

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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA HEME
PEROXIDASE EXCLUSIVA DE PLANTAS**

Autora: Fernanda Lazzarotto

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Dra. Márcia Maria Pinheiro Margis

Co-orientador: Dr. Felipe dos Santos Maraschin

Porto Alegre, julho de 2011

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Esta dissertação de mestrado foi plenamente realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Núcleo de Genômica Funcional de Plantas do Laboratório de Genética Vegetal, localizado no Instituto de Biociências desta Universidade. Os recursos foram obtidos através do ICGEB e do CNPq.

AGRADECIMENTOS

A execução desta dissertação de mestrado só foi possível graças à participação de algumas pessoas na minha vida durante este período. A estas pessoas, o meu sincero agradecimento, pois sei que nada somos sozinhos. Um grande muito obrigado:

à banca, por aceitar avaliar esta dissertação;

à minha orientadora, Dr. Márcia Margis, pela confiança depositada no meu trabalho, pela imensa disponibilidade, e, principalmente, pela grande amizade e ótima convivência;

à Sílvia Barcellos Rosa, pelo papel fundamental que teve no início da minha carreira científica e deste trabalho, a qual esteve sempre disposta a ensinar, com muito carinho e paciência;

aos meus colegas de laboratório, pela imensa amizade de cada um, os quais já não são mais colegas, são amigos;

a todos os meus amigos conquistados na graduação, provavelmente as pessoas mais fantásticas que já conheci;

às minhas amigas queridas, conquistadas durante o colégio e durante a graduação, pelos inesquecíveis momentos vividos juntos;

ao Felipe Maraschin, pelo enorme carinho e pela imensa boa-vontade em ajudar e ensinar, sempre, em qualquer situação;

aos meus pais, pelo amor imensurável e incondicional.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS _____	5
RESUMO _____	7
ABSTRACT _____	9
<i>Capítulo I</i> _____	10
1. Espécies reativas de oxigênio _____	11
2. Sistema antioxidante das plantas _____	15
2.1.1. Antioxidantes não enzimáticos _____	15
2.1.1.1. Ácido ascórbico _____	15
2.1.1.2. Glutathiona _____	16
2.1.1.3. Tocoferóis _____	17
2.1.1.4. Flavonóides _____	17
2.1.2. Antioxidantes enzimáticos _____	18
2.1.2.1. Superóxido dismutase _____	19
2.1.2.2. Catalase _____	20
2.1.2.3. Ascorbato peroxidase _____	21
2.1.2.4. <i>Ascorbate peroxidase-related (APx-R)</i> _____	22
3. O modelo vegetal _____	25
<i>Capítulo II</i> _____	27
<i>Capítulo III</i> _____	29
<i>Capítulo IV</i> _____	54
<i>Capítulo IV</i> _____	65
<i>Bibliografia</i> _____	76

LISTA DE ABREVIATURAS

- OH**: radical hidroxila
- ¹O₂**: oxigênio singlete
- APx**: ascorbato peroxidase
- APx-R**: *ascorbate peroxidase-related*
- AsA**: ascorbato
- BiFC**: *bimolecular fluorescence complementation* (complementação bimolecular da fluorescência)
- CAM**: *crassulacean acid metabolism*
- Cat**: catalase
- DHA**: dehidroascorbato
- DHAR**: dehidroascorbato redutase
- DNA**: ácido desoxirribonucleico
- ERO**: espécie reativa de oxigênio
- GPx**: glutaciona peroxidase
- GR**: glutaciona redutase
- GSH**: glutaciona reduzida
- GSSH**: glutaciona oxidada
- H₂O₂**: peróxido de hidrogênio
- MDA**: monodehidroascorbato
- MDAR**: MDA redutase
- NAD**: nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADP**: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NADPH**: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
- O₂⁻**: íon superóxido
- O₂**: oxigênio molecular
- PrxR**: peroxirredoxina
- RNA**: ácido ribonucleico
- RNAi**: RNA de interferência;
- ROS**: *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)
- SoD**: superóxido dismutase

TBARS: *thiobarbituric acid reactive substances* (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

Trx: tiorredoxina

YFP: *yellow fluorescent protein* (proteína fluorescente amarela)

RESUMO

Peroxidases são enzimas amplamente distribuídas nos organismos, sendo de fundamental importância para o seu desenvolvimento. Atuam reduzindo o peróxido de hidrogênio à água, minimizando, assim, o dano celular em condições de estresse e modulando as respostas celulares que utilizam o peróxido de hidrogênio como molécula sinalizadora. Através de análises em bancos de depósito de genomas, uma provável nova heme-peroxidase (*ascorbate peroxidase-related* ou APx-R) foi identificada. APx-R é uma proteína exclusiva de plantas e está presente desde organismos basais, como algas, até angiospermas. Diferentemente de outras peroxidases, geralmente codificadas por pequenas famílias gênicas originadas a partir de eventos de duplicação, APx-R se apresenta como um gene cópia-única em todos os genomas de plantas já sequenciados e disponibilizados. Apesar de haver grande similaridade de estrutura proteica entre APx e APx-R, APx-R possui um grande número de substituições conservadas em domínios críticos, sugerindo que esta proteína provavelmente se originou de algum membro da família das ascorbato peroxidases, mas acumulou mutações suficientes de forma que não pode mais ser considerado um membro desta família. Para verificar a localização subcelular de APx-R, protoplastos de arroz foram transfectados com uma construção de fusão traducional APx-R::YFP, sob o controle do promotor 35S. A visualização da fluorescência foi feita através de microscopia confocal e revelou que APx-R é uma proteína de dupla-localização, a qual pode localizar-se tanto nas mitocôndrias quanto nos cloroplastos. Análises de *BiFC* mostraram que APx-R pode interagir com as APx presentes nos mesmos compartimentos subcelulares, indicando que estas proteínas podem estar atuando de forma sinérgica no metabolismo de detoxificação do peróxido de hidrogênio. Para caracterizar APx-R funcionalmente, mutantes de arroz superexpressando RNA de interferência objetivando silenciar o gene *OsAPx-R* foram obtidos através de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas RNAi-*OsAPx-R* apresentaram alterações no metabolismo do peróxido de hidrogênio quando comparadas às plantas não-transformadas, mostrando

diferenças nas atividades de SoD. Cat e APx, suportando a provável participação de APx-R na defesa contra o estresse. Assim, estes resultados mostraram que *OsAPx-R* codifica uma proteína funcional, a qual está relacionada com o sistema antioxidante e é requerida na resposta a estresses, provavelmente atuando na proteção dos cloroplastos e mitocôndrias, ambas organelas com intensa formação de espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Peroxidases are widely distributed in all organisms, being of fundamental importance for their development. These enzymes act reducing hydrogen peroxide into water, minimizing cellular damage in stressful conditions and modulating cell responses through hydrogen peroxide signaling. From analysis in public genomic databases, a putative new heme-peroxidase (ascorbate peroxidase-related or APx-R) was identified. APx-R is exclusive of plants and present from basal to vascular organisms. Unlike other peroxidases, usually encoded by large genic families originated from duplication events, *APx-R* is present as a single-copy gene in all available plant genomes. Despite the high structure similarity between APx and APx-R proteins, APx-R presents a great number of conserved substitutions in critical domains, suggesting that this protein probably emerged from the family of ascorbate peroxidases, but accumulated enough mutations so it cannot be grouped in this family anymore. To access subcellular localization, rice protoplasts were transfected with a translational fusion of yellow fluorescent protein (YFP) to APx-R protein under the control of the 35S promoter. Fluorescence visualization was performed by confocal microscopy and revealed that APx-R is a dual-target protein targeted to chloroplasts and mitochondrias. BiFc analysis showed that APx-R can interact with APx proteins which are present in the same subcellular compartments, indicating that these proteins may be acting synergistically in hydrogen peroxide scavenging metabolism. To further characterize APx-R in antioxidant metabolism, rice mutants expressing interference RNA for APx-R gene were obtained through *Agrobacterium tumefaciens* transformation. RNAi-silenced plants presented a disturbed hydrogen peroxide metabolism in comparison to non-transformed plants, with differences in SoD, Cat and APx activity, supporting the participation of APx-R in stress defense. Altogether, these results showed that *OsAPx-R* encodes a functional protein, which is related to the antioxidant system and required in stress response, probably acting in chloroplast and mitochondria protection, both organelles with intense reactive oxygen species formation.

Capítulo I

- Introdução –

1. Espécies reativas de oxigênio

Os organismos fotossintetizantes, capazes de utilizar luz para produzir energia química, possibilitaram o surgimento de organismos aeróbios através da disponibilização de moléculas de oxigênio molecular (O_2) geradas na fotossíntese. As células aeróbias obtiveram vantagem adaptativa em relação às anaeróbias em razão da sua capacidade de utilizar o oxigênio para oxidar compostos orgânicos, podendo, dessa forma, obter a energia química necessária para os processos celulares de maneira muito mais eficiente. Assim, durante os processos de fotossíntese e respiração, ampliaram-se os eventos de oxidação e redução de moléculas e o fluxo de elétrons no interior das células o que levou à geração de subprodutos decorrentes da redução parcial do oxigênio molecular, chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esta redução parcial ocorre porque a conversão de meia molécula de O_2 a duas moléculas de água (H_2O) requer a transferência de quatro elétrons, entretanto, o oxigênio molecular tem preferência por vias univalentes de redução, o que leva à produção de moléculas parcialmente reduzidas (Scandalios, 2002). A excitação de um elétron do O_2 para um orbital de maior energia resulta na formação de uma ERO denominada oxigênio singleto (1O_2). A transferência de um, dois ou três elétrons para uma molécula de O_2 leva à formação de outras três EROs: radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila ($\cdot OH$), respectivamente (Scandalios, 2002). Espécies reativas de oxigênio também são produzidas durante a fotorrespiração, nos peroxissomos, pela ação da enzima glicolato oxidase, bem como em outros compartimentos subcelulares pela ação de enzimas como NADPH oxidases, amino oxidases e peroxidases ligadas às membranas (Ron Mittler, 2002). Assim, a produção de EROs é inevitável, mesmo em condições ótimas de crescimento, ficando em torno de $240 \mu M s^{-1}$ de superóxido e de uma concentração de $0,5 \mu M$ de peróxido de hidrogênio nos cloroplastos. Entretanto, a produção destas moléculas é aumentada quando o organismo é exposto a adversidades bióticas ou abióticas, de forma que os níveis intracelulares de superóxido e peróxido de hidrogênio podem chegar a $720 \mu M s^{-1}$ e $15 \mu M$, respectivamente (Polle 2001; Mittler 2002). O aumento da concentração

de EROs na célula deve ser atenuado, uma vez que a exposição dos componentes celulares a níveis exacerbados destas moléculas pode levar a um quadro de estresse oxidativo, caracterizado pela peroxidação dos lipídios celulares, oxidação proteica, inibição enzimática e ao dano ao DNA e RNA, além da indução de vias de morte celular programada (Ron Mittler, 2002).

A peroxidação lipídica é um processo extremamente danoso para um organismo. Os efeitos diretos deste processo englobam a diminuição da fluidez e da seletividade das membranas celulares, o aumento do intercâmbio de fosfolipídios entre as duas metades da bicamada e o dano a proteínas ancoradas às membranas, inativando receptores, enzimas e canais iônicos (S. S. Gill & Tuteja, 2010). A oxidação proteica é, por definição, uma modificação covalente em uma proteína causada por EROs ou por subprodutos do estresse oxidativo, sendo que a maior parte deste tipo de modificação é irreversível, induzindo a degradação da proteína modificada pela ação de proteases presentes na célula. A oxidação proteica é comumente utilizada como marcador de estresse oxidativo (I. M. Møller, Jensen, & Hansson, 2007). As espécies reativas de oxigênio também danificam o DNA, e, dentre as conhecidas, o radical hidroxila é considerada a molécula mais nociva. O oxigênio singleto ataca principalmente os nucleotídeos que contém a base nitrogenada guanina, enquanto o íon superóxido e o peróxido de hidrogênio não se mostram reativos nesta situação (Wiseman & Halliwell, 1996). No que se refere à modificação de carboidratos, a ERO mais prejudicial é, novamente, o radical hidroxila. Esta molécula reage com polissacarídeos da parede celular, danificando estas estruturas (Stephen C., 1998).

As alterações metabólicas geradas por situações de estresse biótico ou abiótico levam ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nas células. Este aumento, quando não devidamente contido pelo sistema antioxidante, além de promover o dano extensivo das estruturas celulares, desencadeia uma via de resposta ao estímulo, que visa a atenuação do estresse. Esta via tem início com a percepção do estímulo, geralmente mediada pela membrana plasmática (G.-tao Huang et al., 2011). Em seguida, a célula produz mensageiros secundários, tais como espécies reativas de oxigênio ou inositol

fosfatos, os quais alteram as concentrações intracelulares de cálcio. Em resposta a esta alteração, proteínas intracelulares mudam de conformação, o que altera a afinidade de interação destas proteínas com seus parceiros e leva à ativação de cascatas de fosforilação que tem como alvo a indução de genes estresse-responsivos ou de fatores de transcrição que regulam estes genes (G.-tao Huang et al., 2011) (Figura 1).

Apesar de tóxicas quando em altas concentrações, as espécies reativas de oxigênio atuam como moléculas sinalizadoras durante o desenvolvimento da planta, além de sinalizar para as vias responsivas a estresse. O oxigênio singlete e o radical hidroxila são moléculas muito reativas para levar sinais a longas distâncias (I. M. Møller & Sweetlove, 2010) e o íon superóxido, além de ser uma molécula negativamente carregada, e, portanto, com menor mobilidade no ambiente celular, é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio na célula, o que torna esta última espécie reativa como a mais provável para atuar como mensageiro. Além de possuir maior estabilidade química, o peróxido de hidrogênio transita livremente pela célula em razão da sua carga neutra, atravessando as membranas lipídicas através das aquaporinas (Bienert et al., 2007). Em procariotos, já foi demonstrado que o peróxido de hidrogênio é capaz de regular a expressão gênica através da oxidação de fatores de transcrição afetando, portanto, a afinidade destas moléculas ao DNA (Imlay 2008; J.-W. Lee & Helmann 2006; P. E. Lee et al. 2009). Em plantas, o peróxido de hidrogênio é necessário para a biossíntese de componentes da parede celular, bem como para a modificação destes componentes durante o desenvolvimento da planta (Barceló et al., 2004). A extensão celular promovida durante o crescimento das plantas é um processo mediado pelo hormônio vegetal auxina, o qual promove a produção de EROs no apoplasto, gerando pontos de fissão na parede celular (I. M. Møller et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio também regulam processos fisiológicos como alongação das folhas, embriogênese, regulação da abertura dos estômatos, gravitropismo do ápice da raiz e crescimento radicular (Grunberg & Taleisnik 2002; Schopfer et al. 2002; Joo et al. 2001; Foreman et al. 2003; Pasternak et al. 2005), entretanto, as vias utilizadas nestes processos não estão bem estabelecidas. Assim, pode-se verificar que apesar do controle dos níveis

intracelulares de espécies reativas de oxigênio ser necessário para a manutenção da vida do organismo, a produção destas moléculas não pode ser evitada, uma vez que estas estão implicadas em vias de sinalização que regulam direta ou indiretamente o desenvolvimento dos organismos em geral.

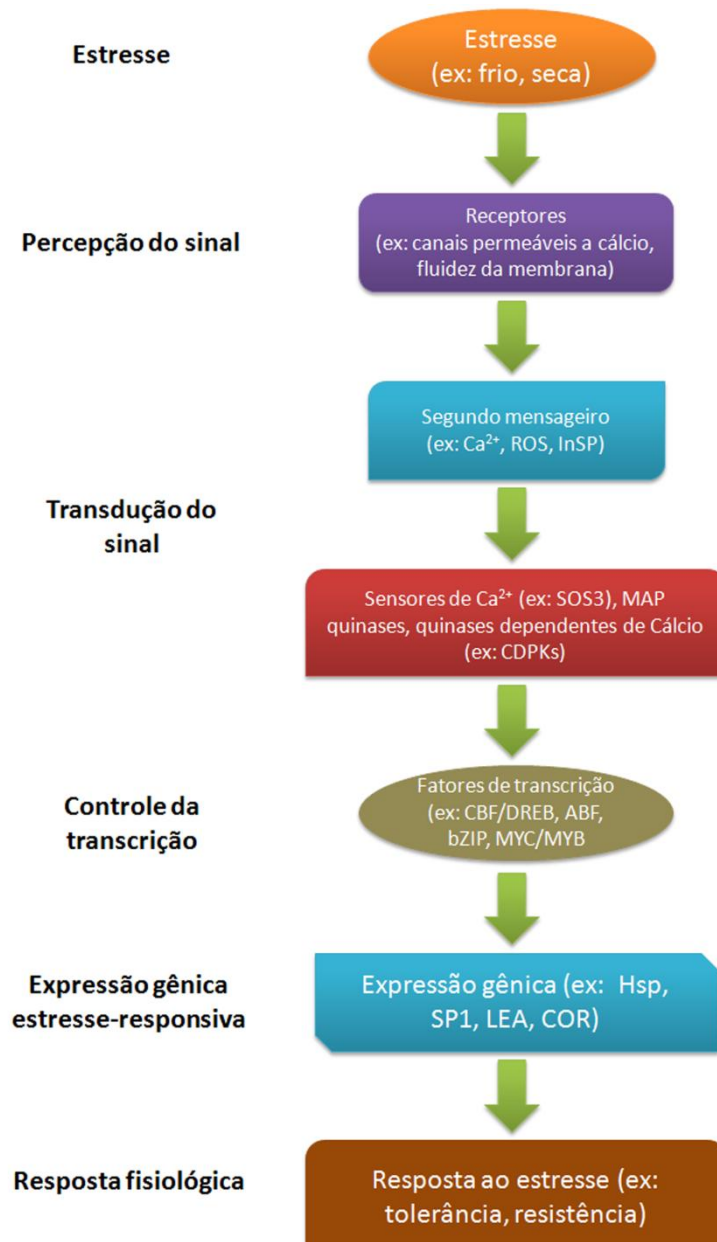


Figura 1. Via genérica de resposta de uma planta a um estresse. O sinal externo é percebido por receptores da membrana celular, dando origem a uma cascata de eventos de sinalização, resultando em uma resposta fisiológica que visa a tolerância ao estresse, direta ou indiretamente (modificado de Huang et al., 2011).

Para evitar a superprodução de EROs no interior das células, as plantas contam com mecanismos que visam diminuir a produção destas moléculas em situações de estresse (Ron Mittler, 2002). Os mecanismos utilizados podem ser via adaptações anatômicas, como através do encurvamento foliar ou do desenvolvimento de uma epiderme refratária; via adaptações fisiológicas, através do metabolismo CAM (*Crassulacean acid metabolism*); ou via adaptações moleculares, através do rearranjo do aparato fotossintético de acordo com a intensidade luminosa, por exemplo (Mittler, 2002; M. P. Johnson et al., 2011). Além destes mecanismos, enzimas chamadas oxidases alternativas podem sequestrar elétrons da cadeia fotossintética para utilizá-los na redução do oxigênio molecular intracelular, diminuindo, assim, o fluxo de elétrons e a concentração de oxigênio molecular, ambos levando à diminuição da produção de EROs (Ron Mittler, 2002).

Além dos mecanismos que visam diminuir a produção de EROs na célula vegetal, estas também contam com um complexo sistema antioxidante, composto por componentes não-enzimáticos e enzimáticos, que buscam limitar os níveis intracelulares destas moléculas. Todos estes mecanismos atuam de forma sinérgica na tentativa de amenizar o dano oxidativo às estruturas celulares.

2. Sistema antioxidante das plantas

2.1.1. Antioxidantes não enzimáticos

2.1.1.1. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico (ascorbato) é o antioxidante hidrossolúvel mais abundante nas células vegetais, e, apesar de presente em todos os tecidos, apresenta-se em maior concentração em folhas maduras, com altos teores de clorofila. Esta molécula atua como um tampão, reagindo preferencialmente com

as EROs em detrimento dos outros componentes celulares. Após ser oxidado, o ascorbato é revertido à sua forma reduzida por ação enzimática. Em condições ótimas de desenvolvimento, esta molécula se encontra disponível na sua forma reduzida, sendo que o ascorbato oxidado apresenta curta meia-vida dentro da célula. O ascorbato é considerado a molécula celular com maior poder antioxidante, graças às suas propriedades químicas que permitem que esta molécula doe elétrons a um grande número de reações enzimáticas e não enzimáticas. Dentre suas funções, podemos citar a redução dos íons superóxido e dos radicais hidroxila produzidos na membrana plasmática e em outros compartimentos subcelulares, a regeneração do alfa-tocoferol, a atuação como cofator da enzima violaxantina de-epoxidase nos cloroplastos, atuando na dissipação do excesso de energia produzida durante a fotossíntese, a preservação da atividade de enzimas que possuem grupamentos contendo íons metálicos, entre outras funções (S. S. Gill & Tuteja, 2010).

2.1.1.2. Glutathione

Juntamente com ascorbato, a glutathione é considerada um dos metabólitos mais importantes na proteção contra o estresse oxidativo. Localizada em todos os tecidos vegetais e compartimentos subcelulares, esta molécula desempenha um papel fundamental em diversos processos fisiológicos, como regulação do transporte de sulfato, transdução de sinal, conjugação de metabólitos e expressão de genes responsivos ao estresse (Sevilla, 1998; Gill & Tuteja, 2010). Sabe-se também que a glutathione desempenha um importante papel em diversos eventos relacionados ao crescimento e desenvolvimento, incluindo diferenciação celular, senescência e morte celular, resistência a patógenos e regulação enzimática (Rausch & Wachter, 2005). O balanço entre glutathione reduzida e oxidada é um dos componentes centrais da manutenção do estado redox na célula, sendo que a manutenção da glutathione na sua forma reduzida é de extrema importância para a defesa da célula contra a injúria oxidativa. A glutathione é capaz de detoxificar oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila diretamente e ainda

outras EROs de forma indireta, uma vez que esta molécula é necessária para a recuperação do ascorbato do seu estado oxidado para o reduzido, através do ciclo do ascorbato-glutationa (S. S. Gill & Tuteja, 2010).

2.1.1.3. Tocoferóis

Tocoferóis são moléculas antioxidantes lipossolúveis, de forma que são extremamente importantes para a proteção das membranas em situações de estresse oxidativo, evitando a peroxidação lipídica (Hollanderczytko, 2005) destas estruturas. São produzidos apenas por organismos fotossintetizantes (Maeda & DellaPenna, 2007), sendo encontrados nas membranas dos cloroplastos (S. S. Gill & Tuteja, 2010) e principalmente em sementes, onde desempenham um papel fundamental durante a germinação (Maeda & DellaPenna, 2007). Assim como ascorbato e glutaciona, os genes da biossíntese dos tocoferóis são induzidos em diversas situações de estresse.

2.1.1.4. Flavonóides

Os flavonoides são mais comumente encontrados em folhas, órgãos florais e pólen (S. S. Gill & Tuteja, 2010). Estas moléculas geralmente acumulam-se nos vacúolos, mas também podem estar presentes em exsudatos na superfície das partes aéreas dos vegetais, onde exercem funções importantes em processos bastante diversos, como pigmentação das flores, frutos e sementes, defesa contra patógenos, fertilidade e sinalização da interação planta-patógeno (S. S. Gill & Tuteja, 2010). Além disso, os flavonóides e outros compostos fenólicos absorvem radiação UV, de forma que estas moléculas estão envolvidas na proteção vegetal contra esse tipo de estresse (Clé et al., 2008).

2.1.2. Antioxidantes enzimáticos

As células contam com diversas enzimas para reduzir as EROs a substâncias menos reativas, geralmente água. Neste grupo heterogêneo de proteínas, encontramos superóxido dismutase (SoD), ascorbato peroxidase (APx), catalase (Cat), glutathiona peroxidase (GPx), entre outras. Dentre estas, destacam-se as enzimas SoD, Cat e APx na detoxificação do peróxido de hidrogênio e do íon superóxido, através do ciclo do ascorbato-glutathiona (Figura 2) e do metabolismo antioxidante dos peroxissomos, no caso da enzima catalase (Tabela 1).

Tabela 1

Códigos enzimáticos e reações catalisadas pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase (modificado de Gill & Tuteja, 2010)

Antioxidante enzimático	Código da enzima	Reação catalisada
Superóxido dismutase	EC 1.15.1.1	$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow 2 H_2O_2 + O_2$
Catalase	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$
Ascorbato peroxidase	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2 H_2O + DHA$

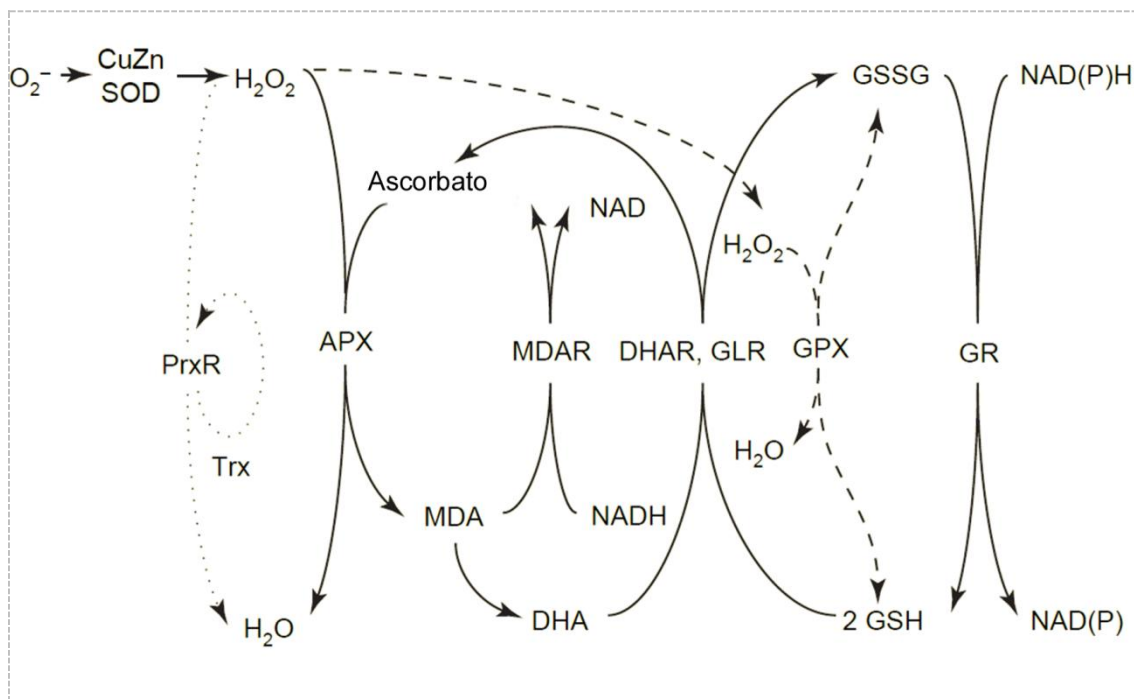


Figura 2. Ciclo do ascorbato-glutationa. SOD, superóxido dismutase; PrxR, peroxirredoxina; Trx, tiorredoxina; APx, ascorbato peroxidase, MDA, monodehidroascorbato; MDAR, MDA redutase; DHA, dehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato redutase; GSH, glutaciona reduzida; GSSH, glutaciona oxidada; GR, glutaciona redutase (adaptado de Mittler et al., 2004).

2.1.2.1. Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase atua no início da defesa antioxidante nas células vegetais, catalisando a dismutação do íon superóxido, gerando peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (tabela 1). Através da remoção do íon superóxido, SoD diminui as chances de haver formação de radical hidroxila via reação de Haber-Weiss, sendo esta molécula muito reativa e conseqüentemente bastante danosa à célula. As superóxido dismutases são classificadas em três grupos, de acordo com o cofator metálico enzimático, que pode ser cobre/zinco (Cu/Zn-SoD), manganês (Mn-SoD) ou ferro (Fe-SoD) (Ron Mittler, 2002). Em razão do íon superóxido não ser capaz de atravessar membranas fosfolipídicas (Takahashi & Asada 1983), a presença de SoD em todos os compartimentos subcelulares onde esta ERO é formada é crucial para a sobrevivência das plantas:

Mn-SoD é encontrada nas mitocôndrias e peroxissomos (del Rio, 2003), Cu/ZN-SoD pode ser encontrada no citosol e cloroplastos (del Río et al., 2002) e Fe-SoD é encontrada nos cloroplastos (Asada, 2006).

2.1.2.2. Catalase

As catalases de plantas são enzimas tetraméricas que catalisam a conversão do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular (tabela 1), através da utilização de um cofator heme (Mhamdi et al., 2010). Estas enzimas são especialmente importantes na remoção do peróxido de hidrogênio gerado nos peroxissomos durante a oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo de purinas (S. S. Gill & Tuteja, 2010), e principalmente durante situações de estresse, onde há o aumento de EROs e proliferação dos peroxissomos na célula (Lopez-Huertas, Charlton, B. Johnson, Graham, & Baker, 2000). Nestas situações, uma população densa de peroxissomos torna-se importante para a detoxificação do peróxido de hidrogênio, uma vez que esta ERO pode difundir livremente do citosol para dentro destas organelas, de forma que esta enzima torna-se importante não só na detoxificação do peróxido produzido nos peroxissomos, mas também durante o aumento global desta molécula dentro da célula em situações de estresse (Ron Mittler, 2002). A presença de catalase em outros compartimentos subcelulares não é bem estabelecida na literatura, mas há evidências de atividade desta enzima nas mitocôndrias e no citosol, a qual pode ser devido à contaminação das frações de mitocôndrias com peroxissomos, uma vez que o importe de catalase para estas organelas nunca foi demonstrado, ou, no que se refere à atividade citoplasmática, devido à presença de proteínas ainda não translocadas aos peroxissomos (Mhamdi et al., 2010). Em geral, as plantas possuem três genes codificadores de catalases, os quais são classificados de acordo com os locais onde são expressos: os genes de classe I codificam proteínas presentes nos tecidos fotossintetizantes, os de classe II estão associados com tecidos vasculares e os de classe III são mais fortemente expressos em sementes e tecidos reprodutivos (Mhamdi et al., 2010).

2.1.2.3. Ascorbato peroxidase

Ascorbato peroxidases são enzimas que catalisam a conversão de peróxido de hidrogênio a água, através da oxidação do substrato ascorbato (tabela 1), estando presentes em plantas vasculares, clorófitas e algas vermelhas (Teixeira & Menezes-benavente, 2004) Esta proteína é classificada como uma heme peroxidase, por necessitar da ligação do cofator heme para exercer sua atividade enzimática. O processo de detoxificação do H_2O_2 catalisado pela enzima ascorbato-peroxidase é acompanhada por uma série de reações que, em conjunto, formam uma das vias antioxidantes mais importantes presentes nas plantas, o ciclo do ascorbato-glutationa. Neste ciclo, o ascorbato e a glutathione são utilizados como fonte redutora para a detoxificação do H_2O_2 e os compostos oxidados são recuperados por várias reações, à custa de ATP e NAD(P)H (Figura 2). Desta maneira, o radical monodesidroascorbato (MDHA), gerado pela oxidação do ascorbato pela APx durante a detoxificação do H_2O_2 é regenerado por duas vias: ele pode ser convertido à ascorbato pela ação da enzima monodesidroascorbato-redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4) utilizando NAD(P)H ou, então, devido à sua instabilidade, pode gerar o radical desidroascorbato (DHA) em uma reação não enzimática. Em seguida, o DHA é regenerado a ascorbato pela enzima desidroascorbato-redutase (DHAR, EC 1.8.5.1) utilizando glutathione como fonte redutora. Por fim, a glutathione oxidada é recuperada pela ação da glutathione-redutase (GR, EC 1.8.1.7), às custas de NAD(P)H. Nas plantas, o ciclo do ascorbato-glutationa é particularmente importante nos cloroplastos, os quais são importantes fontes produtoras de H_2O_2 , mas este também opera no citosol, nos peroxissomos e nas mitocôndrias. Nas plantas vasculares, ascorbato peroxidases são codificadas por pequenas famílias multigênicas e as diferentes isoformas são classificadas de acordo com a sua localização subcelular. Pode-se encontrar isoformas solúveis no citosol e no estroma do cloroplasto, enquanto as ancoradas às membranas podem ser encontradas nos peroxissomos e nos tilacóides (Teixeira & Menezes-benavente, 2004). As ascorbato peroxidases desempenham um papel fundamental em organismos fotossintéticos, onde os cloroplastos produzem altas taxas de superóxido e peróxido de hidrogênio em

decorrência da fotossíntese. Visto que estas organelas não possuem catalases e que os íons superóxido convertem-se rapidamente a peróxido de hidrogênio, APx é a enzima responsável por conter o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio nestas organelas (Noctor & Foyer, 1998). Várias situações de estresse induzem a expressão de genes que codificam ascorbato peroxidases, como estresse hídrico e salino, altas temperaturas, frio, ataque de patógenos, ou através do tratamento com ácido absísico ou com peróxido de hidrogênio (Noctor & Foyer, 1998; Mittler, Vanderauwera, Gollery, & Van Breusegem, 2004). Também podemos observar a indução de praticamente todas as isoformas durante a germinação da semente, as quais podem estar atuando na proteção de estruturas em formação do peróxido de hidrogênio, ou ainda regulando a concentração deste mensageiro nos processos de sinalização do desenvolvimento (Karam & Larissa, 2006).

2.1.2.4. *Ascorbate peroxidase-related (APx-R)*

Além das ascorbato peroxidases já descritas e caracterizadas em genomas de plantas, análises *in silico* revelaram a existência de um outro gene anotado como provável APx. Em arroz, modelo de estudo para o grupo das monocotiledôneas, este gene está localizado no cromossomo oito, possui uma sequência gênica de 3205 pares de bases e codifica uma proteína de 331 aminoácidos. Resultados recentes do nosso grupo mostram que este gene codifica uma proteína que não pode ser classificada como pertencente à família das APx, uma vez que possui um série de diferenças em relação aos membros desta família. Estas diferenças se referem principalmente à estrutura dos genes em questão (número de exons e introns) e à presença de um grande número de substituições em domínios específicos da proteína, inclusive no sítio ativo. Entretanto, pode-se verificar que os membros dessa nova classe de heme peroxidase apresentam os quatro domínios característicos destas enzimas, que incluem a região do sítio ativo, o sítio de ligação ao heme e outros dois domínios não-caracterizados (Teixeira et al., 2004), além de uma alta identidade de

aminoácidos (35%) com os membros da família de APx, de forma que as estruturas tridimensionais de ambas proteínas são bastante similares. Em razão destas características analisadas, esta nova proteína foi intitulada ascorbate peroxidase-related (APx-R). Análises filogenéticas utilizando oito sequências de APx-R e outras 61 sequências representativas das três classes de heme-peroxidases da superfamília não-animal, mostram que as APx-R de diferentes organismos formam uma nova classe de heme peroxidases, a classe IV, uma vez que não agrupam com nenhuma outra classe de heme peroxidases já descrita na literatura (Figura 3). Além disso, análises filogenéticas utilizando as mesmas proteínas, porém feitas a partir dos quatro domínios conservados característicos de peroxidases, mostram a mesma topologia obtida na análise anterior, ou seja, APx-R formando uma nova classe de heme-peroxidases (Lazzarotto et al., 2011). Estes resultados mostram que, apesar de APx-R apresentar muitas similaridades em diversos aspectos em relação aos membros da família de APx, esta nova heme peroxidase não pode ser classificada como pertencente a esta.

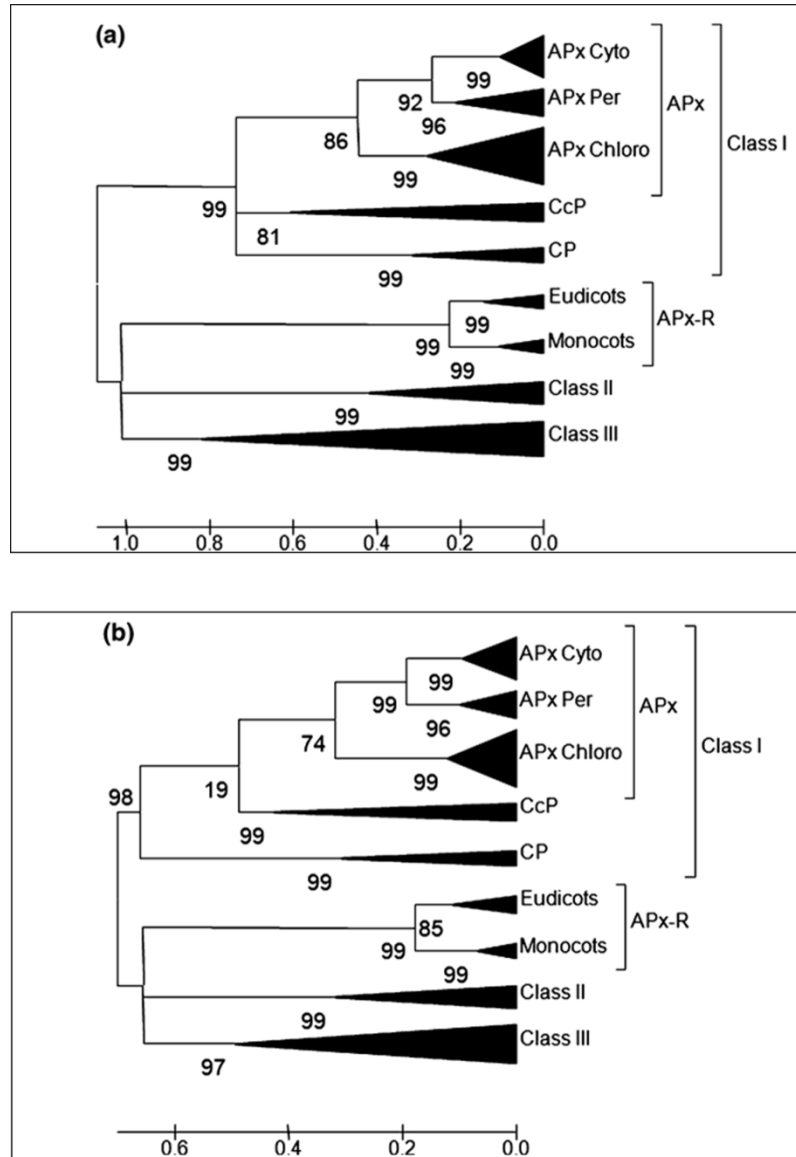


Figura 3. Cladograma obtido através do método Neighbor-joining a partir de 69 sequências proteicas completas representativas de todas as classes de heme peroxidases de plantas. Foram utilizadas para as análises em (a) as sequências proteicas completas e em (b) as sequências proteicas referentes ao quatro domínios conservados. A mesma topologia foi obtida através da utilização do método de máxima-verossimilhança. APx, Ascorbato Peroxidase; APx-R, Ascorbate Peroxidase-Related; CcP, Citocromo c Peroxidase; CP, Catalase Peroxidase. Modificado de Lazzarotto et al., 2011.

3. O modelo vegetal

O arroz (*Oryza sativa*) é a terceira maior cultura cerealífera do mundo, sendo apenas ultrapassado pelo milho e trigo. É cultivado e consumido em todos os continentes, destacando-se pela sua produção e área de cultivo. Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, o que dá origem a 590 milhões de toneladas de grãos, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado (EMBRAPA Clima Temperado).

O arroz é alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, sendo, por isso, considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente nos continentes da Ásia e Oceania. A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo de arroz. O Brasil se destaca como o maior produtor fora do continente asiático, sendo que a sua produção é voltada principalmente para o abastecimento interno (EMBRAPA Clima Temperado).

Assim como outras culturas, o arroz vem sofrendo cada vez mais com as variações climáticas mundiais. A tolerância da planta ao calor e ao frio varia bastante ao longo de seu ciclo, de forma que a temperatura ótima para o seu desenvolvimento fica entre 20°C e 35°C, acima da qual as espiguetas podem tornar-se estéreis. A fase mais sensível do arroz a altas temperaturas é a floração, que só ocorre com sucesso entre 30°C e 33°C. A cultura também é bastante dependente de água, principalmente no período de florescimento e enchimento dos grãos. Para florescer, o arroz precisa de 220 a 250 milímetros (mm) de água. Se submetida ao estresse hídrico durante esta fase do seu ciclo de vida, o desenvolvimento reprodutivo pode ser prejudicado, resultando em esterilidade, dessecamento das espiguetas e, por fim, na diminuição no rendimento da cultura. Ao longo de todo o ciclo, a necessidade hídrica varia entre 650 mm a 750 mm. Se essa quantidade de água não é obtida, podem-se esperar grandes perdas nas safras, as quais são proporcionais à duração e à intensidade das condições meteorológicas adversas. Hoje, o Brasil tem 4.011 municípios em

condições de cultivar arroz com baixo risco à safra. Esse número pode diminuir para cerca de 3.600 em 2070 em razão do aumento da instabilidade climática no país (EMBRAPA Agropecuária). Alterações nas condições de cultivo de arroz, onde estas se afastam muito das condições ideais, desencadeiam um quadro de estresse oxidativo nestes organismos, o qual é responsável pela redução do tamanho das plantas, da quantidade de espiguetas e, conseqüentemente, do número de grãos férteis, levando ao decréscimo da produtividade e até mesmo à morte da planta.

Além da imensa importância econômica, o arroz é a planta modelo de estudo para o grupo das monocotiledôneas. O seu genoma já foi completamente sequenciado e anotado (Rice Sequencing, 2005), o que viabilizou o desenvolvimento de recursos e ferramentas de bioinformática para a exploração destes dados. Somando-se a esse fator, o protocolo de transformação genética de arroz já é bem estabelecido (Upadhyaya et al. 2000), sendo possível obter plantas transgênicas para melhoria genética de cultivares de interesse ou para a utilização destas em estudos de genética funcional.

Capítulo II

- Objetivos -

A recente identificação do gene *APx-R* acrescentou mais um elemento ao complexo sistema antioxidante das plantas. Os dados obtidos previamente indicam que *APx-R* não pode ser classificada como pertencente à família das bem conhecidas enzimas ascorbato peroxidases, bem como de nenhuma classe de heme peroxidases não-animais já descrita da literatura. Tendo em vista a importância dos sistemas de regulação dos níveis de peróxido de hidrogênio para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas, a presente dissertação de mestrado objetivou a identificação dos genes *APx-R* em bancos de dados e a caracterização deste mesmo gene em arroz (*Oryza sativa*), de forma a entender as funções de *APx-R* no sistema de detoxificação vegetal. Portanto, os objetivos específicos desta dissertação foram:

- a. Realizar buscas em bancos de anotação de genomas pelos genes ortólogos de *APx-R* de arroz, a fim de verificar em quais grupos de organismos podemos encontrá-lo;
- b. Caracterizar bioquimicamente plantas de arroz silenciadas para o gene *APx-R* (RNAi-*OsAPx-R*), obtidas previamente;
- c. Identificar os compartimentos subcelulares onde *APx-R* se localiza em arroz;
- d. Realizar estudos de interação entre *APx-R* e ascorbato peroxidases presentes nos mesmos compartimentos subcelulares.

Capítulo III

- Artigo científico -

“Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent”

Fernanda Lazzarotto, Felipe Karam Teixeira, Sílvia Barcelos Rosa, Christophe Dunand, Cláudia Lemelle Fernandes, Adilton de Vasconcelos Fontenele, Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, Hugo Verli, Rogério Margis e Márcia Margis Pinheiro

- Artigo científico publicado no periódico *New Phytologist* -

Capítulo IV

- Adendo científico -

*“Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is not a duplicable
gene”*

Christophe Dunand, Catherine Mathé, Fernanda Lazzarotto, Rogério Margis, Márcia Margis- Pinheiro

- Adendo científico em preparação, o qual será publicado na revista
Plant Signalling & Behavior a convite do editor do periódico -

Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is not a duplicable gene

Christophe Dunand^{1,2}, Catherine Mathé^{1,2}, Fernanda Lazzarotto³, Rogério Margis^{4,5}, Marcia Margis-Pinheiro³

¹Université de Toulouse; UPS; UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Castanet-Tolosan, France.

²CNRS; UMR 5546, Castanet-Tolosan, France

³Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

⁵Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Abstract

Phylogenetic, genomic and functional analyses have allowed the identification of a new class of putative heme peroxidases, so called APx-R (APx-Related) (Lazzarotto et al., 2011). This new class mainly present in the green lineage (including green algae and land plants) and can also be detected in other unicellular chloroplastic organisms. Except for recent polyploid organisms, only one copy of *APx-R* gene was detected in each genome, suggesting that the majority of the *APx-R* extra-copies were lost after chromosomal or segmental duplications. In a similar way, the majority of the *APx-R* co-expressed genes in *Arabidopsis thaliana* do not have conserved extra-copies after chromosomal duplications and the proteins codified by these genes are predicted to be localized in organelles as does APx-R.

Key words: single-copy gene; gene duplication; ascorbate peroxidase

Ascorbate peroxidases (APx) belong to the class I peroxidase. These proteins have been detected in all chloroplastic containing organisms in which they form a small multigenic family. They were subjected to some specie specific duplications which produced punctual variation in number of isoforms, from 3 to

10. These duplications are probably associated with subfunctionalization. Indeed three major subclasses are detected based on their cellular localizations: cytoplasmic, peroxisomal and chloroplastic/mitochondrial. Recently an additional group of sequences closely related to APx has been characterized and named ascorbate peroxidase-related (APx-R). This new class does not seem to be subjected to functional duplication.

Exhaustive data mining of multiple sequence resources have been performed with available genome and EST libraries to confirm the previous observations. No functional *APx-R* gene duplication has been detected. Duplicated *APx-R* are only observed in polyploid organisms such as *Triticum aestivum*, an allohexaploid which possesses 3 *APx-R* or *Brassica napus*, an allotetraploid which contains at least two independent expressed *APx-R* with no evidence of the conservation of all expected paralogs sequences. *Glycine max*, an ancient polyploid (palaeopolyploid, tetraploid) (Schmutz et al., 2010), possesses one *APx-R* sequence and one pseudogene while most of *APx* genes have been detected in duplicated forms.

In silico data shows that *APx-R* orthologous are present in green algae and vascular plants and two marginal presences have been detected in chloroplastic diatoms. In addition to the absence of conserved duplication, high level of sequence conservation is detected (minimum of 50% identity between green algae and Streptophyte, and 40% between chloroplastic diatoms and Streptophytes). Low conservation is observed for the exon 1 and 2 sequences which coincides with the variability of intron structures (intron positions and number) whereas the last 8 intron positions are highly conserved.

Careful analysis of *Arabidopsis thaliana* *APx-R* co-expression network demonstrated that among the 42 genes listed, 31 encode proteins that are predicted to be localized in organelles, in most cases chloroplasts (Table 1). These proteins display a great variety of biological functions, but a considerable number of them are implicated in chloroplasts protection against photooxidative damage, which suggests that *APx-R* could play a role in this protective mechanism as well. Interestingly, more than half of those genes are present as single-copy or

as low-copy genes in *Arabidopsis thaliana* (24 among the 42 genes, Table 1), and also in *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa* and *Vitis vinifera* genomes. In 2010, Duarte et al. suggested that plant proteins predicted to be targeted to organelles are more likely single-copy than expected by chance. This could happen because these proteins, when present in the organelles, interact with proteins that are encoded by the organellar genome. In this case, the level of nuclear genome encoded proteins has to be very well controlled inside the cell, so the interaction network will not be disturbed. Looking specifically to the network genes that are single-copy in the specified genomes, we noticed that the majority of the extra-copies of these genes were lost after chromosomal duplications, in a situation very similar to *APx-R* gene. Thus, it is possible to infer that a great number of single and low-copy genes in this co-expression network could reflect a dose-dependent system, where a raise in copy numbers of such genes would not be favorable to the network. In figure 1, *LPA19* (*At1g05385*), peptide release factor (*At1g33330*) and 15-cis-zeta-carotene isomerase (*At1g10830*) genes were used as examples. The chromosomal segments that contain these genes in *Arabidopsis* were duplicated during the evolution and genomic analyses showed that the extra copies were lost during this process (red dashed lines). However further analyses are mandatory to precisely evaluate the extension of this proposal, taking in consideration that many other neighbor genes were also deleted from these genomic regions.

Figure 1. Comparative analyses between the genomic regions containing *APx-R* co-expressed genes *At1g05385* (A), *At1g33330* (B) and *At1g10830* (C) and the DNA segments generated after these regions were duplicated. Peaks correspond to conserved DNA sequences (in most cases exons) in the *Arabidopsis* chromosomes. The red dot lines indicate the absence of the *APx-R* co-expressed gene in duplicated region. The VISTA program (www-gsd.lbl.gov/vista/) was used in these analyses.

Table 1. Co-expression network around *APx-R* gene (*At4g32320*) in *Arabidopsis thaliana*

References

Duarte, 2010. Identification of shared single copy nuclear genes in Arabidopsis, Populus, Vitis and Oryza and their phylogenetic utility across various taxonomic levels. *BMC Evolutionary Biology*, pp.1-18.

Lazarotto, F. et al., 2011. Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. *The New phytologist*.

Schmutz, J. et al., 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278), pp.178-83.

Figure 1

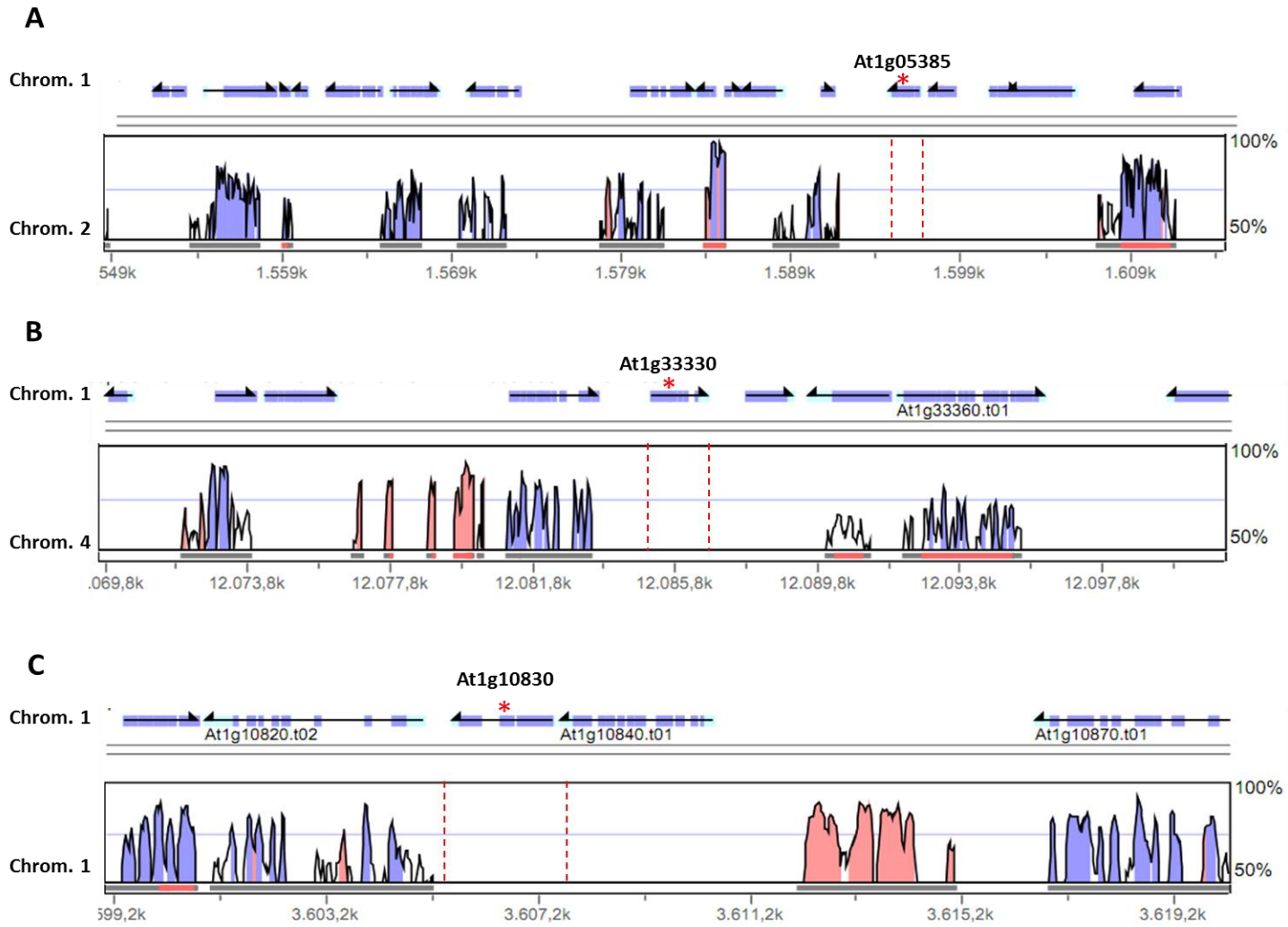


Table 1. Co-expression network around the gene *APx-R* (At4g32320) in *Arabidopsis thaliana*

Gene	Annotation	Subcellular Localization			Single-copy gene*	Low-copy gene**
		TargetP	Psort	TAIR		
At1g05385	<i>LOW PSII ACCUMULATION 19 (LPA19)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast, chloroplast thylakoid lumen	Yes	-
At1g08550	<i>NON-PHOTOCHEMICAL QUENCHING 1 (NPQ1); ARABIDOPSIS VIOLAXANTHIN DE-EPOXIDASE 1 (AVDE1)</i>	Other	Cyto	chloroplast photosystem II, chloroplast thylakoid lumen	No	Yes
At1g10830	<i>15-CIS-ZETA-CAROTENE ISOMERASE (Z-ISO)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast	Yes	-
At1g27385	Unknown protein	Chlo	Chlo	chloroplast	No	Yes
At1g33290	Sporulation protein-related	Chlo	Chlo	n/d	No	No
At1g33330	Peptide chain release factor	Mito	Chlo	chloroplast	Yes	-
At1g54520	Unknown protein	Chlo	Chlo	chloroplast	Yes	-
At1g64430	Unknown protein	Chlo	Chlo	n/d	No	Yes
At1g67840	<i>CHLOROPLAST SENSOR KINASE (CSK)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast, chloroplast stroma	No	Yes
At1g76730	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family protein	Chlo	Chlo	chloroplast	No	Yes
At1g78140	Methyltransferase-related protein	Mito	Chlo	chloroplast, plastoglobule	No	No

At1g78995	Unknown protein	Chlo	Chlo	n/d	No	Yes
At2g01620	<i>MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 11 (MEE11)</i>	Other	Chlo	n/d	No	No
At2g03390	uvrB/uvrC motif-containing protein	Chlo	Chlo	chloroplast	No	No
At2g20860	<i>LIPIC ACID SYNTHASE 1 (LIP1)</i>	Mito	Chlo	mitochondrial matrix, mitochondrion	No	No
At2g30170	Unknown protein	Chlo	Chlo	chloroplast	No	No
At2g37920	<i>EMBRYO DEFECTIVE 1513 (emb1513)</i>	Chlo	Chlo	n/d	No	Yes
At2g38270	<i>CAX-INTERACTING PROTEIN 2 (CXIP2); GLUTAREDOXIN (ATGRX2)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast, chloroplast stroma	Yes	-
At3g10970	Haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	Chlo	Chlo	chloroplast	Yes	-
At3g48560	<i>CHLORSULFURON/IMIDAZOLINONE RESISTANT 1 (CSR1); ACETOLACTATE SYNTHASE (ALS); ACETOHYDROXY ACID SYNTHASE (AHAS); TRIAZOLOPYRIMIDINE RESISTANT 5 (TZP5); IMIDAZOLE RESISTANT 1 (IMR1)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast	No	No
At3g53920	<i>RNA POLYMERASE SIGMA-SUBUNIT C (SIGC); SIGMA FACTOR 3 (SIG3)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast	No	No
At3g55630	<i>A. THALIANA DHFS-FPGS HOMOLOG D (ATDFD)</i>	Other	Cyto	cytosol	No	No
At4g02260	<i>RELA-SPOT HOMOLOG 1 (RSH1); RELA-SPOT HOMOLOG 1 (AT-RSH1); RELA/SPOT HOMOLOG 1 (ATRSH1)</i>	Chlo	Plast	chloroplast	No	No
At4g10000	Electron carrier protein; disulfide oxidoreductase	Chlo	Chlo	chloroplast	Yes	-
At4g25650	<i>ACD1-LIKE (ACD1-LIKE); PROTOCHLOROPHYLLIDE-DEPENDENT TRANSLOCON COMPONENT 52 KDA (PTC52)</i>	Chlo	Plast	chloroplast, chloroplast envelope	No	No

At4g27600	<i>NECESSARY FOR THE ACHIEVEMENT OF RUBISCO ACCUMULATION 5 (NARAS)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast	Yes	-
At4g30310	Ribitol kinase protein	Other	Chlo	chloroplast	No	No
At4g32320	<i>ASCORBATE PEROXIDASE-RELATED (APX-R)</i>	Chlo	Chlo	cytosol	Yes	-
At4g33630	<i>EXECUTER1 (EX1)</i>	Chlo	Chlo	thylakoid membrane	No	No
At5g02250	<i>EMBRYO DEFECTIVE 2730 (EMB2730); RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE 1 (RNR1); ARABIDOPSIS THALIANA MITOCHONDRIAL RNASE II (ATMTRNASEII)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast, mitochondrion	Yes	-
At5g03900	Unknown protein	Chlo	Plast	chloroplast envelope	Yes	-
At5g04360	<i>PULLULANASE 1 (ATPU1); LIMIT DEXTRINASE (ATLDA); PULLULANASE 1 (PU1)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast	No	Yes
At5g06340	<i>ARABIDOPSIS THALIANA NUDIX HYDROLASE HOMOLOG 27 (ATNUDX27)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast	No	No
At5g08340	Riboflavin biosynthesis protein-related	Other	Chlo	cellular_component unknown	No	No
At5g08410	<i>FERREDOXIN/THIOREDOXIN REDUCTASE SUBUNIT A2 (FTRA2)</i>	Chlo	Chlo	chloroplast	No	Yes
At5g13720	Unknown protein	Chlo	Plast	chloroplast, chloroplast inner membrane, chloroplast envelope	No	No
At5g18140	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	Chlo	Nuclear	n/d	No	No
At5g19540	Unknown protein	Chlo	Chlo	chloroplast	No	Yes
At5g26820	<i>MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE 1 (MAR1); IRON REGULATED 3 (IREG3)</i>	Chlo	Plast	chloroplast, chloroplast envelope	No	Yes

At5g38510	Rhomboid family protein	Chlo	Nuclear	integral to membrane	Yes***	-
At5g57040	Lactoylglutathione lyase family protein	Chlo	Chlo	chloroplast	Yes	-
At5g65685	Soluble glycogen synthase-related protein	Chlo	Chlo	chloroplast	No	No

* Single-copy genes in *Oryza sativa*, *Vitis Vinifera*, *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana* genomes, according to Duarte et al., 2010.

** Genes present as one or two copies in at least one of the analyzed genomes.

*** Not present in *Oryza sativa*.

Capítulo IV

- Discussão –

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos para proteger-se das condições adversas impostas pelos seus ambientes. Assim, os vegetais contam com um complexo sistema antioxidante, composto por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos, os quais são responsáveis por atenuar os níveis das espécies reativas de oxigênio, evitando, assim, o dano oxidativo. Dentre os componentes enzimáticos encontram-se as peroxidases, enzimas responsáveis por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio à água. Um novo membro integrante deste grupo foi recentemente identificado e nomeado *ascorbate peroxidase-related* (APx-R), por possuir grande homologia às bem-caracterizadas enzimas ascorbato peroxidases (APx). No entanto, análises de sequência mostram que este gene possui divergências que não permitem sua classificação como membro da família APx, ou mesmo como membro de qualquer outra família ou classe já caracterizada, dando origem, portanto, a uma nova classe de heme peroxidases não-animais, a classe IV. A caracterização inicial deste gene foi o objetivo desta dissertação de mestrado.

A relação filogenética entre APx-R e as demais heme peroxidases não-animais foi inferida por análise de *Neighbor-joining* a partir de 8 sequências proteicas de APx-R e 61 sequências representativas das três classes de heme peroxidases não-animais. A topologia do cladograma gerado nesta análise mostrou que APx-R forma um grupo distinto, o qual não agrupa com nenhuma das três classes já descritas desta superfamília (Figura 3). Para confirmar este resultado, novas análises de *Neighbor-joining* e máxima verossimilhança foram feitas, onde foram incluídas todas as sequências proteicas disponíveis de APx, APx-R e de citocromo c peroxidase (CcP), outra heme peroxidase não-animal de classe I bastante similar a APx, totalizando 296 sequências. A topologia obtida confirmou os dados anteriores, mostrando que as APx-R de diferentes organismos formam um grupo distinto do grupo das APx e do grupo das CcP, as quais são mais filogeneticamente próximas de APx que APx-R, evidenciando, assim, as diferenças existentes entre estas duas famílias.

Para identificar os organismos que possuem genes APx-R, buscas por ortólogos de *OsAPx-R* (*Oryza sativa*) foram realizadas em bancos de depósito de

genomas sequenciados. Os resultados obtidos mostram que este é um gene exclusivo de plantas, presente desde organismos unicelulares, como algas, até angiospermas. Nesta busca, foram identificados 40 genes *APx-R*, os quais estão presentes em 40 espécies distintas. Assim, pode-se observar que *APx-R* é um gene cópia-única em virtualmente todos os organismos que o possuem. Sabe-se que diversos eventos de duplicação gênica e cromossômica ocorreram durante a evolução dos genomas vegetais (Paterson, Freeling, Tang, & Wang, 2010), o que também é verdadeiro para os segmentos cromossômicos que contêm *APx-R* nestas espécies. Entretanto, as cópias extras de *APx-R*, originadas em decorrência de tais eventos, não foram mantidas em nenhum dos genomas analisados. O segmento cromossômico onde *APx-R* se localiza sofreu dez eventos de duplicação em álamo (*Populus trichocarpa*) e sete em soja (*Glycine max*). Entretanto, em ambas as espécies pode-se encontrar apenas uma cópia deste gene, evidenciando a perda sistemática das cópias extras de *APx-R*. Este fato também se mostrou verdadeiro para todas as outras espécies analisadas, indicando que há forte pressão seletiva para que este *locus* permaneça como cópia-única nos genomas vegetais.

Considerando a função que as peroxidases desempenham nas células, o fato de *APx-R* ter se mantido como um gene de cópia-única ao longo da evolução é intrigante. O que observamos, em geral, é justamente o oposto: outras peroxidases são codificadas por vários genes em cada organismo, o que leva à subfuncionalização dos genes e, conseqüentemente, à presença de isoformas enzimáticas nas células. Para tentar entender porque *APx-R* tem se mantido em um número controlado de cópias nos genomas vegetais, iniciamos a caracterização funcional deste gene utilizando arroz como modelo. A partir do entendimento da função de *APx-R* no ambiente celular, buscaremos hipóteses que expliquem esta característica de cópia-única.

A análise bioquímica de plantas de arroz que superexpressam RNA de interferência objetivando silenciar, por mecanismos pós-transcricionais, a expressão do gene *OsAPx-R*, mostrou que este deve estar envolvido na via de regulação dos níveis de peróxido de hidrogênio, em razão do silenciamento deste

gene ter sido capaz de modular a atividade das enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase, enzimas-chave desta via regulatória (Ron Mittler, 2002). A enzima superóxido dismutase atua na conversão do íon superóxido a peróxido de hidrogênio, enquanto as enzimas ascorbato peroxidase e catalase atuam na redução do peróxido de hidrogênio a água, onde diferenças na afinidade pelo peróxido enfatizam a necessidade de manutenção de ambas para a regulação dos níveis intracelulares desta molécula (Ron Mittler, 2002). O silenciamento de *OsAPx-R* levou à diminuição da atividade de superóxido dismutase, indicando que a concentração de íons superóxido estava diminuída nestas plantas e que, conseqüentemente, a produção de peróxido de hidrogênio também estava reduzida. Paralelamente, foi possível observar um aumento na atividade da enzima ascorbato peroxidase nestas plantas, o que é particularmente interessante por indicar que APx-R não só não é uma APx em razão das divergências de sequência que apresenta, mas que também não deve exercer tal atividade, a qual se mostrou aumentada nas plantas RNAi-*OsAPx-R*. A enzima catalase teve sua atividade fortemente diminuída nas plantas transgênicas, possivelmente em resposta à diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio. Sabendo da grande importância da enzima catalase durante episódios de estresse (Ron Mittler, 2002), é possível que estas plantas silenciadas sejam menos tolerantes a variações nas condições de cultivo. Experimentos que submetam estas plantas a adversidades ambientais, como seca, estresse luminoso e frio, deverão ser realizados, possibilitando observar o desempenho destas frente a estes estímulos.

A diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio nas plantas RNAi-*OsAPx-R* parece um dado contraditório a princípio, em razão do silenciamento objetivar a redução da expressão e, portanto, da atividade, de uma enzima que deve catalisar a decomposição destas moléculas. É possível que isto seja um reflexo da redução da atividade de superóxido dismutase e do aumento de atividade de ascorbato peroxidase nestas plantas, o que pode ter levado a um menor acúmulo desta espécie reativa mesmo na ausência de APx-R. Cabe aqui salientar que, apesar de nenhum teste de atividade ter sido realizado para verificar se APx-R possui de fato atividade de peroxidase, esta manteve

conservados, ao longo da evolução, os domínios de sítio ativo, sítio de ligação ao cofator heme e outros dois domínios característicos de peroxidases (Teixeira & Menezes-benavente, 2004), indicando que estas regiões são importantes para o desempenho das funções de APx-R nas células. Assim, esta é uma forte evidência de que APx-R deve ser capaz de catalisar a redução do peróxido de hidrogênio a água. As plantas RNAi-*OsAPx-R* apresentam diversas alterações em todo seu sistema antioxidante, de forma que pode não ser mais possível verificar uma resposta direta de aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio. Assim, a demonstração experimental da atividade de APx-R é fundamental para esclarecer o papel exercido por esta proteína nas células vegetais.

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) apresentou-se maior nas plantas silenciadas em relação às plantas controles. Esta medição reflete a taxa de oxidação lipídica das membranas celulares em decorrência do estresse oxidativo. Este dado indica, portanto, que os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio, que não peróxido de hidrogênio e íon superóxido, estão aumentados nestas plantas. Assim, somando os resultados obtidos através das análises bioquímicas, pode-se inferir que plantas que possuem níveis diminuídos de APx-R apresentam importantes alterações no sistema antioxidante, evidenciando a provável participação desta proteína nas vias de regulação do peróxido de hidrogênio em plantas. Apesar de apresentarem tais alterações, estas plantas crescem normalmente e desenvolvem panículas e sementes, assim como as plantas controles. Entretanto, uma observação interessante é a de que as plantas RNAi-*OsAPx-R* crescem mais lentamente nas fases iniciais do desenvolvimento, para depois atingirem o mesmo tamanho exibido pelas plantas controles. Dados de expressão obtidos através de experimentos de transcriptômica disponíveis *online* (Winter et al., 2007) mostram que APx-R apresenta dois picos de expressão em *Arabidopsis thaliana*, um no início do desenvolvimento e outro durante a senescência das plantas, o que pode explicar o retardo transiente no desenvolvimento das plantas RNAi-*OsAPx-R* durante as primeiras semanas.

Somado ao distúrbio do sistema antioxidante, causado pelo silenciamento de *APx-R*, o envolvimento deste gene em episódios de estresse foi verificado através da exposição de plantas selvagens de arroz às condições de frio, seca, exposição ao alumínio e à radiação UV-C. Todas estas condições modularam a expressão de *OsAPx-R*, sendo esta modulação positiva para os três primeiros estresses e negativa frente a exposição à radiação. Assim, a participação de *APx-R* na resposta ao estresse oxidativo foi evidenciada através de todos os experimentos, o que corrobora com a análise de sequência do gene, a qual identifica este como codificador de uma peroxidase.

Para determinar a localização subcelular de *APx-R*, protoplastos de arroz foram transformados com construção de fusão traducional de *APx-R* à YFP, sob o controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor. A visualização destas células em microscópio confocal mostrou que *APx-R* localiza-se nos cloroplastos e mitocôndrias, o que confirmou a predição da localização subcelular obtida *in silico*, a qual indica a presença de um peptídeo de direcionamento para estas organelas na porção amino-terminal de *APx-R*. As mitocôndrias e os cloroplastos são lugares de intensa formação de espécies reativas de oxigênio em decorrência dos processos de respiração e fotossíntese. A presença de *APx-R* nestes compartimentos subcelulares indica que esta proteína deve estar envolvida na proteção das estruturas organelares contra o dano oxidativo, a qual deve ser particularmente importante para os cloroplastos, organelas desprovidas de catalase (Asada, 2006). É possível que *APx-R* não se localize nas duas organelas em todos os tecidos vegetais, ou em todas as células, ou mesmo em todas as condições. A utilização de protoplastos, apesar de estes serem uma boa ferramenta para determinar a localização de dada proteína em estudos de expressão transiente, pode não refletir a realidade *in planta*. Para tal, a obtenção de plantas transgênicas que expressem de forma estável *APx-R* fusionada a uma proteína repórter, sob o controle do promotor nativo, elucidariam estas questões.

Na tentativa de identificar as vias metabólicas nas quais *APx-R* participa, analisamos a rede de genes coexpressos com *APx-R* em *Arabidopsis thaliana*,

gerada através do ATTED-II *database*. Levando em consideração a premissa de que genes com padrão de expressão similar devem estar funcionalmente relacionados, buscamos entender as funções de APx-R com maiores detalhes através desta abordagem. Dos 42 genes que foram identificados na rede de coexpressão, 31 codificam proteínas com localização predita para os cloroplastos ou mitocôndrias, o que corrobora com o observado para APx-R através das análises de microscopia confocal. Interessantemente, 24 destes genes são cópia-única ou estão presentes em baixo número de cópias nas plantas que os possuem. Um trabalho publicado recentemente por Duarte et al. em 2010, mostrou que genes que codificam proteínas que se localizam nos cloroplastos e/ou mitocôndrias apresentam-se mais frequentemente como cópia-única do que outros genes presentes no genoma nuclear. Isto pode ser em razão da necessidade das proteínas codificadas por estes genes de interagir com proteínas codificadas pelo genoma organelar, necessitando, portanto, um controle mais rígido nos eventos de duplicação de tais genes, os quais não devem apresentar variações. Isto poderia explicar a grande incidência de genes de cópia-única na rede de coexpressão de APx-R e, inclusive, a pressão seletiva para que este permaneça como cópia-única nos genomas vegetais. Outra hipótese que visa explicar este fenótipo cópia-única leva em consideração a homeostase do sistema. Por esta ser uma rede de proteínas onde a maior parte é codificada por genes de baixo número de cópias, o aumento do número de algum destes genes pode levar a alterações de grandezas, as quais poderiam não ser favoráveis para os organismos. Estas hipóteses podem ajudar a explicar a pressão seletiva para que APx-R permaneça como cópia única nos genomas vegetais, entretanto, plantas que superexpresssem APx-R poderão evidenciar as desvantagens adaptativas, se existentes, destas plantas.

A análise dos genes presentes na rede de coexpressão de *AtAPx-R* evidencia a presença de genes relacionados com a biogênese e proteção do aparato fotossintético, os quais, assim como APx-R, codificam proteínas com localização predita para os cloroplastos. Dentre estes, estão presentes *LPA19*, que codifica uma proteína envolvida com a biogênese e estabilidade do fotossistema II (Wei et al., 2010); *VDE*, o qual codifica a enzima violaxantina de-

epoxidase, responsável pela síntese de zeaxantina em resposta à acidificação do lúmen (Arnoux, Morosinotto, Saga, Bassi, & Pignol, 2009); *CSK*, que codifica uma quinase necessária para o controle da transcrição de genes dos cloroplastos em resposta ao estado redox da organela (Puthiyaveetil, 2008) e o gene codificador de Z-ISO, uma enzima necessária para a síntese de carotenoides, os quais atuam como pigmentos acessórios da fotossíntese e na proteção celular durante episódios de estresse fotooxidativo (Y. Chen, Li, & Wurtzel, 2010). Assim, APx-R parece participar das vias responsáveis pela proteção dos cloroplastos frente ao dano oxidativo, ou ser capaz de modificar o estado redox de proteínas que atuam nestas vias, o que, se verdadeiro, poderá ser evidenciado através da exposição das plantas RNAi-OsAPx-R a situações que induzam o estresse fotooxidativo, como através da exposição destas à alta intensidade luminosa, por exemplo.

A formação de heterodímeros entre as ascorbato peroxidases de arroz localizadas nas mitocôndrias e cloroplastos (APx5, APx6 e APx7) e APx-R foi investigada através da técnica de complementação bimolecular da fluorescência. Os resultados mostraram que APx-R pode interagir fisicamente com APx5, APx6, APx7 e com ela mesma, formando, assim, homo e heterodímeros. A interação entre estas proteínas pode indicar que APx-R atua na regulação da atividade das ascorbato peroxidases, por exemplo. Entretanto, a superfície de contato entre as proteínas, quando dimerizadas, não é extensa a ponto de bloquear os seus sítios ativos, como pode ser verificado no modelo gerado por *molecular docking*. Assim, esta não parece ser a função mais provável desta interação proteica, mas certamente não pode ser descartada, uma vez que a interação pode gerar mudanças conformacionais que poderiam modular alostericamente a afinidade das enzimas pelos substratos ou pelo peróxido de hidrogênio (Figura 4A), o que deve ser investigado mais a fundo. Outra hipótese para explicar a função biológica destas interações é o aumento da estabilidade proteica (Figura 4B). Sabe-se que as ascorbato peroxidases já foram purificadas de diversos tecidos vegetais como monômeros, lábeis na ausência de ascorbato (G.-X. Chen & Asada, 1989), ou como homodímeros, estáveis na ausência de ascorbato (R Mittler & Zilinskas, 1991). A estrutura tridimensional de APx-R é extremamente similar à de APx, conforme pode-se observar através da modelagem por

homologia de APx-R. Assim, a interação entre as proteínas pode visar a estabilização das mesmas na ausência dos substratos, diminuindo, assim, o *turnover* proteico. Outra possibilidade é de que a interação entre as proteínas sirva para que estas possam se realocar em outros compartimentos subcelulares, através da interação com proteínas que possuem peptídeos de direcionamento para estas organelas (Figura 4C). Isto se justificaria no caso de APx-R apresentar uma afinidade muito maior ou muito menor ao peróxido de hidrogênio em relação às APx, por exemplo, de forma que esta seria necessária em algumas situações específicas. Estas são apenas algumas especulações, sendo que a função biológica da interação entre APx e APx-R deve ser investigada, a fim de que se possa identificar em quais vias do sistema antioxidante vegetal APx-R participa.

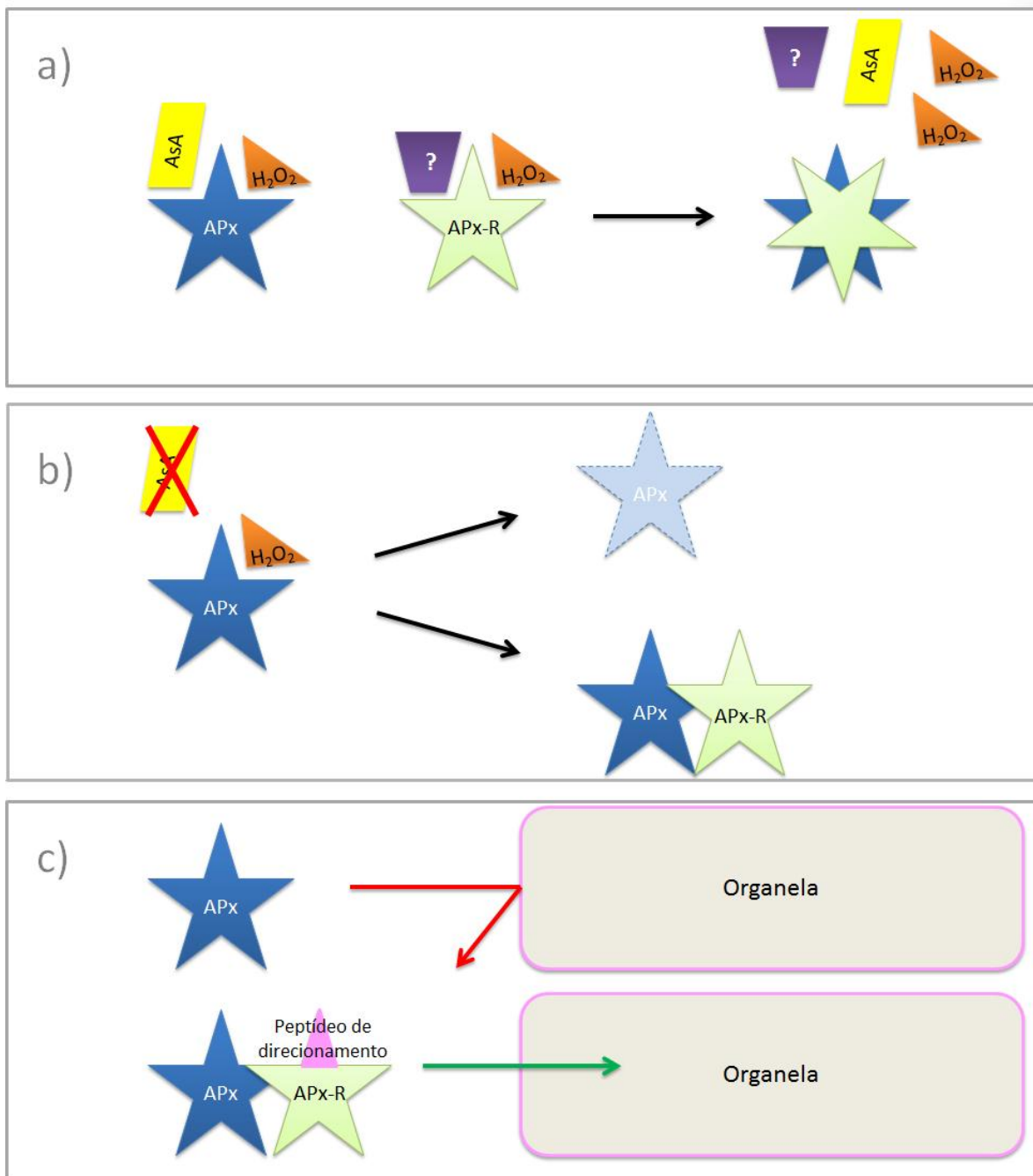


Figura 4. Modelos de interação proteica entre APx e APx-R. a) APx e APx-R poderiam interagir para regular negativamente a atividade enzimática de uma ou ambas proteínas, impedindo a ligação dos substratos. b) APx e APx-R podem interagir a fim de se manterem estáveis na ausência dos substratos, diminuindo o *turnover* destas proteínas. c) APx e APx-R interagiriam para que possam ser transportadas para organelas fazendo uso do peptídeo de direcionamento presente em uma das proteínas. AsA, ascorbato.

O presente trabalho realizou a caracterização inicial de uma nova proteína integrante do sistema antioxidante de plantas. Entretanto, para afirmar o papel desta proteína neste sistema, uma caracterização mais completa se faz necessária, a qual poderia ser feita através da obtenção e análise de mutantes nocautes e, principalmente, de superexpressão do gene *APx-R*, dada a sua característica de gene cópia-única. O desempenho destas plantas deverá ser avaliado sob condições ambientais de estresse, principalmente sob estresse luminoso e de calor, por estas serem condições que sabidamente alteram o funcionamento do sistema fotossintético (Bichele & Rasulov, 2011; Fu & B. Huang, 2001), aumentando, conseqüentemente, o estresse oxidativo no interior dos cloroplastos. Além disso, seria interessante que os experimentos de interação proteica fossem confirmados através da utilização de outra abordagem, como o sistema Duplo-Híbrido em leveduras, por exemplo.

O número de trabalhos abordando a importância das espécies reativas de oxigênio como mensageiros em processos de desenvolvimento e resposta a estresses cresce em ritmo acelerado, o que evidencia a importância do sistema antioxidante para a regulação indireta destes processos. Assim, a caracterização de cada componente, e, em especial de *APx-R*, a qual apresenta características particularmente distintas das outras peroxidases, se faz necessária para o entendimento integral deste complexo sistema.

- *Bibliografia* -

- Arnoux, P., Morosinotto, T., Saga, G., Bassi, R., & Pignol, D. (2009). A Structural Basis for the pH-Dependent Xanthophyll Cycle in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21: 2036-2044.
- Asada, K. (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*, 141: 391-396.
- Barceló, a R., Gómez Ros, L. V., Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Carrión, J. S. (2004). Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? *Phytochemistry Reviews*, 3: 61-78.
- Bichele, I., & Rasulov, B. (2011). When it is too hot for photosynthesis: heat-induced instability of photosynthesis in relation to respiratory burst, cell permeability changes and H₂O₂ formation. *Plant, cell & Environment*, 34: 113-126.
- Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. a, Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., et al. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of biological chemistry*, 282: 1183-1192.
- Chen, G.-X., & Asada, K. (1989). Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties. *Plant Cell Physiology*, 30: 987-998.
- Chen, Y., Li, F., & Wurtzel, E. T. (2010). Isolation and Characterization of the Z-ISO Gene Encoding a Missing Component of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Plant Physiology*, 153: 66-79.
- Clé, C., Hill, L. M., Niggeweg, R., Martin, C. R., Guisez, Y., Prinsen, E., et al. (2008). Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry*, 69: 2149-2156.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., et al. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422: 442-446.
- Fu, J., & Huang, B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and experimental botany*, 45: 105-114.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive Oxygen Species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
- Grunberg, K. A., & Taleisnik, E. L. (2002). Reactive Oxygen Species in the Elongation Zone of Maize Leaves Are Necessary for Leaf Extension. *Plant Physiology*, 129: 1627-1632.

- Hollanderczytko, H. (2005). Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in under stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, 162: 767-770.
- Huang, G.-tao, Bai, L.-ping, Zhang, Li, Jia, P., Liu, J., Zhong, M., et al. (2011). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*, 39: 969-987.
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry*, 77: 755-756.
- Johnson, M. P., Goral, T. K., Duffy, C. D. P., Brain, A. P. R., Mullineaux, C. W., & Ruban, A. V. (2011). Photoprotective Energy Dissipation Involves the Reorganization of Photosystem II Light-Harvesting Complexes in the Grana Membranes of Spinach Chloroplasts. *The Plant cell*, 23: 1468-1479.
- Joo, J. H., Bae, Y. S., & Lee, J. S. (2001). Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant physiology*, 126: 1055-1060.
- Karam, F., & Larissa, T., Galvão V. C., Margis, R., Margis-Pinheiro, M. (2006). Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 224: 300-314.
- Lazzarotto, F., Teixeira, F. K., Rosa, S. B., Dunand, C., Fernandes, C. L., Vasconcelos Fontenele, A., Silveira, J. A. G., Verli, H., Margis, R., Margis-Pinheiro, M. (2011). Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. *The New phytologist*, 191: 234-250.
- Lee, J.-W., & Helmann, J. D. (2006). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature*, 440: 363-367.
- Lee, K., Thorneycroft, D., Achuthan, P., Hermjakob, H., & Ideker, T. (2010). Mapping Plant Interactomes Using Literature Curated and Predicted Protein-Protein Interaction Data Sets. *The Plant Cell*, 22: 997-1005.
- Lee, P. E., Demple, B., & Barton, J. K. (2009). DNA-mediated redox signaling for transcriptional activation of SoxR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 13164-13168.
- Lopez-Huertas, E., Charlton, W. L., Johnson, B., Graham, I. a, & Baker, a. (2000). Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO journal*, 19: 6770-6777.
- Maeda, H., & DellaPenna, D. (2007). Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Current opinion in plant biology*, 10: 260-265.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of experimental botany*, 61: 4197-4220.

Mittler, R., & Zilinskas, B. a. (1991). Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant physiology*, 97: 962-968.

Mittler, Ron. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.

Mittler, Ron, Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9: 490-498.

Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual review of plant biology*, 58: 459-481.

Møller, I. M., & Sweetlove, L. J. (2010). ROS signalling – specificity is required. *Trends in Plant Science*, 15: 370-374.

Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 49: 249-279.

Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., & Jansen, M. a K. (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of experimental botany*, 56: 1991-2001.

Paterson, A. H., Freeling, M., Tang, H., & Wang, X. (2010). Insights from the Comparison of Plant Genome Sequences. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 349-372.

Polle, A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant physiology*, 126: 445-462.

Puthiyaveetil, S. (2008). The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 10061-10066.

Rausch, T., & Wachter, A. (2005). Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in plant science*, 10: 503-509.

International Rice Genome Sequencing Project (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436: 793-800.

Río, L. a del. (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 54: 923-933.

Río, L. a del, Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Gómez, M., & Barroso, J. B. (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of experimental botany*, 53: 1255-1272.

Scandalios, J. G. (2002). The rise of ROS. *Trends in biochemical sciences*, 27: 483-486.

Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, Jianxin, Mitros, T., Nelson, W., et al. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463: 178-183.

Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahy, G., & Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, 214: 821-828.

Sevilla, F., with del Rio LA. (1998). Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant physiology*, 18: 1327-1335.

Stephen C., F. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 14: 125-127.

Takahashi, Masa-Aki and Asada, K. (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 226: 558-566.

Teixeira, F. K., & Menezes-benavente, L. (2004). Analysis of the Molecular Evolutionary History of the Ascorbate Peroxidase Gene Family: Inferences from the Rice Genome. *Journal of Molecular Evolution*, 761-770.

Upadhyaya Narayana M., Surin Brian, Ramm Kerrie, Gaudron Judy, Schünmann Petra H. D., Taylor William, Waterhouse Peter M., W. M.-B. (2000). Agrobacterium-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 201-210.

Wei, L., Guo, J., Ouyang, M., Sun, X., Ma, Jinfang, Chi, W., et al. (2010). LPA19, a Psb27 homolog in *Arabidopsis thaliana*, facilitates D1 protein precursor processing during PSII biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 21391-21398.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one*, 2: e718.

Wiseman, H., & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313: 17-29.

Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent

Fernanda Lazzarotto^{1*}, Felipe Karam Teixeira^{1*}, Silvia Barcelos Rosa^{1,2}, Christophe Dunand^{3,4}, Claudia Lemelle Fernandes², Adilton de Vasconcelos Fontenele⁵, Joaquim Albenisio Gomes Silveira⁵, Hugo Verli², Rogério Margis^{2,6} and Marcia Margis-Pinheiro¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; ²Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; ³Université de Toulouse, UPS, UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Castanet-Tolosan, France; ⁴CNRS, UMR 5546, Castanet-Tolosan, France; ⁵Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil; ⁶Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Summary

Author for correspondence:
Marcia Margis-Pinheiro
Tel: +55 51 3308 9814
Email: marcia.margis@ufrgs.br

Received: 21 November 2010
Accepted: 10 January 2011

New Phytologist (2011)
doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03659.x

Key words: antioxidant, ascorbate peroxidase, H₂O₂ scavenging, heme peroxidase, peroxidase, redox, single copy gene.

- Peroxidases are involved in several important processes, such as development and responses to environmental cues. In higher plants, most peroxidases are encoded by large, multigenic families that mainly originated from gene and chromosomal duplications.
- Using phylogenetic, genomic and functional analyses, we have identified and characterized a new class of putative heme peroxidases, called ascorbate peroxidase-related (APx-R), which arose specifically in the lineage of plants.
- The APx-R protein is structurally related to the ascorbate peroxidases, although the active site contains many conserved substitutions. Unlike all other plant peroxidases, which are encoded by gene families, APx-R is encoded by a single-copy gene in virtually all the species analyzed. APx-R proteins are targeted to the chloroplast and can physically interact with chloroplastic APx proteins. APx-R-knockdown rice (*Oryza sativa*) plants presented delayed development and a disturbed steady state of the antioxidant system compared with wild type. Moreover, the accumulation of APx-R transcripts was modulated by drought, UV irradiation, cold, and aluminum exposure in rice, suggesting the involvement of APx-R in the environmental stress response.
- Our results reveal the existence of a new class of heme peroxidase which seems to play a role in the antioxidant system in plants, probably by modulating the activity of chloroplastic APx proteins.

Introduction

Peroxidases (EC 1.11.1.x) represent a large group of enzymes that reduce peroxide by using a wide variety of substrates, such as lignin subunits, lipid membranes, and some amino acid side chains. These enzymes are involved in a broad range of physiological processes, such as cross-linking of cell wall components, auxin metabolism, responses to stressful conditions, symbiosis, and cell elongation. Because of their multifunctional roles, peroxidase activity and

expression can be detected throughout the whole lifespan of various plants, from the early stage of germination to the final step of senescence (Passardi *et al.*, 2005).

Peroxidases can be heme or nonheme enzymes. The common feature of all heme peroxidases is the presence of a heme moiety (ferriprotoporphyrin IX). The heme-containing peroxidases oxidize a wide variety of substrates via an iron-oxo intermediate in which the heme group is converted from Fe(III) to Fe(IV), a process in which hydrogen peroxide is reduced to water with concomitant oxidation of the substrate. Heme peroxidases are classified into two major superfamilies: one is primarily found in bacteria, fungi, and

*These authors contributed equally to this work.

plants (Passardi *et al.*, 2007a); and the other is mainly found in animals, fungi and bacteria (Daiyasu & Toh, 2000; Furtmuller *et al.*, 2006). The former superfamily, known as 'nonanimal peroxidases' (Passardi *et al.*, 2007a), encompasses three classes of structurally related proteins containing a heme moiety, a histidine as a proximal ligand, and arginine and histidine residues as distal ligands. Class I includes ascorbate peroxidases (APxs), cytochrome *c* peroxidases (CcPs) and catalase peroxidases (CPs); class II comprises lignin peroxidases (LiPs), manganese peroxidases (MnPs), and versatile peroxidase (VP); and class III is only found in plants (Welinder *et al.*, 1992; Ruiz-Duenas *et al.*, 2001).

Class I is the largest class of the nonanimal peroxidase superfamily, and its members are found in all living organisms except Diplomonads, Parabasalids, Apicomplexa, Amoebozoa, and animals. APx and CcP are closely related. However, APx sequences are found in chloroplast-containing organisms, whereas CcP genes are found in most mitochondria-containing organisms. Except for the land plants, which contain only APx, chloroplastic organisms contain both APx and CcP sequences.

Purification of chloroplastic APx from tea (*Camellia sinensis*) leaves has indicated that the enzyme is a 34-kDa monomer that is labile in the absence of ascorbate (Chen & Asada, 1989). However, purification of pea (*Pisum sativum*) cytosolic APx revealed a 57.5-kDa homodimer that was stable in the absence of ascorbate (Mittler & Zilinskas, 1991). APxs purified from different plant species and tissues, such as tea leaves, maize (*Zea mays*) seedlings and leaves, and potato (*Solanum tuberosum*) tubers, have been isolated in both monomeric and dimeric forms (Chen & Asada, 1989; Elia *et al.*, 1992; Koshiha, 1993). In addition, the crystal structure of recombinant pea cytosolic APx supports the APx model as a noncovalent homodimer held together by a series of ionic interactions arranged around the two-fold noncrystallographic dimer axis (Patterson & Poulos, 1994).

In rice (*Oryza sativa*), the eight members of the APx gene family encode two cytosolic, two peroxisomal and three putative chloroplastic isoforms as well as an isoform that is targeted to the mitochondria (Teixeira *et al.*, 2004, 2006). In a previous phylogenetic study of APx genes (Teixeira *et al.*, 2004), an additional group of sequences closely related to APx was found in rice and in other plants. Here, we show that this additional group of genes belongs to a new family of heme peroxidases (ascorbate peroxidase-related (APx-R)), which are encoded by a single-copy gene and present only in plants. These genes encode proteins with a structure related to that of APxs. However, their active site has diverged and contains a set of new and conserved substitutions. Moreover, the conserved structure of APx-R genes is very different from those of previously characterized members of the APx gene families (Teixeira *et al.*, 2004). We show that the APx-R protein is dually targeted

to the chloroplast and mitochondria, and, because APx enzymes may exist as a dimer, we investigated and demonstrated the capabilities of chloroplastic and mitochondrial APxs to dimerize with APx-R.

Finally, we show that the accumulation of APx-R transcripts in rice is modulated in response to stress and that APx-R-knockdown rice plants have a disturbed steady state of the antioxidant system, indicating that this protein is required for the homeostasis of the hydrogen peroxide scavenging system in plants.

Materials and Methods

Data mining and *in silico* analysis

Exhaustive data mining was performed to identify new class I heme peroxidase-encoding sequences in plants (Teixeira *et al.*, 2004). All protein sequences used for the *in silico* analyses can be found in PeroxiBase (Passardi *et al.*, 2007b), (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr>). Protein sequences were aligned using CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), and alignments were further inspected and visually adjusted using GENEDOC version 2.6.002 (Nicholas *et al.*, 1997). Phylogenetic analyses were conducted with either complete protein sequences (excluding sorting peptides and membrane-binding regions) or four conserved domains only. After inspection and visual adjustment of the alignments, the phylogenetic analyses were reconstructed after protein sequence alignments using two different and independent approaches: the neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) methods. The NJ method was performed with MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). The molecular distances of the aligned sequences were calculated according to the p-distance parameter (as recommended by Dwivedi & Gadagkar, 2009) and using the JTT matrix-based method (Jones *et al.*, 1992). All gap and missing data in the alignments were accounted by pairwise deletion. Branch points were tested for significance by bootstrapping with 1000 replications. The ML analysis was performed using PHYML3.0 (Guindon & Gascuel, 2003) with the LG amino acid substitution model and NNI tree improvement. Branch points were tested for significance by bootstrapping with 100 replicates. The 316 protein sequences used for phylogenetic analysis are listed in Supporting Information Table S1.

Comparisons of Arabidopsis, soybean (*Glycine max*) and poplar (*Populus trichocarpa*) genomic sequences were conducted using MVISTA and GENOMEVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) (Mayor *et al.*, 2000). Genomic sequences were obtained from Phytozome (<http://www.phytozome.net>). Synteny analyses comparing 1-Mb-long chromosome blocks were conducted using the Plant Genome Duplication Database (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>). Dot plot analysis was conducted with

100-kb-long DNA sequences using the NUCLEIC ACID DOT PLOTS software (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/dnadot/>). Genomic sequences for *Selaginella moellendorffii* were also obtained from Phytozome.

The coexpression gene network around the *AtAPx-R* gene was constructed using the ATTED-II database ver. 6.0 (<http://atted.jp/>). The level of coexpression between two genes is measured using the mutual rank value (MR; Obayashi *et al.*, 2008). Briefly, the lowest MR value (minimum = 1) corresponds to the most important level of coexpression between a pair of genes.

Plant material and growth conditions

Rice plants (*Oryza sativa*) L. cv Nipponbare were grown in growth chambers with supplemental lighting (12 h dark : 12 h light; 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 28°C). For abiotic stress analyses, seeds were germinated on moistened filter paper at 28°C in the dark, and 4-d-old seedlings were transferred to plastic pots containing Furlani's solution (Furlani & Furlani, 1998) and grown at 28 \pm 2°C under 12 h dark : 12 h light in a growth chamber. The volume and pH of the nutrient solution were monitored daily. The nutrient solution was changed every 4 d. For the aluminum treatment, 2-wk-old seedlings were incubated for 8 h in Furlani's solution supplemented with 20 ppm AlCl_3 . The pH of the solution was adjusted to 4.5. Plants were sampled and immediately frozen at -80°C .

For drought stress, seedlings were grown up to the four-leaf stage on soil with a normal supply of water. After this stage, control plants were normally watered, while stressed seedlings had watering withheld for 6 or 14 d. For UV light treatment, plants were transferred to the growth chamber and exposed to continuous UV-B illumination (0.25 $\text{kJ m}^{-2} \text{min}^{-1}$) for 4 h on two separate days and then kept under normal light for recovery. Analyses were performed 24 h after the onset of UV irradiation.

For cold stress analysis, 4-wk-old plants were transferred to growth chambers and exposed for 6, 12 or 24 h to cold treatment (10°C). Control plants were maintained at 28°C.

Interaction assay performed using a protoplast-based bimolecular fluorescence complementation (BiFC) system

A BiFC assay was used for detection of protein–protein interactions in living cells (Walter *et al.*, 2004). The split-YFP constructs pX-NYFP, pY-CYFP, pGUS-NYFP and pGUS-CYFP, where X and Y correspond to the different APxs and APx-Rs tested, were produced using the plasmids pE3136, pE3134, pE3130, and pE3132 obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). pX-NYFP and pY-CYFP contain an N-terminal YFP (amino acids 1–155) coding sequence and a C-terminal YFP

(amino acids 156–239) coding sequence driven by the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, respectively. pGUS-NYFP and pGUS-CYFP contain in-frame fusions of GUS with N-terminal YFP and C-terminal YFP, respectively. The following primers were used in RT-PCR to amplify specific cDNA regions from rice cv Nipponbare RNA: *OsAPx05*, 5'-AAAAAGCAGGCTTCACAATGGC-CGTCGTGCACC-3' and 5'-AGAAAGCTGGGTCTGATTCAAGTTGAAATAC-3'; *OsAPx06*, 5'-AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCCGTCGTCCAC-3' and 5'-AGAAAGCTGGGTCTGATTCCAGTGAAAT-3'; *OsAPx07*, 5'-AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCGGCCAGCGAC-3' and 5'-AGAAAGCTGGGTCTGAACCGTCCAACGTGA-3'; *OsAPx-R*, 5'-CACCATGGAGCTCACTAATGTCCCCC-3' and 5'-TTAAGCTGATCTCCATGAGG-3'. The amplified cDNAs were introduced into the appropriate plasmids using the Gateway technology. The resulting vectors were used for protoplast transformation.

Protoplast isolation was performed essentially as described by Chen *et al.* (2006) and protoplast transformation followed the methodology reported by Tao *et al.* (2002).

Transformed protoplasts were incubated in the dark for 24–48 h at 27°C before imaging. Fluorescence microscopy was performed under an Olympus FluoView 1000 confocal laser scanning microscope equipped with a set of filters capable of distinguishing between green and yellow fluorescent protein (EGFP and EYFP, respectively) and plastid autofluorescence. Images were captured with a high-sensitivity photomultiplier tube detector.

Construction of the plant vector and plant transformation

A chimeric gene producing mRNA with a hairpin structure (hpRNA) was constructed based on the sequence of the *OsAPx-R* locus (LOC_Os08g41090.1). The following primers were used to amplify 267 bp of the *OsAPx-R* sequence: 5'-CACCATGGATCAATTTATATG-3' and 5'-ATGATTTTCGTAACAGTAA-3'. PCR products were cloned into the Gateway vector pANDA, in which hairpin RNA is driven by the maize ubiquitin promoter and an intron placed upstream of inverted repeats (Miki & Shimamoto, 2004). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation was performed as described previously (Upadhyaya *et al.*, 2000).

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen). The cDNAs were obtained by reverse transcription (RT) using Superscript II (Invitrogen) and a 23-polyT-V primer. Quantitative PCR was performed using *OsAPx-R* gene-specific primers: 5'-GAGAAGCCACAGCCATCTT-3' and 5'-TGCATCCTTGAAGTCGGTA-

3'. The following primers were used as internal controls to normalize the amount of mRNA in each sample: *OseFxlR* (5'-GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA-3') and *OseFxlF* (5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'); *OsFDHR* (5'-TTCCAATGCATTCAAAGCTG-3') and *OsFDHF* (5'-CAAAATCAGCTGGTGCTTCTC-3'). *OsUbiF* (5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3') and *OsUbiR* (5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'). Quantities of amplified products were compared by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Enzymatic extraction

Leaf samples (0.5 g FW) were ground to a fine powder in the presence of liquid N₂ in a mortar and extracted in 3 ml of ice-cold 100 mM K-phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.1 mM EDTA and 1 mM ascorbate for 5 min. After filtration through cheesecloth, the homogenate was centrifuged at 4°C at 15 000 *g* for 15 min, and the extract obtained was used for the determination of the different enzymatic activities. The protein content of crude enzyme extracts was estimated according to (Bradford, 1976), using BSA as standard.

Ascorbate peroxidase, catalase, and superoxide dismutase activities

Ascorbate peroxidase (APx, EC.1.11.1.11), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), and superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) activities were determined as previously described (Rosa *et al.*, 2010).

Hydrogen peroxide assay

The hydrogen peroxide (H₂O₂) content was assayed according to Gay *et al.* (1999), as adapted by Cheeseman (2006), using the Ferric-xylenol orange method (FOX) based on the reaction of the hydroperoxides with ferric-xylenol orange.

Lipid peroxidation (thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS))

The level of lipid peroxidation was determined in terms of the concentration of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) as described in Cakmak & Horst (1991) with minor modifications as described previously (Rosa *et al.*, 2010).

Homology modeling

The sequences of APx05, APx06, APx07 and APx-R proteins from rice (*O. sativa*) were submitted to template identification in the Protein Data Bank (PDB) (Berman

et al., 2000) to construct a 3D structure. The homologous structure of APx from tobacco (*Nicotiana tabacum*) (PDB ID: 1IYN), experimentally determined by X-ray diffraction at 1.6-Å resolution (Wada *et al.*, 2003), was used as a template to model APx05, APx06, and APx07, and the cytosolic APx from soybean (PDB ID: 1OAF) (Sharp *et al.*, 2003) was used to model APx-R. The program MODELLER9v6 (Sali & Blundell, 1993) was used to build the protein models, using a refined protocol of the comparative protein structure modeling methodology (Marti-Renom *et al.*, 2000). The model of each protein was evaluated and selected according to stereochemical quality as determined by PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). Dimer structures (APx05-APx-R, APx06-APx-R, APx07-APx-R and APx-R-APx-R) were built using the 1OAF dimer structure and subsequently submitted to refinement using molecular dynamics (MD) simulations (Fan & Mark, 2004).

Molecular dynamics

All calculations were performed using the GROMACS simulation suite (Van der Spoel *et al.*, 2005) and GROMOS96 force field (van Gunsteren *et al.*, 1996). Briefly, the 3D structures of possible dimer units formed between APx05, APx06, APx07 and APx-R were solvated with Simple Point Charge (SPC) and submitted to an energy minimization using the Steepest Descents algorithm. Counter ions (Na⁺) were added to neutralize the systems, and the Lincs method (Hess *et al.*, 1997) was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2 fs after an initial energy minimization. The dimers were submitted to MD simulations, where the initial 3 ns employed backbone constraints to support an adequate equilibration of the dimer models in solution. Three steps were used, decreasing the constant force from 10 000 to 5000 and 2000 kJ mol⁻¹, each step lasting 1 ns. After this equilibration step, the simulations were extended to 10 ns employing the Particle-Mesh Ewald method (Darden *et al.*, 1993). Temperature and pressure were kept constant by coupling protein and solvent to the external temperature and pressure baths with coupling constants of $\tau = 0.1$ and 0.5 ps, respectively (Berendsen *et al.*, 1987). The reference temperature of the systems was adjusted to 300 K after slowly heating from 50 to 300 K, in steps of 5 ps, each one increasing the reference temperature by 50 K.

Statistical analysis

Data represent mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by ANOVA followed by Duncan's *post hoc* test, using the statistical program SPSS 15.0 for Windows (<http://www.spss.com>). The values were considered statistically different when $P < 0.05$.

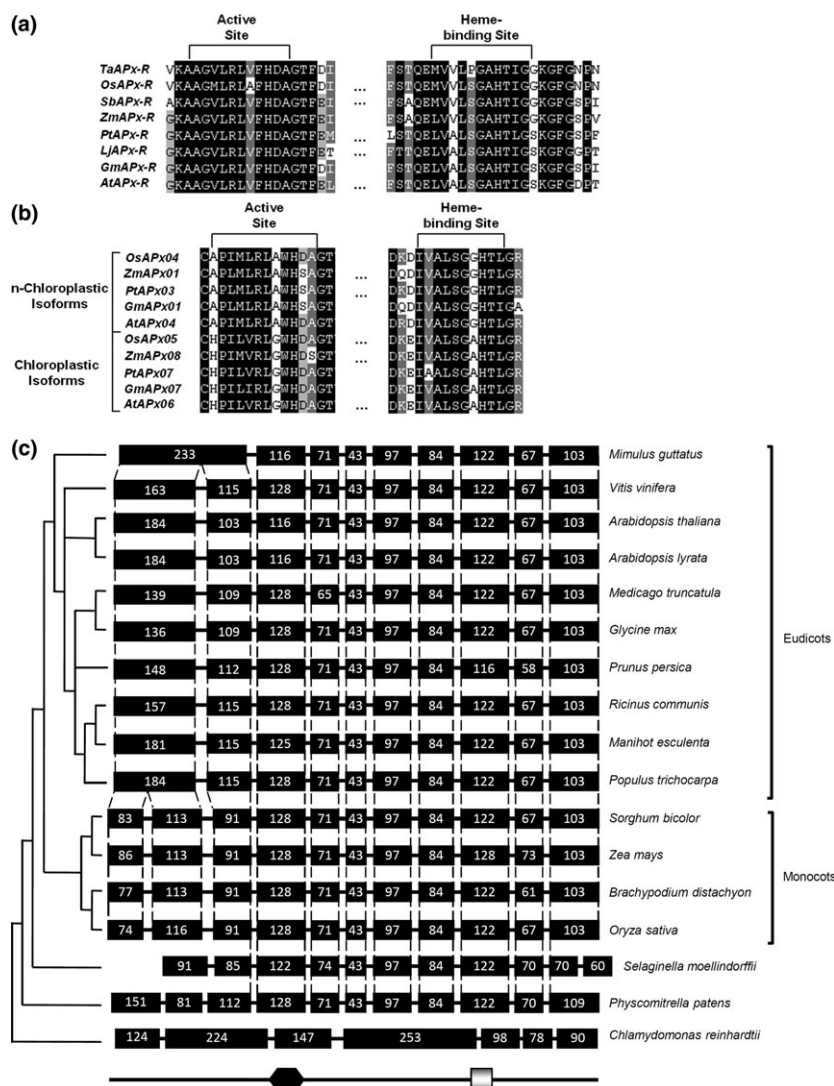


Fig. 1 Conserved amino acid residues corresponding to the active catalytic and heme-binding site centers in (a) ascorbate peroxidase-related (APx-R) and (b) APx, as well as (c) the structural organization of plant APx-R genes. (a, b) Semi-conserved residues present in > 50% of the aligned sequences are highlighted in gray. Residues conserved in all sequences are highlighted in black. (c) Exons are represented as black boxes. The size of each exon in bp is given. Continuous lines represent introns. The species are distributed according to their phylogenetic relationships. Relative positions of the active site (black hexagon) and the heme-binding site (gray rectangle) are shown below the genes.

Results

Identification of a new putative heme peroxidase (APx-R) gene in plants

A systematic search for APx-encoding sequences in the rice genome (Teixeira *et al.*, 2004) led us to identify a locus (*OsAPx-R*; LOC_Os08g41090) encoding a protein with high similarity to the APx primary structure but with degenerated catalytic sites (Fig. 1a,b). The overall structure of both the active and heme-binding domains, as well as their position within the protein primary structure, is conserved in relation to APx. However, substitutions at conserved residues in both domains stood out, notably including the phenylalanine that replaces the tryptophan residue preceding the distal histidine, which is conserved among all APxs described to date. Moreover, and in contrast to the APx families, which are encoded by multicopy

genes in the rice genome (Teixeira *et al.*, 2004, 2006), only one copy of this new APx-related gene, which was called *OsAPx-R*, was found in rice, on chromosome 8. To identify putative homologous sequences to the new *OsAPx-R* locus in other species, exhaustive BLAST searches were conducted in several public databases, including the GenBank and TIGR databases (all of the retrieved sequences are listed in Table 1). Despite our exhaustive searches, we failed to find sequences with high similarity to *OsAPx-R* outside the plant kingdom.

The complete genomic sequence was retrieved for 18 species in addition to rice, allowing us to determine the precise *APx-R* gene structure by comparing genomic and cDNA sequences (Fig. 1c). This analysis revealed the structural conservation of the *APx-R* genes, with the notable exception of the *Chlamydomonas reinhardtii* *APx-R* gene. The genomic structure of the *OsAPx-R* gene is markedly different (in terms of position and number of introns) from that of the highly

Table 1 Ascorbate peroxidase-related (APx-R)-encoding genes identified in different species of plant

Name	GenBank accession number	Species name	Complete CDS	TargetP prediction ¹
AcvAPx-R	BP918000.1	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	No	np ²
AcAPx-R	DV859040	<i>Agrostis capillaris</i>	No	np
AfpAPx-R	–	<i>Aquilegia formosa</i> × <i>Aquilegia pubescens</i>	Yes	Chloroplast
AmAPx-R	AJ798885	<i>Antirrhinum majus</i>	No	np
AlyAPx-R	XP_002869283.1	<i>Arabidopsis lyrata</i>	Yes	Chloroplast
AtAPx-R	NM_119384.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Yes	–
AsAPx-R	CN818988	<i>Avena sativa</i>	No	np
BdiAPx-R	–	<i>Brachypodium distachyon</i>	Yes	–
BnAPx-R	CN729137; EV107496	<i>Brassica napus</i>	Yes	Chloroplast
CreAPx-R	BI718422.1; BI995259.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Yes	–
CsaAPx-R	–	<i>Cucumis sativus</i>	No	np
EeAPx-R	DV152173	<i>Euphorbia esula</i>	No	np
FarAPx-R	DT712416	<i>Festuca arundinacea</i>	Yes	–
GmAPx-R	ACU18323	<i>Glycine max</i>	Yes	–
GhAPx-R	DW510671; DW503037	<i>Gossypium hirsutum</i>	Yes	Chloroplast
GrAPx-R	CO115625; CO070188	<i>Gossypium raimondii</i>	Yes	Chloroplast
HarAPx-R	EE625156.1	<i>Helianthus argophyllus</i>	No	np
HvAPx-R	–	<i>Hordeum vulgare</i>	Yes	–
LcAPx-R	BP040827	<i>Lotus corniculatus</i>	No	np
LeAPx-R	DB685290	<i>Lycopersicon esculentum</i>	No	np
MdAPx-R	CX025415	<i>Malus domestica</i>	No	np
MeAPx-R	DV446698.1	<i>Manihot esculenta</i>	No	np
MpAPx-R	BJ850114	<i>Marchantia polymorpha</i>	No	np
MtAPx-R	AC151482.27	<i>Medicago truncatula</i>	Yes	Chloroplast
OIAPx-R	NC_009362.1	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Yes	–
mAPx-R	CB213157	<i>Oryza minuta</i>	No	np
OsAPx-R	NC_008401.1	<i>Oryza sativa</i>	Yes	Chloroplast
PpaAPx-R	BY946235.1; DC949475.1	<i>Physcomitrella patens</i>	Yes	Chloroplast
PgAPx-R	EX373109.1; CO488325.1	<i>Picea glauca</i>	No	np
PsAPx-R	ES863371.1	<i>Picea sitchensis</i>	No	np
PtAPx-R	CV235026	<i>Populus trichocarpa</i>	Yes	Chloroplast
RcAPx-R	XP_002515511	<i>Ricinus communis</i>	No	np
SoAPx-R	CA169223.1; DV733615.1	<i>Saccharum officinarum</i>	No	np
SmAPx-R	–	<i>Selaginella moellendorffii</i>	Yes	–
StAPx-R	–	<i>Solanum tuberosum</i>	No	np
SbAPx-R	XP_002445876.1	<i>Sorghum bicolor</i>	Yes	–
ToAPx-R	DY820261.1	<i>Taraxacum officinale</i>	No	np
TaAPx-R	–	<i>Triticum aestivum</i>	Yes	–
VvAPx-R	AM448502; CAAP03010003.1	<i>Vitis vinifera</i>	Yes	–
ZmAPx-R	–	<i>Zea mays</i>	Yes	–

¹Prediction was estimated based on cut-off values for a specificity > 0.95.

²Putative subcellular localization was not predicted (np) for partial sequences. CDS, coding sequence.

conserved APx gene families (Teixeira *et al.*, 2004), suggesting that *OsAPx-R* is a member of a distinct family of genes.

Systematic phylogenetic analyses were carried out to determine the relationship of APx-R genes to other known peroxidases. Considering that APx-R genes are highly similar to APx and CcP, we first analyzed the relationships among these three types of peroxidases. All complete APx amino acid sequences present in the PeroxiBase were used (249 APx and 23 APx-R sequences) in addition to 20 CcP sequences. As an out-group, two di heme CcP sequences (SthDiHCcP and CchDiHCcP) and two class III peroxidase sequences (AtPrx01 and AtPrx06) were added to the analysis. Three main clusters were visualized (Fig. 2); the major group (represented in blue in Fig. 2) corresponds to all APx pro-

teins, independently of subcellular localization (Teixeira *et al.*, 2004); the second group (represented in gray) is more closely related to APx and encompasses all CcP sequences; and more distantly, APx-R sequences formed a separate monophyletic group (represented in red). The tree obtained by the NJ method exhibited a similar topology to the phylogenetic tree generated after ML reconstruction (Fig. S1). Taken together, these results indicate that APx-R genes do not represent a divergent subgroup in the APx family but rather a new family or class of peroxidase.

To further investigate the evolution of APx-R proteins, we aligned eight complete APx-R protein sequences (Table 1) with 61 other heme peroxidase sequences, including members of classes I, II, and III (see Materials and

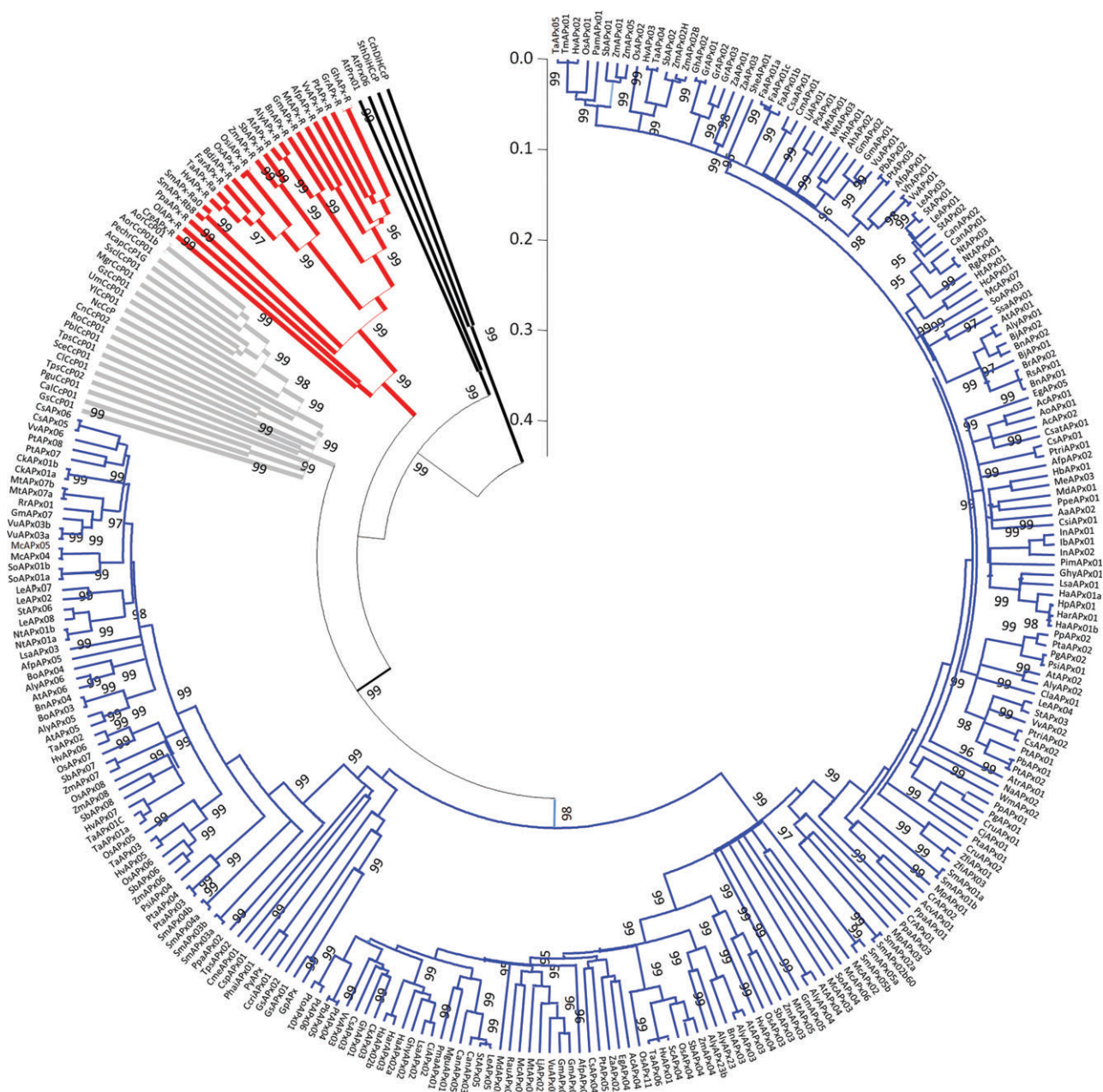


Fig. 2 Phylogenetic relationships between ascorbate peroxidase-related (APx-R) proteins and other class I peroxidases. Phylogenetic analyses were conducted using complete protein sequences of 249 ascorbate peroxidases (APxs), 20 cytochrome c peroxidases (CcPs) and 23 APx-Rs (gene accession numbers are given as in Peroxibase; <http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>). Two Di-haem cytochrome C peroxidase (DiHCcP) and two peroxidase (Prx) protein sequences were used as the out-group. All phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 4.0. The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method and are in units of number of amino acid substitutions per site. The analysis involved 296 amino acid sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. A total of 592 amino acid positions were used in the final data set. Trees were constructed using the neighbor-joining method with pairwise deletion. The phylogeny test used was the interior-branch test with 1000 replications and statistical supporting values shown in main tree condensed branches. The same topology within each group was recovered by maximum-likelihood (ML) methods as described in the Materials and Methods section.

Methods). Two phylogenetic analyses were conducted (Fig. 3). The first was based on entire protein sequences, only excluding sorting peptides and membrane-binding regions (Figs 3a, S2). The second focused on four sequence boxes conserved among all heme peroxidases (Fig. 3b),

including the catalytic and the heme-binding sites (from residues *c.* 40 to *c.* 50 and from *c.* 230 to *c.* 240, respectively; Henrissat *et al.*, 1990), as well as two other still uncharacterized conserved domains (from *c.* 120 to *c.* 150 and from *c.* 360 to *c.* 410; Fig. S3). Both analyses revealed

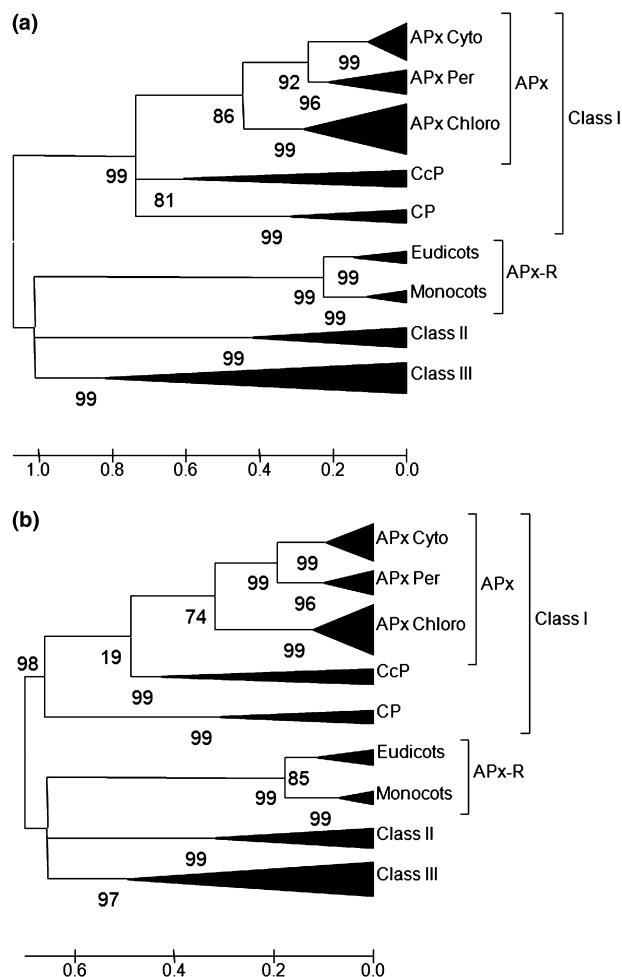


Fig. 3 Consensus phylogenetic trees constructed using 69 protein sequences representative of each clade of heme peroxidases in plants. Analyses were conducted (a) after the removal of targeting peptides and transmembrane domains at N- and C-termini, or (b) by comparing the four conserved boxes among all peroxidases (catalytic site, heme-binding site, and two other still uncharacterized domains described in Supporting Information Fig. S3). All phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 4.0. The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method and are in units of number of amino acid substitutions per site. The analysis involved 69 amino acid sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. A total of 410 (a) or 121 (b) amino acid positions were used in each final data set. Trees were constructed using the neighbor-joining method with pairwise deletion. The phylogeny test used was the interior-branch test with 1000 replications and statistical supporting values shown in main tree condensed branches. The same topology within each group was recovered by maximum-likelihood (ML) methods as described in the Materials and Methods section. APx, ascorbate peroxidase; APx-R, ascorbate peroxidase-related; CcP, cytochrome *c* peroxidase; Chloro, chloroplasmic; CP, catalase peroxidase; Cyto, cytosolic; Per, peroxisomal.

that APx-R sequences form a separate, monophyletic group that is completely independent of and divergent from class I heme peroxidases. In addition, sequence divergence within

Table 2 Position of the ascorbate peroxidase-related (APx-R) locus in the genomes of several plants

Plant species	Chromosome	Position (Mb)
Eudicots		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4	15
<i>Glycine max</i>	6	5
<i>Medicago truncatula</i>	3	20
<i>Populus trichocarpa</i>	6	25
<i>Prunus persica</i>	1	38
<i>Vitis vinifera</i>	4	4
Monocots		
<i>Brachypodium distachyon</i>	3	42
<i>Oryza sativa</i>	8	26
<i>Sorghum bicolor</i>	7	62
<i>Zea mays</i>	1	189

the APx-R group is sufficient to define the groups of monocots or eudicots exclusively. This is consistent with the structure of monocot and eudicot APx genes, which can be distinguished based on a conserved intronic insertion that splits the first eudicot APx-R exon into two exons in monocots (Fig. 1c). Notably, the distribution of all previously characterized groups in both phylogenetic analyses agrees with our expectations (Passardi *et al.*, 2007a).

Analysis of the genomic regions containing the APx-R gene in Arabidopsis, rice and poplar

Only one APx-R-encoding sequence was detected for virtually all plant species analyzed. To investigate this further, we performed a systematic analysis of intra-genomic duplication events that involve the chromosome region containing the APx-R in several plant species, including the eudicots Arabidopsis, *G. max* (soybean), *Medicago truncatula*, *Populus trichocarpa* (poplar), *Prunus persica* (peach), and *Vitis vinifera* (grape vine), as well as the monocots *Brachypodium distachyon*, *O. sativa* (rice), *Sorghum bicolor* and *Z. mays* (maize). To do so, we first characterized the chromosome regions containing the APx-R gene in these species (Table 2). Synteny was observed either among the eudicots or among the monocots, although no synteny between these two groups was detected (data not shown). To exemplify the synteny observed between eudicots, we compared the genomic regions flanking the APx-R gene in Arabidopsis and poplar (Fig. 4a; Table 2). Given the differences in genome size and compaction between these two species, *c.* 150 kb of Arabidopsis chromosome 4 was compared with *c.* 450 kb of poplar chromosome 6 (LG_VI). The upper limits of conservation observed in this comparison are coincident with the exons of syntenic genes (Fig. 4b). Indeed, 21 out of the 37 genes (*c.* 55%) present in the 150 kb of Arabidopsis chromosome 4 surrounding the APx-R locus are also present in the fragment of poplar chromosome 6 analyzed (data not shown).

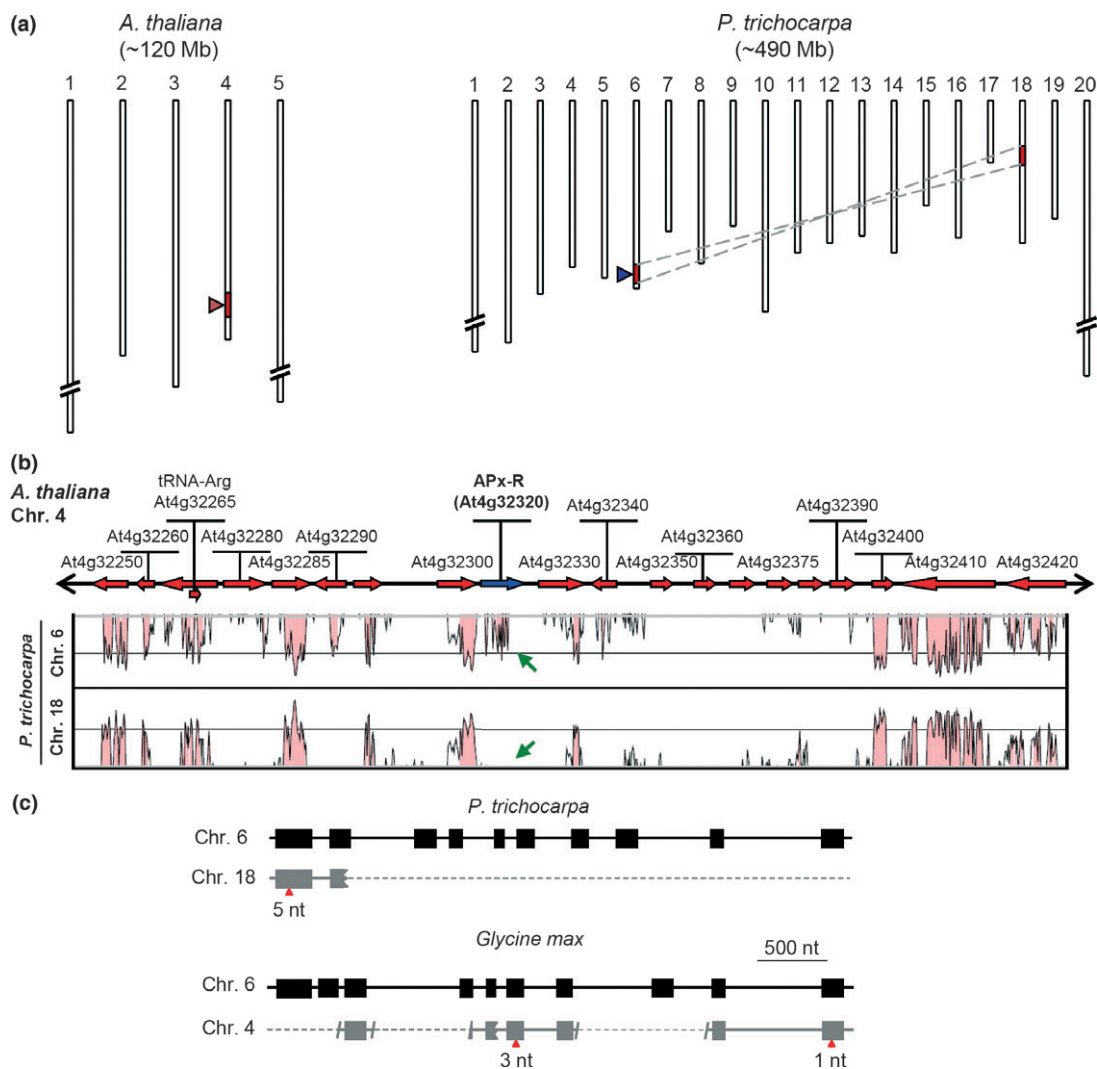


Fig. 4 Analysis of chromosome duplications involving the region containing the ascorbate peroxidase-related (*APx-R*) locus in Arabidopsis, poplar (*Populus trichocarpa*), and soybean (*Glycine max*). (a) The *APx-R* locus maps to chromosome (chr.) 4 in Arabidopsis and to chr. 6 in poplar. In poplar, genomic analyses revealed that the chromosome region containing the *APx-R* locus was recently duplicated to chr. 18 (represented by the dotted lines; for details on genomic analysis results, see Table 3). (b) Comparative analyses between the genomic region containing the *APx-R* locus in Arabidopsis (chr. 4) and the two duplicated regions (chr. 6 and 18) present in the poplar genome reveal the loss of the *APx-R* copy in the poplar chr. 18. Peaks correspond to conserved DNA sequences (in most cases exons) in the poplar chromosomes in relation to the Arabidopsis chr. 4 sequence. Horizontal arrows above the graphics represent the annotated genes present in Arabidopsis chr. 4 (AGI codes are shown). The *AtAPx-R* gene is represented in blue, and nearby genes are in red. The green arrows indicate the presence of the *APx-R* gene on poplar chr. 6 and its absence on poplar chr. 18. The *vista* program (www-gsd.lbl.gov/vista/) was used in this analysis. (c) Schematic representation of the *APx-R* genes (black) and the relics of their duplicated copies (pseudogenes, in gray) in poplar and soybean. Exons and introns are represented as boxes and lines, respectively. Disrupted exons are represented as incomplete boxes. Red triangles, small deletions; dashed lines, large deletions.

Then, we determined the recent intra-genomic duplication events involving the chromosome region containing the *APx-R* locus in each species (Table 3) using the Plant Genome Duplication Database (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>). Except for maize, intra-genome duplication events were observed for all the analyzed species, and all of these probably concern species-specific duplication events. For example, two and 10 duplication events could be observed in *M. truncatula* and in *P. trichocarpa*, respectively.

The extent of conservation in relation to the chromosome region containing the *APx-R* varies for each intra-genomic duplicated copy, which probably reflects the age of the duplication event. We used 1-Mb blocks to determine the extent of conservation of each duplicated copy in relation to the region containing the *APx-R* locus (Table 3). In some cases, the extent of conservation was low (Table 3; small blocks), suggesting that these duplicated chromosome copies originated a long time ago. Most of the intra-genomic

Table 3 Duplications of the genomic region containing the ascorbate peroxidase-related (*APx-R*) locus in several plant species were determined using the Plant Genome Duplication Database

Plant species	Chromosome	Position (Mb)	No. of anchors ¹ within 1 Mb	Score ²	<i>E</i> -value ³	Block size
Eudicots						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	10	73	3386	7.00E-175	Huge
	5	9	13	556	7.00E-43	Large
<i>Glycine max</i>	4	5	791	38 864	0	Huge
	17	8	25	1103	5.00E-141	Large
	15	1	18	791	2.00E-49	Large
	17	34	18	781	0	Large
	13	43	17	741	1.00E-34	Large
	14	13	13	543	6.00E-141	Large
	13	25	10	424	3.00E-45	Small
<i>Medicago trunculata</i>	8	26	18	602.5	0	Large
	1	3	14	548.7	2.00E-157	Large
<i>Populus trichocarpa</i>	18	2	212	10 756	0	Huge
	18	12	28	1284	1.80E-90	Large
	6	4	15	714	2.20E-40	Large
	6	18	10	512	1.80E-26	Small
	9	8	10	401	8.30E-13	Small
	16	1	9	356	5.70E-06	Small
	2	10	9	328	3.40E-16	Small
	5	24	9	327	1.50E-07	Small
	4	15	7	253	1.00E-10	Small
	3	6	7	265	3.00E-11	Small
	<i>Prunus persica</i>	1	37	14	576	4.70E-37
1		36	13	559	3.50E-32	Large
6		25	13	452	2.70E-06	Large
7		20	11	474	7.10E-14	Large
1		38	10	442	7.40E-22	Small
6		21	8	287	9.10E-07	Small
5		11	8	277	4.70E-14	Small
<i>Vitis vinifera</i>	1	33	7	255	2.50E-11	Small
	11	4	39	1508	1.00E-64	Large
	9	6	22	785	0.00E+00	Large
Monocots						
<i>Brachypodium distachyon</i>	4	39	124	5633	4.00E-30	Huge
<i>Oryza sativa</i>	9	19	218	7895	0	Huge
<i>Sorghum bicolor</i>	2	63	125	4774	6.00E-13	Huge

¹Anchors were defined by $E < 1e-5$ matches using BLASTP.

²Score was defined using MCSCAN (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/mcscan/>).

³*E*-value was determined using COLINEARSCAN (<http://colinear.cbi.pku.edu.cn/>).

duplicated blocks showed moderate conservation relative to the chromosome region containing the *APx-R* locus (Table 3; large blocks). In all of these cases, however, we did not observe any trace of the duplicated *APx-R* loci (data not shown).

In a few instances, the extent of conservation between the duplicated chromosome regions was indeed high (Table 3; huge blocks). Such intra-genome duplications, which include a recent duplication that produced part of poplar chromosome 18 (Fig. 4), present an impressive intra-genomic synteny when compared with the chromosome regions containing the *APx-R* loci (Fig. S4). In soybean, the most recently duplicated copy of the chromosome region containing the *APx-R* locus (chromosome 6) was found to be located on chromosome 4 (Table 3, Fig. S4c). As expected,

inspection of the intra-genomic duplication in poplar (Figs 4b, S4b) and in soybean (Fig. S4c) revealed that the extra copy of the *APx-R* gene was lost after duplication, in contrast to most of its neighboring genes. However, careful inspection of these recently duplicated chromosome copies allowed us to characterize the relics of the duplicated *APx-R* locus in both species (Fig. 4c). It is nonetheless worth noting the pronounced differences observed in the structure of these relics of the *APx-R* pseudogenes. Taken together, these results strongly suggest that the duplication of the *APx-R* genes itself may impose a significant adaptive disadvantage to the host.

We also inspected all other recently duplicated chromosome copies (Table 3; huge blocks), including a fairly well-conserved duplication found in the *Arabidopsis* genome

(Fig. S4a). However, we had no success in finding relics of *APx-R*, suggesting that the deterioration of *APx-R* duplicated copies is an extremely fast process. In agreement, dot plot analyses indicate that the duplicated copies in poplar and in soybean originated through more recent duplication events than that in *Arabidopsis* (Fig. S5). In fact, the surprising existence of two *APx-R* genes in the lycophyte *Selaginella moellendorffii* can be explained by the occurrence of a very recent duplication event involving the chromosome region containing the *APx-R* in this species. Indeed, dot plot analyses suggest that this duplication event is the most recent among all those studied here (Fig. S5).

APx-R is dually targeted to chloroplasts and mitochondria

To investigate the *in vivo* subcellular location of the rice APx-R protein, we constructed a translational fusion of *OsAPx-R* with the *YFP* gene driven by the 35S promoter of the CaMV. Transient expression in rice protoplasts of the fusion gene was performed and analyzed under a confocal laser-scanning microscope. Confocal analysis of protoplasts expressing the OsAPx-R::YFP fusion revealed that YFP fluorescence co-localized with chloroplasts (Fig. 5a–c). In addition, the fluorescence in some cells was localized to a smaller organelle distributed around the cytosol. The same pattern was observed when protoplast cells were stained with Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE), a mitochondria-specific fluorescent marker (data not shown). These results indicate that APx-R is a dually localized protein, targeted to both chloroplasts and mitochondria.

Potential interaction between APx-R and chloroplastic and mitochondrial APx isoforms

Since the purification of the cytosolic isoform of APx from *P. sativum*, it has been established that the isoforms of APx may assume a quaternary structure by dimerization (Mittler & Zilinskas, 1991). The capacity for dimerization indicates that protein–protein associations could play a role in the regulation of APx activity within plant cells. In this context, it would be important to determine the potential interaction between different isoforms of APx as well as between APx and APx-R. Given that APx-R localizes to mitochondria and chloroplasts, the association between APx-R and other APx isoforms located at these subcellular compartments (mitochondrial OsAPx06, chloroplastic OsAPx07, and dual target OsAPx05) was experimentally tested. These APx subcellular localizations were previously determined by experimental and *in silico* analyses (Teixeira *et al.*, 2004, 2006).

To examine the association of APx-R with APx05, APx06 or APx07 as well as the potential homodimerization and the subcellular localization of interactions in living plant cells,

BiFC was performed. Fusion proteins of full-length cDNAs of APx-R, APx05, APx06 or APx07 with either the N- or the C-terminal half of yellow fluorescent protein (YFPN or YFPC, respectively) were transiently expressed in pairwise combinations in rice protoplasts (Fig. 5g–r). As a positive control, fusions with the *GUS* gene were produced and transfected into rice protoplasts (Fig. 5d–f). As a negative control, the GUS and APx-R interaction was tested. No reconstitution of YFP fluorescence occurred in the negative control (data not shown). When APx-R::YFPN and APx5::YFPC or APx7::YFPC were co-expressed, strong fluorescence was detected in association with small organelles that also exhibited chlorophyll autofluorescence (Fig. 5g–i, m–o). These organelles may correspond to protoplastids. Merging the chlorophyll autofluorescence with YFP signals confirmed the localization of the interaction at plastids and/or protoplastids. For the co-expression of APx-R::YFPN and APx6::YFPC, the interaction occurred in chloroplasts and in small-sized spots corresponding to mitochondria (Fig. 5j–l). APx-R was also able to form homodimers, because the co-expression of APx-R::YFPN and APx-R::YFPC produced the same pattern of interaction obtained for other chloroplast-localized APx proteins (Fig. 5p–r). In summary, the BiFC analysis confirmed homo- and heterodimerization in mitochondria (for interaction with APx06) and plastids (for homodimerization and also interaction with APx05, APx06 or APx07).

Considering the similarity in sequence and function between different APxs, the potential dimerization of APx05, APx06, APx07 and APx-R from *O. sativa* was further explored by building homology models of these four proteins, using the *N. tabacum* and *G. max* APxs as templates. Because this soybean enzyme crystallizes as a dimer, the models for rice enzymes were constructed as potential dimers, including APx05-APx-R, APx06-APx-R, APx07-APx-R and APx-R-APx-R. Although all models were stereochemically adequate, a further refinement using MD simulations was performed on such structures to evaluate the stability of the complexes between isoforms of APxs in the presence of explicit solvent molecules. In all cases, the dimers remained stable over the time scale used, without major conformational modifications and with similar interaction energies ($\Delta H_{APx5-APx-R} = -528.08 \pm 58.07 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{APx6-APx-R} = -849.67 \pm 126.27 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{APx7-APx-R} = -626.60 \pm 86.89 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta H_{APx-R-APx-R} = -874.44 \pm 103.89 \text{ kJ mol}^{-1}$), suggesting the possibility that the evaluated dimers may occur in solution (Fig. 6).

The effect of *OsAPx-R* gene knockdown

To study the functional role of *APx-R* in plant development and antioxidant responses, we produced transgenic rice expressing a hairpin construct targeting the *APx-R* gene. Three independent transgenic lines carrying the hairpin

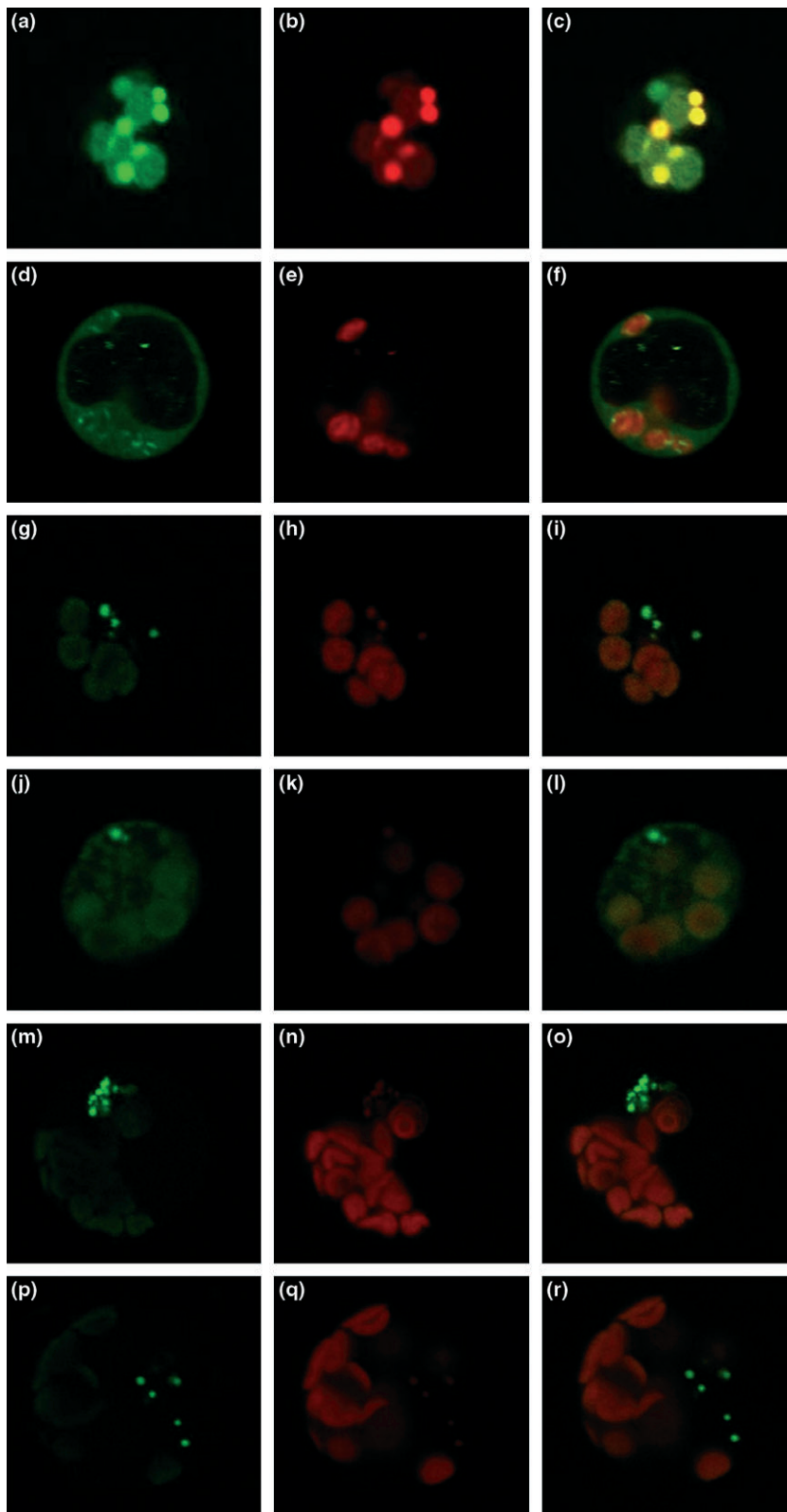


Fig. 5 Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is located in chloroplasts and mitochondria and interacts with ascorbate peroxidase isoforms that are targeted to these subcellular compartments in rice leaf protoplasts. Green signals indicate YFP fluorescence and red signals indicate chlorophyll autofluorescence. (a–c) Localization of APx-R in the chloroplasts of rice protoplasts through transient expression of the 35S-APx-R::YFP cassette. (d–f) Protoplast-based bimolecular fluorescence complementation (BiFC) system showing protein–protein interaction through YFP fluorescence restoration. (d–f) Positive control of interaction using 35S-GUS::YFP^N and 35S-GUS::YFP^C cassettes. (g–r) Restoration of YFP fluorescence through interaction of APx-R and (g–i) APx5, (j–l) APx6, (m–o) APx7 and (p–r) APx-R itself.

construct were analyzed. Plants regenerated from nontransformed calli were used as controls throughout the comparative analyses. During plant growth, transgenic plants

presented delayed development and were shorter than nontransformed plants (Fig. 7a), although all plants reached the same height by maturity and set seeds normally. Expression

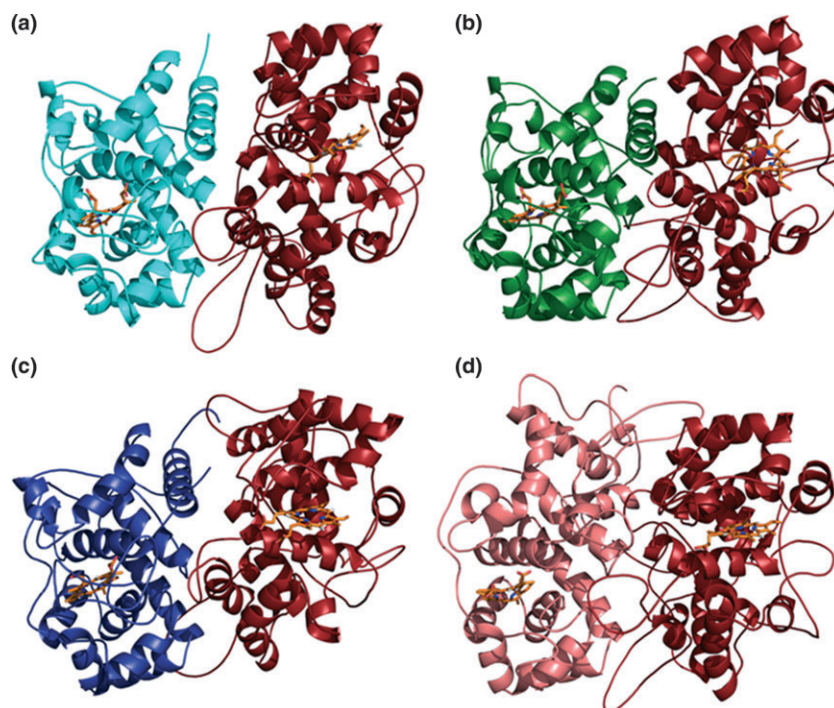


Fig. 6 Models obtained for rice ascorbate peroxidase (APx) after molecular dynamics (MD) simulations for: (a) APx5-APx-R, (b) APx6-APx-R, (c) APx7-APx-R, and (d) APx-R-APx-R. Proteins are colored according to the isoforms: APx5 (cyan), APx6 (green), APx7 (blue) and APx-R (salmon and red), while the heme group is orange.

analysis using RT-qPCR showed that the expression of *OsAPx-R* was strongly reduced in leaves of all transgenic lines when compared with the nontransformed plants (Fig. 7b).

Curiously, the H_2O_2 steady-state concentration was reduced in the knockdown lines (Fig. 7c). This reduction was associated with increased total APx enzymatic activity, which was up to two-fold greater than that of the wild-type plants, and with reduced activity of SOD, which catalyzes the dismutation of superoxide into hydrogen peroxide and oxygen (Fig. 7d). However, the total catalase (CAT) enzyme activity was reduced in transgenic plants compared with wild type (Fig. 7d); this reduction may be related to the fact that transgenic plants showed a higher content of TBARS, which is indicative of lipid oxidation (Fig. 7c).

APx-R transcripts are modulated by abiotic stress in rice

Given the impact of *APx-R* gene silencing on the function of the antioxidant system, we investigated the expression of the rice *APx-R* gene in response to stress conditions. *APx-R* expression was analyzed by RT-qPCR after subjecting rice plants to aluminum treatment (Fig. 8a), drought stress (Fig. 8b), UV light irradiation (Fig. 8c), or cold stress (Fig. 8d). The analyses revealed that *OsAPx-R* expression was up-regulated in response to aluminum treatment, water deficiency, and 24-h cold treatment, while it was down-regulated in plants subjected to UV-C irradiation. Taken together, these results indicate that the *APx-R* gene is modulated in response to environmental stress.

Discussion

Using phylogenetic, genomic and functional approaches, we have identified and characterized a new putative heme peroxidase, called APx-related (APx-R), which arose specifically in the lineage of plants. On the basis of the phylogenetic results (Figs 2, 3), and because the APx-R group formed before the divergence of plants, we propose that APx-R corresponds to a new class (class IV) of the group of nonanimal heme peroxidases.

Plants contain a large number of peroxidases, which are normally encoded by multigenic families that originated mostly from gene and chromosomal duplication.

In marked contrast, the presence of a single copy of the *APx-R* gene suggests that this locus is under strong selective constraints. *APx-R* could be lethal in multiple copies. This hypothesis is plausible but improbable, considering the role of peroxidases in the detoxification of free radicals. However, this protein could play a specific and essential role in plant metabolism other than ROS scavenging. To test this hypothesis, we produced transgenic rice plants overexpressing the *APx-R* gene. However, thus far, no obvious phenotypic alteration has been observed in these plants (data not shown). Although these transgenic lines do overexpress APx-R transcripts, we could not assume that they do so at the protein level. Additional plant transformation experiments are currently underway in our laboratory to confirm the absence of phenotype after *APx-R* overexpression. Nevertheless, it is also possible that a decrease in fitness caused by the presence of multiple copies may only occur in the wild or under specific stress conditions.

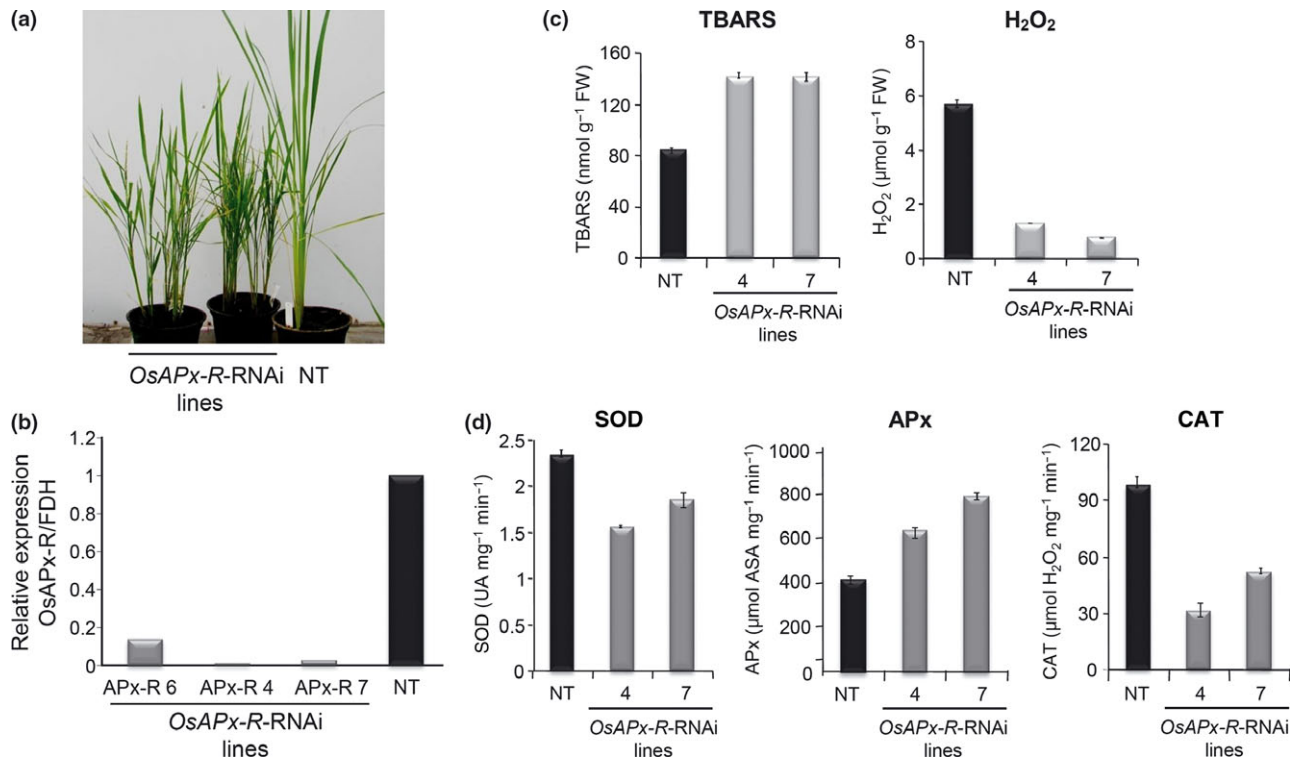


Fig. 7 Characterization of plants carrying the *OsAPx-R-RNAi* construct. (a) Nontransformed (NT) and two independent lines of *APx-R-RNAi* plants (silencing *Oryza sativa* ascorbate peroxidase-related (*OsAPx-R*)) grown under controlled conditions. (b) Quantitative determination of *OsAPx-R* mRNA in leaves of NT and three lines of silenced plants (lines 6, 4 and 7) grown under control conditions. The transcript level of *OsAPx-R* in NT plants was used to normalize transcript accumulation in silenced plants. The effect of *OsAPx-R* knockdown on (c) the content of hydrogen peroxide (H_2O_2) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and on (d) superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidases (APx) activities was assessed. Measurements were performed using 4-wk-old leaves of transgenic rice *OsAPx-Rs* (gray bars) and NT plants (black bars) grown under control conditions. Values represent the mean \pm SD ($n = 3$). Asterisks indicate statistically different means: *, $P < 0.05$. FDH, formaldehyde dehydrogenase.

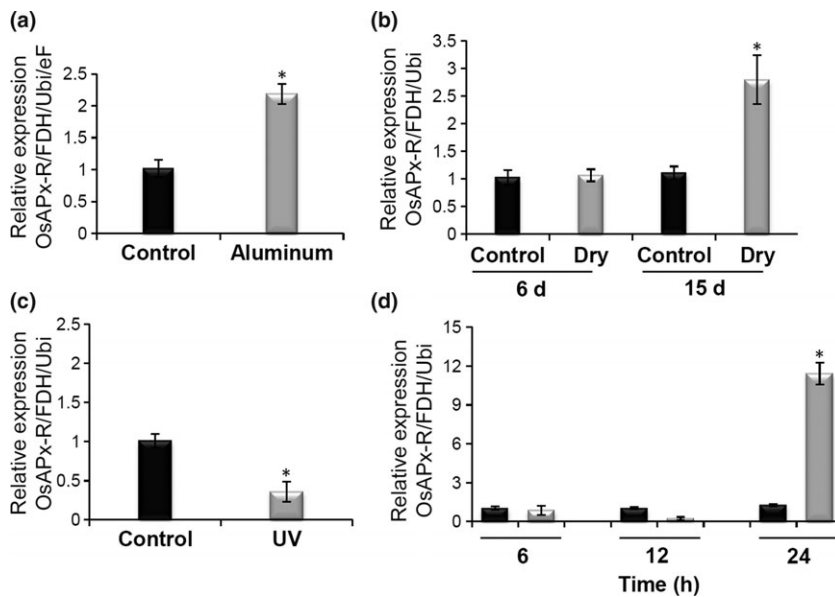


Fig. 8 Expression analysis of the *Oryza sativa* ascorbate peroxidase-related (*OsAPx-R*) genes in response to (a) aluminum treatment, (b) drought stress, (c) UV-B irradiation, and (d) cold stress. Rice plants were subjected to 20 ppm aluminum for 8 h. For drought stress, plants were cultivated for 6 or 15 d under drought conditions. For the experiment with UV treatment, seedlings were subjected to 4 h of UV-C irradiation, and leaves were collected 24 h after this treatment. In the cold-shock stress (black bars, control; gray bars, cold shock), seedlings were maintained for 6, 12 or 24 h at 10°C. Values represent the mean \pm SD ($n = 4$). Asterisks indicate statistically different means: *, $P < 0.05$. FDH, formaldehyde dehydrogenase; Ubi, ubiquitin; eF, elongation factor.

To determine whether *APx-R* is linked to another locus under strong selective pressure, we performed a systematic analysis of duplication events that enclose the chromosome

region containing *APx-R* in several plant species and determined the duplication events involving the chromosome region containing the *APx-R* locus in each species

(Table 3). Our analyses revealed that there is evidence that *APx-R* systematically returns to single-copy status after subsequent chromosomal duplications. For example, the analysis of a recent duplication of the poplar chromosome 6 region containing the *APx-R* locus revealed that the second *APx-R* copy was specifically eliminated during evolution (Fig. 4b). In soybean, only relics of the duplicated *APx-R* locus are still present in the duplicated chromosome copy (Fig. 4c). In poplar, other genes found within the chromosome 6 region containing the *APx-R* locus are also present as single-copy genes in the genome, although this region has been recently duplicated. However, these genes are scattered along the chromosome block containing the *APx-R* gene and are probably not directly related to events driving the evolution of *APx-R*. It is nonetheless worth noting that in all these instances the retained copy is present in poplar chromosome 6 (data not shown), although it is not clear why.

The *APx-R* gene encodes a protein that is dually targeted to chloroplasts and mitochondria in rice. Duarte *et al.* (2010) recently showed that genes encoding proteins localized in organelles are more commonly single copy than expected by chance. They claim that the strong association between organellar (chloroplast and mitochondria) targeted gene products and the shared single-copy genes identified in their study supports the hypothesis that coordination of protein complexes, such as those involved in electron transport in both the plastid and mitochondrion, requires an evolutionarily stable copy number because these nucleus-encoded proteins interact with organelle-encoded proteins (Duarte *et al.*, 2010). However, the mechanism that could explain the evolutionary forces responsible for this bias is not yet known. Also, and in marked contrast to *APx-R*, it is important to note that *APx* genes encoding chloroplast-targeted proteins are present in multiple copies in several plant species (Teixeira *et al.*, 2004).

To elucidate the metabolic processes in which APx-R could be involved, genes sharing the same expression pattern as *AtAPx-R* were identified (Fig. S6). The presence of genes sharing similar expression patterns in a co-expression network implies that these genes may be functionally related. Interestingly, most of the nuclear genes forming the network surrounding the *AtAPx-R* gene encode proteins that are confirmed or predicted to be localized to the chloroplast. In spite of this common subcellular localization, these proteins present a diverse of biological activities (Table S2), and their direct relationship with APx-R remains to be shown.

APxs have been purified in both monomeric and dimeric forms from different plant species and tissues (Chen & Asada, 1989; Elia *et al.*, 1992; Koshiha, 1993). Our BiFC assay showed that APx-R may form homo- or heterodimers when interacting with APx06, APx05 or APx07. The homology models indicate that these interactions can occur in solution

(Fig. 6). The homodimers and the interaction with APx05 and APx07 occur predominantly in plastids smaller than mature chloroplasts. However, merging of the chlorophyll autofluorescence with the YFP signal confirmed that these organelles are plastids (Fig. 5). Further analysis would be necessary to determine whether these organelles correspond to proplastids or, alternatively, to chloroplasts undergoing transformation to nonphotosynthetic gerontoplasts, as during leaf senescence chloroplasts gradually shrink and their numbers gradually decrease (Wada *et al.*, 2009). In support of this idea, *AtAPx-R* is preferentially expressed in senescent leaves (Genevestigator; <http://www.genevestigator.com>).

Total APx enzyme activity was increased significantly in transgenic *APx-R*-knockdown lines (Fig. 7d), being up to twice that found in nontransformed plants, and the H₂O₂ steady-state concentration was drastically reduced (Fig. 7c). The increase in total APx activity in the *OsAPx-R*-silenced plants was an unexpected result, and it is possible that it is directly related to the enhanced H₂O₂ scavenging in these plants. In any case, increased APx activity could be a secondary consequence of the modification of the antioxidant status inside the plant cell (reduced catalase activity, for example). Alternatively, it is possible that the expression of the *APx* genes could be regulated by *APx-R*. However, our analysis of the expression of all members of the *APx* gene family in the *APx-R*-silenced lines did not reveal any modulation in the levels of *APx* mRNA in these plants (data not shown). Therefore, the link between APx activity and *APx-R* expression does not result from the modulation of *APx* gene expression. Another possibility is that APx-R regulates the antioxidant responses by controlling post-translationally APx activity via protein–protein interactions. Considering this possibility and the interaction of APx-R and chloroplastic APx (Figs 5, 6), one may suggest that APx-R could interact with monomers of APx, controlling their activity.

In spite of APx activity enhancement, transgenic plants showed a higher content of TBARS than nontransformed plants (Fig. 7c), suggesting that transgenic plants presented higher levels of lipid oxidation than nontransformed plants, which could have resulted from the reduced SOD and CAT activities. Taken together, our data show that *APx-R* knockdown disturbed the steady state of the antioxidant system in rice. Thus, our results indicate that this new group of proteins is required for the homeostasis of the antioxidant system in plants and may be important in modulating the system at precise developmental stages or when plants are faced with stress conditions. Indeed, abiotic stresses such as drought, salinity and UV irradiation induce increased ROS concentrations in plant cells. *OsAPx-R* is also modulated during stress responses in rice. The modulation of *APx-R* expression in response to treatments that affect the ROS content inside the plant cell may indicate that, in spite of the presence of a degenerate catalytic center in the APx-R

protein and its potential role in controlling APx activity, this protein plays a role during the establishment of the antioxidant responses in diverse processes. Further studies are necessary to elucidate the exact mechanism by which APx-R and its interactions with APx isoforms control the steady state of the antioxidant system in plants.

Acknowledgements

This work was supported by the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB – CRP/06/003), UNESCO, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq). M. Margis-Pinheiro and R. Margis were supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil (303967/2008-0, 472174/2007-0 and 302684/2005-0).

References

- Berendsen HJC, Grigera JR, Straatsma TP. 1987. The missing term in effective pair potentials. *Journal of Physical Chemistry* 91: 6269–6271.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Research* 28: 235–242.
- Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Cakmak I, Horst WJ. 1991. Effect of aluminum on lipid-peroxidation, superoxide-dismutase, catalase and peroxidase-activities in root-tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83: 463–468.
- Cheeseman JM. 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany* 57: 2435–2444.
- Chen GX, Asada K. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves – occurrence of 2 isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology* 30: 987–998.
- Chen SB, Tao LZ, Zeng LR, Vega-Sanchez ME, Umemura K, Wang GL. 2006. A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice. *Molecular Plant Pathology* 7: 417–427.
- Daiyasu H, Toh H. 2000. Molecular evolution of the myeloperoxidase family. *Journal of Molecular Evolution* 51: 433–445.
- Darden T, York D, Pedersen L. 1993. Particle mesh Ewald – an N Log(N) method for Ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics* 98: 10089–10092.
- Duarte JM, Wall PK, Edger PP, Landherr LL, Ma H, Pires JC, Leebens-Mack J, dePamphilis CW. 2010. Identification of shared single copy nuclear genes in *Arabidopsis*, *Populus*, *Vitis* and *Oryza* and their phylogenetic utility across various taxonomic levels. *BMC Evolutionary Biology*. doi: 10.1186/1471-2148-10-61.
- Dwivedi B, Gadagkar SR. 2009. Phylogenetic inference under varying proportions of indel-induced alignment gaps. *BMC Evolutionary Biology*. doi: 10.1186/1471-2148-9-211.
- Elia MR, Borraccino G, Dipierro S. 1992. Soluble ascorbate peroxidase from potato-tubers. *Plant Science* 85: 17–21.
- Fan H, Mark AE. 2004. Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques. *Protein Science* 13: 211–220.
- Furlani AMC, Furlani PR. 1998. Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e de seleção de plantas em condições nutricionais adversas. *Technical bulletin Instituto Agronomico de Campinas* 121: 1–34.
- Furtmuller PG, Zederbauer M, Jantschko W, Helm J, Bogner M, Jakopitsch C, Obinger C. 2006. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445: 199–213.
- Gay C, Collins J, Gebicki JM. 1999. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Analytical Biochemistry* 273: 149–155.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.
- van Gunsteren WF, Billeter SR, Eising AA, Hünenberger PH, Krueger P, Mark AE, Scott WRP, Tironi IG. 1996. Simulation, biomolecular. In: Hochschulverlag AG, ed. *The GROMOS96 manual and user guide*. AG Zürich, Groningen: ETH Zürich and BIOMOS.
- Henrissat B, Saloheimo M, Lavaitte S, Knowles JKC. 1990. Structural homology among the peroxidase enzyme family revealed by hydrophobic cluster analysis. *Proteins* 8: 215–217.
- Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije J. 1997. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* 18: 1463–1472.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275–282.
- Koshiba T. 1993. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant and Cell Physiology* 34: 713–721.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. 1993. Procheck – a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26: 283–291.
- Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29: 291–325.
- Mayor C, Brudno M, Schwartz JR, Poliakov A, Rubin EM, Frazer KA, Pachter LS, Dubchak I. 2000. Vista: visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. *Bioinformatics* 16: 1046–1047.
- Miki D, Shimamoto K. 2004. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiology* 45: 490–495.
- Mittler R, Zilinskas BA. 1991. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* 97: 962–968.
- Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DW. 1997. Genedoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNW NEWS* 4: 14.
- Obayashi T, Hayashi S, Shibaoka M, Saeki M, Ohta H, Kinoshita K. 2008. Coexpressdb: a database of coexpressed gene networks in mammals. *Nucleic Acids Research* 36: D77–D82.
- Passardi F, Bakalovic N, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M, Penel C, Dunand C. 2007a. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* 89: 567–579.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24: 255–265.
- Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixeira F, Margis-Pinheiro M, Ioannidis V, Penel C, Falquet L *et al.* 2007b. Peroxibase: the peroxidase database. *Phytochemistry* 68: 1605–1611.
- Patterson WR, Poulos TL. 1994. Characterization and crystallization of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 269: 17020–17024.
- Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JA, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto J, Margis R, Margis-Pinheiro M. 2010. Cytosolic apx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry* 71: 548–558.

- Ruiz-Duenas FJ, Chau TAL, Perez-Boada M, Martinez MJ, Martinez AT. 2001. Heterologous expression of a ligninolytic versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii* in *Aspergillus* species. *Journal of Inorganic Biochemistry* 86: 411.
- Sali A, Blundell TL. 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology* 234: 779–815.
- Sharp KH, Mewies M, Moody PCE, Raven EL. 2003. Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex. *Nature Structural Biology* 10: 303–307.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- Tao LZ, Cheung AY, Wu HM. 2002. Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression. *Plant Cell* 14: 2745–2760.
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvao VC, Margis R, Margis-Pinheiro M. 2006. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* 224: 300–314.
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Margis R, Margis-Pinheiro M. 2004. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution* 59: 761–770.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Upadhyaya NM, Surin B, Ramm K, Gaudron J, Schunmann PHD, Taylor W, Waterhouse PM, Wang MB. 2000. Agrobacterium-mediated transformation of Australian rice cultivars jarrah and amaroo using modified promoters and selectable markers. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 201–210.
- Van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. 2005. Gromacs: fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry* 26: 1701–1718.
- Wada K, Tada T, Nakamura Y, Ishikawa T, Yabuta Y, Yoshimura K, Shigeoka S, Nishimura K. 2003. Crystal structure of chloroplastic ascorbate peroxidase from tobacco plants and structural insights into its instability. *Journal of Biochemistry* 134: 239–244.
- Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T, Makino A. 2009. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology* 149: 885–893.
- Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C *et al.* 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal* 40: 428–438.
- Welinder KG, Mauro JM, Nørskovlauritsen L. 1992. Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochemical Society Transactions* 20: 337–340.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 Phylogenetic relationships among ascorbate peroxidase-related (APx-R) proteins and other class I peroxidases (APx, cytochrome *c* peroxidase (CcP) and catalase peroxidase (CP)) using maximum-likelihood reconstruction methods.

Fig. S2 Phylogenetic trees with complete topology representing the 69 protein sequences representative of each clade of plant heme peroxidases using neighbor-joining and maximum-likelihood reconstruction methods.

Fig. S3 Alignment of the conserved domains of 74 plant heme peroxidase sequences.

Fig. S4 Overall synteny between the chromosome regions containing the ascorbate peroxidase-related (*APx-R*) gene and their most recently duplicated copy present in the (a) Arabidopsis, (b) poplar and (c) soybean genomes.

Fig. S5 Dot plot analysis was used to determine the extent of DNA sequence similarity between the region containing the ascorbate peroxidase-related (*APx-R*) gene and its most recently duplicated copy in a given genome.

Fig. S6 The coexpressed gene network around the ascorbate peroxidase-related (*APx-R*) gene (At4g32320) in Arabidopsis is mainly composed of nuclear-encoding chloroplastic genes.

Table S1 List of proteins used for the phylogenetic analysis

Table S2 Annotation and subcellular localization prediction of all genes that form the coexpression network around the ascorbate peroxidase-related (*APx-R*) gene in Arabidopsis

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.