

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Arabidopsis thaliana* COMO FERRAMENTA
PARA O ESTUDO FUNCIONAL DE APX-R (*ASCORBATE PEROXIDASE-
RELATED*)**

Maiara Piovesana

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia Pinheiro-Margis

Co-orientadora: Dr^a Fernanda Lazzarotto

PORTO ALEGRE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Arabidopsis thaliana* COMO FERRAMENTA
PARA O ESTUDO FUNCIONAL DE APX-R (*ASCORBATE PEROXIDASE-
RELATED*)**

Maiara Piovesana

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia Pinheiro-Margis

Co-orientadora: Dr^a Fernanda Lazzarotto

Trabalho apresentado como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

PORTO ALEGRE

2016

MAIARA PIOVESANA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Arabidopsis thaliana* COMO FERRAMENTA
PARA O ESTUDO FUNCIONAL DE APX-R (ASCORBATE PEROXIDASE-
RELATED)**

Trabalho apresentado como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Comissão Examinadora:

Profª Drª Janette Palma Fett
Departamento de Botânica – UFRGS

Drª Franceli Kulcheski
Departamento de Biofísica – UFRGS

Profª Drª Marcia Pinheiro-Margis
Departamento de Genética – UFRGS

PORTO ALEGRE

2016

AGRADECIMENTOS

Ao redigir este trabalho de conclusão de curso, muitas são as pessoas que me vêm à mente, cujo apoio, suporte e carinho foram fundamentais durante a realização deste projeto. Primeiramente e de forma especial, gostaria de agradecer à minha orientadora Márcia por ter aberto as portas de seu laboratório para mim ainda durante meu primeiro semestre de graduação. O aprendizado e experiência que adquiri durante estes anos dentro do laboratório sob sua supervisão são imensuráveis, e com toda a certeza a minha formação como profissional foi extremamente enriquecida por ter feito parte deste grupo de pesquisa. À minha co-orientadora Fernanda, palavras não descrevem o tamanho da minha gratidão por ter me acolhido e confiado em mim para percorrer contigo os teus anos de doutorado. Foi sob o teu olhar atento que eu realizei meus primeiros experimentos e dei meus primeiros passos na carreira científica, e eu sempre serei grata pela tua paciência, carinho e companheirismo em todos os momentos. Te agradeço por ter me permitido fazer parte deste projeto do qual eu muito me orgulho e por, acima de tudo, ter se tornado uma grande amiga.

Aos meus colegas de curso e de laboratório, o meu muito obrigada pelo incentivo, amizade e companheirismo durante estes anos. Cada um de vocês faz parte desta trajetória e foi essencial para que eu chegasse até aqui. Obrigada por todos os bons momentos e lembranças que carrego comigo.

Ao meu namorado Jean Marc, obrigada pelo apoio, amor e compreensão durante a escrita deste trabalho, por compartilhar das minhas alegrias e por sempre se fazer presente e atencioso, mesmo quando existe um oceano inteiro de distância no nosso caminho. Obrigada por existir na minha vida.

De forma muito especial, gostaria de agradecer imensamente aos meus pais Cláudio e Sinára por todo o apoio incondicional durante esta caminhada. Estes anos de graduação só foram possíveis graças ao incentivo de vocês. Sou muito grata por sempre terem acreditado em mim e nos meus objetivos, por terem me apoiado em todas as decisões que realizei ao longo deste tempo, e por continuarem comigo, sendo minha base e meu maior exemplo de profissionais e seres humanos. Eu não seria nada do que sou hoje e não teria chegado até aqui sem a presença de vocês na minha vida. Dedico esta conquista a vocês.

RESUMO

A redução do oxigênio molecular a água em organismos aeróbios permitiu a obtenção de energia química de maneira muito mais eficiente, representando um importante ganho adaptativo no metabolismo energético. No decorrer deste processo, porém, moléculas chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas. Apesar de tóxicas quando em altas concentrações, as ERO atuam como moléculas sinalizadoras durante o desenvolvimento da planta, além de sinalizar para vias responsivas a estresses bióticos e abióticos. O acúmulo destas moléculas nas células é modulado pela ação do sistema antioxidante, o qual é composto por componentes enzimáticos e não-enzimáticos. As enzimas do tipo ascorbato peroxidase (APX) são codificadas por uma pequena família gênica presente nos genomas de algas e plantas, onde exercem papel fundamental no metabolismo do peróxido de hidrogênio. Trabalhos prévios do nosso grupo revelaram a existência de um gene anotado como provável APX no genoma de arroz (*Oryza sativa* L.), entretanto, análises filogenéticas mostraram que esta proteína não agrupa com membros da família APX, mas integra uma família distinta de heme peroxidases de classe I, até então desconhecida, a qual foi intitulada *ascorbate peroxidase-related* (APX-R). Linhagens mutantes de *Arabidopsis thaliana* com expressão reduzida de APX-R, bem como linhagens transgênicas que superexpressam o gene resultaram em uma diminuição significativa da taxa de germinação das sementes. Na literatura, APX-R de *Arabidopsis thaliana* é denominada APX6, e foi caracterizada como uma proteína de localização subcelular supostamente citosólica. Nosso grupo, porém, já demonstrou experimentalmente a localização cloroplastídica de APX-R de arroz em protoplastos. Com o propósito de determinar a localização subcelular de APX-R na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, o presente trabalho objetivou a obtenção de linhagens transgênicas superexpressando *AtAPx-R* fusionada à proteína fluorescente *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP). Após a transformação e seleção das linhagens transgênicas, estas plantas foram analisadas em microscópio de fluorescência, por meio do qual se pode comprovar a obtenção de linhagens transgênicas superexpressando a proteína recombinante de maneira estável. Estas linhagens servirão para uma análise detalhada em microscopia confocal de forma a determinar a localização subcelular de APX-R em *Arabidopsis thaliana*.

Palavras-chave: peroxidase, espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, localização subcelular.

ABSTRACT

The reduction of molecular oxygen to water in aerobic organisms allowed the attainment of chemical energy in a much more efficient way, representing an important adaptive gain in the energetic metabolism. During this process, however, molecules known as reactive oxygen species (ROS) are generated. Although toxic in high concentrations, ROS act as signaling molecules during plant development, besides being involved in biotic and abiotic stress responsive pathways. Reactive oxygen species accumulation inside plant cells is modulated by the antioxidant system, which is composed by enzymatic and non-enzymatic components. The ascorbate peroxidase (APX) enzymes are coded by a small gene family present in plant and algae genomes, where they exert an essential role in hydrogen peroxide metabolism. Previous work of our group revealed the existence of a gene annotated as a putative APX in the rice genome (*Oryza sativa* L.). However, phylogenetic analysis showed that this protein does not cluster with the APX family, but integrates a distinct class I haem peroxidases family, unknown by the date, which was addressed as ascorbate peroxidase-related (APX-R). Mutant lineages of *Arabidopsis thaliana* with reduced expression of APX-R, as well as transgenic lineages that overexpress this gene showed a significant reduction in the seeds germination rate. In the literature, *Arabidopsis thaliana* APX-R is known as APX6 and is characterized as a cytosolic protein. Our group, however, has already experimentally shown the chloroplastic localization of APX-R in rice protoplasts. In order to determine the subcellular localization of APX-R in the model plant *Arabidopsis thaliana*, transgenic lineages overexpressing *AtAPX-R* fused to the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) were generated. After transformation and selection of the transgenic lineages, these plants were analyzed by fluorescence microscopy, through which it was proved the obtainment of transgenic plants stably overexpressing the recombinant protein. These lineages will be useful for a detailed analysis in confocal microscopy in order to determine the subcellular localization of APX-R in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: peroxidase, reactive oxygen species, oxidative stress, subcellular localization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** O método *floral dip* (Clough & Bent, 1998) para transformação de *Arabidopsis thaliana* 34
- Figura 2:** Amplificação da sequência codificadora do gene *AtAPX-R* e triagem dos clones de pENTR™/D-TOPO® - *AtAPX-R* 36
- Figura 3:** Triagem dos clones recombinantes do plasmídeo pEarleyGate101–*AtAPX-R* 37
- Figura 4:** Triagem das sementes transgênicas em meio de seleção 39
- Figura 5:** Análise das plântulas transgênicas em microscópio de fluorescência 40
- Figura 6:** Amostras de tecido foliar das plantas transgênicas expressando a proteína recombinante *AtAPX-R-EYFP* analisadas em microscópio de fluorescência 41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS	10
1.1.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	12
1.1.2 DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICA	13
1.1.3 DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA	15
1.2 ASCORBATE PEROXIDASE-RELATED	18
1.3 GERAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS PARA ESTUDOS DE GENÔMICA FUNCIONAL	20
1.3.1 PLANTA MODELO: <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
1.3.2 TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	23
1.3.3 PROTEÍNAS FLUORESCENTES	25
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA	29
4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>AtAPX-R</i> E CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO	29
4.3 TRANSFORMAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> TOP10	30
4.4 TRANSFORMAÇÃO DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	30
4.5 MICROPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	30
4.6 ANÁLISE PLASMIDIAL POR PERFIL DE RESTRIÇÃO	31
4.7 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> PARA O FLORAL DIP	31
4.8 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Arabidopsis thaliana</i> COL-0 POR MEIO DA TÉCNICA DE <i>FLORAL DIP</i>	31
4.9 ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
4.10 SELEÇÃO DAS SEMENTES TRANSFORMADAS	32

4.11 CULTIVO DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 AMPLIFICAÇÃO DE APX-R A PARTIR DE CDNA TOTAL DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
5.2 CLONAGEM DE <i>AtAPX-R</i> NO VETOR DE EXPRESSÃO pEarleyGate101.....	35
5.3 SELEÇÃO DAS SEMENTES TRANSFORMADAS	37
5.4 ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS EM MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA	38
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	42
7 TABELAS	43
8 FIGURAS SUPLEMENTARES	44
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS

Quando as primeiras formas de vida começaram a se desenvolver no planeta, o oxigênio era componente escasso na atmosfera. Ao longo de milhões de anos, porém, com o surgimento do processo fotossintético e dos mecanismos de transporte de elétrons associados ao O₂ presente na respiração aeróbica, compostos intermediários conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) passaram a ser gerados. Quando presentes em quantidade excessiva, as ERO induzem uma condição fisiológica de “estresse oxidativo”, definida como um desbalanço entre a produção de ERO e a defesa antioxidante celular. Em outras palavras, quando os níveis de ERO excedem a capacidade de defesa dos mecanismos antioxidantes, estas moléculas causam extensivos danos aos componentes celulares, caracterizando um cenário de estresse (Yadav et al., 2014). Dessa forma, fez-se necessária a evolução concomitante de sistemas antioxidantes que prevenissem e neutralizassem estas moléculas. Estes sistemas de defesa antioxidante se tornaram amplamente distribuídos, variados, coordenados e efetivos, protegendo as células dos efeitos prejudiciais destes compostos (Haliwell, 1999; Yadav et al., 2014).

Assim como os demais seres vivos, as plantas também precisaram lidar com a toxicidade dos subprodutos do metabolismo aeróbico durante a evolução, adquirindo diferentes antioxidantes e enzimas removedoras/detoxificadoras de ERO para enfrentar o aumento dos níveis de oxigênio atmosférico (Mittler et al., 2011). Nos organismos vegetais, as espécies reativas de oxigênio são geradas não apenas pelos processos metabólicos basais, mas também induzidas por uma variedade de estresses bióticos e abióticos e estágios específicos do desenvolvimento da planta. Radiação ultravioleta, ataque de patógenos, amadurecimento, senescência e escassez de oxigênio estão presentes na lista de fatores que culminam com a produção de ERO em plantas, induzindo dano oxidativo em uma ampla classe de biomoléculas, como o DNA, proteínas e lipídios (Yadav et al., 2014).

Devido à multifuncionalidade das ERO, como será discutido mais adiante, a célula precisa controlar rigidamente os seus níveis para evitar dano oxidativo, mas também, impedir sua completa eliminação. A percepção, sinalização e reprogramação transcricional decorrentes do estresse oxidativo são críticas na

decisão do futuro celular, seja em direção à adaptação ao estresse ou à morte celular (Wrzaczek et al., 2011). Do ponto de vista dos mecanismos de defesa, a colaboração entre os sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos fornece à célula um sistema eficiente e elaborado para regular os níveis de ERO (De Gara et al., 2010; Foyer & Noctor., 2009; Miller et al., 2010), evitando e/ou combatendo os efeitos deletérios derivados do estresse oxidativo, como será abordado mais detalhadamente nos próximos tópicos.

1.1.1. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Os elétrons em um átomo são distribuídos aos pares em camadas que circundam o núcleo, onde prótons e nêutrons coexistem. Em um átomo estável, o número de prótons é igual ao número de elétrons. A reatividade de uma molécula depende da conformação dos elétrons na órbita mais exterior de seus átomos, o que define a facilidade com que a molécula pode aceitar ou doar elétrons. Quando uma molécula possui elétrons não pareados em sua estrutura atômica, refere-se a ela como radical livre, por ser extremamente reativa. As ERO, por sua vez, são formas parcialmente reduzidas de oxigênio atmosférico (O_2), capazes de oxidação irrestrita de vários componentes celulares que podem levar à destruição oxidativa da célula (Mittler, 2002). Enquanto algumas espécies são radicais livres, como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o hidroperoxila (HO_2) e a hidroxila ($\cdot OH$), outras, apesar de também muito reativas, não se caracterizam como radicais, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Krieger-Liszkay, 2005; Yadav et al., 2014).

As diferentes ERO exibem características particulares não compartilhadas entre si. O radical superóxido, por exemplo, é uma molécula carregada sob a maioria das condições fisiológicas vegetais, que não pode ser transportado passivamente através de membranas. No entanto, pode ser facilmente convertido a peróxido de hidrogênio, que por sua vez, é facilmente transportado através de membranas de forma passiva ou por canais de água. Em conjunto, superóxido e peróxido de hidrogênio podem mediar a formação de peróxidos de lipídios, solúveis em membranas (Mittler et al., 2011). Da mesma maneira, as demais ERO exibem propriedades químicas singulares que implicam em sua reatividade e potencial oxidante.

Apesar de serem moléculas bioquimicamente simples, as ERO não são apenas subprodutos citotóxicos do metabolismo com potencial danoso de oxidação, mas também são poderosas moléculas de sinalização envolvidas no controle do crescimento e desenvolvimento das plantas, assim como sinais primários em respostas de aclimatação a estímulos estressores (Foyer & Noctor, 2009). Uma vez que as células vegetais foram capazes de sobrepujar a toxicidade das ERO, elas passaram a utilizá-las como agentes sinalizadores que, atualmente, ocupam papéis centrais como reguladores da adaptação a estresses, morte celular programada, e desenvolvimento vegetal (Mittler et al., 2011; Wrzaczek et al., 2011).

Interessantemente, existem diversas vantagens na utilização das ERO como moléculas sinalizadoras. Devido ao eficiente sistema antioxidante presente nas células vegetais, as ERO podem ser geradas e removidas de maneira simultânea, o que possibilita mudanças rápidas e dinâmicas na concentração das espécies. Além disso, o rígido controle sobre a localização subcelular dos sinais de ERO propicia que flutuações na quantidade das moléculas possam ser limitadas a determinados compartimentos celulares, tornando seu controle espacial altamente específico. Uma terceira vantagem reside na capacidade de autopropagação das ERO a longas distâncias: um sinal pode ser transmitido de célula a célula, ativando mecanismos produtores de ERO ao longo do caminho de maneira autônoma, carregando o sinal e, assim, possibilitando o estabelecimento de respostas de maneira coordenada e sistêmica (Mittler et al., 2011). Estes compostos também interagem com diversas outras redes de sinalização em plantas, incluindo proteinoquinases, sinalização de cálcio, e respostas redox. Em alguns casos, o sinal de ERO precede a ativação de sinalização através destas outras redes, enquanto em outros exemplos, a acumulação de ERO sucedeu estes sinais (Mittler et al., 2011).

Outro exemplo da funcionalidade destas espécies reativas de oxigênio no metabolismo vegetal é o seu envolvimento na resposta a estresses. As ERO foram identificadas como componentes comuns em resposta a todos estresses abióticos analisados, variando-se apenas as espécies formadas e os compartimentos celulares envolvidos (Jaspers & Kangasjärvi, 2010). Já em estresses bióticos, após o reconhecimento de um patógeno, por exemplo, cascatas de sinalização são desencadeadas, acarretando em mudanças no pH, transporte de íons para dentro e fora da célula, ativação de enzimas e mesmo a produção intracelular de ERO, podendo levar a mudanças no padrão de expressão de genes específicos, e até

mesmo à morte celular programada (Yadav et al., 2014). A rede de genes envolvidos com o metabolismo oxidativo em plantas é responsável pela regulação da homeostase celular relativa ao acúmulo de ERO nestes organismos. Em *Arabidopsis*, esta rede inclui em torno de 150 genes (Bailly et al., 2008), cujas funções são controlar a produção e a remoção das ERO, evitando os efeitos danosos do estresse oxidativo e permitindo que estas moléculas cumpram seu papel sinalizador, essencial na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta, morte celular programada, sinalização hormonal, e resposta a estresses (Bailly et al., 2008).

Resumidamente, acredita-se que a necessidade de controlar fontes de ERO, tanto internamente quanto externamente, tenha contribuído para a evolução destas espécies químicas como moléculas sinalizadoras. A capacidade de difusão das ERO dentro da célula, aliada ao conceito de “onda temporal-espacial” (autopropagação do sinal ao longo do organismo), torna a sinalização por meio das ERO um processo dinâmico que ocorre no ambiente intracelular (entre organelas) e extracelular (entre células a longas distâncias) (Mittler et al., 2011). Apesar de estruturalmente simples, as ERO são moléculas versáteis que exercem funções centrais no metabolismo vegetal, e cuja intrincada especificidade, ainda não completamente entendida, tem motivado um número crescente de estudos na área (Gadjev et al., 2006).

1.1.2. DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICA

O abrangente sistema de defesa antioxidante das plantas é subdividido em dois grupos: o sistema enzimático e o não-enzimático. Dentre os componentes da frente de defesa não-enzimática, encontra-se uma diversidade de moléculas hidrofílicas e lipofílicas que interagem com os componentes celulares de diversas maneiras, modulando o crescimento e desenvolvimento vegetal em processos como a mitose, senescência e morte celular (Sharma et al., 2012). Dentre estas substâncias antioxidantes encontram-se cofatores enzimáticos, bem como moléculas que atuam regulando os níveis das ERO prevenindo sua formação, ou promovendo sua remoção e degradação (Barbosa et al., 2014). Alguns dos compostos de maior relevância para a proteção antioxidante das células vegetais são:

- Ácido ascórbico (AsA): a molécula antioxidante hidrofílica mais abundante em plantas. Este composto de baixo peso molecular é um poderoso antioxidante,

devido à sua capacidade de doar elétrons em diversas reações enzimáticas e não-enzimáticas (Sharma et al., 2012), sendo uma molécula extremamente versátil. Apesar de detectável na maioria dos tipos celulares, é particularmente abundante nos tecidos fotossintetizantes, onde atua como um antioxidante muito potente em sua forma reduzida (Smirnov et al., 2004). Desempenha um papel-chave na defesa ao estresse oxidativo, protegendo macromoléculas e membranas biológicas através de reação direta com o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, e da regeneração do α -tocoferol (Sharma et al., 2012). A maior parte do *pool* intracelular de AsA se encontra no citoplasma, mas uma porção substancial é exportada para o apoplasto, onde acredita-se que represente a primeira linha de defesa contra potenciais agentes oxidantes externos. No cloroplasto, sob condições fisiológicas normais, existe majoritariamente na forma reduzida, onde age como cofator da violaxantina de-epoxidase, auxiliando na dissipação do excesso de energia (Sharma et al., 2012). Em conjunto com a glutathiona (GSH), participa do ciclo do Ascorbato-Glutathiona (AsA-GSH), no qual o peróxido de hidrogênio é eliminado pela ação de enzimas ascorbato-peroxidases mediante a peroxidação de AsA, que é então reciclado por meio da oxidação da GSH, posteriormente reduzida por glutathiona redutases (GR) (Barbosa et al., 2014).

- Glutathiona (GSH): antioxidante hidrofílico que possui papel central em diversos processos fisiológicos, como a regulação do transporte de sulfato, transdução de sinais, conjugação de metabólitos, detoxificação de xenobióticos e remoção de ERO (Noctor & Foyer, 1998). Detectável em diversos compartimentos celulares como cloroplastos, mitocôndrias, citosol, retículo endoplasmático e vacúolos, a GSH protege macromoléculas reagindo diretamente com o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (Sharma et al., 2012), além de ser substrato para diversas reações celulares que culminam com a oxidação da molécula e a dimerização por meio de uma ponte dissulfeto. A razão entre os níveis de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) reflete o status redox da célula, estando diretamente envolvida na manutenção de um potencial redox baixo e de um ambiente intracelular altamente reduzido (Meister, 1994; Tanaka et al., 1994). Como citado anteriormente, participa do ciclo AsA-GSH, atuando na

regeneração do ascorbato (Barbosa et al., 2014). Dado o seu papel crucial no metabolismo antioxidante, a geração e manutenção de um *pool* de GSH reduzida, seja por síntese *de novo* ou pela ação da glutathione redutase (GR), é de importância vital para a homeostase celular (Sharma et al., 2012).

- Carotenóides: antioxidantes lipofílicos organizados em complexos na membrana do tilacóide, onde removem e inibem a formação de oxigênio singlete (1O_2) (Collins, 2001). Absorvem comprimentos de onda da região entre 400 e 500 nm do espectro visível, transferindo a energia capturada para moléculas de clorofila e agindo como filtros, reduzindo os danos celulares causados pela luz (Sharma et al., 2012).
- Tocoferóis: antioxidantes lipossolúveis que protegem lipídios, proteínas e membranas retirando radical superóxido, radical hidroxila e oxigênio singlete do ambiente celular (Yadav et al., 2014). Dentre os quatro isômeros existentes (α , β , γ e δ -tocoferol), o isômero alfa possui a maior atividade antioxidante *in vivo* (Sharma et al., 2012). São sintetizados apenas por organismos fotossintetizantes e encontram-se somente nas partes verdes das plantas, onde protegem lipídios e outros componentes de membranas através da reação direta com o oxigênio molecular e do *quenching* de oxigênio singlete, além da interrupção da auto-oxidação lipídica (Sharma et al., 2012).
- Compostos fenólicos: grupo composto por diversos metabólitos secundários abundantes nos tecidos vegetais que possuem propriedades antioxidantes. Estes polifenóis contêm substituições em seus anéis aromáticos (-OH ou -OCH₃) que contribuem para sua atividade biológica. Atuam quelando íons metálicos de transição, inibindo a peroxidação lipídica, ou removendo diretamente espécies reativas de oxigênio (Sharma et al., 2012).

Dentre os metabólitos citados, o ácido ascórbico e a glutathione são os antioxidantes solúveis mais abundantes em plantas, os quais exercem papel fundamental na defesa contra o estresse oxidativo (Foyer & Noctor, 2011).

1.1.3. DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA

Completando o sistema de defesa antioxidante das plantas, o sistema enzimático é constituído por famílias proteicas que incluem as superóxido dismutases (SOD), peroxidases (POX), catalases (CAT), ascorbato peroxidases

(APX) e glutathione redutases (GR) (Yadav et al., 2014), distribuídas em diferentes compartimentos celulares contribuindo para a manutenção da homeostase redox celular (Barbosa et al., 2014). Cada grupo possui características particulares intrínsecas, atuando de maneira individual ou conjunta em diferentes vias metabólicas, como exemplificado a seguir:

- Superóxido dismutases (SOD) = grupo de metaloenzimas que catalisam a dismutação do radical superóxido gerando peróxido de hidrogênio e água (Barbosa et al., 2014). Desempenham papel central na defesa antioxidante em todos os organismos aeróbicos, e em plantas, participam da modulação dos níveis de peróxido de hidrogênio no citosol e nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Mittler, 2002). Diversas isoenzimas estão presentes nos genomas vegetais, variando em número e abundância relativa entre espécies, mas todas codificadas pelo genoma nuclear e classificadas de acordo com seus cofatores metálicos: cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) (Gill & Tujeta, 2010; Barbosa et al., 2014). As enzimas são direcionadas a diferentes compartimentos subcelulares por peptídeo-sinais presentes na sua extremidade amino-terminal, sendo que as Mn-SOD são encaminhadas para as mitocôndrias, as Fe-SOD para os cloroplastos, e as Cu/Zn-SOD, presentes em três isoformas, para os cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias, além do citosol (Sharma et al., 2012).
- Peroxidases (POX) = enzimas que possuem um grupo heme (grupamento prostético férrico) e reduzem o peróxido de hidrogênio utilizando compostos fenólicos como doadores de elétrons (Barbosa et al., 2014). Diversas isoformas estão presentes nas células vegetais, envolvidas em uma gama de processos celulares e localizadas principalmente nas paredes celulares e vacúolos. Atuam na defesa contra estresses bióticos e abióticos nos quais o peróxido de hidrogênio esteja envolvido, e sua atividade pode ser utilizada como marcador bioquímico de estresse oxidativo (Barbosa et al., 2014).
- Catalases (CAT) = enzimas ubíquas tetraméricas que, assim como as peroxidases, possuem um grupamento heme, e convertem duas moléculas de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (Sharma et al., 2012). Encontradas nos peroxissomos, glioxissomos e mitocôndrias, atuam na detoxificação do peróxido de hidrogênio gerado durante a fotorrespiração e a β -oxidação de

ácidos graxos, sem utilizar agentes redutores, sendo uma opção vantajosa do ponto de vista energético para a remoção desta ERO (Barbosa et al., 2014). Apresenta alta afinidade pelo peróxido de hidrogênio, atuando no controle dos níveis da molécula em paralelo com o ciclo do ascorbato-glutationa (Sharma et al., 2012).

- **Ascorbato Peroxidases (APX)** = Heme-proteínas da Classe I da superfamília das peroxidases não-animais que atuam na detoxificação do peróxido de hidrogênio. Utilizam duas moléculas de ascorbato como substrato redutor para cada molécula de peróxido de hidrogênio convertida a água, gerando duas moléculas de monodehidroascorbato (MDHA) simultaneamente (Sharma et al., 2012; Barbosa et al., 2014). Suas diferentes isoformas distribuem-se pelo citosol, parede celular, peroxissomos, mitocôndrias e cloroplastos, nas duas últimas organelas participando do ciclo do ascorbato-glutationa (Teixeira et al., 2006; Sharma et al., 2012; Barbosa et al., 2014). Sua alta afinidade pelo peróxido de hidrogênio a colocou em um papel central no controle dos níveis intracelulares desta ERO, permitindo sua eliminação mesmo quando a molécula encontra-se em baixas concentrações (Mittler et al., 2002).
- **Glutationa redutases (GR)** = flavoenzimas dependentes de NADPH que atuam na detoxificação de peróxido de hidrogênio através da redução da glutatona oxidada (GSSG) à glutatona reduzida (GSH) (Yadav et al., 2014). Contêm um grupo dissulfeto essencial para sua ação catalítica, que ocorre em duas etapas: a redução da porção flavina da enzima pelo NADPH, e a subsequente redução da ponte dissulfeto, produzindo um ânion tiolato e uma cisteína (Sharma et al., 2012). Localizam-se nos cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos, sendo que cerca de 80% de sua atividade nos tecidos fotossintetizantes é proveniente das isoformas citosólicas (Sharma et al., 2012).
- **Guaiacol peroxidases (GPX)**: heme-proteínas que oxidam preferencialmente doadores de elétrons orgânicos como o guaiacol e pirogalol às custas de peróxido de hidrogênio (Sharma et al., 2012). Suas isoformas se encontram nos vacúolos, nas paredes celulares e no citosol de células vegetais, envolvidas em processos biossintéticos relevantes, como a lignificação da parede celular, a biossíntese de etileno e a defesa contra estresses bióticos e abióticos (Sharma et al., 2012).

1.2. ASCORBATE PEROXIDASE-RELATED

Dada a importância do sistema antioxidante em plantas para seu desenvolvimento e sobrevivência, o estudo da intrincada rede de genes envolvidos com o estresse oxidativo é de extrema relevância para que se entenda como estas rotas são reguladas, como e quando são ativadas, e quais genes participam das diferentes vias.

Seguindo esta linha de pesquisa, uma ascorbato peroxidase putativa foi identificada por meio de análises *in silico*, presente em todos os genomas vegetais depositados em bancos de dados. O gene, que foi intitulado *ascorbate peroxidase-related (APX-R)*, foi descrito por nosso grupo em 2011 (Lazzarotto et al., 2011) quando demonstrou-se que, apesar das similaridades, *APX-R* apresenta também diferenças marcantes em relação às ascorbato peroxidases, incluindo alterações em resíduos do sítio catalítico e a estrutura de éxons e íntrons do gene. Dentre os aminoácidos conservados nas APX e não presentes em APX-R, destaca-se a arginina 172, resíduo essencial para a ligação ao substrato ascorbato que dá nome a esta família de enzimas. Sabe-se que alterações nesta região impedem totalmente a ligação da enzima ao ascorbato, evidenciando a não utilização deste substrato por APX-R. Como as demais peroxidases, que são capazes de utilizar guaiacol e pirogalol, por exemplo, é possível que APX-R utilize outras moléculas como substrato, hipótese que é reforçada pela presença de resíduos conservados característicos de ligação a estes substratos (arginina 38 e prolina 132, por exemplo) (Lazzarotto et al., 2015). Corroborando com estas diferenças, análises filogenéticas comprovaram que as APX-R não são membros da família das ascorbato peroxidase, mas sim, constituem um grupo separado dentro da superfamília de peroxidases não-animais, caracterizando uma família de heme-peroxidases de classe I até então não descrita (Lazzarotto et al. 2011 e Lazzarotto et al. 2015).

Outro aspecto curioso relativo à *APX-R* é a manutenção deste gene como cópia única em todos os genomas vegetais analisados, mesmo após a região cromossômica no qual *APX-R* está inserido ter passado por consecutivos eventos de duplicação em diversas espécies - dez vezes em álamo e sete em soja, por exemplo (Lazzarotto et al., 2011; Dunand et al., 2011). Este fato sugere a existência de pressão seletiva para que as cópias extra do gene sejam eliminadas ao longo da evolução dos genomas vegetais, indicando a decorrência de possíveis efeitos

deletérios como resultado de um maior número de cópias e, possivelmente, maior nível de expressão de *APX-R*.

Com o objetivo de entender a funcionalidade deste gene nos genomas vegetais, nosso grupo iniciou os estudos em plantas transgênicas de arroz (*Oryza sativa*) com expressão reduzida do gene codificador de *APX-R*, nas quais se observou a ocorrência de estresse oxidativo mesmo em condições ótimas de cultivo, evidenciado pelo aumento na quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), além de atraso na germinação das sementes em comparação com as plantas selvagens. Além disso, o silenciamento de *APX-R* modulou indiretamente a atividade de enzimas envolvidas na regulação dos níveis de peróxido de hidrogênio (modulação negativa para as superóxido dismutases e catalases, e positiva para as ascorbato peroxidases). Ainda em arroz, a localização subcelular de *APX-R* foi investigada, dada a presença de uma extensão amino-terminal com predita função de peptídeo-sinal. A transformação transiente de protoplastos de arroz esclareceu esta questão, demonstrando o direcionamento de OsAPX-R para o cloroplasto (Lazzarotto et al., 2011).

No banco de dados de referência para estudos funcionais na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*The Arabidopsis Information Resource*, www.arabidopsis.org), o gene ortólogo de *APX-R* de arroz está anotado como codificador de uma provável ascorbato peroxidase citosólica (APX6; At4g32320) nesta espécie. Para investigar a função deste gene na espécie modelo, mutantes de perda-de-função foram analisados em condições ótimas de crescimento e em situações de estresse abiótico. A diminuição dos níveis de expressão do gene codificador de *APX-R* sensibilizou as plantas ao estresse oxidativo durante a germinação induzido por metil viologênio, levando ao acúmulo de peróxido de hidrogênio (dados não publicados). Além disso, de forma semelhante às plantas de arroz silenciadas para este gene, as sementes mutantes de *Arabidopsis* também apresentaram atraso na taxa de germinação, indicando atividade conservada de *APX-R* no processo germinativo entre diferentes espécies. Para estudo dos efeitos da superexpressão de *APX-R* em *Arabidopsis thaliana*, linhagens transgênicas expressando a sequência codificadora do gene sob o controle do promotor constitutivo 35S foram geradas. Interessantemente, o fenótipo de atraso e baixas taxas de germinação (em quatro das seis linhagens geradas) se repetiu, comprovando que alterações nos níveis de expressão de *APX-R* interferem na viabilidade das sementes, provavelmente através

de participação desta peroxidase durante os processos envolvidos com a maturação da semente. A superexpressão de *APX-R* acarretou na morte dos embriões presentes nas sementes, como demonstrado em teste de viabilidade, conforme informado por Fernanda Lazzarotto.

Em concordância com nossos resultados, Chen et al. (2014) mostraram que *APX-R*, citada como *APX6* em seu trabalho, é importante para a proteção das sementes dessecadas e maduras, e para manter o vigor das sementes sob condições de estresse. Além disso, através do trabalho com mutantes, Chen et al. demonstraram que a depleção de *APX-R* leva a um desbalanço hormonal nas plantas, como evidenciado pelo aumento de 40% nos níveis de ácido abscísico (ABA), por exemplo. Sabe-se que ABA está envolvido no desenvolvimento tardio da semente, auxiliando o embrião a sobreviver durante o estágio de dessecação (Meurs et al., 1991), o que pode explicar, pelo menos parcialmente, os efeitos deletérios frente ao aumento e diminuição dos níveis de expressão de *APX-R* sobre as sementes. Da mesma forma, o peróxido de hidrogênio também está envolvido diretamente com a germinação (Lariguet et al., 2013), produzido em diversos compartimentos subcelulares incluindo cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Sharma et al., 2012). Neste cenário, determinar experimentalmente a localização subcelular de *APX-R* em *Arabidopsis* se faz fundamental para que se possa entender em que vias *APX-R* possa estar envolvida e por que sua ausência ou expressão constitutiva alteram a viabilidade das sementes produzidas.

1.3. GERAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS PARA ESTUDOS DE GENÔMICA FUNCIONAL

O conhecimento da sequência codificadora de um gene e a determinação da localização subcelular dos seus produtos proteicos é o primeiro passo para entender como os diferentes componentes de um determinado sistema biológico funcionam em conjunto. A genômica funcional é uma abordagem que encara os genes como as peças de um quebra-cabeça, visando esclarecer a função de cada peça e suas interações (Holtorf et al., 2002). A análise do padrão temporal e espacial de expressão de cada gene é a base para o entendimento de sua função, indicando quando e onde cada gene é necessário durante o desenvolvimento vegetal. A busca por homologia com sequências cuja função já é conhecida também pode indicar

possíveis papéis para genes ainda não anotados, mas nem sempre leva a resultados conclusivos.

O uso de organismos mutantes que apresentam expressão reduzida de genes específicos (perda-de-função ou silenciamento) ou sua expressão constitutiva, tem sido extremamente valioso para a identificação da funcionalidade dos produtos gênicos por eles codificados, seja pela ocorrência de fenótipos deletérios claros, pela identificação de genes induzidos ou reprimidos como resultado da alteração nos níveis de expressão do gene de interesse, ou por outras alterações que estas plantas apresentem quando comparadas com indivíduos selvagens frente a condições específicas.

Modificações no padrão de expressão de genes candidatos podem ser obtidas por meio de diferentes abordagens, incluindo mutagênese química ou física, inserção aleatória de T-DNA ou transposons, ou o uso de ferramentas de engenharia genética para a geração de plantas transgênicas, que oferece uma vasta gama de vetores e métodos de transformação (Holtorf et al., 2002). Além da vantagem de ser direcionada para uma sequência de interesse específica, ao contrário dos métodos de mutagênese química, física e insercional, a engenharia genética permite a rápida obtenção das plantas transgênicas, com cada vez mais protocolos estabelecidos e sistemas de expressão e clonagem disponíveis.

1.3.1. PLANTA MODELO: *Arabidopsis thaliana*

A escolha do organismo modelo em um estudo de genômica funcional é de fundamental importância, visto que o mesmo deve ser apropriado para a realização dos experimentos pretendidos, além de ser facilmente manipulável e, preferencialmente, possuir protocolos bem estabelecidos. Em se tratando de organismos para estudos de genética molecular, a planta modelo *Arabidopsis thaliana* se sobressai como uma das principais escolhas de pesquisadores da área desde meados dos anos 1980, apesar de seu potencial como organismo modelo para estudos genéticos já ter sido evidenciado por Laibach em 1943 (Meinke et al., 1998).

Membro da família Brassicaceae, à qual também pertencem plantas de relevância econômica como a canola, o repolho, o brócolis e a mostarda, *Arabidopsis thaliana* é uma pequena angiosperma modelo para biologia vegetal, cujo

pequeno genoma demonstrou-se ideal para estudos de genética molecular, o que a distinguiu de outros modelos bem estabelecidos para pesquisas de genética clássica. Desde o início da década de 1980, mapas genéticos da espécie já estavam disponíveis para a comunidade científica, seguidos pelo estabelecimento de um grande número de protocolos de biologia molecular, o que impulsionou o seu uso como organismo modelo (Meyerowitz, 1987; Meinke et al., 1998).

Com vasta distribuição pela Europa, Ásia e América do Norte, diversos ecotipos (também chamados de “acessos”) foram coletados e estão disponíveis para estudos, sendo os ecotipos Columbia (Col) e Landsberg erecta (Ler) os mais utilizados para pesquisas genéticas e moleculares. Com um tempo de geração de em torno de seis semanas, uma planta de *Arabidopsis thaliana* possui uma estrutura de roseta com folhas e um escapo floral, do qual emergem inflorescências. O desenvolvimento e tamanho da planta, além do seu tempo de floração, variam de acordo com suas condições de cultivo, incluindo nutrição, temperatura e a relação de horas claro/escuro. Plantas adultas podem atingir de 15 a 40 cm de altura, enquanto as rosetas variam de 2 a 10 cm de diâmetro, e as flores têm tamanho aproximado de 2 mm de comprimento. As flores, que geralmente se autopolinizam, podem ser facilmente manipuladas em laboratório para a realização de cruzamentos entre plantas de diferentes genótipos, levando à produção de frutos alongados contendo de 30 a 60 sementes cada um quando atingida a maturidade (em torno de duas semanas após a fertilização, a 25 °C). Suas pequenas sementes, que em média possuem 0,5 mm de comprimento e pesam em torno de 20 µg, são geradas aos milhares, podendo-se obter até 10.000 sementes de uma única planta. A estocagem das sementes maduras, quando em ambiente seco, pode ocorrer por anos, sem a ocorrência de perda de vigor germinativo. Plantas de *Arabidopsis* podem ser cultivadas em solo, placas com meio de cultura ou em hidroponia, e seu pequeno porte propicia o cultivo de um grande número de plantas em um pequeno espaço (Meyerowitz, 1987; Meinke et al., 1998). Seu genoma, cuja sequência foi publicada em 2000 como resultado da “Iniciativa Genoma de *Arabidopsis*”, possui 125 Mb e 25.498 genes, os quais codificam proteínas pertencentes a mais de 11.000 famílias (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

1.3.2. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Dentre os métodos de transformação genética de plantas, a utilização da bactéria gram-negativa de solo *Agrobacterium tumefaciens* se destaca há décadas, com diversos protocolos bem estabelecidos disponíveis para transformação de plantas mono e dicotiledôneas. Diversas linhagens da bactéria estão disponíveis atualmente, cada qual com características vantajosas para fins específicos, e a grande quantidade de dados disponíveis referentes à sua fisiologia e biologia molecular facilita ainda mais o seu uso como método para obtenção de plantas transgênicas (Gelvin, 2003).

Na natureza, *Agrobacterium tumefaciens* infecta plantas dicotiledôneas e induz a formação de tumores chamados de galha-da-coroa (De la Riva et al., 1998). Ferimentos nos tecidos vegetais são a porta de entrada da bactéria, que através da transferência de material genético para o genoma da planta faz com que as células vegetais se multipliquem e produzam aminoácidos e carboidratos modificados chamados de opinas, que servirão como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento bacteriano. O material genético transferido é um fragmento específico chamado de T-DNA, presente na região-T do plasmídeo Ti (*Tumor-inducing*), e que após ser transportado até o núcleo da célula vegetal, é integrado ao seu genoma e transcrito, causando o tumor. Dois tipos de genes estão presentes no T-DNA: os oncogenes, que codificam enzimas envolvidas na síntese de auxinas e citocinas, essenciais para a formação do tumor, e os genes codificadores da síntese de opinas (De la Riva et al., 1998).

A transferência do T-DNA é coordenada pela ação conjunta de proteínas codificadas pelos genes de virulência (*vir* genes) presentes no plasmídeo Ti e genes presentes no cromossomo bacteriano, e acontece através de uma série de etapas: colonização bacteriana do tecido vegetal, indução do sistema de virulência da bactéria, geração do complexo de transferência do T-DNA, e subsequente transferência e integração do T-DNA no genoma da planta hospedeira (De la Riva et al., 1998). No plasmídeo Ti, o T-DNA é flanqueado por duas bordas de 25 pares de base que apresentam alta homologia de sequência e que são essenciais para o seu reconhecimento, excisão e transferência.

De maneira a utilizar este sistema natural para a introdução de fragmentos exógenos de DNA no genoma de plantas eliminando, porém, a indução de tumor no

tecido vegetal, linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* foram modificadas em laboratório e um sistema de vetores binários foi criado. Devido ao grande tamanho do plasmídeo Ti e a consequente dificuldade de manipulação genética, desenvolveu-se a estratégia de utilizar dois vetores separados: um contendo a região-T, e o outro, os genes de virulência. Desta maneira, apenas o plasmídeo contendo o T-DNA é manipulado, inserindo-se o transgene de interesse entre as bordas direita e esquerda que caracterizam a região-T, que não mais conterá as sequências indutoras de tumor. As proteínas codificadas pelos genes *vir* são capazes de agir em trans sobre estas sequências, o que elimina a necessidade de ambas estarem presentes na mesma molécula de DNA (Gelvin, 2003). Assim, o replicon contendo o T-DNA é o chamado vetor binário, enquanto que o replicon contendo os genes *vir* é denominado *vir helper* (Hoekema et al., 1983). O sistema de vetores binários expandiu as possibilidades de transformação de plantas utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, visto que estes vetores são pequenos e facilmente manipuláveis em *Escherichia coli* para a obtenção da construção desejada. Diversos vetores foram desenhados possibilitando a obtenção de variadas construções gênicas, incluindo o uso de diferentes promotores, marcas de seleção, peptídeo-sinais e fusões tradicionais entre o gene de interesse e proteínas fluorescentes, por exemplo (Gelvin, 2003).

Um exemplo de protocolo de transformação de plantas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* é o *floral dip* (Clough & Bent, 1998), uma técnica fácil, rápida e eficiente que exclui a necessidade de cultura de tecidos e regeneração de plantas, eliminando etapas e reduzindo o tempo necessário para obtenção das plantas transgênicas. Além disso, os reagentes e demais materiais utilizados são relativamente baratos e simples, e a metodologia não requer um alto grau de especialização técnica (Zhang et al., 2006). Segundo Clough & Bent (1998), os três parâmetros principais para o sucesso da transformação por *floral dip* são: o estágio de desenvolvimento da planta (é ideal um grande número de botões florais fechados), e as concentrações de sacarose e surfactante na solução na qual a bactéria é ressuspensa, sendo que as demais variáveis (como pH, temperatura e umidade) não são críticas para a eficiência da técnica. Devido à sua simplicidade, permite a obtenção de diversas linhagens transgênicas independentes em um curto período de tempo, sendo facilmente escalonável (Zhang et al., 2006). O grande número de sementes produzido por planta de *Arabidopsis thaliana* compensa a taxa

de transformação que pode não ser alta, e o tamanho reduzido permite que centenas de sementes sejam analisadas em cada rodada de *screening* em placas de petri.

Métodos simples e eficientes como o *floral dip* popularizaram ainda mais o uso de *Agrobacterium tumefaciens*, aliados à variedade de linhagens e vetores binários disponíveis, possibilitando a obtenção das mais diversas construções gênicas. Dentre as vantagens da utilização desta bactéria para transformação de plantas está o número reduzido de cópias do transgene que são inseridas em cada evento de transformação, diminuindo a probabilidade de supressão e instabilidade do transgene, além do número cada vez maior de espécies suscetíveis à transformação por esse método (De la Riva et al., 1998).

1.3.3. PROTEÍNAS FLUORESCENTES

O uso de proteínas fluorescentes (PF) para a obtenção de imagens em sistemas biológicos possibilitou a criação de novas técnicas e experimentos, revolucionando estudos de interação e localização subcelular de proteínas, imunoprecipitação e purificação de afinidade (Earley et al., 2006). Uma ampla gama de proteínas fluorescentes está disponível atualmente, incluindo versões modificadas que ampliaram as possibilidades de utilização destas proteínas em diferentes técnicas e/ou propósitos. A variedade de opções, porém, torna a escolha mais criteriosa, dependendo do objetivo a ser alcançado, incluindo o tempo de duração do experimento, o sistema no qual a proteína será utilizada (*in vitro* ou *in vivo*), as condições experimentais (pH e temperatura, por exemplo), o sistema de detecção de imagens, dentre outros fatores. A ausência de toxicidade é de extrema importância para que se possa introduzir uma proteína fluorescente em determinado organismo, além da verificação do sinal emitido pela proteína em comparação com a autofluorescência do sistema a ser estudado, de forma a garantir que seu sinal será detectável. A PF deve apresentar fotoestabilidade adequada para a duração do estudo a ser realizado, e não ser sensível às condições ambientais do experimento a fim de não alterar os resultados obtidos. Quando utilizadas para a construção de produtos de fusão tradicionais entre a proteína fluorescente e uma proteína de interesse do pesquisador, e dependendo do objetivo do estudo, é ideal que a PF não

forme oligômeros, sendo este outro critério a ser analisado no momento da escolha da proteína fluorescente adequada (Shaner et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A determinação da localização subcelular de uma proteína é de extrema importância para o entendimento de sua função biológica, visto que os diversos processos e reações químicas do ambiente intracelular ocorrem de forma específica, associados a diferentes estruturas subcelulares. Em se tratando de plantas, métodos que permitam a visualização da localização subcelular de proteínas estavelmente expressas *in planta* possibilitam analisar diferentes tipos celulares ao longo de todo o ciclo de vida do vegetal, diferentemente de técnicas como a transformação transiente de protoplastos, por exemplo.

A análise da localização de APX-R em *Arabidopsis thaliana* auxiliará na elucidação do papel exercido pela proteína, sendo um indicativo de sua função biológica e dos processos nos quais ela pode estar envolvida. A confirmação de sua presença nos cloroplastos, como experimentalmente demonstrado em arroz, reforçaria a hipótese de que APX-R atua no metabolismo do peróxido de hidrogênio nesta organela, molécula essencial durante a formação, maturação e germinação das sementes – embasando os fenótipos observados nas sementes em condições de depleção e expressão constitutiva do gene. O conhecimento das características e funcionalidade de enzimas integrantes do sistema antioxidante vegetal é uma valiosa ferramenta para que se entenda, de maneira abrangente, o envolvimento do metabolismo do peróxido de hidrogênio nos processos que regulam o desenvolvimento das plantas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir linhagens transgênicas superexpressando o produto de fusão *AtAPX-R-EYFP*, visando a obtenção de plantas estavelmente transformadas para posterior análise em microscopia de fluorescência e confocal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar a sequência codificadora (CDS) de *APX-R* de *Arabidopsis thaliana* a partir de cDNA previamente sintetizado;
- Clonar a CDS de *AtAPX-R* no vetor de entrada pENTR/D-TOPO® para subsequente recombinação com o vetor binário pEarleyGate101 (Earley et al., 2006);
- Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* por meio da técnica de *floral dip* (Clough & Bent, 1998);
- Analisar fenotipicamente as linhagens transgênicas obtidas;
- Analisar a expressão do transgene em microscópio de fluorescência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA

O RNA total de folhas de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia foi extraído utilizando-se *TRIzol Reagent* (*Thermo Fisher Scientific*), de acordo com o protocolo do fabricante. Após quantificação por espectrofotometria a um comprimento de onda de 260 nm e eletroforese em gel de agarose 1%, as amostras foram tratadas com DNase (*Promega*) visando a degradação de DNA genômico presente na amostra. Posteriormente, a síntese do cDNA total da amostra foi realizada utilizando-se o RNA extraído como molde e oligonucleotídeos iniciadores oligo-dT através de reação catalisada pela enzima transcriptase reversa M-MLV (*Thermo Fisher Scientific*), segundo protocolo do fabricante.

4.2. AMPLIFICAÇÃO DO GENE *AtAPX-R* E CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

A sequência codificadora de *APX-R* foi amplificada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores *AtAPX-R FOR* e *AtAPX-R REV* (Tabela 1) a partir do cDNA total de *Arabidopsis thaliana*. A reação foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo 2 μ L de cDNA molde, 5 μ L de Tampão 5X, 0,5 μ L de dNTPs (10 mM), 1,25 μ L de oligonucleotídeos iniciadores (10 μ M), 0,25 μ L de *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (*New England BioLabs® Inc.*) e 16 μ L de água deionizada autoclavada. A etapa de desnaturação inicial constituiu-se de 3 minutos a 98 °C, a qual foi seguida de 30 ciclos de amplificação com etapas de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 61 °C por 20 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. O amplicon de *AtAPX-R* foi clonado no vetor de entrada pENTR™/D-TOPO® (*Thermo Fisher Scientific*) (Figura S1) seguindo o protocolo de clonagem *Directional TOPO®*, no qual a clonagem direcional é catalisada pela ação da enzima Topoisomerase I, que se encontra conjugada ao vetor de entrada. Para a transferência do gene de interesse para o vetor binário de expressão, procedeu-se a reação de recombinação LR entre o vetor de entrada pENTR™/D-TOPO®- *AtAPX-R* e o vetor binário de destino

pEarleyGate101 (Earley et al., 2006) (Figura S2), preparada de acordo com o protocolo do sistema *Gateway*[®] (*Thermo Fisher Scientific*).

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação da CDS de *AtAPX-R* e sequenciamento do plasmídeo pENTRTM/D-TOPO[®]- *AtAPX-R*.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência
<i>AtAPX-R</i> FOR	5' CACCATGACGACGACGACT 3'
<i>AtAPX-R</i> REV	5' TAACATATTCCATTTGGCCC 3'
RT-qPCR <i>AtAPX-R</i> FOR	5' CGGATCATGCTTTAGTGAC 3'
RT-qPCR <i>AtAPX-R</i> REV	5' CCAAATTATTCGGGCATGTT 3'
M13 FOR (-20)	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13 REV	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

4.3 TRANSFORMAÇÃO DE *Escherichia coli* TOP10

Células termocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 foram utilizadas para multiplicação dos vetores recombinantes pENTRTM/D-TOPO[®]- *AtAPX-R* e pEarleyGate101 – *AtAPX-R*. Para realização do choque térmico, o DNA de interesse foi adicionado à alíquota de células competentes e os tubos foram mantidos no gelo por 10 minutos antes da aplicação do choque térmico a 42 °C por 1 minuto e 30 segundos. Após retornarem ao gelo por 2 minutos, 500 µL de meio LB (Luria-Bertani) líquido foram adicionados aos tubos, incubados por 1 hora sob agitação a 37 °C. As bactérias foram então plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina (50 µg/mL), para ambos os vetores, e incubadas em estufa a 37 °C *overnight*.

4.4. TRANSFORMAÇÃO DE *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

A reação de recombinação entre o vetor de entrada e o vetor binário de expressão foi inserida em células de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 eletrocompetentes. O DNA de interesse foi adicionado às alíquotas de células e as cubetas foram posicionadas no eletroporador, onde o pulso elétrico foi aplicado.

Meio LB líquido foi adicionado às cubetas, e as suspensões de células foram transferidas para tubos de microcentrífuga e mantidas a 28 °C por 1 hora sob agitação. As alíquotas foram então plaqueadas em LB sólido contendo canamicina (25 µg/mL) e rifampicina (100 µg/mL) e incubadas em estufa a 28 °C por 48 horas.

4.5. MICROPREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

A extração de DNA plasmidial foi realizada com o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega Corporation)* de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

4.6. ANÁLISE PLASMIDIAL POR PERFIL DE RESTRIÇÃO E SEQUENCIAMENTO

As reações de clivagem por enzima de restrição foram realizadas a partir de 500 ng de DNA plasmidial, 5 unidades de enzima, 2 µL do respectivo tampão de reação e água deionizada estéril para um volume final de 20 µL. As reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os plasmídeos também foram analisados em reação de sequenciamento utilizando-se 3 pares de oligonucleotídeos iniciadores, indicados na Tabela 1.

4.7. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE *Agrobacterium tumefaciens* PARA O FLORAL DIP

Colônias de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 transformadas foram utilizadas para preparação de pré-inóculos em 5 mL de meio LB líquido, incubados a 28 °C por 48 horas sob agitação. Os pré-inóculos foram adicionados a frascos Erlen Meyer contendo 500 mL de LB líquido, que foram incubados sob agitação a 28 °C até que atingisse a concentração celular adequada para a realização do *floral dip* ($OD_{600} = 1,5 - 2,0$), monitorada em espectrofotômetro. Os antibióticos rifampicina e canamicina foram adicionados ao meio durante todas as etapas de cultivo da bactéria transformada, para concentrações finais de 100 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. A cultura de células foi então centrifugada a 4000 g por 10 minutos em temperatura ambiente, e os precipitados foram ressuspensos em um volume

de solução 5% sacarose preparada na hora. Após, adicionou-se o surfactante Silwet-L77 a uma concentração final de 0,02%.

4.8. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Arabidopsis thaliana* COL-0 POR MEIO DA TÉCNICA DE *FLORAL DIP*

Plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia foram transformadas através do método *floral dip*, cujo protocolo é mostrado na Figura 1. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 carregando o vetor binário de expressão pEarleyGate 101 – *AtAPX-R* foi cultivada em meio LB na presença dos antibióticos rifampicina (100 µg/mL) e canamicina (25 µg/mL) até atingir a densidade óptica adequada ($OD_{600} = 1,5 - 2,0$), sendo então centrifugada e os precipitados lavados e ressuspendidos em solução de sacarose e surfactante (Figura 1a). Potes com plantas em estágio de floração (Figura 1b) foram invertidos e a parte aérea das plantas foi mergulhada na suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 por 10 segundos, aplicando-se sutil agitação (Figura 1c). Ao submergir as plantas, todas as inflorescências, incluindo as menores e mais jovens, estiveram em contato com a solução, de forma a maximizar a eficiência da transformação. As plantas foram então removidas da solução e aguardou-se de 3 a 5 segundos para que o excesso de líquido escorresse. As plantas foram cobertas com sacos plásticos (Figura 1d) e posicionadas na horizontal, permanecendo assim de 16 a 24 horas (Figura 1e), a fim de manter um ambiente úmido propício para a ocorrência da infecção por *Agrobacterium tumefaciens*. Após este período, a cobertura plástica foi removida e os potes foram recolocados na posição vertical. As plantas foram então cultivadas normalmente até o momento da coleta de sementes (adaptado de Clough & Bent, 1998).

4.9. ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES DE *Arabidopsis thaliana*

As sementes coletadas das plantas transformadas foram esterilizadas de acordo com protocolo descrito por Zhang et al., 2006. Para a esterilização, as sementes foram lavadas com etanol 70% por 1 minuto, seguido de incubação por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 6% e Tween 20 0,05%, sob agitação constante. As sementes foram então lavadas de 3 a 5 vezes com água destilada

autoclavada e por fim adicionou-se solução 0,1% agarose para facilitar o plaqueamento no meio de seleção.

4.10. SELEÇÃO DAS SEMENTES TRANSFORMADAS

A seleção das sementes transformadas foi realizada em placas contendo meio MS (*Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, Sigma-Aldrich*) suplementado com o antifúngico nistatina (50 mg/L), o antibiótico carbenicilina (500 mg/L; utilizado para inibir o crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*) e o herbicida glufosinato de amônio (10 mg/L; marca de seleção das sementes transgênicas). Após esterilização com álcool 70% e hipoclorito de sódio, as sementes foram ressuspensas em solução de agarose 0,1% e plaqueadas no meio seletivo. As placas foram seladas e mantidas a 4 °C por 48 horas para realizar a quebra da dormência das sementes, sendo posteriormente levadas para a sala de cultivo e mantidas sob as condições padrão utilizadas para o cultivo das plantas de *Arabidopsis thaliana*. Após seleção em meio de cultivo, plantas transgênicas com 25 dias de idade foram analisadas por microscopia de fluorescência em filtro FITC (excitação 470 nm e emissão 520 nm) a fim de detectar a expressão da proteína fluorescente EYFP. As plântulas transgênicas expressando a proteína de fusão foram transferidas para potes com substrato onde completaram o seu ciclo de desenvolvimento.

4.11. CULTIVO DE *Arabidopsis thaliana*

As plantas de *Arabidopsis thaliana*, cultivadas tanto *in vitro* quanto em solo, foram mantidas em sala de cultivo a 22 °C, sob um regime claro/escuro de 16 e 8 horas, respectivamente. A quebra de dormência das sementes foi realizada com tratamento de frio (4 °C) em condições de umidade por um período de 48 a 72 horas.

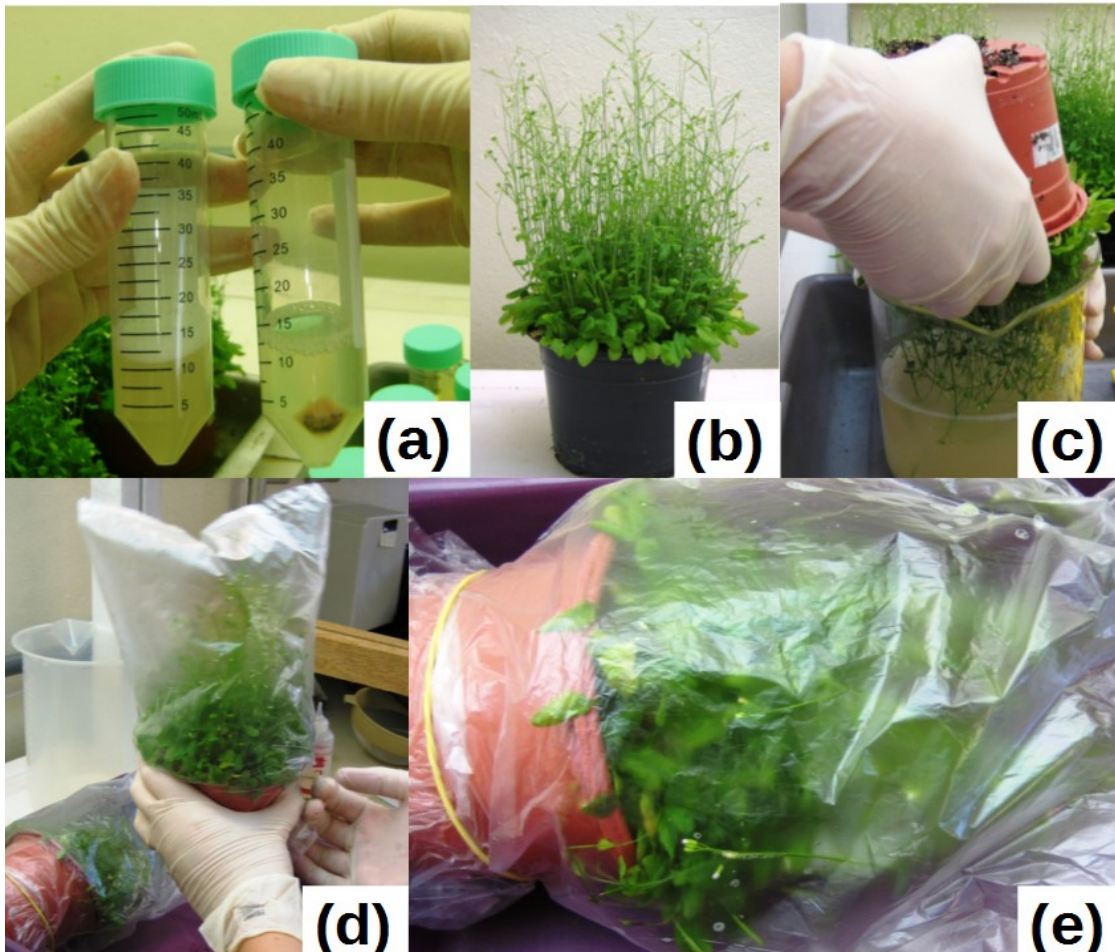


Figura 1. O método *floral dip* (Clough & Bent, 1998) para transformação de *Arabidopsis thaliana*. (a) *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contendo o plasmídeo pEarleyGate101 – *AtAPX-R* foi ressuspensa em solução 5% sacarose e 0.02% Silwet L-77. (b) Plantas saudáveis no estágio apropriado para a transformação (c) foram mergulhadas na solução por 10 segundos sob sutil agitação. (d) As plantas foram cobertas com sacos plásticos e (e) mantidas na posição horizontal por 24 horas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AMPLIFICAÇÃO DE *APX-R* A PARTIR DE CDNA TOTAL DE *Arabidopsis thaliana*

A reação de amplificação da sequência codificadora de *AtAPX-R*, a partir de amostra de cDNA total de plântulas de *Arabidopsis* de dez dias, possibilitou a obtenção de um fragmento único de DNA de tamanho compatível com o esperado (990 pares de base) (Figura 2a). O códon terminador não foi incluído no iniciador reverso a fim de permitir a clonagem do gene em fusão com o gene codificador da proteína fluorescente *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) e a otimização da reação de PCR garantiu a obtenção de uma banda única, assegurando a especificidade da reação. O produto de PCR obtido foi posteriormente clonado no vetor de entrada pENTR™/D-TOPO®. A triagem dos clones foi realizada por meio de PCR de colônia (Figura 2b) e análise do perfil de restrição através da clivagem do plasmídeo com as enzimas *Apal* (*Promega*) e *Alw44I* (*Promega*), resultando na liberação de fragmentos de 2247 e 887 pares de base (Figura 2c), perfil esperado para o vetor contendo o inserto de *AtAPX-R*. O vetor vazio não foi clivado como controle devido ao alto custo do kit comercial, mas de acordo com previsões *in silico*, 3 fragmentos de 1687, 567 e 320 pares de base seriam liberados através da clivagem do vetor não clonado. As duas amostras confirmadas foram enviadas para sequenciamento, realizado com os 3 pares de oligonucleotídeos iniciadores mostrados na Tabela 1, cujo resultado confirmou que a sequência do plasmídeo não sofreu mutações e que o inserto foi integrado na fase de leitura correta.

5.2. CLONAGEM DE *AtAPX-R* NO VETOR DE EXPRESSÃO pEarleyGate101

O fragmento contendo a sequência codificadora de *AtAPX-R* foi subclonado no vetor pENTR™/D-TOPO® (vetor de entrada), que recebeu a denominação de pENTR™/D-TOPO®- *AtAPx-R*. Em seguida procedeu-se a clonagem no vetor de expressão pEarleyGate101 (vetor de destino) por meio de reação de recombinação LR entre o vetor de entrada e o vetor de destino. Como ambos os plasmídeos possuem a mesma marca de seleção (canamicina), o vetor pENTR™/D-TOPO®- *AtAPx-R* foi digerido com a enzima de restrição *Alw44I* (*Promega*) antes da

recombinação, o que levou à linearização do plasmídeo. Essa estratégia foi empregada para evitar a obtenção de colônias transformadas com o vetor de entrada não recombinado. A triagem inicial de confirmação do inserto no vetor de expressão foi feita por meio PCR de colônia utilizando os mesmos iniciadores específicos para a amplificação do gene *AtAPX-R*. Todos os clones analisados continham o fragmento de DNA de interesse (990 pares de base), como demonstrado na Figura 3a. As colônias PCR-positivas foram inoculadas em meio LB líquido contendo canamicina (50 µg/mL) e incubadas sob agitação a 37 °C *overnight*, e as culturas celulares resultantes foram utilizadas para a micropreparação do DNA plasmidial. Após a extração, os plasmídeos foram clivados com a enzima *EcoRI* (*Promega*) para a confirmação da presença do inserto no vetor recombinante. O perfil de restrição esperado deveria apresentar duas bandas de 8653 e 3086 pares de base, e como demonstrado na Figura 3b, 4 das 6 amostras clivadas apresentaram este perfil, confirmando a presença do inserto de *AtAPX-R* no vetor (o vetor não recombinado teria liberado fragmentos de 8653, 2009 e 1792 pares de base).

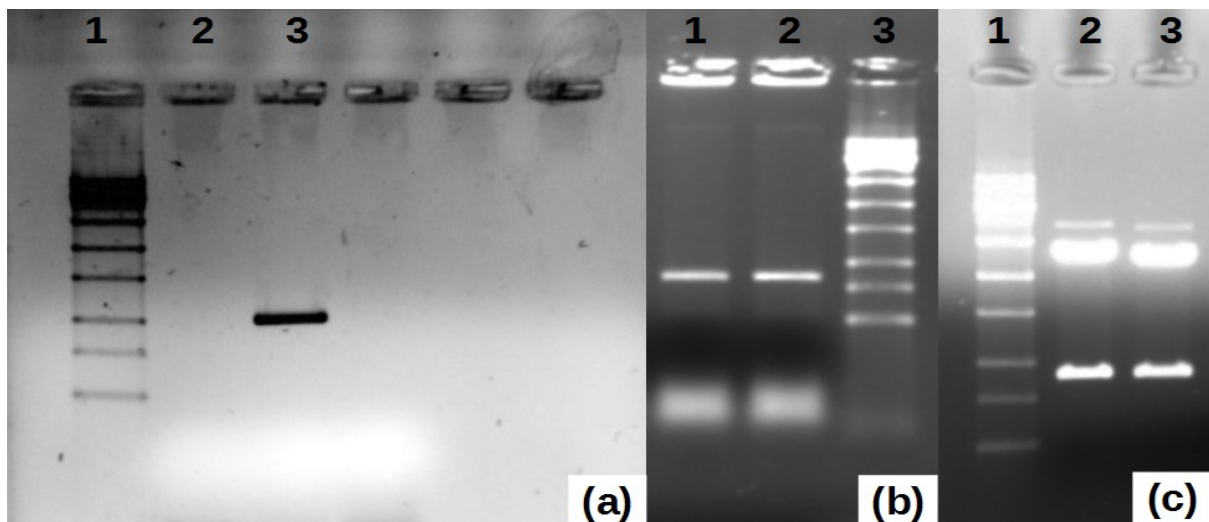


Figura 2. Amplificação da sequência codificadora do gene *AtAPX-R* e triagem dos clones de pENTR™/D-TOPO® - *AtAPX-R*. (a) A sequência codificadora de *AtAPX-R* foi amplificada a partir do cDNA total de *Arabidopsis thaliana* e visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Linha 1: Marcador de Peso Molecular de 1 kb (Ludwig®); Linha 2: Controle negativo da reação de PCR; Linha 3: amostra do produto de PCR (990 pares de base). (b) PCR de colônias de *Escherichia coli* TOP10 transformadas com o plasmídeo pENTR™/D-TOPO® - *AtAPX-R*. Linhas 1 e 2: colônias testadas e positivas; Linha 3: Marcador de Peso Molecular de 1 kb (Ludwig®). (c) Após micropreparação, o DNA plasmidial obtido das células recombinantes PCR-

positivas foi clivado com as enzimas de restrição *Apal* (*Promega*) e *Alw44I* (*Promega*), e o produto da clivagem foi resolvido em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Linha 1: Marcador de Peso Molecular de 1 kb (Ludwig®); Linhas 2 e 3: fragmentos de DNA plasmidial resultantes da clivagem (bandas esperadas: 2247 e 887 pares de base); a terceira banda (3134 pares de base) corresponde ao vetor não clivado.

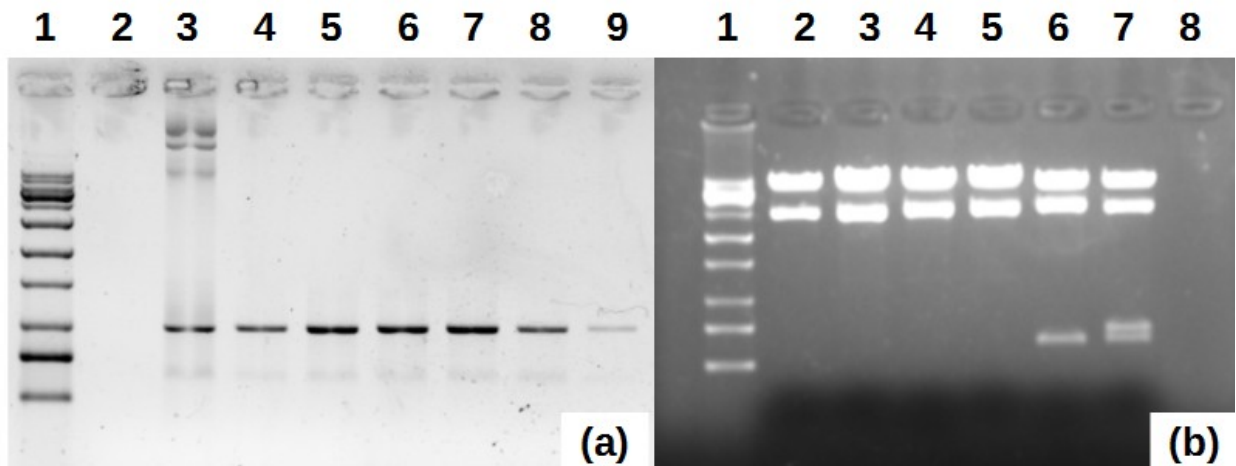


Figura 3. Triagem dos clones recombinantes do plasmídeo pEarleyGate101 – *AtAPX-R*. (a) Colônias de *Escherichia coli* TOP10 transformadas com o vetor recombinante pEarleyGate101 - *AtAPX-R* foram testadas através de PCR de colônia para a confirmação da presença do inserto *AtAPX-R* (990 pares de base). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Linha 1: Marcador de Peso Molecular de 1 kb (Ludwig®); Linha 2: Controle negativo da reação; Linha 3: Controle positivo da reação (pENTR™/D-TOPO®- *AtAPX-R*); Linhas 4 a 9: colônias recombinantes de *Escherichia coli* TOP10 testadas. (b) Após micropreparação, o DNA plasmidial obtido das células recombinantes PCR-positivas foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI* (*Promega*), e o produto da clivagem foi resolvido em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Linha 1: Marcador de Peso Molecular de 1 kb (Ludwig®); Linhas 2 a 7: fragmentos de DNA plasmidial resultantes da clivagem (bandas esperadas: 8653 e 3086 pares de base).

5.3. SELEÇÃO DAS SEMENTES TRANSFORMADAS

A seleção das sementes transgênicas foi realizada em meio seletivo contendo o herbicida glufosinato de amônio, cuja marca de resistência está presente no vetor pEarleyGate101. As sementes transformadas foram capazes de germinar, e as plântulas iniciaram seu desenvolvimento normalmente, expandindo cotilédones e emitindo o primeiro par de folhas verdadeiras, exibindo aparência saudável semelhante a de plantas selvagens se desenvolvendo em condições normais

favoráveis. Já as plantas não transformadas apresentaram desenvolvimento limitado à expansão dos cotilédones, exibindo coloração pálida em comparação às plântulas transgênicas, devido à presença do herbicida glufosinato de amônio (Figura 4).

Em adição à triagem baseada no fenótipo de resistência ou susceptibilidade ao herbicida, as placas de seleção contendo plântulas da geração T1 com 5 dias de idade foram analisadas em microscópio de fluorescência sob o filtro FITC (excitação 470 nm e emissão 520 nm) para visualização da fluorescência emitida por EYFP, visando a identificação das plântulas resistentes expressando o cassete transgênico inserido em seu genoma. Na Figura 5, é possível ver um comparativo entre plântulas não resistentes (5a e 5b) e plântulas transgênicas (5c e 5d). Quando expostas ao comprimento de onda capaz de excitar a proteína EYFP, as plântulas transformadas emitem a fluorescência amarelo-esverdeada característica desta proteína fluorescente, enquanto que as plântulas não transformadas exibem a coloração vermelha típica da autofluorescência da clorofila. Nas plântulas transgênicas, a autofluorescência da clorofila não é visualizada devido aos altos níveis de expressão do transgene, fazendo com a fluorescência da EYFP se sobressaia.

Uma vez identificadas, as plantas transgênicas foram transferidas para potes de vidro contendo meio MS não-seletivo, onde permaneceram por alguns dias. Por fim, as plantas foram passadas para potes com terra, onde completaram seu ciclo de vida.

5.4. ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS EM MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA

Após identificadas, as plantas transgênicas foram cultivadas sob condições normais em sala de cultivo (22 °C e 16/8 horas claro/escuro), até completarem seu desenvolvimento normal. Amostras de tecido foliar de plantas transgênicas foram coletadas e analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando-se o filtro FITC (excitação 470 nm e emissão 520 nm). Como demonstrado na Figura 6, as plantas transgênicas emitiram a fluorescência amarelo-esverdeada proveniente da proteína EYFP, comprovando a expressão estável do produto de fusão *AtAPX-R-EYFP* no mesófilo foliar (6a e 6b) e tricomas (6c e 6d).

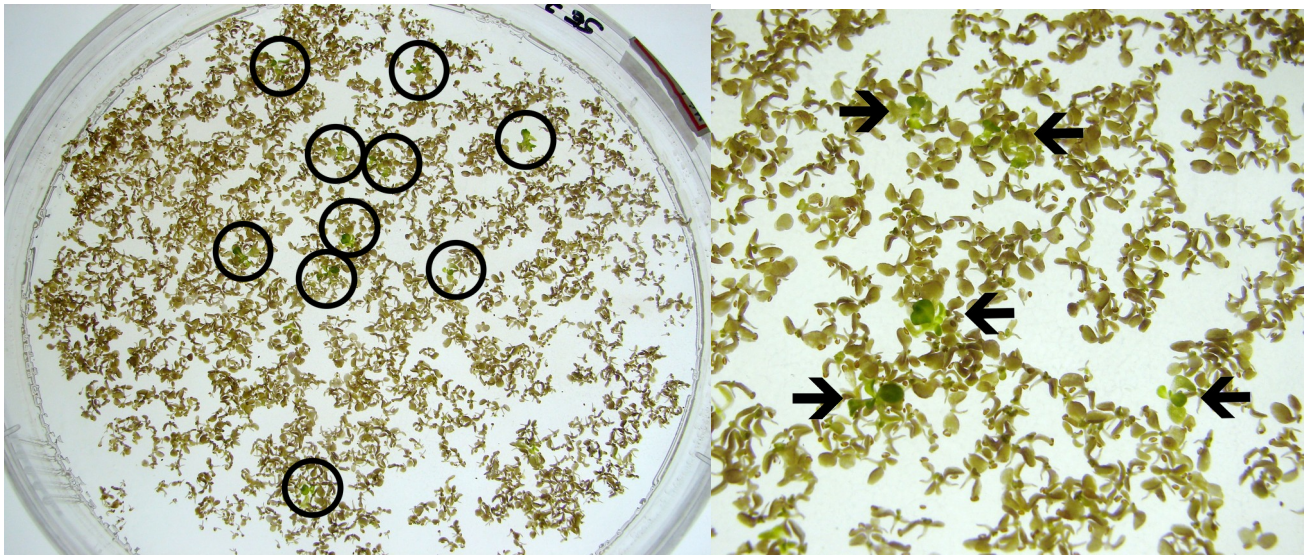


Figura 4. Triagem das sementes transgênicas em meio de seleção. Após coletadas, as sementes provenientes das plantas utilizadas no *floral dip* foram esterilizadas e plaqueadas em meio seletivo (MS suplementado com glufosinato de amônio, carbenicilina e nistatina) para seleção das sementes transformadas. As sementes transgênicas, resistentes ao herbicida presente no meio, foram capazes de germinar normalmente e sobreviver à seleção. Os círculos e setas pretos indicam as plântulas resistentes ao agente seletivo.

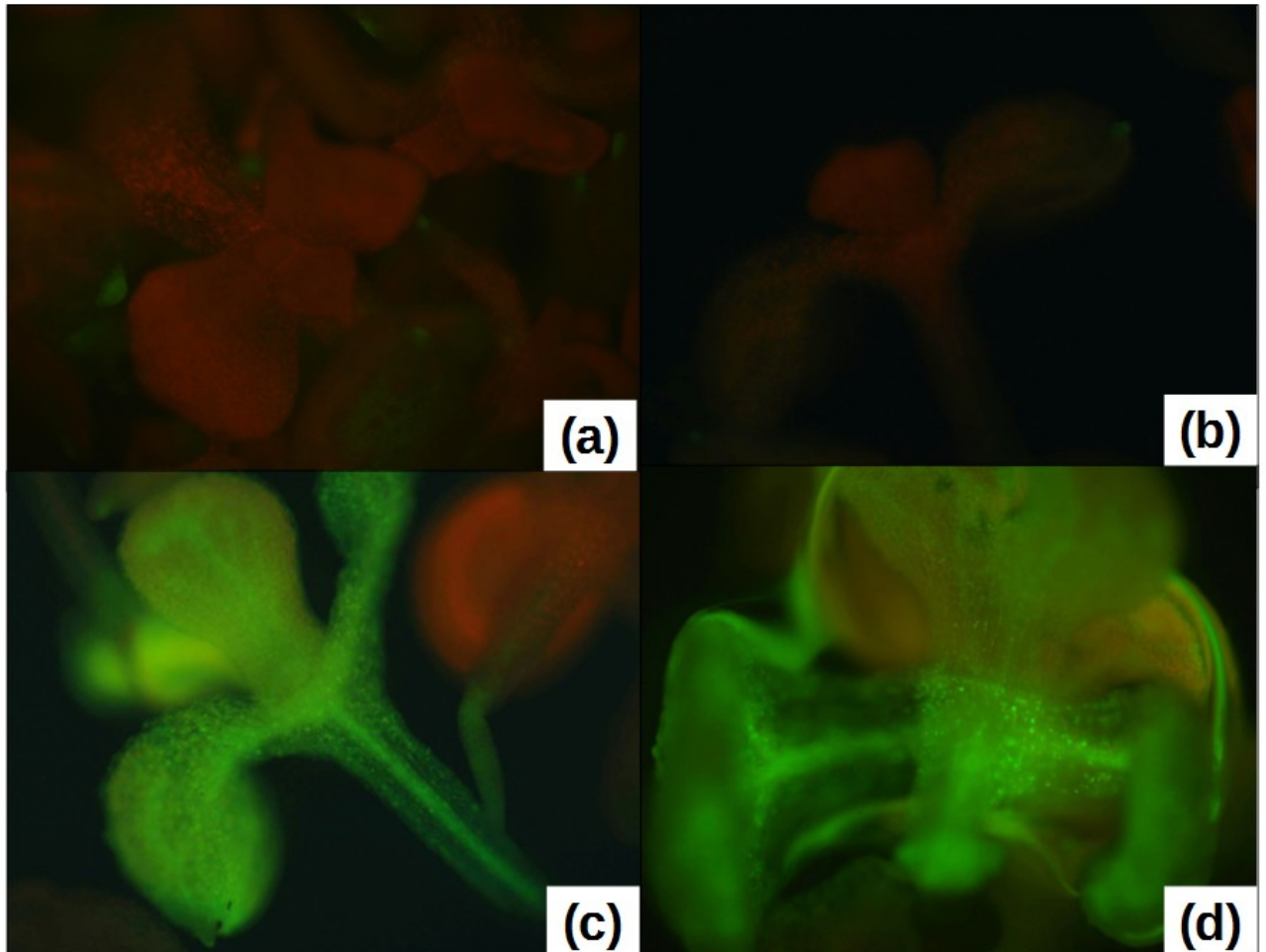


Figura 5. Análise preliminar das plântulas transgênicas em microscópio de fluorescência. As plântulas resistentes ao agente de seleção foram analisadas em microscópio de fluorescência (filtro FITC; excitação 470 nm e emissão 520 nm) antes de serem transferidas para meio não-seletivo. Em comparação à coloração avermelhada da autofluorescência da clorofila exibida pelas plantas não transformadas (a-b), as plantas transgênicas exibiram fluorescência amarelo-esverdeada característica da proteína fluorescente EYFP (c-d), confirmando o sucesso da transformação e a expressão constitutiva da proteína de fusão *AtAPX-R-EYFP*.

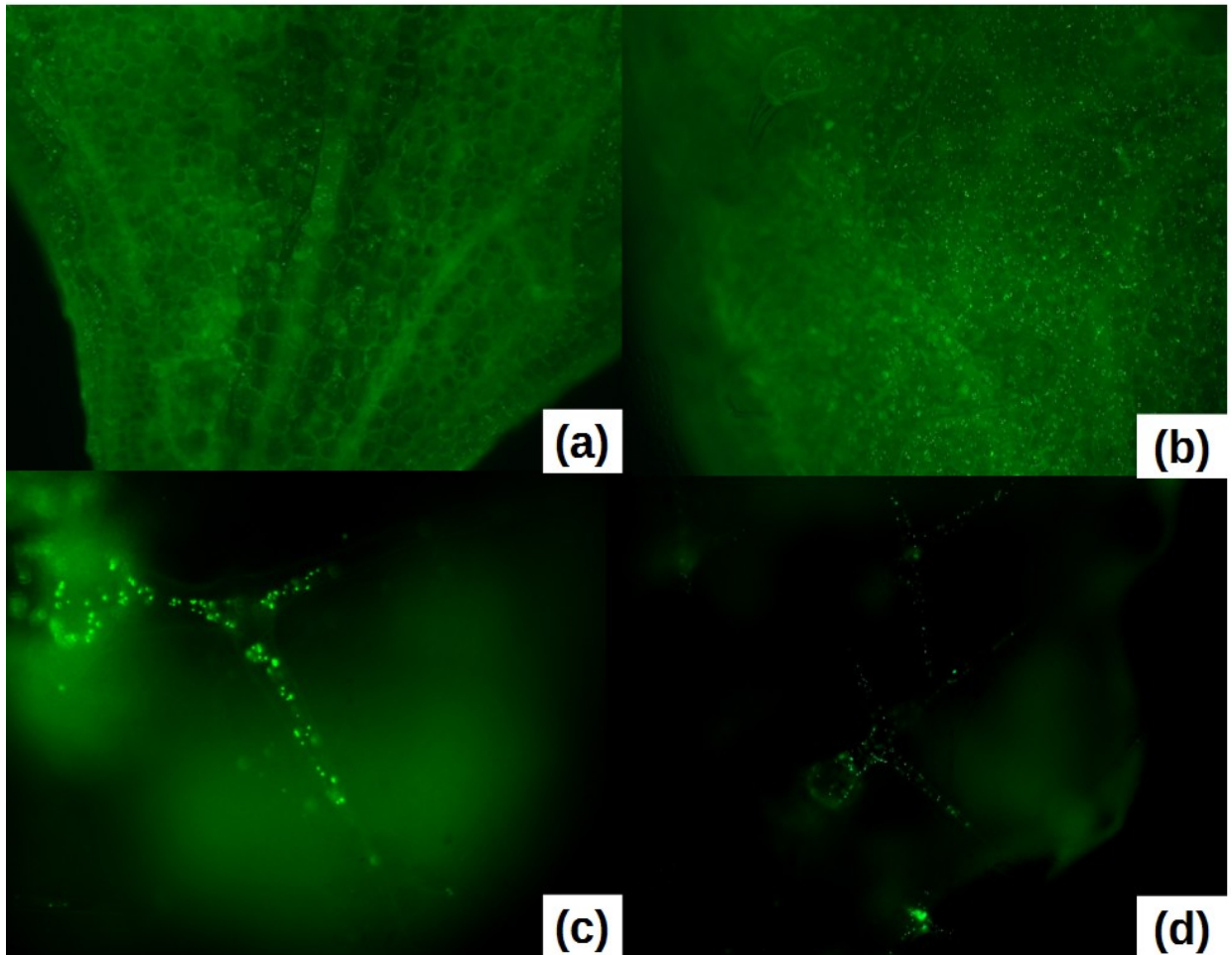


Figura 6. Amostras de tecido foliar das plantas transgênicas expressando a proteína recombinante *AtAPX-R-EYFP* analisadas em microscópio de fluorescência. As plantas transgênicas obtidas foram analisados em microscópio de fluorescência (filtro FITC; excitação 470 nm e emissão 520 nm), demonstrando a expressão constitutiva estável da fusão *AtAPX-R-EYFP* no mesófilo foliar (a-b) e tricomas (c-d).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A clonagem e a construção da fusão traducional entre *AtAPX-R* e EYFP foi obtida no vetor binário pEarleyGate101, eficientemente introduzido na linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, utilizada para a transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana* pelo método *floral dip*. Eventos de transformação superexpressando o produto de fusão *AtAPX-R-EYFP* foram obtidos com sucesso. As linhagens transgênicas apresentaram expressão estável do produto de fusão, confirmada através de análises em microscópio de fluorescência.

Assim, tendo obtido as plantas transgênicas expressando estavelmente a construção gênica de interesse, resta analisá-las a nível subcelular em microscópio confocal para, por fim, esclarecer a questão fundamental que baseia este trabalho: a localização subcelular de *AtAPX-R*. Através da utilização de diferentes filtros de fluorescência no microscópio confocal, será possível identificar estruturas subcelulares e, então, localizar o sinal de fluorescência amarelo-esverdeado proveniente de EYFP. Devido à presença de clorofila, que possui autofluorescência vermelha, os cloroplastos são facilmente visualizados, e a sobreposição das imagens obtidas com os diferentes filtros permitirá verificar se ambos os sinais estão co-localizados na célula.

Para permitir a visualização de mitocôndrias, organelas de tamanho muito reduzido em relação aos cloroplastos, pretende-se realizar a transformação transiente de protoplastos isolados das plantas transgênicas *AtAPX-R-EYFP* com o plasmídeo pBIN20 (Nelson et al., 2007) (Figura S3), vetor este que permite a expressão da proteína fluorescente *enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP) fusionada a um peptídeo-sinal de direcionamento para a mitocôndria (29 primeiros aminoácidos da região amino-terminal da citocromo c oxidase IV de *Saccharomyces cerevisiae*). Desta forma, também será possível avaliar a presença de *AtAPX-R* neste outro compartimento subcelular.

Para além do propósito da determinação de localização subcelular, as plantas transgênicas obtidas neste projeto também poderão ser utilizadas para a realização de ensaios de imunoprecipitação, utilizando-se anticorpos anti-EYFP. A obtenção da proteína recombinante purificada possibilitará a realização de ensaios de atividade enzimática, os quais serão importantes para o esclarecimento da provável função enzimática de *AtAPX-R*, seus substratos e características catalíticas.

8. FIGURAS SUPLEMENTARES

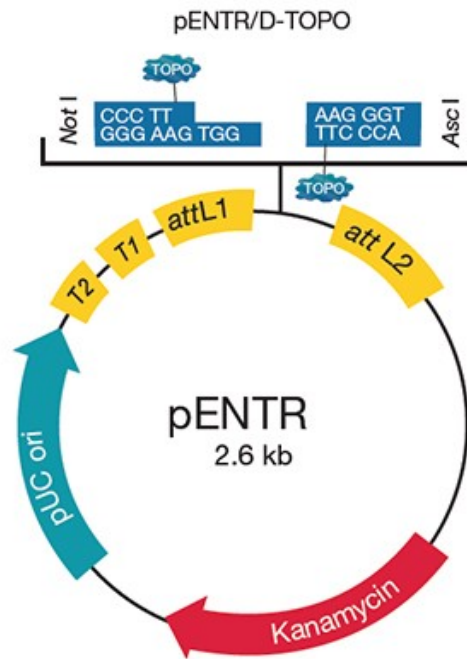


Figura S1. Mapa do vetor de entrada pENTR™/D-TOPO® (<http://www.thermofisher.com>). Kanamycin: gene de resistência à canamicina; attL1 e attL2: sequências de recombinação homóloga que pareiam com os sítios attR2 e attR2 no vetor de destino; TOPO: enzima Topoisomerase I.

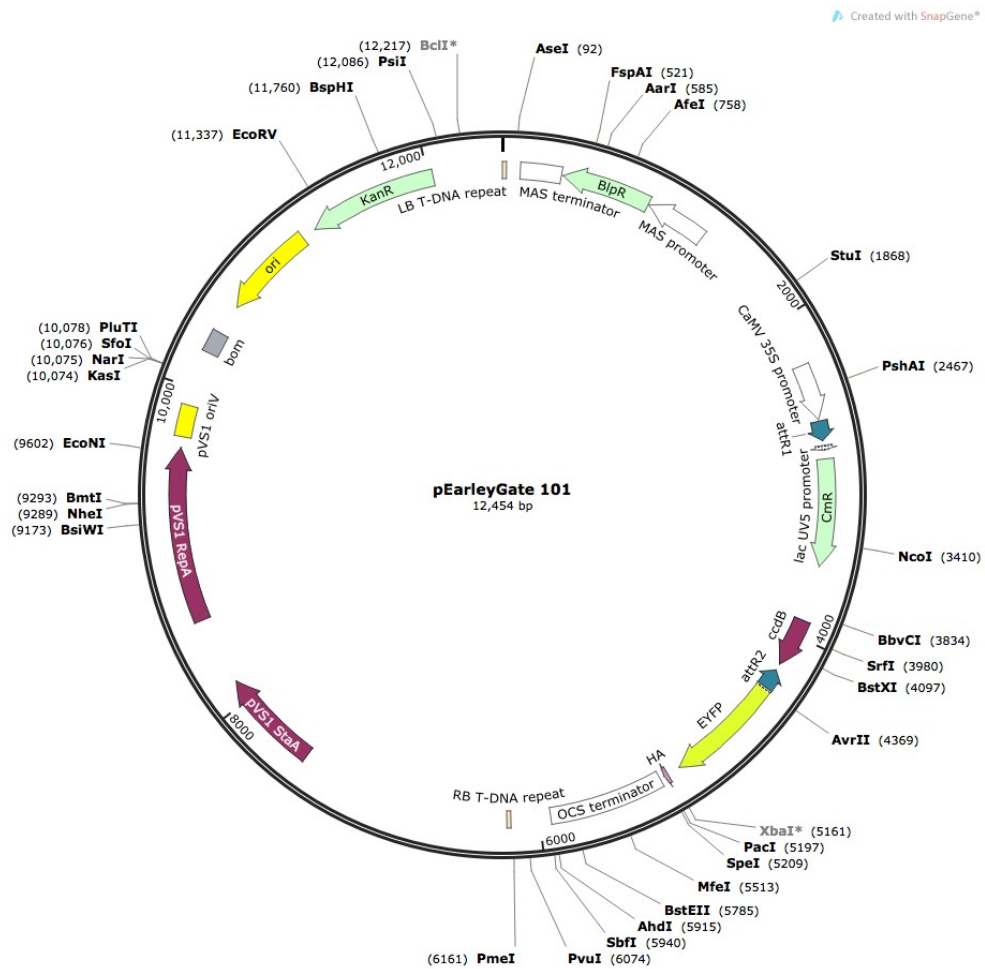


Figura S2. Mapa do vetor binário pEarleyGate101 (<http://www.snapgene.com>). BIpR: gene *bar* de resistência ao glufosinato de amônio; EYFP: *enhanced yellow fluorescent protein*; attR1 e attR2: sequências de recombinação homóloga que pareiam com os sítios attL2 e attL2 no vetor de entrada; RB e LB T-DNA *repeat*: bordas direita e esquerda, respectivamente, do T-DNA.

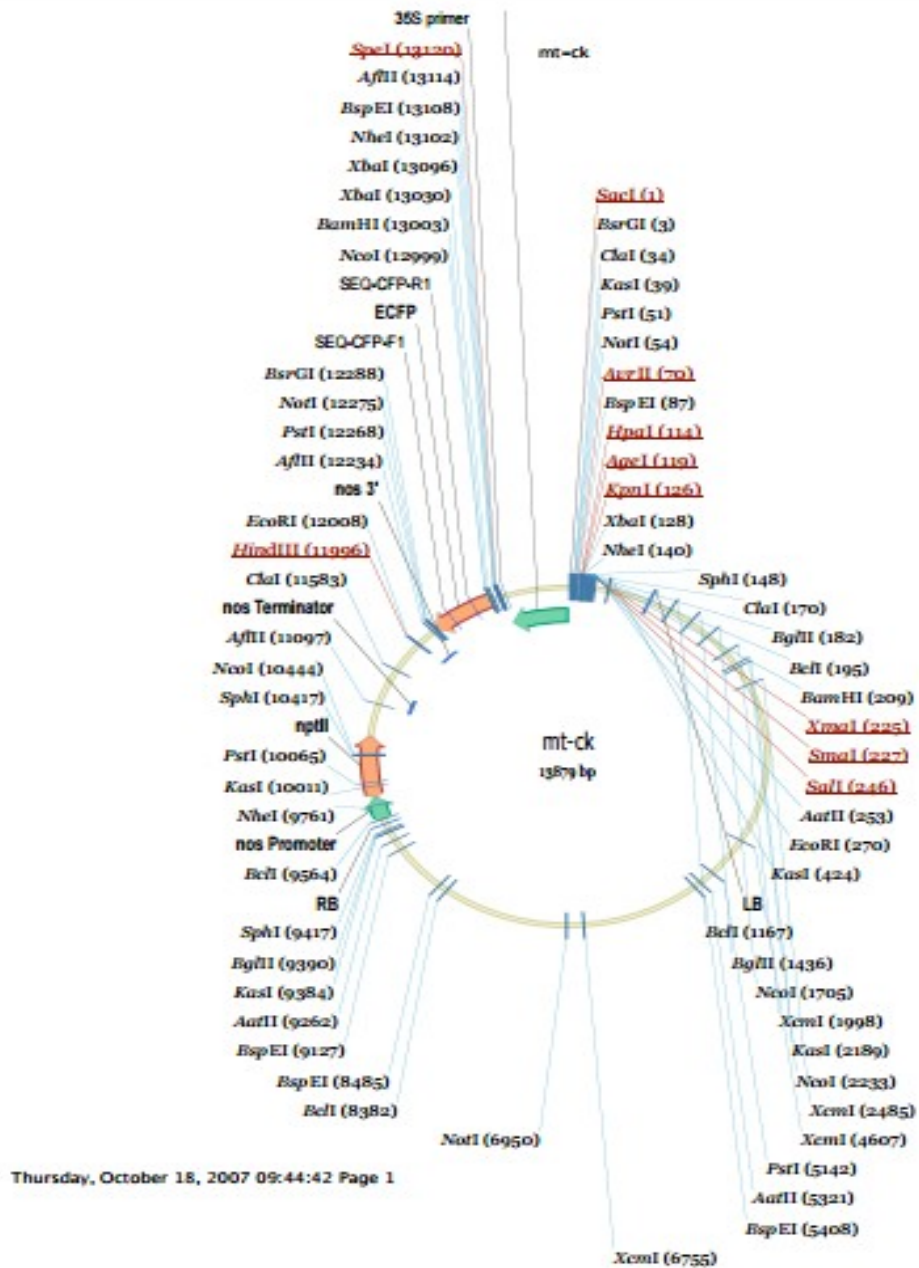


Figura S3. Mapa do vetor binário pBIN20 (Nelson et al., 2007). RB e LB: bordas direita e esquerda, respectivamente, do T-DNA; ECFP: enhanced cyan fluorescent protein; nptII: gene *neomycin phosphotransferase II* de resistência à canamicina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bailly et al. (2008) From intracellular signaling network to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biologies* 331, 806.

Barbosa et al. (2014) Geração e Desintoxicação de espécies reativas de oxigênio. *Ciência Rural* 44(3), 453.

Chen et al. (2014) Ascorbate peroxidase6 protects *Arabidopsis* desiccating and germinating seeds from stress and mediates cross talk between reactive oxygen species, abscisic acid, and auxin. *Plant Physiology* 166, 370.

Clough & Bent (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16(6), 735.

Collins (2001) Carotenoids and genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 1.

De Gara et al. (2010) Redox homeostasis in plants: the challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 173, S13.

De la Riva et al. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Elec. Journal of Biotechnology* 1(3), 118.

Dunand et al. (2011) Ascorbate peroxidase-related (APX-R) is not a duplicable gene. *Plant Signal Behav.* 6(12), 1908.

Earley et al. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal* 45, 616.

Foyer & Noctor (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 11(4), 861.

Foyer & Noctor (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155(1), 2.

Gadjev et al. (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* 141(2), 436.

Gelvin (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. *Microb. And Molec. Biology Reviews* 67(1), 16.

Gill & Tujeta (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12), 909.

Halliwell (1999) Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr. Rev.* 57, 104.

Holtorf et al. (2002) Plant functional genomics. *Naturwiss.* 89(6), 235.

Jaspers & Kangasjärvi (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiology Plantarum* 138(4), 405.

Kangasjärvi et al. (2008) Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochem. Journal* 412(2), 275.

Krieger-Liszkay (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Exp. Botany* 56(411), 337.

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

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

Lazzarotto et al. (2015) Revisiting the non-animal peroxidase superfamily. *Trends Plant Sci.* 20(12), 807.

Meinke et al. (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. Science Mag 282, 662.

Meister (1994) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. Journal Biol. Chem. 269, 9397.

Meurs et al. (1991) Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 98, 1484.

Meyerowitz (1987) *Arabidopsis thaliana*. Ann. Rev. Genet. 21, 93.

Miller et al. (2010) Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 15681.

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

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

Nelson et al. (2007) A multi-color set of *in vivo* organelle markers for colocalization studies in *Arabidopsis* and other plants. Plant Journal 51, 1126.

Noctor & Foyer (1998) A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C₃ photosynthesis. Journal of Exp. Botany 49, 1895.

Shaner et al. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. Nature Methods 2(12), 905.

Sharma et al. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany 2012, 1.

Smirnoff et al. (2004) Ascorbate biosynthesis: a diversity of pathways, in: Asard & Smirnoff (Eds.), *Vitamin C: its functions and biochemistry in animals and plants*, BIOS Scientific, New York, USA, pp. 7-29.

Tanaka et al. (1994) Tolerance to herbicides and air pollutants, in: Foyer and Mullineaux, (Eds.), *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 365-378.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796.

Wrzaczek et al. (2011) *Reactive oxygen in abiotic stress perception – from genes to proteins*. Rijeka, InTech, 2011.

Yadav et al. (2014) *Oxidative stress and antioxidant defense system in plants*. *Biotechnology Vol 2: Plant Biotechnology*, 261.

Zhang et al. (2006) *Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method*. *Nature Protocols* 1(2), 641.