004, **64**:5245-5250.
50. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
51. Allen D, Winters E, Kenna PF, Humphries P, Farrar GJ: **Reference gene selection for real-time rtPCR in human epidermal keratinocytes.***J Dermatol Sci* 2008, **49**:217-225.
52. Coll A, Nadal A, Collado R, Capellades G, Kubista M, Messeguer J, Pla M: **Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices.***Plant Mol Biol* 2010, **73**:349-362.
53. Radonić A, Thulke S, Bae H-G, Müller MA, Siegert W, Nitsche A: **Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections.***Virol J* 2005, **2**:7.

54. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M: **A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines.***Methods* 2010, **50**:S1-5.
55. Wu SJ, Shi M, Wu JY: **Cloning and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene for diterpenoid tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage) hairy roots.***Biotechnol Appl Biochem* 2009, **52**:89-95.
56. Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, Ferrer A, Boronat A, Campos N: **Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway.** *Plant Physiol* 2002, **129**:1581-1591.
57. Liao Z, Chen R, Chen M, Yang C, Wang Q, Gong Y: **A new 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene encoding the committed-step enzyme in the MEP pathway from *Rauvolfia verticillata*.** *Z. Naturforsch C.* 2007, **62**:296-304.
58. Yan X, Zhang L, Wang J, Liao P, Zhang Y, Zhang R, Kai G: **Molecular characterization and expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia miltiorrhiza*.** *Acta Physiol Plant* 2009, **31**:1015-1022.
59. Yue H, Eastman PS, Wang BB, Minor J, Doctolero MH, Nuttall RL, Stack R, Becker JW, Montgomery JR, Vainer M, Johnston R: **An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression.***Nucleic Acids Res* 2001, **29**:E41-1.
60. Stankovic KM, Corfas G: **Real-time quantitative RT-PCR for low-abundance transcripts in the inner ear: analysis of neurotrophic factor expression.** *Hear Res* 2003, **185**:97-108.
61. Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M: **Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification.** *Clin Chem* 2004, **50**:509.
62. Bustin SA: **Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.***J Mol Endocrinol* 2002, **29**:23-39.
63. Gachon C, Mingam A, Charrier B: **Real-time PCR: what relevance to plant studies?***J Exp Bot* 2004, **55**:1445-1454.
64. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G: **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Nat Biotechnol* 1993, **11**:1026-1030.

65. Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJM, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Linehan WM, Knezevic V, Emmert-BuckMR: **Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments.***Nat Genet* 2002, **32 Suppl**:509-514.
66. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C: **An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression.***Methods* 2001, **25**:386-401.
67. Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Van Wuytswinkel O: **Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR.***Plant Cell* 2008, **20**:1734-1735.
68. Volkov RA, Panchuk II, Schöffl F: **Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR.***J Exp Bot* 2003, **54**:2343-9.
69. Zhou L, Lim Q-E, Wan G, Too H-P: **Normalization with genes encoding ribosomal proteins but not GAPDH provides an accurate quantification of gene expressions in neuronal differentiation of PC12 cells.***BMC Genomics* 2010, **11**:75.
70. McIntosh KB, Bonham-Smith PC: **The two ribosomal protein L23A genes are differentially transcribed in *Arabidopsis thaliana*.** *Genome* 2005, **48**:443-454.
71. Wool IG: **Extraribosomal functions of ribosomal proteins.** *Trends Biochem Sci* 1996, **21**:164-165.
72. Taylor MA, Arif SA, Pearce SR, Davies HV, Kumar A, George LA: **Differential expression and sequence analysis of ribosomal protein genes induced in stolon tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) during the early stages of tuberization.** *Plant Physiol* 1992, **100**:1171-1176.
73. Williams ME, Sussex IM: **Developmental regulation of ribosomal protein L16 genes in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant J* 1995, **8**:65-76.
74. Revenkova E, Masson J, Koncz C, Afsar K, Jakovleva L, Paszkowski J: **Involvement of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress.***EMBO J* 1999, **18**:490-499.
75. Kim K-Y, Park S-W, Chung Y-S, Chung C-H, Kim J-I, Lee J-H: **Molecular cloning of low-temperature-inducible ribosomal proteins from soybean.***J Exp Bot* 2004, **55**:1153-1155.

76. Saez-Vasquez J, Gallois P, Delseny M: **Accumulation and nuclear targeting of BnC24, a *Brassica napus* ribosomal protein corresponding to a mRNA accumulating in response to cold treatment.** *Plant Sci* 2000, **156**:35-46.
77. Marty I, Brugidou C, Chartier Y, Meyer Y: **Growth-related gene expression in *Nicotiana tabacum* mesophyll protoplasts.** *Plant J* 1993, **4**:265-278.
78. Moran DL: **Characterization of the structure and expression of a highly conserved ribosomal protein gene, L9, from pea.***Gene* 2000, **253**:19-29.
79. Cottage A, Mullan L, Portela MBD, Hellen E, Carver T, Patel S, Vavouri T, Elgar G, Edwards YJK: **Molecular characterisation of the sand protein family: a study based on comparative genomics, structural bioinformatics and phylogeny.** *Cel Mol Biol Lett* 2004, **9**:739-753.
80. Menges M, Jager SM de, Gruissem W, Murray JAH: **Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control.***Plant J* 2005, **41**:546-66.
81. Umeda M, Shimotohno A, Yamaguchi M: **Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants.***Plant Cell Physiol* 2005, **46**:1437-42.
82. Wind M, Reines D: **Transcription elongation factor SII.** *Bioessays* 2000, **22**:327-336.
83. Duchêne A-M, Giritch A, Hoffmann B, Cognat V, Lancelin D, Peeters NM, Zaepfel M, Maréchal-Drouard L, Small ID: **Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*.***Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:16484-16489.
84. Kamada T, Nito K, Hayashi H, Mano S, Hayashi M, Nishimura M: **Functional differentiation of peroxisomes revealed by expression profiles of peroxisomal genes in *Arabidopsis thaliana*.***Plant Cell Physiol* 2003, **44**:1275-1289.

## Figures

### Figure 1 - Expression of 21,442 *Eucalyptus* genes in *E. grandis* leaves and xylem and in *E. globulus* xylem evaluated by microarray hybridization analysis.

(A) Scatter plot of the observed relative difference  $d(i)$  (observed score) versus the expected relative difference  $d_E(i)$  (expected score) built with the Significance Analysis of Microarray (SAM) method. The solid black line indicates the line for  $d(i) = d_E(i)$ , where the observed relative difference is identical to the expected relative difference with a delta set to 0.2. Solid and dotted red and green lines represent genes whose observed relative differences were lower or higher the expected relative differences, i.e., whose expressions varied among tissues tested. (B) Three-dimensional graph generated with the Standard Deviation Microarray Analysis (SDMA) method evidencing genes (open circles) expressed in positions equivalent to their overall average expression among the three conditions analyzed in the microarrays, i.e., leaves (EgrL,  $z$  axis) and xylem (EgrX,  $x$  axis) of *E. grandis* and xylem of *E. globulus* (EglX,  $y$  axis). The higher concentration of circles around the main diagonal line proved that most genes exhibited very similar expression values in the analyzed tissues. The most differentially expressed genes appeared proportionally far from the main diagonal line. (C) SDMA 3D graph representing the 50 most invariable *Eucalyptus* genes according to microarray data. Points representing selected genes tend to form a straight line since their means of expression are similar to the global average, with a standard deviation tending to zero.

### Figure 2 - Functional classification of the 50 most stable *Eucalyptus* genes according to microarray hybridization data analysis through SAM and SDMA.

Gene Ontology hits registered for the 50 most constitutive genes that could be assigned a putative function based on Swiss-Prot query. Only known genes are shown.

### Figure 3 - Expression stability of candidate genes evaluated by RT-qPCR in all tissues/organs and species of *Eucalyptus* analyzed.

RT-qPCR results were analyzed according to algorithms *geNorm* and *NormFinder* and represent the general average values of expression. Lower the values, more stable the gene expression. (A) Average  $M$  stability values of candidate gene expressions calculated with the *geNorm* algorithm. As indicated, genes positioned to the right are the most stable in expression among variables assayed. (B) Pairwise variation ( $V$ ) values calculated with the *geNorm* algorithm in order to

estimate the optimal number of reference genes necessary for accurately normalize the expressions of genes of interest. Values lower than 0.15 indicate that no additional genes are required for the normalization of expression in organs/tissues studied. (C) Stability values of gene expressions calculated with the *NormFinder* algorithm.

**Figure 4 - Relative expression of the isoprenoid biosynthetic gene *dxr* in different tissues/organs of *Eucalyptus* by RT-qPCR and normalization with different reference gene pairs.**

Gene pairs employed as references are indicated in the bottom of the graphics. Average values of reference gene relative expressions in the different tissues were set to one (1) in order to normalize the *dxr* expressions. (A) Expression patterns of the *dxr* gene in flowers, leaves and xylem tissues of *E. grandis*. (B) Expression patterns of the *dxr* gene in xylem tissues of *E. grandis*, *E. globulus* and *E. pellita*.

## Tables

**Table 1 - Fifty most stable *Eucalyptus* genes selected from microarray data analysis employing the SDMA and the SAM statistical algorithms.**

Gene names and the identity of *E. grandis* genomic (EUCAGEN) scaffolds where sequences are located, as well as EMBL or GenBank accession codes (Gene ID) and putative functional identity of sequences based on BLAST analysis are indicated along with the estimated (e) value. Results of the statistical analysis performed are indicated: standard deviations (SD) for the SDMA method, and fold change and final score (*d*) of the SAM method. Genes were ranked from highest to lowest stability for both methods. Lines shaded in gray represent genes selected for validation via RT-qPCR analysis.

**Table 2 - Primer sequences (5'-3') employed in RT-qPCR analysis of candidate reference genes for *Eucalyptus* including genes traditionally employed as references in plant gene expression studies.**

Gene name abbreviations, GenBank, EMBL or TAIR accession codes and the putative functional identity of genes based on BLAST analysis are indicated. The EUCAGEN scaffolds containing

the genome sequences of the referred genes are presented. Based on the *Eucalyptus* sequences, primers were designed as shown along with amplicon lengths (bp).

**Table 3 - Expression stability values (SV) and standard deviations (SD) of *Eucalyptus* reference genes calculated by the *NormFinder* software.**

Complementary DNAs from leaf and xylem (*E. grandis*, *E. dunnii*, *E. pellita*, *E. saligna* and *E. urophylla*), xylem (*E. globulus*) and flower (*E. grandis*) were subjected to RT-qPCR and results were analyzed with the *NormFinder* software in single groups of leaf or xylem, or all tissues/organs together. Results for the groups of leaf and xylem together are also presented. Best two reference genes for all the analysis performed are indicated at the bottom.

**FIGURE 1**

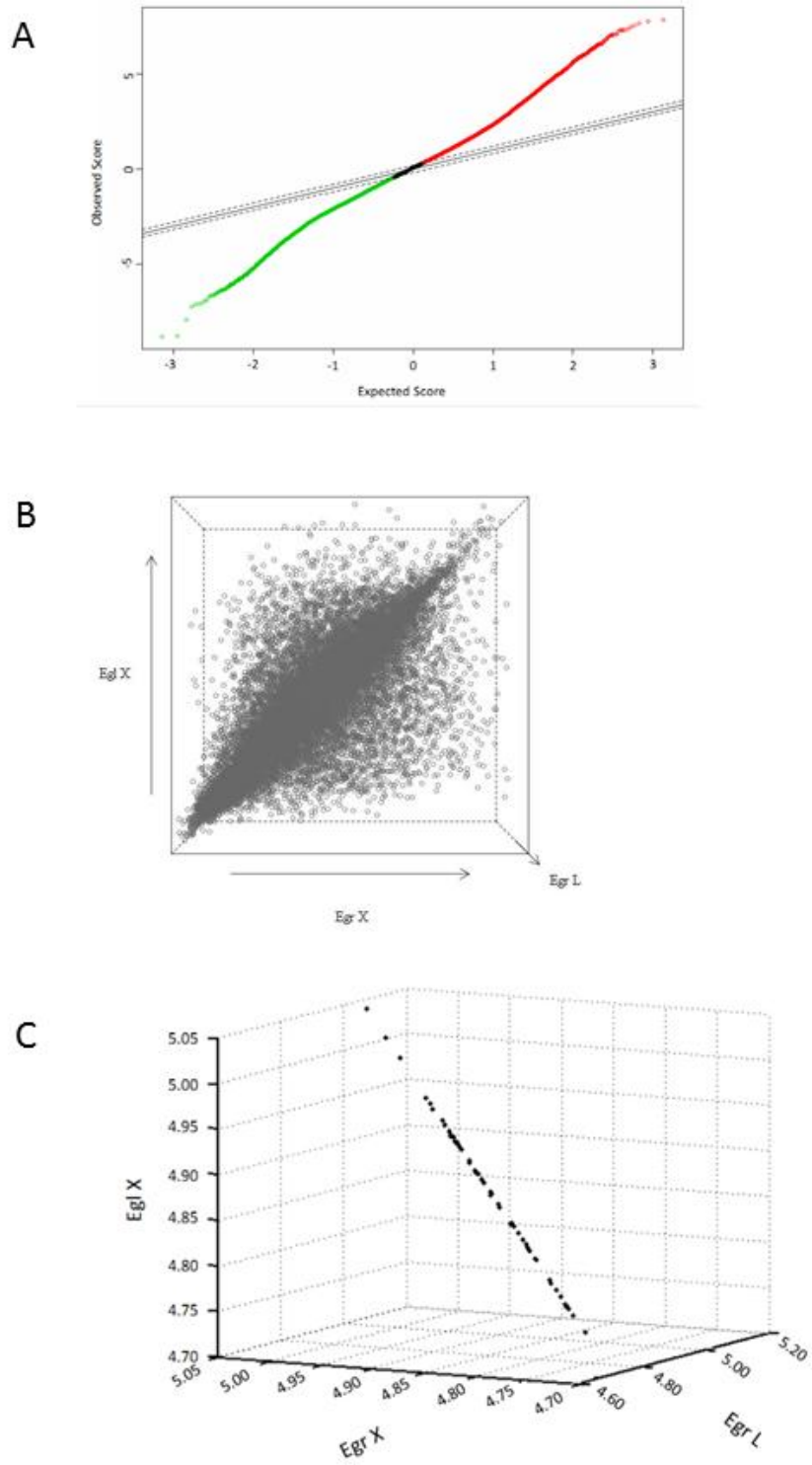
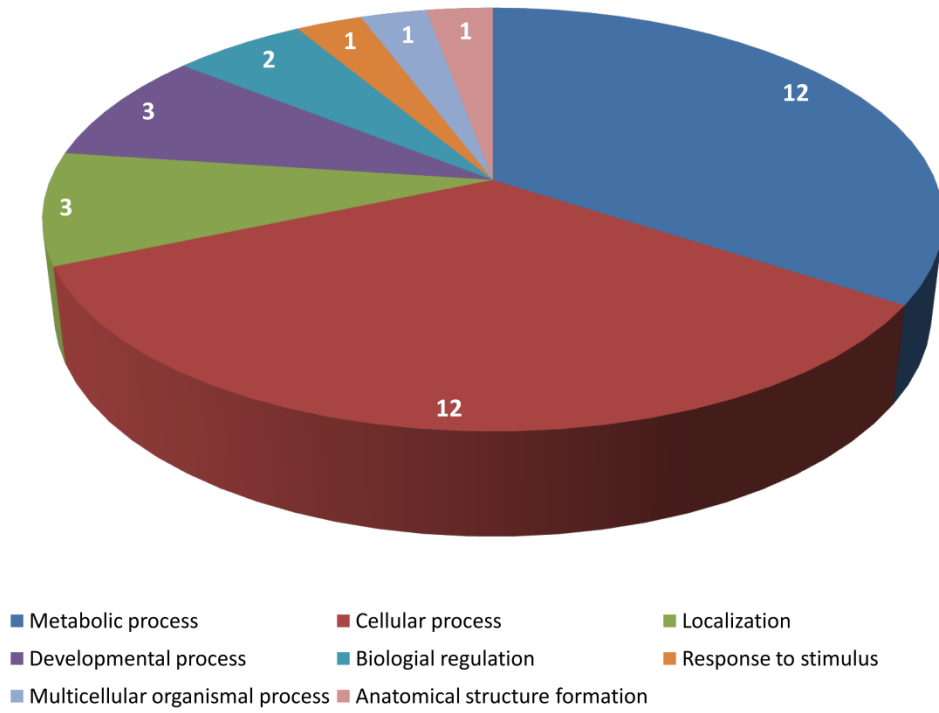




Figure 2



**Figure 3**

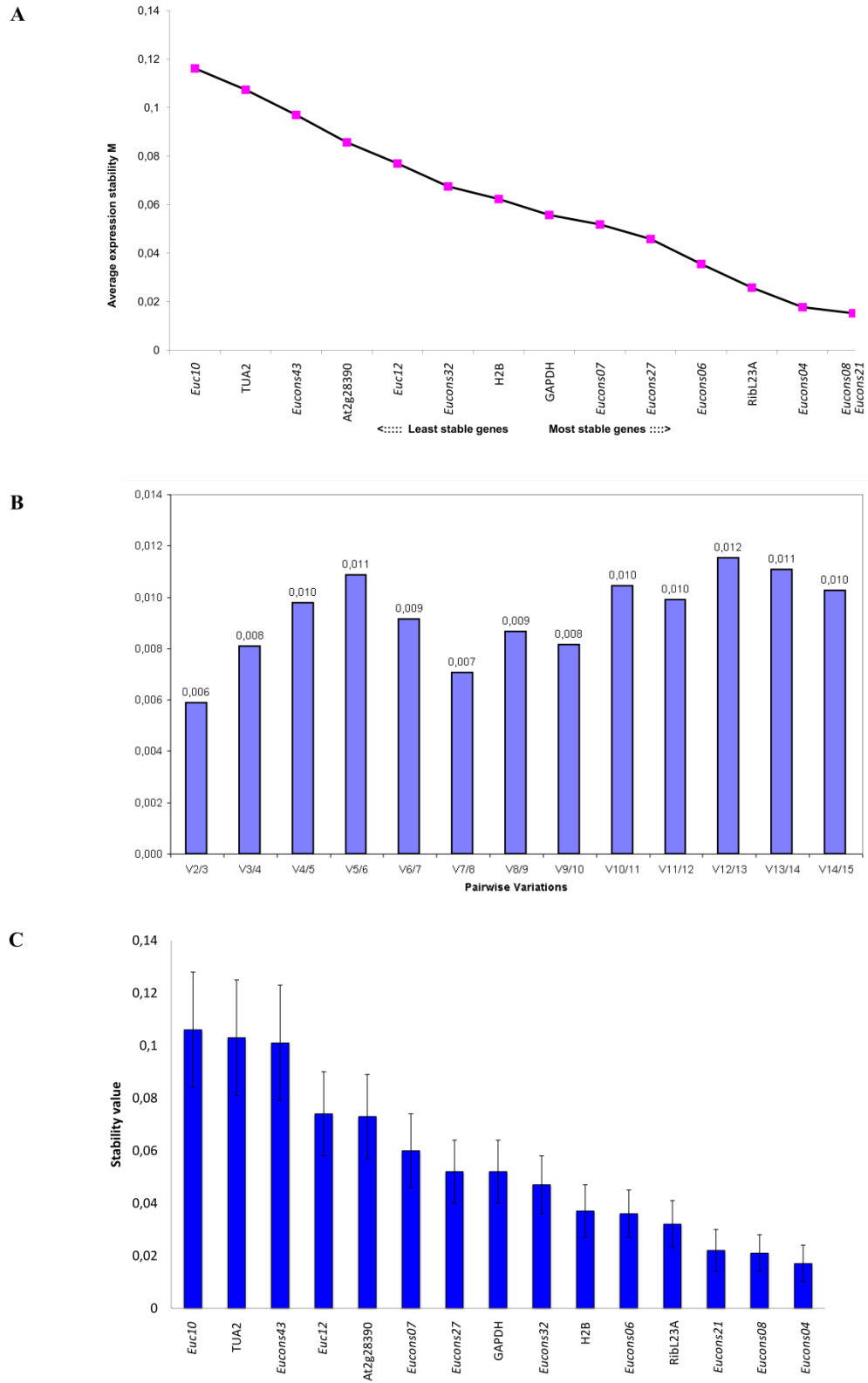
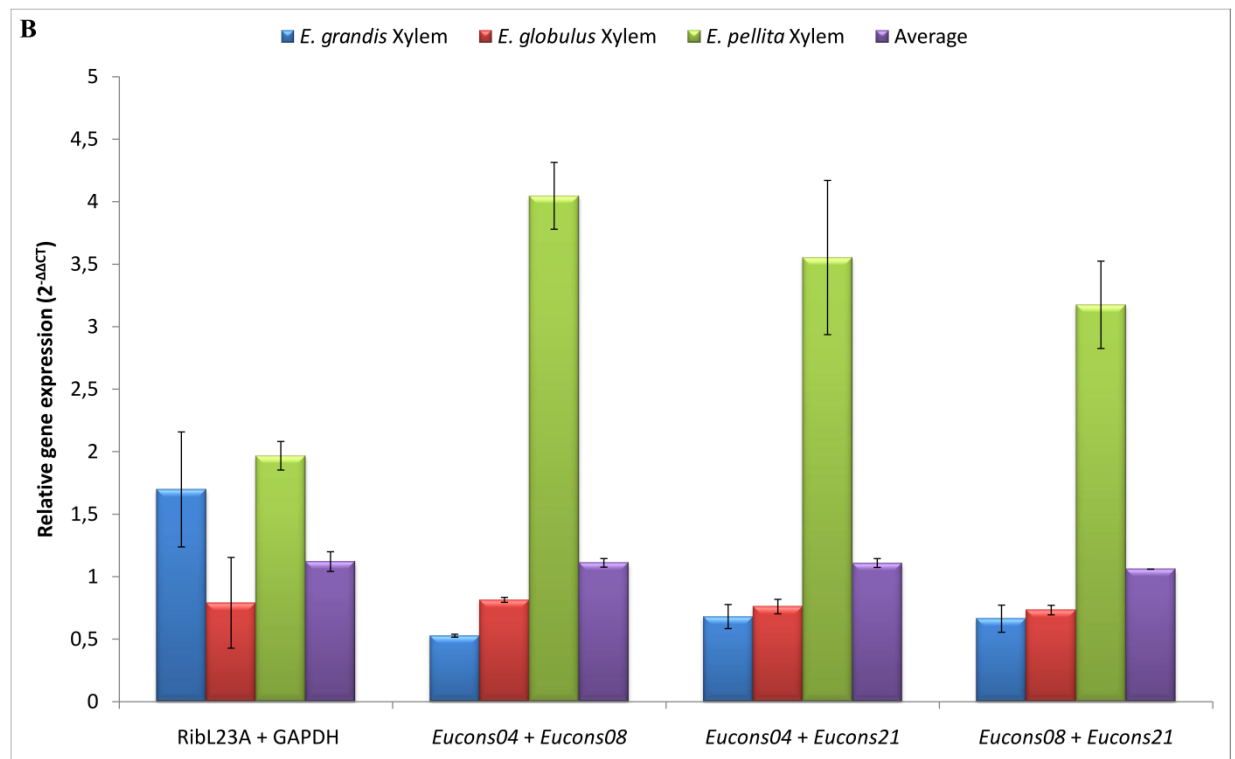
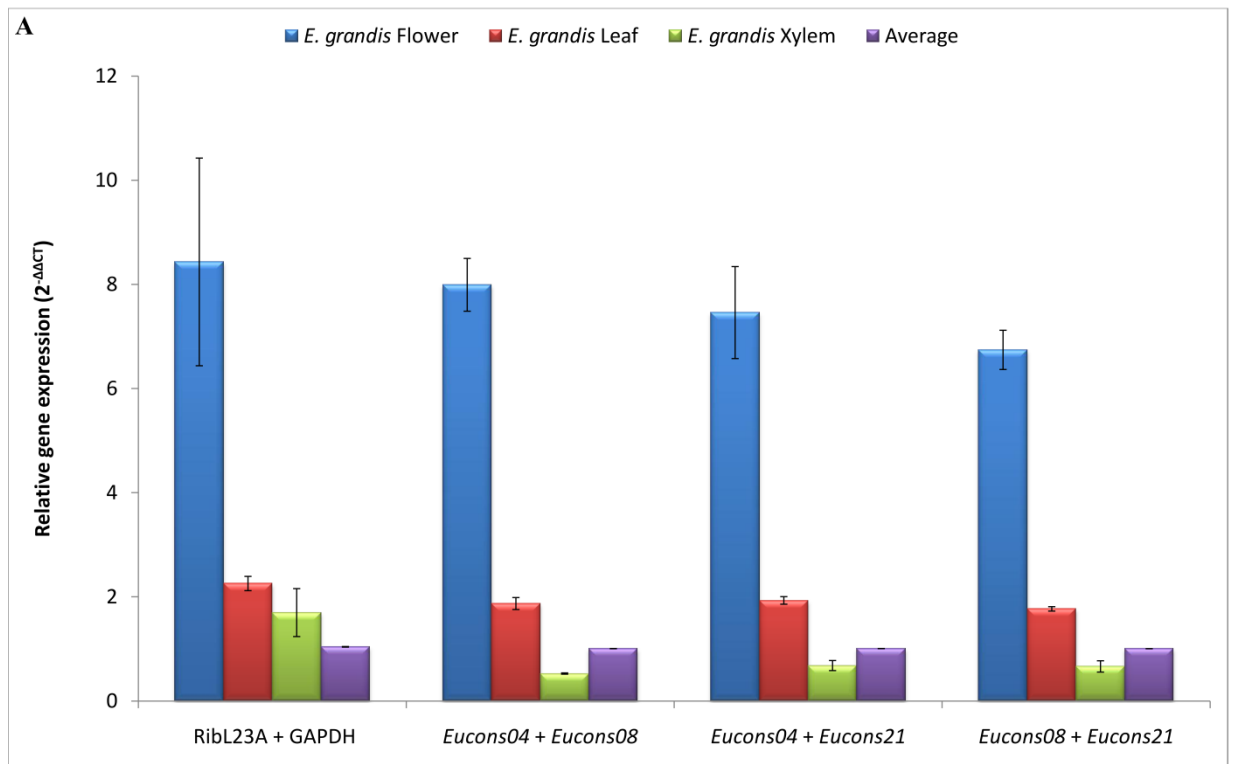


Figure 4



## TABLES

**Table 1**

Gene Name	EUCAGEN Scaffold	Gene ID	BLAST Annotation	e-Value	SDMA		SAM		
					SD	Ranking	Fold Change	Score ( <i>d</i> )	Ranking
<i>Eucons01</i>	4	<a href="#">emb CAY47298.1 </a>	serine transporter ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25)	2e-94	0.000082	1	0,999995685	0,00661473	48
<i>Eucons02</i>	1,599		No hit		0.00029	2	1,000005363	0,007716502	23
<i>Eucons03</i>	7	<a href="#">gb EEY18801.1 </a>	DNA damage checkpoint protein rad24 ( <i>Verticillium alboatrium</i> VaMs.102)	7e-44	0.000365	3	0,999993841	0,008958654	41
<i>Eucons04</i>	88	<a href="#">gb EEF43392.1 </a>	Cdk8, putative ( <i>Ricinus communis</i> )	2e-49	0.000461	4	1,000006755	0,009261212	21
<i>Eucons05</i>	332		No hit		0.000509	5	1,000008973	0,010259132	46
<i>Eucons06</i>	134	<a href="#">gb EEF44719.1 </a>	Plastidic ATP/ADP-transporter, putative ( <i>R. communis</i> )	5e-20	0.000549	6	1,000009876	0,012322456	40
<i>Eucons07</i>	515	<a href="#">gb EEF03117.1 </a>	ABC transporter family protein ( <i>Populus trichocarpa</i> )	7e-29	0.000561	7	1,000010164	0,01241657	8
<i>Eucons08</i>	2	<a href="#">gb EEF33688.1 </a>	Transcription elongation factor s-II, putative ( <i>R. communis</i> )	1e-25	0.000582	8	1,000013416	0,012556064	15
<i>Eucons09</i>	6	<a href="#">gb EEF42371.1 </a>	Nucleic acid binding protein, putative ( <i>R. communis</i> )	1e-18	0.000665	9	1,000015637	0,013553234	9
<i>Eucons10</i>	369	<a href="#">gb ACG37397.1 </a>	Anther-specific proline-rich protein APG ( <i>Zea mays</i> )	3e-42	0.000678	10	1,000018989	0,015574381	2
<i>Eucons11</i>	1		No Hit		0.000694	11	1,0000296	0,016330796	44
<i>Eucons12</i>	2,755		No hit		0.000694	12	0,999973005	0,016437714	7
<i>Eucons13</i>	288		No hit		0.000732	13	0,999966	0,016807148	17

<i>Eucons14</i>	899	<a href="#">gb AAM52237.1 </a>	senescence/dehydration-associated protein-related ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	8e-14	0.000734	14	1,000035875	0,017118153	36
<i>Eucons15</i>	2	<a href="#">emb CAA65477.1 </a>	lipid transfer protein ( <i>Prunus dulcis</i> )	7e-35	0.000785	15	1,000039015	0,018024764	5
<i>Eucons16</i>	6,792	<a href="#">gb EEF44560.1 </a>	F-box and wd40 domain protein, putative ( <i>R. communis</i> )	5e-19	0.000791	16	0,999960301	0,01818155	35
<i>Eucons17</i>	62		No hit		0.000794	17	1,000045767	0,020617825	34
<i>Eucons18</i>	6		No hit		0.000800	18	0,999960851	0,021328632	4
<i>Eucons19</i>	9		No hit		0.000821	19	1,000046587	0,021445011	1
<i>Eucons20</i>	175	<a href="#">gb EEE97842.1 </a>	Chromatin remodeling complex subunit ( <i>P. trichocarpa</i> )	6e-47	0.000879	20	1,000054302	0,021978112	14
<i>Eucons21</i>	1,753	<a href="#">gb EEF48129.1 </a>	Aspartyl-tRNA synthetase, putative ( <i>R. communis</i> )	2e-42	0.000913	21	0,99994759	0,022500691	6
<i>Eucons22</i>	584		No hit		0.000931	22	1,000052414	0,02331048	28
<i>Eucons23</i>	180	<a href="#">dbj BAB02414.1 </a>	Chloroplast nucleoid DNA binding protein-like ( <i>A. thaliana</i> )	2e-53	0.000970	23	1,000055076	0,02331048	3
<i>Eucons24</i>	15	<a href="#">gb EEF45372.1 </a>	Conserved hypothetical protein ( <i>R. communis</i> )	5e-44	0.000992	24	0,999948713	0,024728932	10
<i>Eucons25</i>	531		No hit		0.001028	25	0,999941348	0,024874888	19
<i>Eucons26</i>	95	<a href="#">gb EEF45384.1 </a>	Vacuole membrane protein, putative ( <i>R. communis</i> )	3e-15	0.001030	26	1,000068819	0,024983297	11
<i>Eucons27</i>	743	<a href="#">gb EEF44734.1 </a>	Peroxisome biogenesis factor, putative ( <i>R. communis</i> )	2e-51	0.001063	27	1,000059599	0,025183557	16
<i>Eucons28</i>	87		No hit		0.001085	28	0,999931481	0,025250589	13
<i>Eucons29</i>	6	<a href="#">gb EER99842.1 </a>	Hypothetical protein SORBIDRAFT_02g041780 ( <i>Sorghum bicolor</i> )	4e-13	0.001158	29	0,999914659	0,025278616	12

<i>Eucons30</i>	173	<a href="#">gb EEF45541.1 </a>	Sentrin/sumo-specific protease, putative ( <i>R. communis</i> )	4e-46	0.001175	30	1,000062543	0,025638209	20
<i>Eucons31</i>	842	<a href="#">emb CAP42856.1 </a>	SsrA-binding protein ( <i>Bordetella pertussis</i> )	8e-43	0.001175	31	0,999931592	0,02654049	50
<i>Eucons32</i>	8	<a href="#">gb EDS90429.1 </a>	Nitrogen regulation protein NR(II) ( <i>Escherichia albertii</i> TW07627)	6e-34	0.001181	32	1,000079957	0,026547459	18
<i>Eucons33</i>	1,056		No hit		0.001189	33	1,000081012	0,026669523	26
<i>Eucons34</i>	1,034	<a href="#">gb EEE90904.1 </a>	Predicted protein ( <i>P. trichocarpa</i> )	5e-18	0.001256	34	1,000078558	0,026841264	30
<i>Eucons35</i>	349		No hit		0.001257	35	1,000079192	0,027114749	37
<i>Eucons36</i>	52	<a href="#">ref NP_565080.1 </a>	Mitochondrial transcription termination factor-related / mTERF-related ( <i>A. thaliana</i> )	3e-45	0.001263	36	0,999911838	0,027388068	38
<i>Eucons37</i>	229		No hit		0.001273	37	0,999915438	0,027861819	24
<i>Eucons38</i>	447	<a href="#">emb CAN64407.1 </a>	Hypothetical protein ( <i>Vitis vinifera</i> )	8e-25	0.001276	38	0,999891043	0,027872741	45
<i>Eucons39</i>	1,208		No hit		0.001286	39	0,99990712	0,028070603	25
<i>Eucons40</i>	570		No hit		0.001293	40	0,999908155	0,028195758	33
<i>Eucons41</i>	720		No hit		0.001303	41	1,000098979	0,028550233	32
<i>Eucons42</i>	4		No hit		0.001361	42	0,999893249	0,028605047	29
<i>Eucons43</i>	482	<a href="#">gb EEF46905.1 </a>	Serine/threonine-protein kinase PBS1, putative ( <i>R. communis</i> )	6e-35	0.001365	43	1,000105741	0,028682612	27
<i>Eucons44</i>	228	<a href="#">gb EEF48108.1 </a>	Pollen specific protein sf21, putative ( <i>R. communis</i> )	3e-42	0.001378	44	1,000117513	0,030661159	43
<i>Eucons45</i>	10,041		No hit		0.001385	45	0,9999055	0,030782861	42
<i>Eucons46</i>	485	<a href="#">gb ACM45716.1 </a>	Class IV chitinase ( <i>Pyrus pyrifolia</i> )	2e-61	0.001428	46	1,000104153	0,031264117	49
<i>Eucons47</i>	175	<a href="#">gb EEE86166.1 </a>	F-box family protein ( <i>P. trichocarpa</i> )	4e-31	0.001432	47	1,00010279	0,031514942	22

<i>Eucons48</i>	873		No hit		0.001613	48	1,00012433	0,031516084	39
<i>Eucons49</i>	359	<a href="#">gb EEF03628.1 </a>	Predicted protein ( <i>P. trichocarpa</i> )	9e-25	0.001848	49	0,999886858	0,031626533	47
<i>Eucons50</i>	30		No hit		0.001303	50	1,000098979	0,031987517	31

---

**Table 2**

<b>Gene Name</b>	<b>Gene ID</b>	<b>BLAST Annotation</b>	<b>EUCAGEN Scaffold</b>	<b>Forward and Reverse Primers (5'-3')</b>	<b>Amplicon (bp)</b>
<i>Eucons01</i>	emb CAY47298.1	Serine transporter ( <i>P. fluorescens</i> SBW25)	4	TGGTGCTGACGGTGATGTTCTTCT AAGGATTTGGTGATCGCCACCAGT	178
<i>Eucons04</i>	gb EEF43392.1	Cdk8, putative ( <i>R. communis</i> )	88	TACAAGCGCTGTTGATATGTGGGC TTGCCAATGAGGCGGATTCACAAG	196
<i>Eucons06</i>	gb EEF44719.1	Plastidic ATP/ADP-transporter, putative ( <i>R. communis</i> )	134	TCCTCTGTCCACAAATGGGTTCCA TCACCAAAGACAGGCTGACCATCA	141
<i>Eucons07</i>	gb EEF03117.1	ABC transporter family protein ( <i>P. trichocarpa</i> )	515	AAGCCTCATTGGCTGGCTCACATA TCAGCACAAGAGCTCCACCATCAT	153
<i>Eucons08</i>	gb EEF33688.1	Transcription elongation factor s-II, putative ( <i>R. communis</i> )	2	TCCAATCCGAGTCGCTGTCATTGT TGATGAGCCTCTCTGGTTTGACCT	152
<i>Eucons15</i>	emb CAA65477.1	Lipid transfer protein ( <i>P. dulcis</i> )	2	AAGTGAGAGCAAAGATGGAGCGCA GACCATATTACACGACGCATCGCA	154
<i>Eucons21</i>	gb EEF48129.1	Aspartyl-tRNA synthetase, putative ( <i>R. communis</i> )	1,753	AGAGGTGAAATTCCAGAAGCCCGT CTTCCCTTTGGCTTCCGCCAATTA	155
<i>Eucons27</i>	gb EEF44734.1	Peroxisome biogenesis factor, putative ( <i>R. communis</i> )	743	CATTTTCATGCTGCTGTTGGCCGTT AGTCCACCAACATCATCCCATCCA	184
<i>Eucons32</i>	gb EDS90429.1	Nitrogen regulation protein NR(II) ( <i>E. albertii</i> TW07627)	8	GACAACGTGCGGTTGATTTCGTGAT ACGCAGAATGATTTACCCGCCTTC	144



<i>Eucons43</i>	gb EEF46905.1	Serine/threonine-protein kinase PBS1, putative ( <i>R. communis</i> )	482	TATTTCTCCTGTTTCGCTCCGGGT TACCATCTCTTTGTGCTCTGCGCT	166
<i>At2g28390</i>	AT2G28390.1	SAND family protein ( <i>A. thaliana</i> )	3,502	CCATTCAACACTCTCCGACA TGTGTGACCCAGCAGAGTAAT	143
<i>GAPDH</i>	AT1G13440.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( <i>A. thaliana</i> )	4,044	TTGGCATTGTTGAGGGTCTA AAGCAGCTCTTCCACCTCTC	107
<i>H2B</i>	AT5G02570.1	Histone H2B, putative ( <i>A. thaliana</i> )	90	GAGCGTGGAGACGTACAAGA GGCGAGTTTCTCGAAGATGT	127
<i>RibL23A</i>	AT2G39460.2	Ribosomal protein L23A ( <i>A. thaliana</i> )	317	AAGGACCCTGAAGAAGGACA CCTCAATCTTCTTCATCGCA	128
<i>TUA2</i>	AT1G50010.1	TUA2; structural constituent of cytoskeleton ( <i>A. thaliana</i> )	687	GCAAGTACATGGCTTGCTGT CACACTTGAATCCTGTTGGG	132
<i>Euc10</i>	AT3G07640.1	Unknown protein ( <i>A. thaliana</i> )	62	AGGAGTCCTTCGAGCTTCC CAGCACGGACACCTGATAAA	110
<i>Euc12</i>	AT1G32790.1	RNA-Binding protein, putative ( <i>A. thaliana</i> )	107	GCGTGGTTCTTGGATCACTA TGGTGACAAAGTCAGGTGCT	114

---

**Table 3**

1 Group						2 Groups	
Leaf		Xylem		All Organs		Leaf + Xylem	
Ranking	SV ± SD	Ranking	SV ± SD	Ranking	SV ± SD	Ranking	SV
<i>Eucons04</i>	0.008 ± 0.010	<i>Eucons27</i>	0.010 ± 0.010	<i>Eucons04</i>	0.017 ± 0.007	<i>Eucons04</i>	0.011
<i>Eucons08</i>	0.018 ± 0.009	<i>Eucons07</i>	0.017 ± 0.010	<i>Eucons08</i>	0.021 ± 0.007	<i>Eucons08</i>	0.016
<i>Eucons32</i>	0.023 ± 0.010	<i>Eucons06</i>	0.023 ± 0.010	<i>Eucons21</i>	0.022 ± 0.008	<i>Eucons21</i>	0.019
<i>Eucons21</i>	0.027 ± 0.011	H2B	0.024 ± 0.011	RibL23A	0.032 ± 0.009	RibL23A	0.020
RibL23A	0.033 ± 0.012	<i>Eucons21</i>	0.025 ± 0.011	<i>Eucons06</i>	0.036 ± 0.009	<i>Eucons06</i>	0.036
GAPDH	0.035 ± 0.013	RibL23A	0.027 ± 0.011	H2B	0.037 ± 0.010	H2B	0.037
<i>Eucons06</i>	0.038 ± 0.014	<i>Eucons04</i>	0.028 ± 0.012	<i>Eucons32</i>	0.047 ± 0.011	<i>Eucons27</i>	0.045
H2B	0.045 ± 0.016	<i>Eucons08</i>	0.029 ± 0.012	GAPDH	0.052 ± 0.012	<i>Eucons32</i>	0.046
<i>Eucons07</i>	0.051 ± 0.017	<i>Euc12</i>	0.036 ± 0.013	<i>Eucons27</i>	0.052 ± 0.012	GAPDH	0.048
At2g28390	0.054 ± 0.018	<i>Eucons32</i>	0.050 ± 0.017	<i>Eucons07</i>	0.060 ± 0.014	<i>Eucons07</i>	0.058
<i>Eucons27</i>	0.059 ± 0.020	GAPDH	0.056 ± 0.019	At2g28390	0.073 ± 0.016	<i>Euc10</i>	0.062
TUA2	0.059 ± 0.020	At2g28390	0.058 ± 0.020	<i>Euc12</i>	0.074 ± 0.016	At2g28390	0.067
<i>Euc12</i>	0.069 ± 0.023	TUA2	0.071 ± 0.023	<i>Eucons43</i>	0.101 ± 0.022	<i>Euc12</i>	0.068
<i>Euc10</i>	0.074 ± 0.024	<i>Eucons43</i>	0.088 ± 0.029	TUA2	0.103 ± 0.022	<i>Eucons43</i>	0.083
<i>Eucons43</i>	0.086 ± 0.028	<i>Euc10</i>	0.138 ± 0.044	<i>Euc10</i>	0.106 ± 0.023	TUA2	0.094
<b>Best combination of 2 genes</b>						<i>Eucons04</i>	0.009
						<i>Eucons08</i>	

## CURRICULUM VITAE RESUMIDO

### De Oliveira, LA

#### I. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Luisa Abruzzi de Oliveira

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, RS, Brasil, 17 de novembro de 1984.

**Endereço Profissional:**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Centro de Biotecnologia (CBiot)  
Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Sala 212  
Avenida Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43431  
CEP 90501-970 Bairro Agronomia  
Porto Alegre, RS-Brasil.

**Telefone Profissional:** +55 51 3308 6094

**E-mail:** [lu\\_abruzzo@yahoo.com.br](mailto:lu_abruzzo@yahoo.com.br)

#### II. FORMAÇÃO

- **Mestrado: (2006-2008)**

Biologia Celular e Molecular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), CBiot, UFRGS

- **Graduação: (2002-2005)**

Ciências Biológicas

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

### **III. ESTÁGIOS**

#### **A) DOUTORADO SANDUÍCHE**

Virginia Polytechnic and State University, Fralin Biotechnology Center, Estados Unidos da América

Laboratório de Mateloenzimas

**Supervisão:** Dr. Dennis R. Dean

**Períodos:**

Março 2010-Março 2011

Janeiro 2012- Fevereiro 2012

**Atuação:** Bolsista do Programa de Estágio de Doutorando no Exterior (PDEE/CAPES).

#### **B) INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Laboratório de Biologia Molecular - FFFCMPA

Tipo: voluntário

Período: 3/2005 -12/2005

Orientador: Cláudio Osmar Pereira Alexandre

#### **C) INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Laboratório de Bioquímica e Genética Molecular- PUCRS

Tipo: bolsista FAPERGS

Período: 3/2004 -3/2005

Orientador: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

#### **D) INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Laboratório de Bioquímica e Genética Molecular- PUCRS

Tipo: bolsista Projeto Bambuí

Período: 8/2003 – 2/2004

Orientador: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

### **E) INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Laboratório de Bioquímica e Genética Molecular - PUCRS

Tipo: bolsista PIBIC/CNPq

Período: 2/2003 – 8/2003

Orientador: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

### **F) INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Estágio: Laboratório de Bioquímica e Genética Molecular - PUCRS

Tipo: voluntário

Período: 8/2002 – 2/2003

Orientador: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

## **IV. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS**

HEIS, MD ; Ditmer, Elle ; OLIVEIRA, Luisa Abruzzi de ; FRAZZON, Ana Paula Guedes ; MARGIS, R. ; FRAZZON, J. Differential expression of cysteine desulfurases in soybean. *BMC Plant Biology*, v. 11, p. 166, 2011.

OLIVEIRA, Luisa Abruzzi de ; Breton, M. C. ; Bastolla, F. M. ; da Silva Camargo, S. ; MARGIS, R. ; FRAZZON, J. ; PASQUALI, G. . Reference Genes for the Normalization of Gene Expression in Eucalyptus Species. *Plant and Cell Physiology*, v. 1, p. 1-18, 2011.

DAMIN, Andrea P S ; FRAZZON, Ana Paula Guedes ; DAMIN, Daniel C ; BIEHL, Henrique ; OLIVEIRA, Luisa Abruzzi de ; AULLER, R ; MARRONI, C ; ALEXANDRE, Claudio Osmar Pereira . Detection of human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the esophagus by auto-nested PCR. *Diseases of the Esophagus*, USA, v. 19, n. 2, p. 64-68, 2006.