**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Consequências da expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* de *Pisum sativum* em plantas de *Nicotiana tabacum*: impactos no proteoma foliar, montagem dos fotossistemas e influência no desenvolvimento vegetal

José Matheus Camargo Bonatto

Dissertação apresentada para a obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas

**Piracicaba
2010**

José Matheus Camargo Bonatto
Biólogo

Consequências da expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* de *Pisum sativum* em plantas de *Nicotiana tabacum*: impactos no proteoma foliar, montagem dos fotossistemas e influência no desenvolvimento vegetal

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Bonatto, José Matheus Camargo

Consequências da expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* de *Pisum sativum* em plantas de *Nicotiana tabacum*: impactos no proteoma foliar, montagem dos fotossistemas e influência no desenvolvimento vegetal / José Matheus Camargo Bonatto. - - Piracicaba, 2010.

109 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Cloroplastos 2. Ervilha 3. Expressão gênica 4. Fotossíntese 5. Fumo 6. Plantas transgênicas 7. Ritmo circadiano I. Título

CDD 633.71
B699c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*“E agora, José?
A festa acabou,
a luz apagou,
o povo sumiu,
a noite esfriou,
e agora, José?...”*

Carlos Drummond de Andrade

Aos Meus Pais; Maria Virginia e José Carlos,

Ao meu Irmão José Thiago,

Pelos ensinamentos de Princípios e Valores para toda a Vida,

Ofereço.

À minha Amada Namorada Laila,

Por todo o Amor, Amizade, Carinho e Apoio,

Dedico.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Labate, por toda a oportunidade e confiança depositada em mim, pela amizade e orientação desde a minha graduação e neste mestrado.

A Dr^a. Mônica T. V. Labate, pela amizade, sugestões e auxílio na execução dos PRCs quantitativos e troca de experiência em MET.

Ao meu grande amigo Alexander de Andrade, pois, se eu sei algo de Proteômica, aprendi e devo tudo a você.

Aos meus queridos amigos e estagiários Ivan M. Mozol, Felipe G. Marques e Júlia Morosini, pois sem a ajuda e colaboração de vocês, jamais conseguira executar essa dissertação. Muito obrigado na análise dos 2D-PAGE, preparo de amostras para MS/MS e cooperação no MET.

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima, Prof. Dr. Francisco A. O. Tanaka e ao técnico Renato Salaroli, pela imersa ajuda e aprendizagem no microscópio eletrônico de transmissão.

Aos meus grandes Amigos de laboratório; que nas horas mais difíceis desse mestrado, contei com Vocês: Tiago Falda Leite, Ilara Gabriela F. Budzinski (que difícil!) e M. Juliana C. Rodrigues, os quais enfrentamos juntos as maravilhosas disciplinas obrigatórias; à Fernanda Salvato por dividir o difícil fardo de operar o espectrômetro de massas; ao Luis Felipe Boaretto pelas constantes contribuições, sugestões e aprendizagem em todo meu trabalho; o meu muito obrigado!

Aos colegas de laboratório: Daniela D. do Nascimento, David H. Moon, Edenilson Rabello, Gisele Lacerda, Juliano Bragatto, Hana K. P. da Silva, Gabriela B. Lavorente, Lilia Barbosa e Simone Bragatto pela convivência e ajuda no decorrer desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – (2008/03280-6) pelas bolsas concedidas, que tornaram possível a execução dessa dissertação.

Aos meus dois grandes amigos Guilherme Moro, o Lonzo; e Fernando T. Zamunér, o Spigão; que apesar da distância, sempre foram presentes durante minha pós-graduação; não se esqueçam: “Mas tudo acaba onde começou!”

Aos amigos os quais tive a felicidade de morar junto e que tornaram esses Sete anos em Piracicaba inesquecíveis; em especial aos espartanos que tive o privilégio de conviver, alias de viver, durante esse mestrado: Daniel, Carol Z, Eduardo, Saito Japonês, Priscila, Andréas, Bianca Pâtxo, Maíra, Fernanda Romã, Carina Pitanga, Tiago Shell, Camila Ort's, Carol X, Marcelo, Carlos Zóio e o meu muito Obrigado à Tia estatística Chris** ($p < 0,05$) pela imensa ajuda no programa SAS e na formatação. Deixo o meu muito Obrigado à todos, e espero que a nossa amizade não morra com a fúnebre despedida e minha derradeira partida, pois afinal de contas “This is Spartaaaaaa!”

À segunda turma do curso de Ciências Biológicas, ESALQ-USP, meus queridos amigos, os quais no lado de vocês vivi um sonho de estudar e me formar biólogo. Valeu a pena.

À Deus, por iluminar todo o meu caminho, me amparando e dando forças para avançar sob as dificuldades; sabedoria e serenidade para aprender com elas, e por colocar na minha vida pessoas maravilhosas as quais tenho a oportunidade de oferecer, dedicar e agradecer.

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Importância da fotossíntese	23
2.2 O processo fotossintético	24
2.3 O complexo antena	25
2.4 Transformação genética de <i>Nicotiana tabacum</i> com o gene <i>Lhcb1*2</i> de ervilha	28
2.5 Efeitos pleiotrópicos da expressão do gene <i>Lhcb1*2</i> de ervilha em <i>Nicotiana tabacum</i>	30
2.6 A dinâmica da diferenciação de plastídios à cloroplastos	31
2.7 Ciclo Circadiano em Plantas	33
2.8 Proteoma: interação entre Genoma e Fisiologia	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Material vegetal e condições experimentais.....	37
3.2 Extração e quantificação das proteínas	37
3.3 Quantificação das proteínas.....	38
3.4 Separação das proteínas por 2D-PAGE	38
3.5 Detecção das proteínas.....	40
3.6 Obtenção e análise das imagens	40
3.7 Digestão das proteínas.....	41
3.8 Sequenciamento por Espectrometria de Massas	42
3.9 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão	43
3.10 PCR quantitativo	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Material Vegetal	49
4.2 Proteoma foliar de plantas transgênicas de <i>Nicotiana tabacum</i> que expressam constitutivamente o gene <i>Lhcb1*2</i> de ervilha	51
4.3 Eletroforese bidimensional	52

4.4 Identificação de proteínas diferencialmente expressas	56
4.5 Evolução estrutural dos plastídios à cloroplastos por microscopia eletrônica de transmissão	77
4.6 Análise por PCR quantitativo da evolução de plastídios à cloroplastos e do ritmo circadiano	85
5 CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS	103

RESUMO

Consequências da expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* de *Pisum sativum* em plantas de *Nicotiana tabacum*: impactos no proteoma foliar, montagem dos fotossistemas e influência no desenvolvimento vegetal

O complexo coletor de luz (LHC) do fotossistema II (PSII) é o principal complexo de proteínas associado a pigmentos situado na membrana dos tilacóides de cloroplastos em plantas. O LHCII funciona como uma antena de transferência de energia para a captura e direcionamento da energia luminosa do PSII para o PSI. A ação coordenada dos dois fotossistemas com o direcionamento do fluxo de elétrons gera a quebra da molécula de água, através da membrana do tilacóide, produzindo força assimilatória – ATP e NADPH. A energia química produzida na fotossíntese é de suma importância para a assimilação de carbono, biossíntese de aminoácidos e metabólicos secundários. Portanto, este é um importante gene para estudos em biotecnologia. Linhagens transgênicas de tabaco (TR-1 e TR-2) as quais expressam constitutivamente o transgene *Lhcb1*2* de ervilha obtidas por Labate e colaboradores (2004) foram utilizadas nesse trabalho. Estas plantas apresentaram diversos efeitos pleiotrópicos relacionados à anatomia, morfologia, bioquímica e fisiologia. Uma proteína pode não atuar isoladamente, mas frequentemente interagindo com outras proteínas, influenciando diversos processos metabólicos. O perfil de proteômica dessas linhagens transformantes, em relação à planta selvagem (WT) foi investigado. As proteínas totais foram extraídas de folhas de plantas de três meses crescidas em câmaras de crescimento, então separadas por 2D-PAGE. As proteínas diferencialmente expressas foram identificadas por LC-MS/MS. Os resultados mostram que 244 *spots* apresentaram alterações significativas na expressão nas duas linhagens transgênicas em relação à WT. 122 *spots* são expressos exclusivamente nas linhagens transformantes, e 24 *spots* somente na selvagem. Muitas proteínas como *ATP synthase* e *ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase* foram mais expressas nas linhagens transgênicas, mas a *glutamine synthetase*, uma importante proteína na reciclagem de nitrogênio nos cloroplastos, teve sua expressão diminuída. Para analisar as alterações na expressão

de genes relacionados ao ritmo circadiano entre outros, como a conformação do PSII, cotilédones de plântulas estioladas foram submetidas à luz e amostras coletadas depois de 0, 3, 6, 12 e 24 horas. O nível de transcritos foram analisados por PCR quantitativo. A diferenciação de plastídio à cloroplasto maduro foi analisado por microscopia eletrônica de transmissão, para se entender as diferenças entre os genótipos em estudo no desenvolvimento vegetal. A expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* de ervilha em plantas transgênicas de tabaco acarretou a indução e repressão de várias proteínas e genes em distintos passos de vias metabólicas, estabilizando a homeostase celular, exercendo uma influência significativa no desenvolvimento vegetal e produção de biomassa.

Palavras-Chave: Fotossistema II, Complexo Coletor de Luz, Proteoma, Ritmo Circadiano, Cloroplastos, Fotossíntese

ABSTRACT

Consequences of constitutive expression of *Lhcb1*2* gene of *Pisum sativum* in *Nicotiana tabacum* plants: Impact of leaves' proteomics, assembly of photosystem and influence of plant development

The light harvesting complex (LHC) of photosystem II (PSII) is the major ensemble of pigment-binding proteins situated in the thylakoid membranes of the chloroplast in plants. The LHCbII functions as an energy-transferring antenna for capturing and delivering light energy to the photosystems PSII and PSI. The coordinated actions of the two photosystems in turn drive the flow of electrons, generated by the splitting of water, through the thylakoid membranes to produce the assimilatory force – ATP and NADPH. The chemical energy produced by photosynthesis is very important for the assimilation of carbon, amino acids biosynthesis, and secondary metabolism. Therefore it is an important gene for biotechnological studies. Transgenic tobacco lines (TR-1 and TR-2) which express the pea *Lhcb1*2* transgene constitutively obtained by Labate *et al.* (2004) were used in this work. These plants presented pleiotropic effects related to anatomy, morphology, biochemistry and physiology. As a protein may not act by itself, but it is, frequently interacting with other proteins, influencing a lot of metabolic processes. The proteomic profile of these transgenic lines, in relation to the wild type (WT), was investigated. The total proteins extracted from leaves of three-month old plants grown in growth chambers were separated by 2D-PAGE. The differentially expressed proteins were identified by LC-MS/MS. The results showed that 225 spots displayed significant changes in the expression of the two transgenic lines in relation to the WT. 122 spots were exclusively expressed in the transgenic lines, and 24 only in the wild type. Many proteins as ATP synthase and ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase are overexpressed in the transgenic lines, but the glutamine synthetase, an important protein for nitrogen recycling in the chloroplasts, showed a reduced level of expression. In order to analyse the alterations of the expression of genes related to the circadian rhythm among others, involved in the conformation of the PSII, cotyledons from etiolated seedlings were then

exposed to light and samples collected after 0, 3, 6, 12 and 24 hours. The level of transcripts were analysed by RT/RT-PCR. The PSII conformation were analysed by transmission electron microscopy, with the aim of verifying the evolution of plastids into the chloroplasts which could be leading to changes in plant development. The overexpression of the pea *Lhcb1*2* gene in transgenic tobacco plants, lead to the induction and suppression of several proteins and genes in key metabolic pathways, as a way to establish a cellular homeostasis, exerting a significant influence on plant development and biomass production.

Keywords: Photosystem II, Light Harvesting Complex, Proteomics, Circadian rhythm, Chloroplasts, Photosynthesis

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
3-PGA	Ácido 3-fosfoglicérico
ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina 5-difosfato
AMBIC	Bicarbonato de amônio
ATP	Adenosina 5-trifosfato
DHAP	Dehidroxido acetona fosfato (triose fosfato)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilenodiaminatetracetato
GAP	Gliceraldeído fosfato (triose fosfato)
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LHC	<i>Light harvesting complex</i> – Antena coletora de luz
MS	Espectrometria de massas
NADPH	Dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida (reduzido)
NADP ⁺	Dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida (oxidado)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pI	Ponto isoelétrico
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
p/v	Concentração em peso/volume
RuBP	Ribulose 1,5-bifosfato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando SDS
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TR-1	Linhagem transgênica nº1 de <i>Nicotiana tabacum</i>
TR-2	Linhagem transgênica nº2 de <i>Nicotiana tabacum</i>
TW	TeraWatt
WT	Linhagem selvagem (não transformada) de <i>Nicotiana tabacum</i>
v/v	Concentração em volume/volume ¹

INTRODUÇÃO

Embora a fotossíntese seja fundamental para a produtividade das plantas, produção de biomassa e seqüestro de carbono, há diversos fatores que modificam e limitam toda a sua magnitude. A fim de nos beneficiarmos do processo fotossintético, devemos entender o mecanismo das reações primárias, eventos de membrana e sua regulação enzimática.

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e transformação genética de plantas, é possível modificar determinado processo metabólico, alterando um de seus componentes, por exemplo silenciando ou aumentando a expressão de determinado gene e, conseqüentemente, a quantidade da respectiva enzima ou proteína. Dessa forma é possível identificar passos metabólicos limitantes e desvendar aspectos moleculares e bioquímicos das interações entre diferentes processos fisiológicos. Com o objetivo de aumentar o tamanho do LHC (*light harvesting complex*) do PSII (fotossistema II) e estudar as conseqüências sobre a regulação do processo fotossintético, plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas com o gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha (LABATE et al., 2004). Os autores selecionaram duas linhagens (TR-1 e TR-2) das vinte e uma transformações, as quais apresentaram os maiores níveis de expressão do transgene e revelaram grandes diferenças em relação às plantas controle, não transformadas. A expressão constitutiva desse gene sob o controle do promotor do CAMV 35S resultou em uma série de efeitos pleiotrópicos, como o aumento da biomassa vegetal, alterações morfológicas e anatômicas das folhas, com as transgênicas apresentando um maior número de cloroplastos por célula, além de um menor número de células por área, maior conteúdo de carboidratos (amido e sacarose), maior conteúdo de amido nas sementes e aumento do tamanho das flores. As duas linhagens transgênicas também apresentaram diferenças nas quantidades de aminoácidos nas folhas, principalmente uma diminuição de Serina e Glicina, e um grande aumento de Glutamato; além de maior produção de biomassa e atraso no florescimento; esses resultados sugeriam a hipótese de uma alteração no processo fotorespiratório, porém a taxa fotorespiratória foi determinada para as duas linhagens e para a WT e não foi encontrada diferenças, anulando essa hipótese. Os resultados observados nessas plantas transgênicas levantaram uma série de questões sobre os

efeitos da expressão do transgene na regulação de uma série de processos metabólicos primários e do desenvolvimento das plantas, que resultaram em alterações muito significativas.

A caracterização dos genomas dos organismos foi um dos principais avanços da ciência na última década. Entretanto, os dados gerados pelo sequenciamento, embora relevantes, são limitados, sendo importante à integração com outros estudos como o de processos de transcrição e de seus produtos, dando início assim a uma nova etapa na pesquisa biológica conhecida como “Era Pós-Genômica”. A proteômica – (WILKINS, 1995) vai além da simples listagem de proteínas, permite conhecer o produto final de um gene, suas propriedades químicas e locais de atuação. Todavia, uma proteína muitas vezes não atua isoladamente, estando com frequência envolvida em interações com outras, influenciando assim o metabolismo, sua regulação e as interações com outros processos metabólicos. A análise proteômica permite saber, se e quando um produto genético está sendo expresso, a concentração relativa desse produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após sua tradução; podendo assim contribuir na elucidação de genes alvos para manipulação genética, marcadores biológicos de resposta a um estresse biótico ou abiótico, ou então no mapeamento de intrincados caminhos metabólicos celulares (PIMENTA, 2003). Dessa forma, a análise e comparação do proteoma das duas linhagens transgênicas de tabaco e o controle (não transformado), pode indicar, de modo multidimensional, as principais alterações na expressão gênica que ocorre entre essas plantas. Partindo do princípio de que os vários genes de uma planta formam uma rede integrada (“Sistema”), cuja expressão deve ser altamente regulada, estamos interessados em testar a hipótese de que a expressão constitutiva de um gene, que codifica a principal proteína do sistema antena do LHCII, alterando a expressão de outros genes; elucidando assim como esse sistema foi perturbado pela expressão constitutiva de um gene fotossintético, e como os demais genes do metabolismo primário e desenvolvimento estão respondendo.

Além disso, como a dinâmica, manutenção e evolução dos cloroplastos é regida pela expressão de genes nucleares, dentre os quais a família LHCII, sendo que esses genes possuem promotores fracos (NOTT et al, 2006; LOPEZ-JUEZ et al., 2005). Essas plantas das linhagens transgênicas, com a expressão constitutiva da principal proteína

do LHC do PSII, testamos a hipótese que a formação e a montagem da arquitetura fotossintética é diferencial nessas plantas, para isso estudamos a transição do metabolismo heterotrófico de cotilédones estiolados com protoplastos, para o metabolismo autotrófico de cotilédones ricos em cloroplastos maduros, sob regime de luz constante em diferentes períodos até 24 horas. Utilizamos também a microscopia eletrônica de transmissão para entender essa formação e análise por PCR quantitativo de diversos genes do fotossistema II, dinâmica dos carotenóides, biossíntese de glutamato e clorofila, e diversos genes do ritmo circadiano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da fotossíntese

Segundo Allakhverdiev e colaboradores (2009), o mais importante evento na história da Terra é a evolução dos organismos fotossintetizantes capazes de realizar a quebra da molécula de água. Através deles, ocorreu o acúmulo de oxigênio atmosférico, acarretando um ambiente aeróbico. Além disso, com a proteção do ozônio, organismos até então limitados aos oceanos, passaram a terra. E todo o acúmulo de energia luminosa armazenada em energia química em petróleo, gás natural e carvão mineral devem-se a esses organismos.

O consumo global de energia atual está na casa dos 12,8 TeraWatt (TW) e estimativas apontam para 27 TW em 2050 (LEWIS; NOCERA, 2006), durante os últimos 50 anos a concentração de CO₂ atmosférico teve um acréscimo de 18% (TANS, 2009) e no mesmo período a média de temperatura na Terra aumentou em 0,64°C (SOLOMON; QIN; MANNING, 2007). Com o crescimento da população humana, necessita-se que a produção de alimento deva acompanhar esse crescimento; estima-se que a demanda mundial por alimento passe dos 12 Teracalorias por dia atualmente para 25 Teracalorias em 2030 (FAO, 2009). Portanto, atualmente, a capacidade de assimilação de carbono atmosférico passa a ser de suma importância global, assim como formas limpas de geração de energia, alimento e fibras.

A fotossíntese sustenta toda a produção de alimento, fibras e biocombustíveis e combustíveis fósseis existentes, e há uma necessidade crescente de formas eficientes de conversão de energia solar em biomassa através da fotossíntese. Nesse contexto, a aplicação de ferramentas de biotecnologia e biologia molecular para otimizar as plantas em organismos que são mais eficientes na conversão de energia solar em biomassa passa a ser um objetivo de fundamental importância (BASIC RESEARCH NEEDS, 2005). O ponto chave de início é identificar e avaliar possíveis alvos biotecnológicos para otimizar fotossinteticamente a conversão da energia luminosa em biomassa de forma eficiente, para isso, um bom entendimento do processo fotossintético é necessário.

2.2 O processo fotossintético

A fotossíntese em plantas superiores abrange diversas reações bioquímicas que iniciam nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos nas células, com a captação da energia luminosa por pigmentos de clorofilas *a*, *b* e carotenóides; complexados a proteínas coletoras de luz (*light-harvesting complex*, LHC), associados aos fotossistemas II e I (PSII e PSI, respectivamente) (TAIZ; ZEIGER, 2004). A transformação da energia luminosa em energia química através da fotossíntese começa no LHC do PSII, o complexo antena que absorve a energia luminosa para a quebra da molécula de água, tendo assim a produção de oxigênio, elétrons e prótons. Os elétrons resultantes são transferidos para o PSI através de uma série de reações de oxidação e redução envolvendo vários transportadores de elétrons. Já no PSI, os elétrons são transferidos para o sistema ferredoxina/tioredoxina, os quais serão responsáveis pela redução de NADP^+ e ativação de enzimas do ciclo de Calvin-Benson. Já os prótons gerados pela quebra da molécula de água e pelo fluxo vetorial de elétrons entre o PSII e PSI, são acumulados no interior do lúmen dos tilacóides, criando uma diferença de pH entre este e o estroma, possibilitando uma condição favorável à enzima ATPsintase para gerar ATP, a partir do ADP do fosfato inorgânico formado durante a fixação do carbono no estroma dos cloroplastos.

No ciclo de Calvin, a carboxilação da ribulose 1,5 bisfosfato (RuBP) é catalisada pela enzima RUBISCO (Ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase), produzindo duas moléculas de 3-PGA (ácido glicerato 3-fosfato), os quais sofrerão uma fosforilação pela glicerato 3-fosfato quinase produzindo glicerato 1,3-bisfosfato. Este, é imediatamente reduzido à gliceraldeído fosfato (GAP) e dehidróxido acetona fosfato (DHAP) pela NADP-gliceraldeído fosfato desidrogenase através do NADPH como doador de elétrons vindo da fase de claro da fotossíntese. Uma fração das trioses-fosfato produzidas (5/6) são utilizadas para regenerar RuBP via ciclo de Calvin, e a menor parte (1/6) será exportada ao citoplasma e entrar na síntese de sacarose reciclando assim fosfato inorgânico. Portanto, para a fixação biológica do CO_2 atmosférico através do processo da fotossíntese, é necessária a produção de ATP e NADPH gerados a partir da energia luminosa captadas pelos LHCs (NELSON; COX, 2008).

Como a fotossíntese é um processo extremamente dependente de energia luminosa, ao longo do processo evolutivo das plantas, houve um ajuste no tamanho do aparelho fotossintético, em decorrência das mudanças do ambiente. Assim, plantas de ambiente de sombra aumentam o tamanho das antenas coletoras de luz, a quantidade de granas nos tilacóides, número de cloroplastos por células, alteram a morfologia e inclinação das folhas; captando uma quantidade maior de luz. Porém, ao serem alocadas em ambientes de maior luminosidade, é necessário reduzir o tamanho das antenas e do aparelho fotossintético, evitando que o excedente de energia cause a fotodestruição da planta. Para suprir essa nova necessidade, as plantas dispõem de diversos mecanismos de fotoaclimatação, que envolvem alterações na expressão gênica, alterações de proteínas e metabólitos (LABATE, 2001); e a elucidação do ajuste dos mecanismos de fotoaclimatação pode contribuir no ganho da eficiência fotossintética das plantas, possibilitando a obtenção de plantas tolerantes à baixa e alta luminosidade, com um grande incremento no ganho de biomassa, com um enorme potencial biotecnológico.

2.3 O complexo antena

Embora as moléculas de clorofila *a* dos centros de reação sejam capazes de absorver diretamente a luz e iniciar a fotossíntese, elas são energizadas indiretamente pela energia transferida dos complexos protéicos coletores de luz – LHC (*light harvesting complex*) – em uma antena associada. Mesmo em condições de máxima intensidade luminosa encontradas pelas plantas em condições naturais, cada molécula de clorofila *a* do centro de reação absorve apenas cerca de um fóton por segundo, o que não é suficiente para sustentar a fotossíntese para suprir a necessidade das plantas. A participação dos LHCs aumenta muito a eficiência fotossintética, já que as proteínas LHC mantêm as moléculas de pigmento na posição e orientação precisas, ideais para absorção de luz e transferência de energia, maximizando assim a transferência de energia por ressonância dos pigmentos da antena para as clorofilas do centro de reação (LODISH et al., 2005).

Convencionou-se que as proteínas antena do PSII recebem a nomenclatura de LHCb; enquanto que as do PSI são chamadas de LHCa. A família de proteínas do

LHCa são transcritas e traduzidas por diversos genes nucleares, em *Arabidopsis thaliana* há seis isoformas – LHCa1-6 – e nove em *Chlamydomonas reinhardtii* – LHCa1-9 – os quais exibem alta homologia na sequência (MUSSGNUG et al., 2007). As proteínas LHCa captam uma quantidade de energia necessária para reduzir o NADP^+ à NADPH no complexo ferredoxina. As proteínas do LHCb são codificadas por genes nucleares que pertencem a uma família multigênica consistindo de 5 genes em *Arabidopsis*, 6 em *Nicotiana tabacum*, 8 em *Nicotiana plumbaginifolia* e 15 em *Lycopersicon esculentum*. (JANSSON et al., 1992). Essas proteínas são sintetizadas no citoplasma e depois importadas pelo cloroplasto onde sofrem processamento para serem integradas às membranas dos tilacóides (GREEN et al, 1991). Elas são subdivididas em antena maior e menor. A antena maior é formada por trímeros protéicos e é a principal fonte de absorção de energia luminosa no PSII para a quebra da água; contrapondo a antena menor que é formada por monômeros. Green (1991) elucida a importância da antena maior do LHCb, já que aproximadamente 50% de toda a clorofila das plantas está localizada neste complexo protéico, e está envolvido em processos de aclimação e respostas em diferentes condições de luminosidade e temperatura. Essa grande discrepância no número de genes do LHCb de diferentes espécies causa uma numeração e nomenclatura própria em cada organismo; e evolutivamente não é totalmente elucidado essa grande variabilidade, porém isso deve refletir uma capacidade adaptativa e flexibilidade necessária à maquinaria fotossintética ao longo da evolução de cada espécie.

A estrutura molecular da antena maior LHCb é formada por monômeros e posteriormente por trímeros protéicos. A estrutura dos monômeros foi elucidada à dimensão de 3.4 Å, a proteína possui cerca de 12 moléculas de clorofilas (Sete clorofilas *a* e Cinco clorofilas *b*) associadas a duas luteínas, estas duas são mantidas na parte terminal do polipeptídeo. Os monômeros possuem três hélices das quais a 1ª e a 3ª são homólogas, formando o centro do complexo e estas são unidas através de ligações entre os aminoácidos Arg-Glu entre as hélices (KÜHLBRANDT et al., 1994). Os trímeros podem ser formados ao acaso entre os três tipos de monômeros, dessa forma qualquer proporção das proteínas de 25, 27 e 28 KDa pode ser formada (LARSSON et al., 1987). A biogênese do LHCb foi elucidada com plântulas de cevada germinadas no

escuro e transferidas para luz intermitente por um período de três dias, inicialmente as proteínas do LHCb são importadas pelo cloroplasto e se acumulam nas membranas dos tilacóides na forma monomérica, associadas aos pigmentos e, posteriormente, começam a formar os trímeros, durante a diferenciação dos plastídeos à cloroplastos (DREYFUS; THORNER, 1994).

Figura 1 - Modelo do Light-harvesting chlorophyll protein complex (LHCs) em plantas e algas verdes, adaptado de Kanehisa (2010)

Atualmente, é aceito que os sistemas coletores de luz nos cloroplastos são auto-regulados e respondem ao estado de redução dos componentes do transporte de elétrons nas membranas dos tilacóides (ALLEN et al., 1995). O mecanismo de sinalização, presente nos tilacóides para indicar o aumento no estado de redução das membranas, envolve um intrincado conjunto de fatores de regulação pós-traducionais com a fosforilação das proteínas do LHCII. Em condições de excesso de luz, o aumento do estado de redução das plastoquinonas, localizadas entre os dois fotossistemas, promove a ativação de uma proteína quinase que fosforila o LHCII, assim, tem-se uma alteração no alinhamento do LHCII com o PSII, conseqüentemente ocorre um distanciamento em direção ao PSI. Esse mecanismo de ajuste da distribuição da energia de excitação entre os dois fotossistemas, conhecido como transição de estado, é extremamente importante para evitar a fotodestruição do PSII causada pelo excesso de luz. O significado funcional dos vários complexos e as relações de organização ainda são pouco conhecidas, especialmente com relação às respostas de

fotoaclimação das plantas às diferentes condições de intensidade de luz (LABATE, 2001), porém a elucidação desse complexo mecanismo de respostas à fotoaclimação pode gerar informações extremamente valiosas no entendimento da biologia vegetal em distintas condições de luminosidade, incluindo excesso de luminosidade que é um fator limitante às plantas.

2.4 Transformação genética de *Nicotiana tabacum* com o gene *Lhcb1*2* de ervilha

Segundo Labate (2004), a alteração da estrutura do complexo protéico LHC do PSII de tabaco foi obtida com a suplementação constitutiva do gene *Lhcb1*2* de ervilha, aumentando a transcrição, tradução e importação da proteína nos cloroplastos. A construção quimérica contendo o gene *Lhcb1*2* de ervilha foi realizada com a fusão da seqüência de DNA que codifica a porção madura da proteína *Lhcb1*2* e do peptídeo trânsito da subunidade menor do gene que codifica a enzima *ribulose 1,5-bisphosphate carboxilase (Rbcs)* (CASHMORE, 1983; CASHMORE, 1984). O promotor utilizado foi o 35S CaMV, e os sinais de terminação da transcrição do gene *Lhcb1*2* foram mantidos. A construção foi transferida para o vetor binário pEND4K (KLEE et al., 1985) sendo então introduzido em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404. A transformação genética foi feita por infecção de discos foliares (HORSCH et al., 1985; DEROLES e GARDNER, 1988) com regeneração *in vitro*. Foram obtidos vinte e um transformantes primários, e foram selecionadas as plantas que apresentaram alta expressão do transgene, sendo então escolhidas apenas duas linhagens (TR-1 e TR-2). O número de cópias do transgene foi investigado com a hibridação do DNA genômico com a sonda do gene de resistência à canamicina (*nptII*) presente na construção quimérica, a progênie TR-1 possui uma cópia do transgene, enquanto que a TR-2 possui quatro cópias (Figura 2).

Figura 2 - (A) Características morfológicas de plantas cultivadas à baixa irradiância ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Plantas de tabaco durante o período de florescimento: WT-) Amostra das plantas da linhagem selvagem não transformante. TR-1-) Amostra das plantas da primeira linhagem transgênica. TR-2-) Amostra das plantas da segunda linhagem transgênica. (B) Desenvolvimento diferencial entre TR-1, o hemizigoto (HEM(1)) e WT, 74 dias após a germinação. Adaptado de Labate e colaboradores (2004)

2.5 Efeitos pleiotrópicos da expressão do gene *Lhcb1*2* de ervilha em *Nicotiana tabacum*

Ocorreram diversos efeitos pleiotrópicos a nível morfológico, bioquímico e fisiológico com a introdução do gene *Lhcb1*2* de ervilha em tabaco. A nível morfológico e anatômico, com o aumento na produção das proteínas LHCb ocorreu o aumento no número de grana dos tilacóides, acompanhado do aumento da divisão dos cloroplastos por célula, o qual induziu o subsequente aumento no tamanho (volume) da célula e consequente aumento na expansão e área foliar. Essas alterações são independentes das condições de crescimento das plantas (alta ou baixa luminosidade). Há indícios que existem moléculas sinalizadoras entre o núcleo e o cloroplasto, que atuam co-regulando a expressão gênica entre os dois compartimentos e poderiam regular as respostas celulares e anatômicas descritas (TAYLOR, 1989). Além disto, no nível morfológico, as duas linhagens transformantes e a linhagem Hemizigoto apresentam aumento significativos em relação à WT na altura das plantas, no número de folhas, no dias de florescimento e no acúmulo de açúcar e amido; interessante o Hemizigoto possui comportamento intermediário entre as linhagens parentais WT e TR-1, mostrando que esses efeitos pleiotrópicos são devidos ao genótipo, e não há possíveis variações somaclonais decorrentes da transformação genética.

Nesse trabalho, a expressão de uma proteína da antena maior do LHC do PSII resultou numa maior eficiência fotossintética em baixa luminosidade, aumento da produção de biomassa, dias para o florescimento e peso das sementes. As causas do aumento de biomassa são desconhecidas, entretanto, o aumento na capacidade fotossintética das plantas transformadas, particularmente sob baixa luminosidade, ocorre uma maior fixação de CO₂ e acúmulo de carboidratos; o qual acarretou uma maior disponibilidade energética para o crescimento; todavia, o período de florescimento foi deslocado, sendo que as plantas das linhagens transformadas possuem um atraso significativo nesse período. A indução de florescimento em plantas está intimamente relacionada ao fotoperíodo e ao ritmo circadiano, sendo que este possui íntima relação com a absorção de energia luminosa.

Cloroplastos podem ser considerados como sensores ambientais, regulados pela família gênica LHC e outros genes nucleares. Sob alta excitação luminosa, esses genes

são suprimidos e reduz o crescimento vegetal; porém, em baixa excitação à expressão é aumentada e a produção de biomassa é maximizada. A expressão constitutiva do *Lhcb1*2* pode ter interferido na via de transdução de sinais entre núcleo e cloroplastos, mantendo a organela em constante pressão de alta excitação, interferindo na montagem e manutenção da arquitetura fotossintética, em genes do ritmo circadiano como o TOC – *timing of CAB* – e na biossíntese de diversos aminoácidos.

O maior impacto da produção constitutiva das proteínas *Lhcb1*2* de ervilha sobre o metabolismo das plantas transgênicas foi à diminuição de diversos aminoácidos, principalmente Serina e Glicina, indicando que o processo fotorrespiratório pode ter sido alterado, diminuindo assim a reciclagem da amônia, principal fonte de nitrogênio na formação da glutamina, sendo que a formação de glutamato aumentou drasticamente. Porém, em condições de saturação de luz não ocorreu qualquer limitação devido a fotoinibição, ao contrário do esperado. É notório que alterações significativas ocorreram nas plantas transgênicas, manifestando-se numa série de mudanças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas; porém pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares que desencadeiam essas diferenças (LABATE, 2001; LABATE et al., 2004).

Além disto, Andreote (2008) investigou a comunidade bacteriana na rizosfera e no rizoplane da linhagem WT e das duas linhagens transformantes – TR-1 e TR-2. A rizosfera – região do solo influenciada pelos exudatos das raízes – e o rizoplane – superfícies das raízes – constituem em um nicho altamente complexo que pode ser explorado por uma grande diversidade bacteriana, e a interação planta-bactéria nesses nichos é influenciada por uma série de fatores, como a expressão heteróloga de um gene pelas plantas. Com a identificação de bandas diferencialmente expressas de cada linhagem através da técnica de PCR-DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) foi revelada a íntima relação entre distintos gêneros de bactérias e cada genótipo das plantas estudadas.

2.6 A dinâmica da diferenciação de plastídios à cloroplastos

Plastídios são organelas de extrema importância para os vegetais, envolvidos na fixação de carbono via fotossíntese, biossíntese de aminoácidos, amido, e diversos metabólitos secundários. Em resposta ao estímulo ambiental e tecido-específico, ocorre

diferentes tipos de plastídios especializados, os quais podem ser distinguidos entre si por sua estrutura, composição dos pigmentos (cor) e função. Por exemplo, elaioplastos estão presentes no endosperma de sementes, cromoplastos em frutas e pétalas florais, amiloplastos em raízes e cloroplastos em tecidos com atividade fotossintética (RAVEN et al., 1996; KLEFFMANN et al., 2007).

A iluminação de folhas de plantas que foram crescidas no escuro desencadeiam a evolução de etioplastos a cloroplastos. Essa diferenciação é particularmente interessante já que há mudança no metabolismo heterotrófico à autotrófico, com isso há mudanças em expressão de genes e proteínas, formação de tilacóides com a montagem de todo o aparato dos fotossistemas I e II, complexo ferredoxina/tioredoxina, complexo *b₆f*, complexo ATPsintase e todas as enzimas do ciclo de Calvin (KANERVO et al., 2008).

A diferenciação de cloroplastos com origem em etioplastos em resposta a luz necessita de uma coordenada e integrada expressão diferencial de genes plastidiais e nucleares. Por exemplo, os genes nucleares controlam a expressão de genes do plastídio através da importação à essa organela de fatores de transcrição, proteínas quinases, nucleases e *RNA-binding proteins*. Em contra partida, os plastídios regulam a expressão do núcleo em diversas vias não totalmente elucidadas, mas sabe-se que as proteínas dos fotossistemas oriundas do núcleo são reguladas por mecanismos de *feedback*. A primeira evidência da existência de sinais localizados no plastídio que controlam a expressão de genes nucleares foi feita em estudos com os mutantes *albostrians* e *saskatoon* de cevada. Uma mutação recessiva nuclear nesses mutantes impede a acumulação de carotenóides, resultando em cotilédones e folhas completamente brancas ou com manchas esbranquiçadas, possuindo uma série de pequenos plastídios indiferenciados, e traços de clorofila a/b, acarretando uma inatividade fotossintética. A análise de folhas desses mutantes revelou que a expressão de uma série de genes nucleares importantes na diferenciação de cloroplastos, incluindo a família gênica LHC, a sub-unidade menor da RUBISCO e as enzimas do ciclo de Calvin tiveram sua expressão diminuída (NOTT, et al., 2006; KLEFFMANN et al., 2007). Com o advento de técnicas de biologia molecular e transformação genética

de plantas, é possível entender como um determinado gene alvo, ou via metabólica, atua e como os demais genes participantes desse processo são afetados.

2.7 Ciclo Circadiano em Plantas

O ritmo circadiano, subconjunto de ritmos biológicos com período de aproximadamente vinte e quatro horas, em plantas está envolvido com diversos aspectos no crescimento, desenvolvimento e na homeostase biológica. A identificação de componentes moleculares do relógio, primeiramente em *Arabidopsis thaliana*, tem sofrido um grande e rápido aumento no progresso em sua elucidação e entendimento aplicáveis às plantas superiores. A recente utilização de modelos matemáticos e diversas condições experimentais acarretou no desenvolvimento de um modelo de relógio, incorporando mecanismos de regulações transcricionais e pós-transcricionais dos genes do ritmo circadiano, conforme figura 3.

Figura 3: Modelo da interação entre os genes do ritmo circadiano em plantas superiores (HARMER, 2009)

Neste modelo, o primeiro oscilador (*loop A*) é constituído por dois fatores de transcrição do tipo *Myb*, o CCA1 – *circadian clock associated 1* – e LHY – *late elongated hypocotyl* – os quais regulam negativamente a expressão do *timing of CAB expression 1* (TOC1), via modificação da cromatina do locus desse gene. Acredita-se que o TOC1 ative diretamente ou indiretamente um determinado componente ainda não elucidado, componente X, e esse deva induzir a expressão do CCA1 e LHY. O segundo oscilador (*loop B*) é composto pela passagem da tarde à noite, é composto por dois genes, um fator também desconhecido – chamado de Y – e o TOC1, aparentemente a *gigantea* (GI) pode promover a atividade de Y. Já o terceiro oscilador, *loop C*, é constituída pelos genes expressos pela manhã, *pseudo-response regulator 7* (PRR7) – também chamada de *constans-like 2* (COL), PRR9, CCA1 e LHY, os quais novamente alimentam o oscilador A. No oscilador D (*loop D*) a ZTL, identificada primeiramente no mutante *zeitlupe* em *Arabidopsis*, regula negativamente a abundância da proteína TOC, a qual é ativada pela GI e pela PRR3 (MÁS, 2008; HARMER, 2009).

Além desses genes centrais constituintes do ciclo circadiano em plantas, estes sofrem a ação de diversos outros genes, como os relacionados à temperatura e captação de luz, os quais desencadeiam fortes mudanças no ciclo. A ZTL – um fotorreceptor – o qual controla a estabilidade sob luz azul da TOC1 é um dos exemplos de como a luz é de extrema importância para a manutenção do ciclo; assim como as *phytochrome proteins* e *cryptochrome proteins* os quais absorvem os comprimentos de onda no vermelho e azul para a manutenção do relógio; porém a participação dos fotorreceptores e de proteínas coletoras de luz – incluindo a família do LHC do PSII – não é totalmente clara na manutenção do ciclo circadiano em plantas (LU et al., 2009).

Todavia, Kaldis e Prombona (2006) realizaram experimentos de expressão gênica para LHY e *Lhcb* em cotilédones estiolados de *Phaseolus vulgaris*, sob pulsos de luz e diferentes fotoperíodo. Houve uma sinergia entre a expressão desses distintos genes, propondo um novo mecanismo de sincronização do relógio biológico com a luz.

Segundo Zhang (2007) a expressão constitutiva do fator de transcrição CCA1 resultou num encurtamento do período do oscilador central (*loop A*) e alterações arrítmicas nos outros três osciladores, ocasionando mudanças no tempo de florescimento, hipocótilos maiores e taxa de germinação reduzida no escuro, além de

uma diminuição da expressão gênica do LHCb. Xu e Johnson (2001) identificaram e caracterizaram um novo gene em tabaco, chamado de ZGT – abreviação em chinês de Controlado por Luz e Relógio – sendo que este gene é expresso ritmicamente em ciclos de claro/escuro e em luz constante. A expressão constitutiva desse gene sustenta a expressão do *Lhcb1*1* em escuridão constante, mas não afeta a expressão deste em luz constante; porém afeta a expressão de diversos genes do ritmo circadiano; funcionando como um componente entre o ritmo biológico e a absorção de energia luminosa afetando diversas vias de transdução de luz na planta. Não há trabalhos na literatura com a expressão constitutiva de genes do *Lhcb* afetando o ritmo circadiano.

2.8 Proteoma: interação entre Genoma e Fisiologia

Os dados gerados pelo seqüenciamento do genoma, embora relevantes, são limitados, tornando necessária à integração com outras técnicas que permitam estudar tanto os processos de transcrição das informações contidas nos genes quanto os seus produtos, as proteínas. Esta constatação deu início a uma nova etapa na pesquisa biológica conhecida como “Era Pós-Genômica”, que vem promovendo o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de técnicas utilizadas no estudo de transcritos (transcritômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica); todas integradas pela bioinformática (ANDRADE et al., 2006). A proteômica tem ganhado destaque por complementar e ser complementada pelos dados gerados pela genômica e pelo transcrito, representando uma ponte de ligação entre os genes e os seus produtos. Os recentes avanços na proteômica, como a introdução da espectrometria de massas para a análise de macromoléculas, unidos a técnicas analíticas bem conhecidas como a eletroforese bidimensional, eletroforese capilar e a cromatografia líquida e gasosa, têm possibilitado o estudo de processos fisiológicos complexos e dinâmicos (PATTERSON e AEBERSOLD, 2003).

A proteômica tem possibilitado saber se, e quando, um produto gênico está sendo expresso, a concentração relativa desse produto e as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução. Tais informações não podem ser determinadas a partir do genoma e do transcrito de um organismo. A análise do proteoma vai além da simples listagem de proteínas podendo fornecer indícios

substanciais quanto a organização e à organização e à dinâmica dos processos metabólicos, regulatórios e de sinalização através dos quais ocorre o desenvolvimento celular. Uma das inovações geradas pelos projetos de proteoma, além do mapeamento e elucidação de intrincados caminhos metabólicos celulares, é a possibilidade de identificar novos genes alvos que podem ser usados na manipulação genética (PIMENTA, 2003; ANDRADE, 2006).

A utilização da proteômica na caracterização molecular de efeitos pleiotrópicos em mutantes e em transgênicos tem ganhado enorme importância (ZIVY e VIENNE, 2000). A utilização de mutantes para a caracterização de processos fisiológicos embora seja relevante, é limitado, pois não há mutantes naturais para todos os componentes de diversas vias metabólicas, sendo que o surgimento de técnicas de genética molecular e transformação de plantas, tornou possível modificar um único componente, aumentando ou reduzindo a síntese da proteína específica, e analisando o impacto que essa mudança provoca em determinado fluxo metabólico; porém apesar dessa potencialidade, poucos trabalhos de proteoma têm utilizado essa abordagem empregando transgênicos para elucidar efeitos pleiotrópicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições experimentais

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana), das duas linhagens transgênicas (TR-1 e TR-2) e a linhagem selvagem não transformante (WT) foram mantidas em câmara de crescimento controlada (Convicon E15) com $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância, usando 16/8 horas de fotoperíodo Claro/Escuro, com temperatura de 24°C no Claro e 18°C no escuro. As plantas foram cultivadas em uma mistura de vermiculita média e substrato orgânico na proporção de 1:1; e regadas diariamente com solução nutritiva completa comercial.

Para um segundo experimento, sementes das três linhagens foram esterilizadas em solução de 50% v/v de hipoclorito de sódio durante um minuto e álcool etílico 70% v/v por aproximadamente 10 minutos em fluxo laminar; germinadas em placas de petri contendo água Milli-Q estéril em papel de filtro; e acondicionadas no escuro à 18°C durante uma semana com a finalidade de promover o estiolamento das plântulas. Após esse período, as plântulas foram submetidas à luz ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.2 Extração e quantificação das proteínas

As folhas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e as suas proteínas extraídas conforme o método de extração fenólica (HURKMAN e TANAKA, 1986).

Nesse método de extração fenólica, em 15 mL de solução de extração (0,7 M sacarose, 0,5M Tris-HCl, 0,1 M KCl, 50 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% p/v PVPP, 2% v/v β -mercaptoetanol) pH 7,5 à 4°C, adicionou-se 2,5 g do material vegetal macerado. Depois de homogeneizar a amostra em “vortex” por aproximadamente 30 minutos, adicionou-se 15 mL de fenol saturado com Tris-HCl pH 7,5. Posteriormente à uma nova homogeneização em “vortex” por 30 minutos, o material foi centrifugado à 10.000 g por 30 minutos a 4°C, sendo que posteriormente coletou-se o sobrenadante que foi transferido para um novo tubo. Neste, adicionou-se 15 mL de solução de extração e repetiu-se os passos anteriores. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi então transferido para um novo tubo, a esse se acrescentou oito volumes de 0,1 M de acetato de amônio em metanol a -20°C. Esse material foi mantido *overnight* a -20°C e em

seguida foi centrifugado a 16.000 *g* por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi novamente lavado com 0,1 M de acetato de amônio em metanol a -20°C. Posterior 4 horas a -20°C, centrifugou-se novamente (16.000 *g* por 20 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet dessa vez foi lavado com acetona a -20°C. Posterior há 4 horas, o material foi centrifugado a 16.000 *g* por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet resultante foi submetido a secagem em dissecador a -4°C por 48 horas. As proteínas foram então ressuspensas em tampão de solubilização (7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 10 mM DTT, 0,4% v/v Triton X-100).

3.3 Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se um kit comercial (BioRad). Alíquotas de 5 µL de cada amostra, juntamente com 3,5 mL do reagente diluído (3:1) e 10 µL HCl 0,1N foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, conforme recomendações do fabricante. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm. Foram realizadas três leituras independentes de cada amostra, sendo realizado uma média das leituras para estipular a concentração protéica. As concentrações das proteínas foram calculadas através da comparação com uma curva-padrão da proteína albumina do soro bovino como padrão.

3.4 Separação das proteínas por 2D-PAGE

As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI), através do processo de focalização isoelétrica (IEF), usando o sistema IPGphor 3 Strip Holder (Immobilized pH Gradient strips – GE Healthcare). A caracterização das proteínas foi realizada com fitas de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 3-10 não linear. As amostras de proteínas usadas na análise dos géis e sequenciamento dos *spots* diferencialmente expressos foram separadas utilizando-se fitas de 18 cm com gradiente de pH linear de 4-7.

As fitas de 18 cm de gradiente de pH imobilizado de 3-10 não linear foram reidratadas durante 1 hora a 20°C no aparato de focalização isoelétrica com 350 µL de

amostra, contendo 500 µg de proteína dissolvida no tampão de solubilização acrescido de 2% p/v CHAPS, 1,5% v/v Anfólitos e 0,005% p/v Azul de Bromofenol. Sobre as fitas acrescentou-se 1 mL de óleo mineral (Fluid Cover, GE Healthcare) para evitar a evaporação dos reagentes. A focalização isoeletrica foi realizada nas seguintes condições: 30 V por 11 horas em *step*, 100 V por 1 hora em *step*, 200 V por 1 hora em *step*, 400 V por 1 hora em *step*, 700 V por 1 hora em *step*, 1000 V por 1 hora em *step*, 5.000 V por 10 horas em *step* e 8.000 V constante até que a voltagem total acumulada chegasse a 80.000 V. Após a focalização, as fitas foram retiradas do aparato de focalização isoeletrica, lavadas com água Milli-Q e armazenadas a -80°C até prosseguir com a segunda dimensão.

Já as fitas de 18 cm com gradiente de pH linear de 4-7 foram reidratadas durante 12 horas a 20°C no aparato de focalização isoeletrica com 375 µL de amostra, contendo 900 µg de proteína dissolvida no tampão de solubilização acrescido de 3% p/v CHAPS, 1% v/v Anfólitos, 0,005% p/v Azul de Bromofenol, 0,4% v/v Triton X-100, 90 mM DTT, 2 mM TCEP. Novamente, sobre as fitas acrescentou-se 1 mL de óleo mineral (Fluid Cover, GE Healthcare) para evitar a evaporação dos reagentes. A focalização isoeletrica foi realizada nas seguintes condições: 100 V por 1 hora em gradiente, 500 V por 1 hora em gradiente, 1.000 V por 1 hora em gradiente, 5.000 V por 1 hora em gradiente, 8.000 V por 1 hora em gradiente e 8.000 V constante até que a voltagem total acumulada chegasse a 80.000 V. Após a focalização, as fitas foram retiradas do aparato de focalização isoeletrica, lavadas com água Milli-Q e armazenadas a -80°C até prosseguir com a segunda dimensão.

Após a focalização, as fitas foram lavadas duas vezes com água Milli-Q, mantidas por 15 minutos em solução de equilíbrio e redução (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS e 2% p/v DTT). Após, as fitas foram transferidas e mantidas por 15 minutos em solução de alquilação (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS, 4% p/v iodoacetamida e 0,005% p/v azul de bromofenol).

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em um gel vertical homogêneo de 12,5% de acrilamida (180 x 160 x 0,75 mm), conforme Laemmli (1970). O gel foi preparado com 12,5% Acrilamida/Bis (30/08), 0,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,5% (v/v) persulfato de amônio e 0,075% (v/v) TEMED. Posteriormente equilibradas, reduzidas e

alquiladas, as fitas foram inseridas sob o gel de acrilamida e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5% (p/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0,1% p/v SDS). A separação eletroforética das proteínas foi realizada a 8°C em uma cuba modelo PROTEAN II XI 2-D Cell (BioRad). No primeiro estágio utilizou-se uma corrente fixa de 16 mA, por gel, durante 30 minutos e no segundo estágio, utilizou-se uma corrente fixa de 24 mA, por gel, até o azul de bromofenol atingir o final do gel. As massas moleculares aparentes das proteínas foram determinadas utilizando-se padrões de massa molecular (Broad Range - Molecular Weight Marker, Bio-Rad). Foram produzidos três géis de cada tratamento para prosseguir com a análise das imagens.

3.5 Detecção das proteínas

As proteínas separadas nos géis bidimensionais de poliacrilamida foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue G-250*, realizada de acordo com o protocolo de Candiano e colaboradores (2004). Para isso, ao fim da corrida, o gel foi colocado em solução fixadora contendo 10% v/v de ácido acético e 40% v/v de metanol durante 1 hora, para prevenir a mobilidade das proteínas no gel. Então, os mesmos foram acondicionados por 48 horas em solução de coloração contendo 10% v/v ácido fosfórico, 10% p/v sulfato de amônio, 0,1% p/v *Coomassie Brilliant Blue G-250* e 20% v/v metanol. Por fim, os géis foram lavados com água Milli-Q e armazenados em solução 5% v/v ácido acético.

3.6 Obtenção e análise das imagens

Os géis de poliacrilamida bidimensionais corados triplicados em cada tratamento foram digitalizados com resolução de 300 dpi com auxílio do programa LabScan 6.0 (GE Healthcare) no ImageScanner 3 (GE Healthcare). Para a análise das imagens, foi adotado o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare).

A detecção dos *spots* e a determinação de seu volume foram realizadas de modo automático adotando-se os seguintes parâmetros: *smooth* = 10, área mínima = 23 e *saliência* = 200. Após essa detecção, foram realizadas correções com a adição, remoção e arranjo manual dos *spots*. Dentro de cada triplicata, foi efetuado o *match*

gels, uma comparação e normalização entre os *spots* das réplicas de cada tratamento. Após esse passo, com as correções manuais devidamente efetuadas, procedeu-se a análise das classes, que nos forneceu a diferença estatística entre os tratamentos experimentais propriamente ditos.

Para determinar diferenças na expressão protéica, foram consideradas as alterações de volume normalizado dos *spots* com 5% de significância no teste estatístico de ANOVA (*analysis of variance*), utilizando como controle do experimento a linhagem WT, e como tratamentos, as linhagens transformantes. Além desses *spots* diferencialmente expressos a 5% com ANOVA, visamos também os *spots* exclusivos de cada tratamento. Ao invés de se utilizar o valor de volume bruto para essa análise estatística, optamos conforme recomendação do fabricante, o uso do volume em porcentagem, também chamado de normalizado, o qual implica na normalização do spot, pois para calcular a porcentagem de volume, considera-se o volume total de todos os *spots* no gel. Assim, minimizam-se possíveis variações decorrentes da quantidade de proteína aplicada e do procedimento de coloração. Pelo programa também foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot* identificado, levando em consideração o padrão de migração horizontal na focalização isoelétrica e por se tratar de um gradiente linear de pH 4 até 7 em 18 cm, e padrões de massa molecular (Broad Range - Molecular Weight Marker, Bio-Rad) estimamos uma correlação com a migração vertical em centímetros.

3.7 Digestão das proteínas

Após a análise dos géis, as regiões de interesse contendo a proteína (*spot*) foram icortadas, com o auxílio de uma ponteira de 1.000 µL com a ponta adaptada no diâmetro do *spot* em questão, e com o auxílio de um bisturi, cortada em segmentos de aproximadamente 1 mm³, colocadas em tubos *ependorf* e armazenados na temperatura de 4°C. Os *spots* foram tratados e digeridos de acordo com ANDRADE *et al.*, (2007), conforme descrito:

Remoção do corante: Os segmentos de gel contendo as proteínas foram lavados em água Milli-Q, descorados por seis vezes na solução contendo 50% v/v de acetonitrila (ACN) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC), posteriormente foram

desidratados duas vezes em 100% ACN durante 10 minutos. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente do gel foi deixado para evaporar a temperatura ambiente.

Redução e alquilação: Os fragmentos de gel contendo as proteínas foram reidratados e reduzidos em DTT (20 mM DTT / 50 mM AMBIC) a 56°C durante 40 minutos e posteriormente alquilados com iodoacetamida (55 mM IAA / 50 mM AMBIC) no escuro por 30 minutos. A iodoacetamida foi removida e os fragmentos foram lavados em 25 mM AMBIC e posteriormente desidratados em 100% acetonitrila. A acetonitrila foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar à temperatura ambiente.

Digestão das proteínas: Os fragmentos de gel contendo as proteínas de interesse foram então reidratados com 30 µL de solução contendo 100 ng de tripsina em 25 mM de bicarbonato de amônio e mantidas a 37°C por 12 horas. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 20 µL de solução bloqueadora (50% v/v ACN e 5% v/v ácido fórmico).

Extração dos peptídeos: Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 20 minutos com a solução de 60% v/v metanol e 1% v/v ácido fórmico; e duas vezes com a solução 50% v/v acetonitrila e 1% v/v ácido fórmico; todas as lavagens foram realizadas a 45°C sob sonicação com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos do gel foi submetida a secagem em um concentrador (Eppendorf) à temperatura ambiente, por 2-3 horas. Os peptídeos foram ressuspensos em 1% (v/v) ácido fórmico e seqüenciados por espectrometria de massas

3.8 Sequenciamento por Espectrometria de Massas

Os peptídeos foram seqüenciados em um espectrômetro de massas Q-TOF-Ultima API (ESI-MS/MS *quadrupole/aceleração orthogonal time-of-flight*, Waters) acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar, CapIC (Waters). A separação dos peptídeos foi realizada usando-se uma pré-coluna C18 (Sentry Guard Column C18, Waters) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry C18 5 µm 0,32 x 150 mm, Waters). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A (95% v/v H₂O, 5% v/v ACN e 0,1% v/v ácido fórmico) e do tampão B (95% v/v ACN,

5% v/v H₂O e 0,1% v/v ácido fórmico). Durante a corrida, o fluxo utilizado foi de 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ nos primeiros 15 min, 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 15 e 40 min e novamente 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 40 min e 45 min. A variação de gradiente do tampão B foi de 10% (v/v) a 15% (v/v) em 5 min, de 15% (v/v) a 35% (v/v) em 20 min, de 35% (v/v) a 45% (v/v) em 5 min, de 45% (v/v) a 80% (v/v) em 5 min, mantido por 5 min em 80% (v/v) e os últimos 5 minutos em 10% (v/v).

A ionização das moléculas por electrospray foi realizada com uma voltagem fixa de 3.000 V, temperatura de 90°C sob 5 psi de nitrogênio. Os espectros foram adquiridos em modo positivo de MS/MS automaticamente com um limiar de 25 *counts*, dentro de uma amplitude de 300 a 2000 m/z. As aquisições foram realizadas simultaneamente com o peptídeo padrão GFP através do sistema Nanolock Spray (Waters), para corrigir as variações de massa que ocorrem ao longo do tempo.

Os espectros de massas das amostras dos diferentes tratamentos foram processados através do programa ProteinLynx V 2.1 (Waters) e analisados para a identificação proteica no programa MASCOT MS/MS Ions Search (<http://www.matrixscience.com>). Neste, utilizamos como parâmetros para identificação:

- *Database*: SwissProt (Bairoch et al., 2005);
- *Taxonomy*: Viridiplantae,
- *Enzyme*: Trypsin;
- *Fixed modification*: Carbamidomethyl (C);
- *Variable modifications*: Oxidation (M);
- *Peptide tol.*: $\pm$ 80ppm;
- *MS/MS tol.*: $\pm$ 0.5 Da;
- *Peptide charge*: 2+ and 3+.

3.9 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos diferentes tempos de exposição à luz, conforme figura 2, foram pré-fixados em uma mescla de 2,5% v/v glutaraldeído e 2,5% v/v paraformaldeído em 0,05M cacodilato pH 7 e 0,001M CaCl₂. Posteriormente, foram lavados três vezes em tampão 0,05M cacodilato; e pós-fixados

com 1% p/v OsO_4 em tampão 0,05M cacodilato durante 2 horas. Então, foram lavados com água destilada e fixados por uma noite em 0,5% p/v acetato de uranila.

Após, desidratarmos o material em gradiente de acetona (10%, 30%, 50%, 70%, 90% v/v) durante 10 minutos em cada solução e por fim foi lavado três vezes em acetona 100% durante 10 minutos em cada lavagem. Infiltramos com uma mistura 1:1 de acetona / Spurr durante quatro horas e depois com resina pura Spurr durante uma noite. Colocamos o material vegetal em forma de silicone cheia de resina pura e foi polimerizado em estufa à 70°C durante 48 horas. Em seguida, os blocos foram aparados (*trimming*) no aparelho EM Trimer (Leica) com o objetivo de reduzir a superfície de corte e eliminar o excesso de resina. Após esse procedimento, os blocos foram levados ao ultramicrotomo Ultracut E (Reicher), para então desbastar com lâmina de vidro até que o material dos cotilédones ficasse exposto; e então foi utilizada a lâmina de diamante para obter cortes de aproximadamente 50nm de espessura. Esses cortes foram pescados com auxílio da tela porta espécime de 300 mesh.

As telas foram contrastadas com solução de 3% p/v acetato de uranila durante 15 minutos, lavadas três vezes em água destilada, e 5% p/v citrato de chumbo durante 15 minutos em ambiente saturado de NaOH, e novamente lavados três vezes com água destilada. As telas porta espécie foram observadas e analisadas no microscópio eletrônico de transmissão EM 900 (Zeiss), com uma velocidade de aceleração de 50KV. Todo esse procedimento foi realizado no Núcleo de Apoio à Pesquisa / Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, ESALQ/USP.

3.10 PCR quantitativo

Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 2, foram utilizadas para a extração do RNA total utilizando-se o reagente Trizol da Invitrogen. Os Poly(A) mRNAs foram purificados a partir de 150 µg de RNA total, com auxílio do “Dynabeads mRNA Purification kit” de acordo com descrito pelo fabricante (Invitrogen), e eluídos em 20 µL de Tris-HCl 10 mM. Os cDNAs foram então, sintetizados com auxílio do kit SuperScript™ One-step RT-PCR with Platinum® *Taq* (Invitrogen) em uma reação de 20 µL, contendo 3 µL do mRNA eluído, 10µM de cada par de primers específicos, conforme tabela 1, 2µL do tampão de

reação e 1 µL do tampão contendo a enzima RT/Platinum *Taq*. O programa de amplificação utilizado compreendeu: 2 ciclos (49°C, 30 min; 94°C, 2 min.) e 10 ciclos (94°C, 45s; 55°C, 1 min.; 72°C, 1^{1/2} min.), seguidos de uma extensão final de 5 min a 72°C.

As reações de análise de PCR quantitativo foram realizadas com o MaximaTM Sybr Green qPCR Master Mix, de acordo com as normas do fabricante (Fermentas). Para as reações utilizou-se 1/10 do cDNA sintetizado por reação, baseado em análise preliminar. O programa de amplificação utilizado compreendeu: 1 ciclo (95°C, 3 min.) e 45 ciclos (95°C, 20s; 55°C, 30s; 72°C, 30s.), seguidos de 1 ciclo (95°C, 30s) e 40 ciclos (55°C, 30s). Os primers utilizados, com suas seqüências, gi e tamanho do produto resultante estão listados na Tabela 1. A especificidade de anelamento dos primers nas reações de amplificação foram verificadas pela análise das curvas de “melting” e a inclinação das curvas padrões, determinadas para cada corrida de PCR, foram utilizadas para o cálculo da eficiência, de acordo com o programa LinReg (Ruijter *et al.*, 2009). A análise de quantificação da expressão dos genes de interesse relativa à expressão do gene da ubiquitina foi determinada pelo método $2^{-\Delta CT}$ REST© (Pfaffl, 2002).

Tabela 3 - Genes analisados por PCR em tempo real de amostras de cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos diferentes períodos de exposição à luz. Identificação do Gene (gi) de acordo com o NCBI. Sequência dos *primers* e tamanho dos produtos resultantes das amplificações, em pares de bases (pb)

(continua)

Genes	Produto (pb)	gi (NCBI)	Sequência do Primer
Chlorophyll a-b binding protein 21, chloroplastic (Lhcb1*2 / Tab)	276	19822	L:AGCGAGGGTGGACTTGACTA R:CCTGAACAAAGAATCCGAACA
Photosystem II protein D1 (D1 / Tab)	728	11465934: c1595-534	L:TTCATTGCTGCTCCTCCAGT R:AATCCAAGGTCGCATACCC
Photosystem II protein D2 (D2 / Tab)	659	11465934: 34470-35531	L:ATTTGAAGACGGTGATGGTG R:CCTGAGAAACGAAGTCATAGGC
Photosystem II 44 kDa reaction center protein (CP43 / Tab)	773	11465934: 35515-36900	L:GGGAGGGGGAGATGTAAGAA R:CAAGCAATGAAACCAAAGACG
Photosystem II 47 kDa protein (CP47 / Tab)	676	11465934: 74953-76479	L:CGGTTGGATGGTTAGGACAC R:CCCTTGGACTGCTACGAAAA
ATPase alfa subunit (ATP-A / Tab)	284	76559634	L:GGCGGTCATACTTCCTTCAC R:CTATTGTGGTAGCCGAAACG
ATPase beta subunit (ATP-B / Tab)	254	47508447	L:GGAAACTCCATCCCTAAATCC R:ATTGGTGGCAAACCTTCATC
Violaxanthin de-epoxidase, chloroplastic (VDE / Tab)	223	1463122	L:TCCAAAGTAGAAAATAGTCCAGAGG R:TCTCAACAAGGGGAGGTTCA

Tabela 3 - Genes analisados por PCR em tempo real de amostras de cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos diferentes períodos de exposição à luz. Identificação do Gene (gi) de acordo com o NCBI. Sequência dos *primers* e tamanho dos produtos resultantes das amplificações, em pares de bases (pb)

(conclusão)

Genes	Produto (pb)	gi (NCBI)	Sequência do Primer
Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic (ZEA / Tab)	264	1370273	L:TCTTCTGGTTGGTGCTGATG R:CTTGCCTTTTTACCGTTTGG
Chlorophyll synthase, chloroplastic (ChlS / Ara)	292	145339377	L:TGTCTGGTCCTTGTCTTACTGG R:TCCAACCCATCCATTTTGT
Timing of CAB protein TOC1 (TOC / Ara)	171	836259	L:GATTCCACGAGTTTGGGAGA R:CAGCATCTTCATACCCTTAGCC
Late elongated hypocotyl protein (LHY / Ara)	126	839341	L:TGGACTGAGGATGAGCATGA R:GAACTTTTGTGCATGACTTCTGA
CIR1/RVE2 (CCA / Ara)	180	833700	L:TGGACAGAAGCAGAGCATGA R:CGGGATCTCAATGGACTCAG
Constans-like 2 (COL / Ara)	214	821298	L:CGACTCTGCCTACTTGTGC R:AATCGGAACTCGCTGATGAC
Phytochrome-associated protein 1 (PIF / Ara)	189	820898	L:TGGTCAAGGAGAAGAGAAACCT R:CATCCAAATGTCAAGGCAGA
Phytochrome B protein (Phy / Ara)	293	2370331	L:ACCTACGGGGATTGTTACCC R:TATGGGACCGAAACCAAAAC
Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1, chloroplastic (GLS / Ara)	220	120549344	L:TGGCTTCTCAAGGAAAGGAA R:GAGGCATTCTCAGGTCCAAG

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Material Vegetal

As plantas de *Nicotiana tabacum* das duas linhagens transgênicas – TR-1 e TR-2 – e da linhagem selvagem WT mantidas em câmara de crescimento controlada, após 12 semanas da germinação, o terceiro par de folhas de seis plantas de cada linhagem, foi colhido e congelado em nitrogênio líquido para prosseguir com a extração de proteínas, conforme figura 4.

No segundo experimento, os cotilédones estiolados das três linhagens foram coletados nos períodos de 0 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas e 24 de luz; congelados em nitrogênio líquido para proceder com o isolamento do RNA total; ou fixados em tampão de fixação para microscopia eletrônica; conforme a figura 5.

Figura 4 - Plantas de *Nicotiana tabacum* da linhagem selvagem (WT) e as duas linhagens transgênicas (TR-1 e TR-2) após 12 semanas da germinação. No detalhe, o terceiro par de folhas de cada linhagem, utilizado na análise de proteômica (barra= 5 centímetros)

Figura 5 - Plântulas de *Nicotiana tabacum* selvagem (WT) e as duas linhagens transgênicas (TR-1 e TR-2) germinadas no escuro com 18°C durante uma semana e submetidas a um banco de luz com $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância. Os cotilédones de cada linhagem foram coletados em cada período para a análise em PCR em tempo real e microscopia eletrônica de transmissão)

4.2 Proteoma foliar de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* que expressam constitutivamente o gene *Lhcb1*2* de ervilha

Existem distintos protocolos de extração de proteínas publicados na literatura, todavia, grande parte otimiza os protocolos originais de extração ácida utilizando ácido tricloroacético (TCA) para precipitação protéica e lavagem deste *pellet* com acetona, conforme o trabalho proposto por Damerval (1986); ou então o protocolo de extração utilizando centrifugação diferenciada em um gradiente de sacarose e fenol. Na fase fenólica, a qual encontra-se a população de proteínas, lava-se com acetato de amônio em metanol e acetona sob baixa temperatura, ambiente insolúvel para proteínas, conforme proposto inicialmente por Hurkman e Tanaka (1986). Este trabalho; por ser específico de plantas, organismos recalcitrantes para extração de proteínas já que estes possuem uma infinidade de metabólicos secundários tais como polifenóis e açúcares complexos como amido e constituintes de parede celular; tem sido amplamente utilizado em trabalhos de proteômica vegetal, possuindo mais de 300 citações (Web of Science, Dezembro de 2009).

No presente trabalho de folhas de *Nicotiana tabacum* WT, TR-1 e TR-2; a metodologia de extração fenólica foi muito eficiente com alto rendimento; e após a solubilização e quantificação procedeu-se à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE) com a finalidade de verificar a qualidade da extração (figura 6), o qual não apresentou nenhum sinal de impurezas ou degradação das três amostras.

Figura 6 - Imagem do gel de SDS-PAGE, conforme Laemmli (1970), das proteínas extraídas de folhas de *Nicotiana tabacum* conforme o método fenólico de Hurkman e Tanaka (1986). MW; marcador molecular em KDa (*Broad Range, Protein Molecular Weights*, BioRad). WT; amostra das plantas da linhagem selvagem não transformante. TR-1; amostra das plantas da primeira linhagem transgênica. TR-2; amostra das plantas da segunda linhagem transgênica

4.3 Eletroforese bidimensional

A separação das proteínas de folhas de *Nicotiana tabacum* dos diferentes tratamentos por eletroforese bidimensional usando um gradiente de pH de 3-10; o mais amplo gradiente disponível comercialmente; apresentou grandes diferenças na expressão de diversos *spots* nos distintos tratamentos, como mostra a figura 7.

Figura 7 - Imagem dos géis 2D-PAGE das proteínas extraídas de folhas de *Nicotiana tabacum*, utilizando fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 3-10 não linear, corados com a solução de Coomassie G250. WT; amostra das plantas da linhagem selvagem não transformante. TR-1; amostra das plantas da primeira linhagem transgênica. TR-2; amostra das plantas da segunda linhagem transgênica

Entretanto, testes preliminares de sequenciamento de proteínas por espectrometria de massas separadas com fitas de pH 3-10 apresentaram baixa eficiência de identificação, já que possuem diversas proteínas em um mesmo *spot*. Para contornar essa problemática, optamos em utilizar fitas com um gradiente menor, com a finalidade de aumentar a resolução da eletroforese bidimensional.

Com a análise desses géis de pH 3-10 percebemos que grande parte das proteínas estão na faixa de pH 4-7, como demonstra a figura 8. Assim, para melhorar a resolução dos *spots*, realizamos géis bidimensionais com fitas de pH 4-7 em triplicata para cada tratamento, os quais apresentaram grande reprodutibilidade.

Figura 8 - Avaliação por eletroforese bidimensional da distribuição das proteínas de folhas de *Nicotiana tabacum* com três meses. Coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

Figura 9 - Imagem dos géis 2D-PAGE das proteínas extraídas de folhas de *Nicotiana tabacum*, utilizando fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7, corados com a solução de Coomassie G250. WT; amostra das plantas da linhagem selvagem não transformante. TR-1; amostra das plantas da primeira linhagem transgênica. TR-2; amostra das plantas da segunda linhagem transgênica

4.4 Identificação de proteínas diferencialmente expressas

Após a eletroforese bidimensional de pH 4-7, a triplicata de cada tratamento foi fotodocumentada e posteriormente analisado pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). Para determinar diferenças na expressão protéica, foram consideradas as alterações de volume normalizado dos *spots* com 5% de significância no teste estatístico de ANOVA (*analysis of variance*), utilizando como controle do experimento a linhagem WT, e como tratamentos, as duas linhagens transformantes. Além desses *spots* diferencialmente expressos a 5% com ANOVA, visamos também os *spots* exclusivos de cada tratamento.

No total, encontramos 244 *spots* de interesse; dos quais 24 estavam presentes somente no material controle WT, sendo suprimidos nas linhagens transgênicas. 10 *spots* foram encontrados somente na TR-1, e 12 *spots* são exclusivos da linhagem TR-2; entretanto, 122 estão presentes em ambos os tratamentos transgênicos, ausentes no material WT. Foram encontrados 76 *spots* diferencialmente expressos nos três tratamentos, com 5% de significância no teste de ANOVA. Tais quantidades de *spots* estão representados na figura 10. Não foram encontrados *spots* presentes somente em uma linhagem transformante, quaisquer delas, e o material WT. Todos os *spots* de interesse (244) estão marcados em verde na figura 11.

Figura 10 - Representação esquemática da quantidade de *spots* diferencialmente expressos e exclusivos de cada tratamento

Figura 11 - Imagem dos géis 2D-PAGE das proteínas extraídas de folhas de *Nicotiana tabacum*, utilizando fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7, corados com a solução de Coomassie G250. WT; amostra das plantas da linhagem selvagem não transformante. TR-1; amostra das plantas da primeira linhagem transgênica. TR-2; amostra das plantas da segunda linhagem transgênica. Em vermelho, spots que estão presentes nos três tratamentos, porém não apresentaram alterações de volume significativas ($p < 0,05$). Em verde, 244 spots diferencialmente expressos ($p < 0,05$) e spots exclusivos de cada tratamento

Nas plantas selvagens (WT), os 24 *spots* exclusivos estão marcados em verde na figura 12. Estes foram recortados, descorados, digeridos e seus peptídeos seqüenciados por espectrometria de massas. As proteínas identificadas; numeradas com o respectivo *spot* conforme a figura 12, número de peptídeos identificados, cobertura, número de acesso, ponto isoelétrico e massa molecular teórica e observada, volume normalizado de cada *spot*; encontram-se listadas na tabela 4.

Figura 12 - Imagem do gel 2D-PAGE das proteínas extraídas de folhas de *Nicotiana tabacum*, utilizando fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7, corados com a solução de Coomassie G250. WT; amostra das plantas da linhagem selvagem não transformante. Em verde, 24 *spots* exclusivos desse tratamento, sendo os que estão numerados em verde, identificados na tabela 4

Tabela 4 - Identificação de proteínas exclusivas da linhagem não transformada WT. Numeração dos *spots* conforme figura 12

Spot	Proteína	Número de acesso	Score - Mascot	Peptídeos Encontrados	Cobertura (%)	Teórico		Experimental		Volume Encontrado
						pI	Mr (KDa)	pI	Mr (KDa)	
2	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic EC=3.6.3.14	Q8S8Y3	92	12	24	5,26	55,419	5,1750	51,3437	0,419009
7	Glutamate decarboxylase	Q8LKR4	80	5	8	5,66	55,931	6,2684	43,9167	0,205297
14	Malate dehydrogenase, mitochondrial EC=1.1.1.37	Q43744	63	2	6	8,81	35,86	6,8250	27,2665	0,133601
15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic EC=1.2.1.12	P09094	106	5	22	6,14	35,685	7,0218	29,0679	0,140476
16	14-3-3-like protein A	P93342	202	14	48	4,69	28,813	4,6774	14,6499	0,362132
18	Ascorbate peroxidase	Q945R6	67	4	19	6	16,118	5,7147	17,1314	0,143667
19	Cytosolic ascorbate peroxidase 1	Q3I5C4	81	4	7	5,61	27,739	5,8974	16,5799	0,152056
20	Carbonic anhydrase, chloroplastic EC=4.2.1.1	P27141	84	3	10	6,41	3,4895	6,6845	8,5782	0,210584
21	Carbonic anhydrase, chloroplastic EC=4.2.1.1	P27141	78	5	13	6,41	3,4916	6,7547	8,3036	0,91241

Dentre as proteínas identificadas exclusivas da linhagem WT podemos destacar a enzima Descarboxilase do Glutamato, *spot 7*, que participa na produção do ácido gama-aminobutírico (GABA), um aminoácido não-proteico, e sua função em plantas não é totalmente elucidada, mas sua expressão foi relatada em distintas condições ambientais, tais como hipoxia, congelamento, choque por calor, germinação, estresse hídrico e ausência de luminosidade (MATSUYAMA et al., 2009). Além disso, foram encontradas proteínas relacionadas com estresses como a *14-3-3-like protein A* e a proteína envolvida no ciclo do ácido ascórbico, *ascorbate peroxidase* em dois *spots* distintos.

A enzima Anidrase Carbônica (EC=4.2.1.1), foi encontrada em dois *spots* distintos, sendo que o *spot 21* possui alta expressão; gera o íon bicarbonato a partir da hidratação do CO₂. Lazova e colaboradores (2009) em um experimento com o mutante *costata* de ervilha, mutante este que superexpressa a isoforma anidrase carbônica no tilacóide, em comparação ao WT concluem que esta enzima está intimamente relacionada à regulação do gradiente de prótons através das membranas dos tilacóides, sendo que a alta atividade da enzima causa a regulação negativa do PSII.

No material transformante, TR-1, os 10 *spots* exclusivos estão marcados em verde na figura 13, os quais foram preparados para espectrometria de massas. As proteínas identificadas; número de peptídeos identificados, cobertura, número de acesso, ponto isoelétrico e massa molecular teórica e observada, volume normalizado de cada *spot*; encontram-se listadas na tabela 5.

Figura 13 - Imagem do gel 2D-PAGE das proteínas extraídas de folhas de *Nicotiana tabacum*, utilizando fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7, corados com a solução de Coomassie G250. TR-1; amostra das plantas da linhagem transformante. Em verde, 10 *spots* exclusivos desse tratamento, sendo os que estão numerados em verde, identificados na tabela 5

Tabela 5: Identificação de proteínas exclusivas da linhagem transformada, TR-1. Numeração dos *spots* conforme figura 13

Spot	Proteína	Número de acesso	Score - Mascot	Peptídeos Encontrados	Cobertura (%)	Teórico		Experimental		Volume Encontrado
						pI	Mr (KDa)	pI	Mr (KDa)	
3	Methionine synthase EC=2.1.1.14	Q9LM03	495	14	14	5,93	84,898	6,6957	93,0062	0,276596
4	Methionine synthase EC=2.1.1.14	Q9LM03	203	6	9	5,93	84,903	6,7969	92,4606	0,216325
6	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplastic	Q40565	70	3	10	8,14	48,313	5,0935	57,9199	0,079614

Entre as proteínas identificadas exclusivas da linhagem TR-1 podemos destacar a enzima Sintetase de Metionina (EC=2.1.1.14) encontrada em dois *spots* distintos, o qual catalisa a reação de metilação de homocisteína à metionina. Ravel e colaboradores (2004) propõem a relação entre a biossíntese desse aminoácido e o metabolismo do carbono nos cloroplastos, já que uma isoforma desta proteína está localizada somente no estroma, desempenhando um papel fundamental na autonomia dessa organela na síntese desse aminoácido.

Já no material transformante TR-2, os 12 *spots* exclusivos estão marcados em verde na figura 14. As proteínas identificadas; numeradas com o respectivo *spot* conforme a figura 14, com o número de peptídeos identificados, cobertura, número de acesso, ponto isoelétrico e massa molecular teórico e observada, volume normalizado de cada *spot*; encontram-se listadas na tabela 6.

Figura 14 - Imagem do gel 2D-PAGE das proteínas extraídas de folhas de *Nicotiana tabacum*, utilizando fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7, corados com a solução de Coomassie G250. TR-2; amostra das plantas da linhagem transformante. Em verde, 12 *spots* exclusivos desse tratamento, sendo os que estão numerados em verde, identificados na tabela 6

Tabela 6 - Identificação de proteínas exclusivas da linhagem transformada, TR-2. Numeração dos *spots* conforme figura 14

<i>Spot</i>	Proteína	Número de acesso	Score - Mascot	Peptídeos Encontrados	Cobertura (%)	Teórico		Experimental		Volume Encontrado
						pI	Mr (KDa)	pI	Mr (KDa)	
3	Magnesium-chelatase subunit chlI, chloroplastic EC=6.6.1.1	O22436	75	3	7	6,64	46,884	5,2818	52,4623	0,0747438
9	ATP synthase subunit beta EC=3.6.3.14	Q8MBI2	102	5	10	5,17	52,279	6,6367	35,5589	0,0768851
11	ATP synthase subunit beta, chloroplastic EC=3.6.3.14	Q85V44	87	7	10	5,16	53,408	5,9199	23,5514	0,0269664

Dentre as proteínas identificadas que são exclusivas à linhagem TR-2; a enzima *Magnesium-chelatase subunit chl* (EC=6.6.1.1), envolvida na biossíntese de clorofila, responsável pela ligação do íon magnésio ao anel de porfirina, sendo que é fortemente expressa em folhas jovens e possui expressão basal em folhas maduras.

Todavia, foram encontrados 122 *spots* em ambas as linhagens transgênicas, ausentes na linhagem WT. Estes estão marcados em verde na figura 15. As proteínas identificadas, número de peptídeos identificados, cobertura, número de acesso, ponto isoelétrico e massa molecular teórico e observada, volume normalizado de cada *spot*; encontram-se listadas na tabela 7.

Figura 15 - Imagem dos géis 2D-PAGE das proteínas extraídas de folhas de *Nicotiana tabacum*, utilizando fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7, corados com a solução de Coomassie G250. TR-1; amostra das plantas da primeira linhagem transgênica. TR-2; amostra das plantas da segunda linhagem transgênica. Em verde, 122 spots exclusivos das linhagens transformantes, ausentes na WT

Tabela 7: Identificação de proteínas exclusivas das linhagens transformadas. Numeração dos *spots* conforme figura 15

(continua)

Spot	Proteína	Número de acesso	Score - Mascot	Peptídeos Encontrados	Cobertura (%)	Teórico		Experimental		Volumes Encontrados	
						pI	Mr (KDa)	pI	Mr (KDa)	TR-1	TR-2
11	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic (60 kDa chaperonin subunit alpha)	P21239	75	4	6	4,84	57,714	5,3464	32,2272	0,037524	0,067745
3	Elongation factor 2	O23755	43	3	3	5,53	94,708	6,5158	96,9677	0,574685	0,675402
10	Isocitrate dehydrogenase [NADP] EC=1.1.1.42	Q06197	167	9	12	5,87	46,363	4,8292	67,9589	0,056388	0,091869
24	Magnesium-chelatase subunit chl, chloroplastic EC=6.6.1.1	O22436	57	7	11	6,64	46,912	5,1469	58,0744	0,224017	0,175327
29	Quinone oxidoreductase-like protein	Q8LEB8	58	3	12	5,89	32,764	5,9733	45,6590	0,115055	0,073201
31	Glutamate receptor 3.2	Q93YT1	43	2	2	8,03	101,947	6,2544	51,4824	0,117701	0,093679
32	GDP-mannose 3,5-epimerase EC=5.1.3.18	Q93VR3	56	3	10	5,85	43,157	6,3584	50,3815	0,316357	0,198619
34	Isocitrate dehydrogenase [NADP] EC=1.1.1.42	Q06197	57	2	5	5,87	46,363	6,4933	54,3248	0,217732	0,111567
35	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic EC=1.1.1.42	Q40345	41	3	7	6,15	48,701	6,6985	57,0011	0,102602	0,105537
38	DNA-directed RNA polymerase subunit beta EC=2.7.7.6	Q85FM7	42	2	1	6,41	121,567	5,1216	31,7226	0,084977	0,095469
46	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial EC=1.1.1.37	Q9ZP06	95	5	9	8,54	36,01	6,2600	41,9845	0,30667	0,212697
49	ATP synthase gamma chain, chloroplastic	P29790	78	3	9	8,16	41,706	6,5973	44,1626	0,24703	0,469308

Tabela 7: Identificação de proteínas exclusivas das linhagens transformadas. Numeração dos *spots* conforme figura 15

(conclusão)											
Spot	Proteína	Número de acesso	Score - Mascot	Peptídeos Encontrados	Cobertura (%)	Teórico		Experimental		Volumes Encontrados	
						pI	Mr (KDa)	pI	Mr (KDa)	TR-1	TR-2
52	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic EC=1.2.1.12	P34921	67	2	6	6,46	37,105	6,4399	39,7667	0,385044	0,595089
54	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A subunit	Q38IX1	105	3	10	8,42	43,506	6,7744	48,5013	0,719	0,342876
56	Fructose-bisphosphate aldolase EC=4.1.2.13	Q9SXX4	54	3	12	6,92	42,858	6,6535	46,1660	0,24703	0,469308
61	14-3-3 a-1 protein	Q75ZE5	84	5	13	4,7	28,861	4,8236	29,4539	0,079297	0,073987
62	14-3-3-like protein B	P42654	87	4	9	4,82	29,62	4,8714	31,8233	0,085767	0,068343
75	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic EC=1.11.1.15	Q96291	47	2	9	6,92	29,074	4,8208	19,3066	0,037374	0,045552
77	ATP synthase delta chain, chloroplastic	P32980	78	4	17	8,96	26,798	5,0822	10,9636	0,083469	0,103289
84	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplastic	Q40565	242	10	15	8,14	48,541	4,8967	6,4151	0,078692	0,088072
89	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplastic	Q7DM39	80	6	20	6,84	28,805	5,5769	14,4223	0,336363	0,350021
96	ATP synthase epsilon chain, chloroplastic	P00834	109	3	14	5,18	14,598	5,5460	6,5481	0,094341	0,226933
105	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	Q01587	65	4	11	7,57	45,909	6,3528	14,5739	0,100804	0,139147
106	ADP-ribosylation factor	P49076	65	5	25	6,31	20,705	6,8278	12,4115	0,350182	0,100526

Dentre as proteínas exclusivas das linhagens transgênicas, encontramos novamente a enzima *Magnesium-chelatase subunit chlI* (EC=6.6.1.1), responsável pela biossíntese de clorofila, correspondendo ao *spot* 24.

A enzima Desidrogenase do Isocitrato [NADP] (EC=1.1.1.42), identificada nos *spots* 10, 34 e 35; a qual possui o nome alternativo de Descarboxilase do Oxalosuccinato, está envolvida em suprir com 2-oxoglutarato para a síntese de aminoácidos e assimilação de amônia.

A proteína transmembrana *Glutamate receptor 3.2*, *spot* 31, é um receptor de membrana não seletivo e está envolvida com distintos processos fisiológicos, tais como a transdução de sinal de alta luminosidade e a homeostase de cálcio.

A enzima desidrogenase do Gliceraldeído-3 fosfato, encontrada em dois *spots* distintos, importante enzima da glicólise pode nos indicar uma maior demanda energética nas plantas TR-1 e TR-2, com relação à linhagem controle WT. Também participante da glicólise, a enzima frutose-bisfosfato aldolase, *spot* 56. Já a proteína desidrogenase do malato, *spot* 46, enzima do ciclo de Krebs, o qual produz oxaloacetato a partir de malato, e reduzindo NAD à NADH.

Foram encontradas nessas duas linhagens de plantas transgênicas – TR-1 e TR-2 – duas proteínas da família 14-3-3, isoformas A e B, correspondendo respectivamente aos *spots* 61 e 62. As proteínas 14-3-3 são conservadas e presentes em todas as células eucariotas, atuando com função reguladora em diversas proteínas, como quinases, fosfatases e receptores transmembranas. Há diversos fatores ambientais relacionados à expressão da 14-3-3, como estresses bióticos e abióticos.

A proteína encontrada 2-Cys peroxiredoxin BAS1, *spot* 75, com o nome alternativo de *Thiol-specific antioxidant protein A*, específica de cloroplastos atua como enzima peroxidase antioxidante no processo fotossintético, envolvida na destoxicação de alquil hidroperóxido através da redução via o sistema tiól, protegendo assim as proteínas que possuem ligações cruzadas de enxofre via cistinas da oxidação deste composto reativo.

A enzima *Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase*, encontrada nos *spots* 84 e 105, nos indica uma maior expressão e atividade da RUBISCO, juntamente com o ciclo de Calvin nas plantas TR-1 e TR-2, assim como há uma maior

geração nessas plantas de ATP a partir de ADP+P através do complexo ATP sintase cloroplastidial, sendo que encontramos 3 *spots*; 49, 77 e 96; com cadeias protéicas distintas os quais formam esse complexo.

Já a proteína *Oxygen-evolving enhancer protein*, *spot* 89, importante proteína do *core* central do PSII, a qual desempenha a função de gerar oxigênio molecular a partir de duas moléculas de espécies reativas de oxigênio (ROS), após a quebra da molécula de água. Esta proteína possui função reguladora no fotossistema II.

Além dessas proteínas exclusivas de determinado tratamento, identificamos as proteínas presentes nos géis bidimensionais das três linhagens, e que apresentaram alterações de volume significativas ($p < 0,05$), totalizando 76 *spots*. Estes estão marcados em verde na figura 16. As proteínas identificadas; numeradas com o respectivo *spot* conforme a figura 16, número de peptídeos identificados, cobertura, número de acesso, ponto isoelétrico e massa molecular teórica e observada, volume normalizado de cada *spot*; encontram-se listadas na tabela 8.

Figura 16 - Imagem dos géis 2D-PAGE das proteínas extraídas de folhas de *Nicotiana tabacum*, utilizando fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7, corados com a solução de Coomassie G250. WT; amostra das plantas da linhagem selvagem não transformante. TR-1; amostra das plantas da primeira linhagem transgênica. TR-2; amostra das plantas da segunda linhagem transgênica. Em verde, 76 spots diferencialmente expressos ($p < 0,05$)

Tabela 8: Identificação de proteínas diferencialmente expressas das três linhagens. Numeração dos *spots* conforme figura 16 (continua)

Spot	Proteína	Número de acesso	Score - Mascot	Peptídeos Encontrados	Cobertura (%)	Teórico		Experimental		Volumes Encontrados			ANOVA
						pI	Mr (KDa)	pI	Mr (KDa)	WT	TR-1	TR-2	
1	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha (60 kDa chaperonin subunit alpha)	P08824	413	17	23	4,77	52	4,9782	69,9926	0,889475	0,88584	1,14483	0.502273
2	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic (60 kDa chaperonin subunit beta)	B96597	469	14	21	6,21	64,17	5,3493	70,3698	1,60067	1,65707	0,717866	0,362946
3	Tubulin beta-1 chain	P37392	84	10	18	4,75	50,83	5,1131	67,4157	1,07422	0,523823	0,293196	0,000822911**
4	Tubulin beta-1 chain	P12411	134	9	18	4,68	50,19	5,1469	66,6990	0,486475	0,43724	0,875866	0,243466
5	V-type proton ATPase subunit B 1	Q40078	73	12	24	5,12	54,11	5,2116	66,8774	1,26943	0,783793	0,752232	0,0848231
6	Alpha tubulin	Q9NH81	156	5	13	6,02	41,46	5,2762	66,1669	1,26943	0,783793	0,752232	0,0848231
7	ATP synthase subunit beta, chloroplastic EC=3.6.3.14	P26530	471	11	24	5,15	53,49	5,3633	65,9906	1,91591	2,08512	2,72707	0,388616
8	ATP synthase subunit beta, chloroplastic EC=3.6.3.14	Q3C1J5	560	23	24	5,1	53,56	5,4280	63,4049	9,7236	7,30182	9,59173	0,0262483**
9	FtsH-like protein Ptf	Q9ZP50	458	27	26	6	74,51	5,3493	79,9779	0,402549	0,274018	0,262959	0,0741114
10	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B, chloroplastic	P31542	284	21	19	5,86	102,2	5,6978	96,9677	0,993614	0,538506	0,436173	0,00867035**
11	ATP-dependent Clp protease	Q9FI56	411	24	21	6,36	103,6	5,6556	97,8511	0,382216	0,24852	0,255922	0,102253
12	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B, chloroplastic	P31542	573	36	28	5,86	102,5	5,7400	98,1484	0,132405	0,182868	0,118127	0,0377082**
13	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	P14226	157	6	19	6,25	35,1	5,1975	36,2043	0,467771	1,19179	1,35255	0,00259617**
14	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	P23322	237	10	25	5,91	35,16	5,2846	35,1323	2,80344	2,30453	2,66514	0,250397
15	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	Q40459	139	17	17	5,89	35,38	5,3549	35,3452	1,50649	1,30117	1,21987	0,311513
16	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	P23322	237	10	25	5,91	35,16	5,4167	35,5589	1,52533	1,0863	1,2511	0,208172
17	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic EC=3.1.3.37	P46285	78	5	11	6,04	42,56	5,1131	48,6337	0,762533	0,408523	0,534492	0,0534594**
18	30S ribosomal protein S1, chloroplastic	P29344	99	4	8	5,41	44,58	5,1581	54,6164	0,338424	0,260735	0,249718	0,435852

Tabela 8: Identificação de proteínas diferencialmente expressas das três linhagens. Numeração dos spots conforme figura 16 (conclusão)

Spot	Proteína	Número de acesso	Score - Mascot	Peptídeos Encontrados	Cobertura (%)	Teórico		Experimental		Volumes Encontrados			ANOVA
						pI	Mr (KDa)	pI	Mr (KDa)	WT	TR-1	TR-2	
19	Phosphoribulokinase, chloroplastic	P27774	285	16	21	6,03	44,49	5,2818	44,9062	0,997171	0,689618	0,981528	0,403444
20	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplastic	Q40565	423	26	27	8,14	48,31	5,4364	47,8436	6,02618	4,94295	5,47299	0,188704
21	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplastic	Q40565	293	29	27	8,14	48,31	5,4111	52,6035	0,695337	1,833407	2,516463	0,03285507**
22	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplastic	Q40565	271	24	21	8,14	48,31	5,5601	54,7628	0,794659	1,23293	1,02253	0,0833718
23	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplastic	Q40565	180	7	15	8,14	48,31	5,6219	53,1719	0,833488	0,606714	0,778853	0,443485
24	Actin	Q05214	125	5	27	5,43	41,94	5,6809	55,2039	0,139489	0,616714	0,299809	0,0244865**
25	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplastic	Q40460	127	6	8	7,59	47,43	5,7737	52,8871	1,38684	0,886275	0,978196	0,0492366**
26	Glutamine synthetase EC=6.3.1.2	Q69B32	317	14	14	6,73	47,95	5,8721	53,0293	4,49987	3,93467	3,67634	0,341277
26	Elongation factor TuB, chloroplastic	Q43364	199	7	12	5,7	46,67	5,8721	53,0293	4,49987	3,93467	3,67634	0,341277
27	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic EC=2.7.2.3	Q42961	874	27	42	8,48	50,15	6,0520	53,1719	1,24878	1,5543	2,41968	0,0120733**
28	Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic EC=4.1.2.13	Q9SJU4	137	11	15	6,18	43,08	5,7765	42,1035	0,702586	0,559191	0,765646	0,135156
29	Fructose-bisphosphate aldolase EC=4.1.2.13	Q9SXX5	267	9	15	6,38	42,79	6,0042	44,2859	0,664629	0,340734	0,439266	0,193748
30	Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic EC=4.1.2.13	Q9SJU4	123	6	11	6,18	42,9	6,2769	44,4094	0,247706	0,51878	0,760918	0,00249863**
31	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic EC=1.18.1.2	P41346	199	16	19	8,7	40,84	6,4764	41,5109	0,062072	0,492824	0,550817	0,00201929**
32	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic EC=1.18.1.2	P41346	151	8	9	8,7	40,55	6,7997	41,6289	0,162869	0,311397	0,440599	0,00998967**
33	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic EC=1.18.1.2	P10933	156	10	21	8,56	40,46	6,7069	46,0389	0,084977	0,062768	0,115268	0,00357637**
34	Probable fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplastic EC=4.1.2.13	Q944G9	109	4	8	6,78	42,96	6,6620	45,1561	0,079891	0,24703	0,469308	0,000200678**
35	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic EC=1.18.1.2	P41346	118	8	9	8,7	40,55	6,6423	37,4056	0,047709	0,0679893	0,0713006	0,0713006

Os *spots* 1 e 2 representam respectivamente duas sub-unidades de função chaperônica da RUBISCO, alfa e beta, sendo que é particularmente interessante enquanto a sub-unidade alfa, *spot* 1, teve sua expressão aumentada na TR-2 em relação a WT; a sub-unidade beta, *spot* 2, teve seu volume diminuído nessa linhagem transgênica em relação à WT; e a linhagem TR-1 teve um comportamento intermediário entre a WT e a TR-2 com relação a essas duas proteínas; assim é claro que cada genótipo está recrutando isoformas específicas para a manutenção de sua homeostase.

A beta tubulina, representada pelos *spots* 3 e 4, também possui sua expressão intimamente relacionada a cada genótipo em estudo. Enquanto o *spot* 3 possui uma diminuição da expressão na TR-2 em relação à WT, o *spot* 4 possui um aumento; enquanto que a TR-1 novamente possui um situação intermediária. Já a alfa tubulina, *spot* 6, teve sua expressão diminuída nas duas linhagens transformantes em relação à WT. Outra proteína estrutural, também componente do citoesqueleto, a actina, *spot* 24, teve sua expressão aumentada nas plantas transformadas, principalmente na TR-1. Essas alterações na expressão das proteínas estruturais do citoesqueleto podem nos auxiliar na interpretação dos dados anatômicos observados por Labate (2004), no qual as plantas TR-1 e TR-2 possuíam um menor número de células do parênquima paliçádico e na epiderme por extensão linear; portanto as células nessas linhagens transformantes são maiores, necessitando de um aumento na expressão de actina e tubulina.

O *spot* 5 representando a proteína *V-type proton ATPase*, proteína transmembrana no vacúolo, importante na manutenção do ΔpH entre o citoplasma e o vacúolo, gerando assim ATP a partir de ADP+P; teve sua expressão diminuída nas linhagens transformantes. Com sua diminuição de expressão, há um maior acúmulo de prótons no citoplasma, ocorrendo assim uma acidificação neste. Com isso, há alterações na cinética enzimática no citosol, assim a expressão de distintas isoformas de uma mesma proteína podem ser melhor compreendida, como ocorreu nos *spots* 1 e 2, as sub-unidades alfa e beta chaperômicas da RUBISCO, enquanto a sub-unidade alfa com ponto isoelétrico ácido teve sua expressão aumentada na linhagem TR-2 em relação à WT; a isoforma beta com *pI* básico tem uma maior expressão na WT em relação à TR-2. Além disto, com alteração do pH no citosol, ocorre também alterações

na solubilidade de gases, principalmente o CO₂. Em um meio aquoso, o gás carbônico reage com a água, originando o ácido carbônico que por ser instável gera o íon carbonato ácido (bicarbonato) e próton; resultando assim num sistema-tampão com uma constante de equilíbrio. Com o aumento na concentração de H⁺ no citosol pela diminuição da expressão da *V-type proton ATPase*, o equilíbrio do sistema-tampão CO₂ – Bicarbonato é deslocado para um aumento nas concentrações de água e CO₂; assim, nas plantas transformantes, a pressão parcial de CO₂ no citosol é maior em relação a linhagem selvagem; influenciando assim numa alta excitação no ciclo de Calvin, já que há nessas plantas transgênicas uma maior produção de força-assimilatória - ATP e NADPH.

Já a proteína *FtsH-like protein Pftf*, *spot 9*, a qual possui função catalítica de proteólise, portanto um mecanismo de controle da expressão gênica pós-traducional, teve sua expressão diminuída nas linhagens transformantes. Também com função de proteólise, a proteína *ATP-dependent Clp protease*, encontrada nos *spots 10, 11 e 12*, é expressa unicamente em cloroplastos maduros, e está envolvida na reciclagem de proteínas desnaturadas por causa da fotossíntese, teve sua expressão também diminuída nos três *spots* nas linhagens transformantes em relação ao WT.

Novamente, encontramos a proteína do *core* central do PSII *Oxygen-evolving enhancer protein* nos *spots 13, 14, 15 e 16*. Houve um grande aumento na expressão dessa proteína especialmente no *spot 13* nas linhagens transformantes de forma gradativa em relação à WT; porém os outros três *spots* dessa proteína tiveram uma oscilação de volume nos três genótipos em estudo. Isto, juntamente com uma isoforma presente somente nas linhagens transformadas, sugere o recrutamento específico de isoformas ou de modificação pós-traducional em cada estado fisiológico.

Assim como ocorreu com a *Oxygen-evolving enhancer* e sub-unidade chaperômica da RUBISCO, a proteína Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase ativase, responsável pela ativação enzimática da RUBISCO, com a isoforma 1 encontrada no *spot 25* e a isoforma 2 encontrada nos *spots 20, 21, 22 e 23*, sofreu uma diminuição de expressão da isoforma 1 com *pl 7,59*; nas linhagens TR-1 e TR-2 em relação à WT. Porém, a isoforma 2 - *pl 8,14* - teve um grande aumento nas linhagens transformantes, principalmente no *spot 21*.

Ocorreu um grande aumento de expressão nas linhagens TR-1 e TR-2 a enzima participante do ciclo de Calvin, fosfoglicerato quinase, *spot* 27, a qual atua na fase de redução do ciclo, gerando 3-fosfo-glicerol fosfato a partir de fosfo-glicerato com o consumo de ATP. Já a enzima fosforibuloquinase, *spot* 19, a última enzima na regeneração de ribulose 1,5 bisfosfato, teve uma expressão elevada na linhagem TR-2 e WT. Essas duas enzimas nos mostram que o Ciclo de Calvin está em alta excitação, como discutido anteriormente.

O *spot* 26, representando a enzima Sintetase de Glutamina (GS), enzima essencial no metabolismo de nitrogênio, o qual catalisa a formação do aminoácido glutamina a partir de glutamato e amônia no interior dos cloroplastos, teve sua expressão diminuída nas linhagens transformantes em relação à WT, apesar de não ser uma alteração significativa. Essa enzima atua no processo de reciclagem de amônia para os cloroplastos, após o evento da fotorrespiração, e a diminuição da expressão dessa enzima sugere uma mudança nos ciclos do carbono e do nitrogênio de forma holística nessas linhagens transformantes.

As proteínas Ferredoxina--NADP redutase encontradas nos *spots* 31, 32, 33 e 35, a qual realizam a redução de NADP^+ à NADPH ao final do PSI, tiveram sua expressão aumentada nas linhagens TR-1 e TR-2, principalmente no *spot* 32. Juntamente com as sub-unidades do complexo protéico ATP sintase, *spots* 7 e 8, sugerem uma maior produção de força assimilatória – ATP e NADPH – para a fixação biológica de carbono no ciclo de Calvin nessas linhagens transformadas.

A enzima Frutose-bisfosfato aldolase, *spots* 28, 29, 30 e 34, a qual catalisa a reação de conversão de frutose 1,6-bisfosfato em glicerato fosfato e gliceraldeído 3-fostato, reação pertencente a glicólise, teve sua expressão aumentada nas linhagens transformantes.

Portanto, com o aumento do tamanho do complexo antena coletora de luz do fotossistema II nas plantas TR-1 e TR-2, tivemos um aumento de quebra da molécula de água – justificada pelo aumento de *Oxygen-involving enhancer* - e geração de prótons e elétrons. Os prótons irão gerar uma quantidade maior de ATP – observado pelos *spots* da ATP sintase exclusivos das linhagens transformantes – e a maior quantidade de elétrons irão ser transportados ao PSI, na qual no complexo ferredoxina-

NADP – o qual também teve sua expressão aumentada – irá gerar uma quantidade maior de NADPH.

A quantidade maior de ATP e NADPH, juntamente com uma elevada pressão parcial de CO₂ no citosol, irão exercer uma maior excitação no Ciclo de Calvin, como ocorreu uma maior expressão de fosfoglicerato quinase, fosforibuloquinase e RUBISCO ativase. Com isso, teremos uma maior síntese de triose-fosfato, e posteriormente açúcares complexos. Com uma maior disponibilidade de glicose, a via glicolítica está em maior excitação – como mostra o aumento de fucose-bisfosfato aldolase. Assim, as plantas transformadas têm uma maior quantidade de energia disponível, inclusive para o crescimento celular, como mostra a expressão de tubulina, actina e dados anatômicos de Labate (2004).

Quando falamos que uma proteína teve sua expressão aumentada ou diminuída, não necessariamente está correto, há diversos mecanismos de regulação da expressão gênica, tal como a degradação de proteínas via proteossomos, como *FtsH-like protein Pftf* e *ATP-dependent Clp protease*. Assim, uma proteína que acreditamos que teve sua expressão aumentada por análise de volume de *spot*, também pode estar ocorrendo uma diminuição no ritmo de degradação dessa proteína em estudo.

4.5 Evolução estrutural dos plastídios à cloroplastos por microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de cotilédones de plântulas, estiolados durante uma semana, provenientes das sementes da linhagem não transformante WT e das duas linhagens transformantes TR-1 e TR-2 foram submetidas à luz (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e os cotilédones das três linhagens foram coletados nos períodos de 0 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas de iluminação; fixados em tampão de fixação para microscopia eletrônica; conforme a figura 5. Após o preparo das amostras para microanálise; observamos e analisamos no microscópio eletrônico de transmissão EM 900 (Zeiss), utilizando os aumentos de 3.000x, 4.400x, 7.000 e 12.000x, respeitando as escalas das figuras 17, 18, 19, 20 e 21. Para essas imagens, focamos principalmente a estrutura e morfologia dos plastídios dos parênquimas.

Ausência de luz

Figura 17 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células dos cotilédones estiolados durante uma semana. Linhagem selvagem (WT), primeira linhagem transformante (TR-1) e da segunda linhagem transformante (TR-2). Aumento de 3.000x, 4.400x, 7.000x e 12.000x; conforme escala

Três horas de luz

Figura 18 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células dos cotilédones estiolados durante uma semana. Linhagem selvagem (WT), primeira linhagem transformante (TR-1) e da segunda linhagem transformante (TR-2). Aumento de 3.000x, 4.400x, 7.000x e 12.000x; conforme escala

Seis horas de luz

Figura 19 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células dos cotilédones estiolados durante uma semana. Linhagem selvagem (WT), primeira linhagem transformante (TR-1) e da segunda linhagem transformante (TR-2). Aumento de 3.000x, 4.400x, 7.000x e 12.000x; conforme escala

Doze horas de luz

Figura 20 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células dos cotilédones estiolados durante uma semana. Linhagem selvagem (WT), primeira linhagem transformante (TR-1) e da segunda linhagem transformante (TR-2). Aumento de 3.000x, 4.400x, 7.000x e 12.000x; conforme escala

Vinte e quatro horas de luz

Figura 21 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células dos cotilédones estiolados durante uma semana. Linhagem selvagem (WT), primeira linhagem transformante (TR-1) e da segunda linhagem transformante (TR-2). Aumento de 3.000x, 4.400x, 7.000x e 12.000x; conforme escala

Com a análise dessas imagens, podemos perceber no tempo zero, nas linhagens transformantes (TR-1 e TR-2) os pro-plastídios (organelas eletrodensas, escuras nas imagens) são extremamente disformes, de tamanho e morfologia discrepantes, muito nítido nas imagens correspondentes a TR-1, contrapondo a linhagem WT que possui plastídios de tamanho compatível ao descrito na literatura e todos com iguais dimensões. Ainda sobre essa prancha, percebemos a completa ausência de tilacóides nos três materiais vegetais.

No tempo de três horas de iluminação, fica claro a enorme quantidade de pro-plastídios das linhagens transgênicas em relação ao WT, particularmente à linhagem TR-2. Já no período de seis horas encontramos grandes diferenças estruturais; com a imagem feita em estereoscópio percebemos na linhagem TR-2 a abertura e diferenciação dos cotilédones, e acúmulo de pigmento. Já nas imagens de microscopia eletrônica, no interior dos plastídios há um início de formação dos tilacóides, mais evidente na ampliação na figura 22. Tal diferenciação não é acompanhada nesse período pelas linhagens WT e TR-1.

Figura 22 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células dos cotilédones estiolados da segunda linhagem transformante (TR-2) durante com 6 horas de iluminação. Aumento de 12.000x; conforme escala. No detalhe, início da formação de tilacóides

No período de doze horas, nas imagens de esteriomicroscópio, as linhagens TR-1 e TR-2 possuem cotilédones já formados, abertos e com pigmentos. Nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão é nítido que no interior dos plastídios das linhagens transformantes – TR-1 e TR-2 – há diversos tilacóides, ausentes nesse período de luminosidade na linhagem WT. Nesse período é bem clara a discrepância no tamanho dos plastídios das transgênicas com relação à WT.

Já no tempo de vinte e quatro horas de iluminação, no qual os cotilédones das três linhagens estão bem formados, assim como os plastídios – agora designados de cloroplastos – nos três genótipos de estudo. Porém, é evidente as diferenças entre as linhagens transformadas com relação à WT. Nestas, possuem cloroplastos imensamente maiores que a WT, principalmente a linhagem TR-2. Além disso, os tilacóides dessas linhagens são muito densos e numerosos, contrapondo aos tilacóides disformes presentes na WT. Vothknecht e colaboradores (2001) descrevem que a manutenção dos cloroplastos em uma intensa formação das membranas do tilacóide, ocorrendo simultaneamente o acúmulo dos complexos fotossintéticos, os quais são transcritos no núcleo e importados para os plastídios, posteriormente o desenvolvimento do sistema do tilacóide continua com a formação. A fim de elucidar essa diferenciação e como a expressão constitutiva do principal gene do complexo antena do PSII afeta esse processo, e como outros genes interagem com este, partimos para uma análise de PCR quantitativo nesses cotilédones nos mesmo períodos de luminosidade.

4.6 Análise por PCR quantitativo da evolução de plastídios à cloroplastos e do ritmo circadiano

Cotilédones de plântulas de tabaco dos três genótipos em estudo foram coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5. Prosseguiu-se com a extração do RNA e a purificação de mRNA a partir deste. Os cDNAs foram então, sintetizados com cada par de *primers* específicos, conforme tabela 3.

A partir das reações de análise de PCR quantitativo; a análise de quantificação da expressão dos genes de interesse foi realizada relativamente à expressão do gene da ubiquitina pelo método $2^{-\Delta CT}$ REST© (PFAFFL, 2002). Os dados gerados estão agrupados nas figuras 23, 24 e 25.

Figura 23 - PCR quantitativos de genes relacionados a formação do PSII, ritmo circadiano e evolução de plastídios a cloroplastos. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5. (*<0,05, Dunnett)

Figura 24 - PCR quantitativos de genes relacionados a formação do PSII, ritmo circadiano e evolução de plastídios a cloroplastos. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5. (*<0,05, Dunnett)

Figura 25 - PCR quantitativos de genes relacionados a formação do PSII, ritmo circadiano e evolução de plastídios a cloroplastos. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5. (*<0,05, Dunnett)

A análise de quantificação da expressão dos genes de interesse foi realizada relativamente à expressão do gene da ubiquitina pelo método $2^{-\Delta CT}$ REST® (PFAFFL, 2002), sendo que esse gene de referência se comportou de forma constante entre os genótipos e entre os tempos de estudo, como mostra a figura 26, sendo assim um excelente gene de referência.

Figura 26 - PCR quantitativo do gene de referência Ubiquitina de *Nicotiana tabacum*. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5

Com a análise dos resultados de PCR quantitativo podemos observar que a expressão constitutiva do *Lhcb1*2* de ervilha interfere no mesmo gene endógeno de tabaco (figura 27).

Figura 27: PCR quantitativo de gene *Lhcb1*2* endógeno de *Nicotiana tabacum*. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5

Podemos perceber que a expressão desse gene no tempo zero é praticamente nula nos três genótipos, com um pico na expressão no tempo de 6 horas e um declínio em 12 horas de luz. Porém, em 24 horas, a expressão na WT é bem elevada em comparação às duas linhagens transformantes – TR-1 e TR-2 – pois deve ocorrer um mecanismo compensatório de dosagem de uma mesma proteína nas células, possivelmente um ajuste no controle da expressão gênica entre plastídios e núcleo.

Com relação à montagem do PSII, houve grandes alterações de expressão gênica entre os genótipos em estudo.

Figura 28 - PCR quantitativo de genes D1, D2, CP43 e CP47 de *Nicotiana tabacum*. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5

Através desses resultados, notamos grandes diferenças no padrão de formação do PSII. No tempo zero, a planta-selvagem WT possui níveis basais de expressão da D1, D2, CP43 e CP47 – proteínas estruturais do *core* central do PSII, ilustradas na Figura 1 – e com um aumento de expressão em 6 horas, porém com forte expressão no tempo de 24 horas; tempo esse no qual observamos estruturas de tilacóides por microscopia eletrônica de transmissão, conforme figura 21. Esses resultados estão coerentes com os encontrados por Kanervo e colaboradores (2008), no qual as proteínas dos *core* do PSII e PSI só passam a ser detectadas após 6 horas de iluminação; e nesse tempo há uma grande expressão da proteína D2, já que esta é precursora da D1. Todavia, as plantas das linhagens transgênicas têm um comportamento completamente diferente; a TR-2 possui um comportamento na montagem do PSII semelhante, porém não com mesma intensidade, com relação à WT. Esta possui expressão baixa no tempo zero e no tempo de 3 horas, assim como a WT; porém no tempo de 6 horas há uma expressão muito grande desses genes, superando a expressão do mesmo na WT; e nesse tempo na TR-2 observamos o início da formação dos tilacóides, conforme a figura 22. Porém, no tempo de 24 horas, ocorreu grandes diferenças nessas duas linhagens, enquanto a expressão desses genes estruturais é baixa na planta TR-2, são extremamente altas na WT, principalmente a D2 e a CP43.

Já a linhagem TR-1 têm um comportamento completamente diferente das demais, enquanto as outras duas linhagens possuem níveis basais no tempo zero e no tempo de 3 horas; a TR-1 possui uma alta expressão nesses genes do *core* central do PSII. Já no tempo de 6 horas, enquanto as linhagens WT e TR-2 apresentaram um pico de expressão, a TR-1 sofreu uma forte redução, e já no tempo de 12 horas, na qual a WT e a TR-2 apresentam uma redução de expressão, a TR-1 têm uma elevada expressão gênica, principalmente no gene da D2.

A dinâmica de formação do complexo protéico ATP sintase cloroplastidial, através da quantificação da expressão gênica das duas principais sub-unidades – alfa e beta – possui um comportamento similar aos genes estruturais do PSII entre as linhagens, conforme figura 29.

Figura 29 - PCR quantitativo de genes ATPase sub-unidade alfa e beta, de *Nicotiana tabacum*. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5

Figura 30 - PCR quantitativo de genes *Violaxanthin de-epoxidase* e *Zeaxanthin epoxidase* de *Nicotiana tabacum*. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5

Nesses genes da ATPase cloroplastidial sub-unidade alfa e beta, no tempo zero e no tempo de 3 horas, enquanto a WT possui níveis basais de expressão nesses dois genes, nas duas linhagens transformantes possuem um aumento significativo, sendo que a TR-1 possui alta expressão desses genes principalmente no tempo zero, assim como ocorreu com os genes estruturais do *core* central do PSII nessa linhagem. No tempo de 6 horas, no qual há uma forte expressão desses genes nas linhagens WT e TR-2, ocorreu uma diminuição na TR-1. E no tempo de 24 horas, há uma elevada expressão gênica principalmente na sub-unidade alfa da ATPase nas três linhagens.

Em condições naturais, as plantas estão sujeitas a grandes variações de intensidade de luz que excedem a capacidade de absorção das antenas coletoras, ocasionando a fotodestruição. Evolutivamente, é importante que as plantas tenham a capacidade de se ajustar ao excesso de energia, como a modificações na inclinação das folhas, mudanças na posição e orientação dos cloroplastos, ajuste fino no tamanho das antenas e via de dissipação do excesso de energia por calor. A dissipação térmica é dependente da formação do ΔpH no lúmen dos tilacóides e ocorre no LHC do PSII, com o acúmulo de zeaxantina produzida pelo ciclo das xantofilas. O Aumento do ΔpH induz a ativação da enzima violaxantina de-epoxidase nas membranas dos tilacóides, promovendo a de-epoxidação da violaxantina (livre nas membranas) à anteraxantina e zeaxantina. A formação de zeaxantina favorece a transferência do excesso de energia das clorofilas do LHC do PSII, protegendo-o assim do excesso de energia e da fotodestruição.

Com a análise por PCR quantitativo dos genes da Zeaxantina epoxidase e da Violaxantina de-epoxidase; estas possuem alta expressão no tempo de 3 horas de luminosidade na linhagem TR-1, e níveis basais de expressão gênica na TR-2 e no tipo-selvagem WT. No tempo de 6 horas, há uma alta expressão da Violaxantina de-epoxidase na linhagem TR-2, o qual leva um acúmulo de zeaxantina, decorrente na formação do PSII. Ainda no tempo de 6 horas, a WT possui um elevado nível de expressão da Zeaxantina epoxidase; já no tempo de 24 horas, ocorreu um elevado nível de expressão desta enzima Zeaxantina epoxidase na linhagem-selvagem, na qual não foi acompanhado pelas linhagens transformantes, possivelmente pois na WT

somente em 24 horas há a formação dos fotossistemas, enquanto nas transformantes isso ocorre antecipadamente.

Com relação à enzima *Chlorophyll synthase*, temos um comportamento bem distinto entre os três genótipos em estudo, como demonstra a figura 31.

Figura 31 - PCR quantitativo do gene *Chlorophyll synthase* de *Nicotiana tabacum*. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5

A expressão deste gene de biossíntese da clorofila na linhagem WT está em níveis bem baixo nos tempos zero e 3 horas, e um ligeiro aumento nos tempos de 6 e 12 horas; porém com elevada expressão no tempo de 24 horas. Já a TR-1, assim como os demais genes em estudo, possui expressão considerada nos tempos zero e 3 horas, e com um pico de expressão no tempo de 12 horas. A linhagem TR-2, possui níveis baixo de expressão nos tempos zero e 3 horas, e com uma expressão elevada no tempo de 6 horas, precoce em relação às demais linhagens. Esse comportamento da *chlorophyll synthase* está condizente com o comportamento da diferenciação dos cotilédones, conforme figura 5, e conseqüentemente nas análises em microscopia eletrônica de transmissão.

Com esses resultados de proteínas estruturais do *core* do PSII, complexo ATP sintase e de biossíntese de pigmentos, a linhagem TR-1 em relação à WT; já no tempo zero possui expressão gênica, assim possivelmente o complexo PSII já começa a formação mesmo na ausência de luz; devido à expressão constitutiva de um gene do complexo coletor de luz. Porém, com 12 horas de luminosidade observamos alta

expressão principalmente na síntese de clorofila e da proteína D2, sendo que nesse tempo pudermos observar tilacóides por microscopia eletrônica, conforme figura 20. A outra linhagem transformante – TR-2 – possui comportamento distinto, as maiores expressões gênicas ocorrem em 6 horas de luminosidade, como a biossíntese de clorofila, violaxantina de-epoxidase, D2, CP43 e ATP sintase sub-unidade Alfa; juntamente com a formação de tilacóides conforme imagem 22; sendo que nesse tempo deve estar ocorrendo à formação dos complexos PSII; muito prematuro em relação à WT, que possui uma maior biossíntese de clorofila, ATP sintase sub-unidade Alfa, zeaxantina epoxidase, D2 e CP43 somente em 24 horas; devido possivelmente à expressão gênica do *Lhcb1*2* endógeno, que somente possui altos níveis de expressão em 24 horas.

Já os genes relacionados ao ciclo circadiano estão completamente perturbados nas linhagens transgênicas, como mostra a figura 32.

Figura 32 - PCR quantitativo dos genes do ciclo circadiano em *Nicotiana tabacum*. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5

A planta WT possui um comportamento esperado nesses genes do ciclo circadiano, os genes CCA1 e LHY estão regulando negativamente o TOC1, conforme o primeiro oscilador (*loop A*) da figura 3; com a repressão da TOC1 deve estar sendo expresso o fator X desconhecido e as PRRs – tais como o gene COL – que por sua vez estão regulando a expressão do CCA1 e do LHY, como ocorre no terceiro oscilador (*loop C*). O mecanismo de absorção de luz está regendo esse ciclo, o gene *Phytochrome-associated protein 1* (PIF) e o *Phytochrome B protein* (Phy) têm comportamento rítmico em relação aos demais genes com um pico de expressão no tempo de 6 horas, na qual há a repressão da TOC e alta expressão do CCA e do LHY.

Nas plantas transformantes esses genes do ciclo têm a sua expressão extremamente distinta da esperada. O gene central do ritmo – TOC1 – possui um ciclo de expressão arrítmico, principalmente na TR-2 na qual esse gene oscila mais de uma vez num período de 24 horas. Na linhagem TR-2 há a coerência entre os genes CCA, LHY, COL e a TOC, mas a mesma coerência não ocorre na linhagem TR-1. É interessante nessas linhagens o papel do o *Phytochrome B protein* (Phy), o qual já possui uma expressão elevada nos tempos iniciais – principalmente no tempo de 3 horas – na TR-1; já na TR-2 apresenta um pico de expressão no tempo 6 horas, mas uma elevada expressão em 24 horas. Porém, para uma melhor elucidação do impacto da expressão constitutiva do *Lhcb1*2* no ciclo circadiano é necessário estudos posteriores com um período maior de coleta, para esclarecimento do ritmo dos diversos genes em análise.

Assim como em folhas maduras dos genótipos em estudo encontramos diferenças na enzima *Glutamine synthetase* (GS), analisamos a expressão da *Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1* (GLS-GOGAT), enzima que participa de reciclagem de amônia após a fotorespitação, conforme figura 33.

Figura 33 - PCR quantitativo do gene *glutamate synthase* de *Nicotiana tabacum*. Amostras Cotilédones de plântulas de tabaco coletadas nos distintos períodos de luminosidade, conforme figura 5

A linhagem controle WT e a linhagem TR-1 possuem comportamento semelhante, porém com intensidade diferente; sendo que nas primeiras horas do estudo a TR-1 possui uma expressão mais elevada, e em 12 e 24 horas possui uma expressão menor em relação à WT. Já a TR-2 apresenta um comportamento completamente distinto, com picos de expressão elevada em 3 e 12 horas, e níveis basais no tempo zero e em 24 horas.

Em conclusão, a super-expressão do gene *Lhcb1*2* de ervilha em plantas transgênicas de tabaco acarretou a indução e repressão de várias proteínas e genes em distintos passos de vias metabólicas, estabilizando a homeostase celular, exercendo uma influência significativa no desenvolvimento vegetal.

5 CONCLUSÕES

A introdução do gene *Lhcb1*2* de ervilha em plantas de tabaco alterou a estrutura do complexo principal do LHC do PSII, com consequência aumento no seu tamanho. Com a análise proteômica, encontramos diversas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas; dentre nas quais podemos elucidar os diversos efeitos pleiotrópicos ocorridos nas plantas transformadas. Com o aumento do complexo antena do PSII, tivemos um aumento de quebra da molécula de água – justificada pelo aumento de *Oxygen-envolving enhancer* do PSII - e geração de prótons e elétrons. Os prótons irão gerar uma quantidade maior de ATP – observado pelos *spots* da ATP sintase exclusivos das linhagens transformantes – e a maior quantidade de elétrons irão ser transportados ao PSI, na qual no complexo ferredoxina-NADP – o qual também teve sua expressão aumentada – irá gerar uma quantidade maior de NADPH. A quantidade maior de ATP e NADPH, juntamente com uma elevada pressão parcial de CO₂ no citosol, irão exercer uma maior excitação no Ciclo de Calvin, como ocorreu uma maior expressão de fosfoglicerato quinase, fosforibuloquinase e RUBISCO ativase. Com isso, teremos uma maior síntese de triose-fosfato, e posteriormente açúcares complexos. Com uma maior disponibilidade de glicose, a via glicolítica está em maior excitação – como mostra o aumento de fucose-bisfosfato aldolase. Assim, as plantas transformadas têm uma maior quantidade de energia disponível, inclusive para o crescimento celular, como mostra a expressão de tubulina, actina e dados anatômicos e morfológicos.

A formação do fotossistema II não segue o mesmo padrão entre as linhagens transformantes e a tipo-selvagem, sendo que nas plantas transformantes há uma antecipação da montagem e formação dos tilacóides, e desenvolvimento à cloroplastos, analisados por microscopia eletrônica de transmissão. Os genes do core central do PSII, complexo ATP sintase e genes relacionados a biossíntese de pigmentos acompanham essa antecipação na formação de tilacóides. O ritmo circadiano das plantas transformantes mostram-se completamente alterados em relação à WT, porém é necessário estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins** : fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos, Viçosa : UFV, 1998. 574p.
- ALLAKHVERDIEV, S.; CASAL, J.; NAGATA, T. Photosynthesis from molecular perspectives: towards future energy production. **Photochemical & Photobiological Sciences**, London, v. 8, p. 137-138, 2009
- ALLEN, J. F. Thylakoid proteinphosphorylation, state 1- state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 93, p. 196-205, 1995.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p.3389-3402, 1997.
- ANDERSSON, I.; BACKLUND, A. Structure and function of Rubisco. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 275-291, 2008.
- ANDERSON, J. M. Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 37, p. 93-136, 1986.
- ANDERSON, J. M. Changing concepts about the distribution of Photosystems I and II between grana-appressed and stroma-exposed thylakoid membranes. **Photosynthesis Research**, Doudrecht, v. 73, p. 157-164, 2002.
- ANDERSON, J. M.; CHOW, W. S.; RIVAS, J. D. L. Dynamic flexibility in the structure and function of photosystem II in higher plant thylakoid membranes: the grana enigma. **Photosynthesis Research**, Doudrecht, v. 98, p. 575-587, 2008.
- ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***. Piracicaba, 2006. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ANDREOTE, F. D.; MENDES, R.; ANDREOTE, F. D.; ROSSETTO, P. B.; LABATE, C. A.; KLEINER, A. A. P.; ELSAS, J. D. V.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 93, p. 415-424, 2008.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 408, p. 796-815, 2000.
- ASHCROFT, A. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. **Natural Product Reports**, London, v. 20, p. 202-215, 2003.

BAGINSKY, S. Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrometry Reviews**, Hoboken, v. 28, p. 93-120, 2009.

BAIROCH, A.; APWEILER, R.; WU, C. H.; BARKER, W. C.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M. J.; NATALE, D. A.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; YEH, L. S. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, London, v. 1, 33, p.154-159, 2005.

BALLOTTARI, M.; OSTO, L. D.; MOROSINOTTO, T.; BASSI, R. Contrasting behavior of higher plant Photosystem I and II Antenna Systems during acclimation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 282, n. 12, p. 8947-8958, 2007.

BARBER, J.; KÜHLBRANDT, W. Photosystem II. **Current Opinion in Structural Biology**, New York, v. 9, p. 469-475, 1999.

BASIC RESEARCH NEEDS. **The path to sustainable nuclear energy basic and applied research opportunities for advanced fuel cycles**. Disponivel em: < <http://www.er.doe.gov/bes/reports/archives.html>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

BJÖRN, L. O.; PAPAGEORGIOU, G. C.; BLANKENSHIP, R. E.; GOVINDJEE. A viewpoint: why chlorophyll *a*?. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 99, p. 85-98, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRÄUTIGAM, A., HOFMANN-BENNING, S.; WEBER, A. P. M. Comparative proteomics of chloroplasts envelopes from C₃ and C₄ plant reveals specific adaptations o the plastid envelopo to C₄ photosynthesis and candidate proteins required for maintaining C₄ metabolite fluxes. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 148, p. 568-579, 2008.

CAEMMERER, S. V.; FURBANK, R. T. The C₄ pathway: an efficient CO₂ pump. **Photosynthesis Research**, Amsterdam, v. 77, p. 191-207, 2003.

CAMP, W. V. Yield enhancement genes: seeds for growth. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, p. 147-153, 2005.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CASHMORE, A. R. Nuclear genes encoding the small submit of ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C. P.; HOLLAENDER, A. (Ed.) **Genetic Engineering of Plants**, New York, Plenum Press, 1983, p. 27-38.

CASHMORE, A. R. Structure and expression of pea nuclear gene encoding a chlorophyll a/b – binding polypeptide. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 2960-2964, 1984

DAMERVAL, C.; VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling protein. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 7, p. 53-54, 1986.

DELORES, S. C.; GARDNER, R. G. Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by Agrobacterium-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, Dordredt, v. 11, p. 355-364, 1988.

DREYFUSS, B. W.; THORNER, J. P. Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of Photosystem II: Monomeric LHC IIb complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHC IIb Complexes. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 106, p. 829-839, 1994.

EBERHARD, S.; FINAZZI, G.; WOLLMAN, F. A. The dynamics of photosynthesis. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 42, p. 463-515, 2008.

FAO. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 10 dez. 2009.

FRIGERIO, S.; CAMPOLI, C.; ZORZAN, S.; FANTONI, L. I.; CROSATTI, C.; DREPPER, F.; HAEHNEL, W.; CATTIVELLI, L.; MOROSINOTTO, T.; BASSI, R. Photosynthetic Antenna size in higher plants is controlled by Plastoquinone redox state at the post-transcriptional rather than transcriptional level. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 282, n. 40, p. 29457-29469, 2007.

GARCÍA-CERDÁN, J. G.; SVESHNIKOV, D.; DEWEZ, D.; JANSSON, S.; FUNK, C.; SCHRÖDER, W. P. Antisense Inhibition of the PsbX protein affects PSII integrity in the higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 50(2), p. 191-202, 2009.

GIORGIANNI, S. B. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003.

GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GREEN, B. R.; PICHERSKY, E.; KLOPPSTECH, K. Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 16, p. 181-186, 1991.

GYGI, S. P.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, Amsterdam, v. 4, p. 489-494, 2000.

HAFERKAMP, S.; KIRCHHOFF, H. Significance of molecular crowding in grana membranes of higher plants for light harvesting by photosystem II. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 95, p. 129-134, 2008.

HANKAMER, B.; BARBER, J. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 641-671, 1997.

HARMER, S. L. The circadian system in higher plants. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 357-377, 2009.

HEATON, E.; FLAVELL, R. B.; MASCIA, P. N.; THOMAS, S. T.; DOHLEMAN, F. G.; LONG, S. P. Herbaceous energy crop development: recent progress and future prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, p. 202-209, 2008.

HIBBERD, J. M.; SHEEHY, J. E.; LANGDALE, J. A. Using C4 photosynthesis to increase the yield of rice – rationale and feasibility. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 11, p. 228-231, 2008.

HOOBER, J. K.; EGGINK, L. L. Assembly of light-harvesting complex II and biogenesis of thylakoid membranes in chloroplasts. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 61, p. 197-215, 1999.

HOOBER, J. K.; EGGINK, L. L. CHEN, M. Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 94, p. 387-400, 2007.

HORSCH, R. B.; FRY, J. E.; HOFFMAN, N. L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes in plants. **Science**, Hanover, v. 227, p. 1229, 1995.

HORTON, P.; RUBAN, A. V.; WALTERS, R. G. Regulation of light harvesting in green plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 655-684, 1996.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 81, p. 802-806, 1986.

JANSOON, S.; PICHESKY, E.; BASSI, R.; GREEN, B. R.; IKEUCHI, M.; MELIS, A.; SIMPSON, D. J.; SPANGFORT, M.; STAEHELIN, A.; THORNER, P. A nomenclature for genes encoding the chlorophyll a/b – binding proteins in higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 10, p. 242-253, 1992.

KALDIS, A. D.; PROMBONA, A. Synergy between the light-induced acute response and circadian cycle: a new mechanism for the synchronization of *Phaseolus vulgaris* clock to light. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, p. 883-895, 2006.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; FURUMICHI, M.; TANABE, M.; HIRAKAWA, M. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, p. 355-360, 2010.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; HATTORI, M.; AOKI-KINOSHITA, K. F.; ITOH, M.; KAWASHIMA, S.; KATAYAMA, T.; ARAKI, M.; HIRAKAWA, M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, p. 354-357, 2006.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, p. 27-30, 2000.

KANERVO, E.; SINGH, M.; SUORSA, M.; PAAKKARINEN, V.; ARO, E.; BATTCHIKOVA, N.; ARO, E. M. Expression of protein complexes and individual proteins upon transition of etioplasts to chloroplasts in pea (*Pisum sativum*). **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 49, e. 3, p. 396-410, 2008.

KLEE, H.; YANOFSKY, M. F.; NESTER, E. W. Vectors for transformation of higher plants. **Nature Biotechnology**, London, v. 3, p. 637-642, 1985.

KLEFFMANN, T.; ZYCHLINSKI, A.; RUSSENBERGER, D.; HIRSCH-HOFFMANN, M.; GEHRIG, P.; GRUISSEM, W.; BAGINSKY, S. Proteome dynamics during plastid differentiation in rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 143, p. 912-923, 2007.

KLIMMEK, F.; SJÖDIN, A.; NOUTSOS, C.; LEISTER, D.; JANSSON, S. Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 140, p. 793-804, 2006.

KÜHLBRANDT, W.; WANG, D. N. Three-dimensional structure of plants light-harvesting complex determined by electron crystallography. **Nature**, London, v. 350, p. 130-134, 1991.

KÜHLBRANDT, W.; WANG, D. N. FUJIYOSHI, Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. **Nature**, London, v. V. 367, p. 614-621, 1994.

LABATE, C. A. **Efeitos pleiotrópicos da expressão constitutiva do gene *Lhcb1*2* de ervilha em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e petúnia (*Petúnia hybrida*)**. 2001. Tese (Livre - Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

LABATE, M.T.V.; KO, K.; KO, Z.W.; PINTO, L.S.R.; REAL, M.J.U.D.; ROMANO, M.R.; BARJA, P.R.; GRANELL, A.; FRISO, G.; VAN WIJK, K.J.; BRUGNOLI, E.; LABATE, C.A. Constitutive expression of pea *Lhcb1-2* in tobacco affects plant development, morphology and photosynthetic capacity. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, p. 701-714, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARSSON, U. K.; ANDERSON, J. M.; ANDERSSON, B. Variations in the relative content of peripheral and inner light-harvesting chlorophyll a/b – protein complex (LHCII) subpopulations during thylakoid light adaptation and development. **Biochemical Biophysical Acta**, Dordrecht, v. 894, p. 69-75, 1987.

LAZOVA, G.; NAIDENOVA, N.; IGNATOVA, L.; STEFANOV, D. A pea mutant (*costata*) expressing higher activity in thylakoid membrane-bound carbonic anhydrase alters PSII downregulation mechanisms. **Cell Biology International**, Dordrecht, v. 33, p. 867-873, 2009.

LEWIS, N. S.; NOCERA, D. G. Powering the planet: Chemical challenges in solar energy utilization. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 15729-15735, 2006.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P. **Biologia Celular e Molecular**, 5^a ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

LOPEZ-JUEZ, E.; PYKE, K. A. Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. **International Journal of Developmental Biology**, Leioa, v. 49, p. 557-577, 2005.

LU, S. X.; KNOWLES, S. M.; ANDRONIS, C.; ONG, M. S.; TOBIN, E. M. CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL Function Synergistically in Circadian Clock of Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 150, p. 834-843, 2009.

LUCINSKI, R. JACKOWSKI, G. The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 53, n. 4, p. 693-708, 2006.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C. A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 70, p. 437-473, 2001.

MANN, M.; STEEN, H. The ABC'S and XYZ'S of peptide sequencing. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v. 5, p. 699-711, 2004.

MATSUYAMA, A.; YOSHIMURA, K.; SHIMIZU, C.; MURANO, Y.; TAKEUCHI, H.; ISHIMOTO, M. Characterization of glutamate decarboxylase mediating γ-amino butyric acid increase in the early germination stage of soybean (*Glycine max*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, n. 5, p. 538-543, 2009.

MÁS, P. Circadian clock function in Arabidopsis thaliana: time beyond transcription. **Trends in Cell Biology**, London, v. 18, n. 6, p. 276-281, 2008.

- McCLUNG, C. R. Plant circadian rhythms. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 792-803, 2006.
- MUELLER-CAJAR, O.; WHITNEY, S. M. Directing the evolution of Rubisco and rubisco activase: first impressions of a new tool for photosynthesis research. **Photosynth. Res.**, Dordrecht, v. 98, p. 667-675, 2008.
- MULLINEAUX, P.; KARPINSKI, S. Signal transduction in response to excess light: getting out of chloroplast. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 5, 43-48, 2002.
- MURCHIE, E. H.; PINTO, M.; HORTON, P. Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. **New Phytologist**, London, v. 181, p. 532-552, 2009.
- MUSSGNUG, J. H.; HALL, S. T.; RUPPRECHT, J.; FOO, A.; KLASSEN, V.; McDOWALL, A.; SCHENK, P. M.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion. **Plant Biotechnology Journal**, Bristol, v. 5, p. 802-814, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: principles of biochemistry. 5 ed. th. New York : Freeman, 2008.
- NELSON, N.; YOCUM, C. F. Structure and function of photosystems I and II. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 521-565, 2006.
- NIYOGI, K. K. Safety valves for photosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 3, p. 455-460, 2000.
- NOTT, A.; JUNG, H. S.; KOUSSEVITZKY, S.; CHORY, J. Plastid-to-Nucleus Retrograde Signaling. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 739-759, 2006.
- O'FARELL, P. H. High-resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, p. 325-333, 2000.
- PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 311-323, 2003.
- PARK, Y.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. Antenna Size Dependent of Photoinactivation of Photosystem II in Light-Acclimated Pea Leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 115, p. 151-157, 1997.
- PETERHANSEL, C.; NIESSEN, M.; KEBEISH, R. M. Metabolic Engineering Towardas the Enhancement of Photosynthesis. **Photochemistry ans Photobiology**, Lawrence , v. 84, p. 1317-1323, 2008.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 1-10, 2002

PIMENTA, A. M. C. Os desafios do proteoma. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 32, n. 192, p. 16-22, 2003.

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins in 2D electrophoresis. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 112, p. 9-19, 1999.

RASCHER, U.; NEDBAL, L. Dynamics of photosynthesis in fluctuating light. **Current Opinion in Plant Biology**, Corvallis, v. 9, p. 671-678, 2006.

RAVANEL, S.; BLOCK, M. A.; RIPPERT, P.; JABRIN, S.; CURIEN, G.; RÉBEILLÉ, F.; DOUCE, R. Methionine metabolism in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 21, p. 22548-22557, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1996.

REA, G.; VOLPICELLA, M.; LEO, F. D.; ZOLLA, L. GALLERANI, R.; CECI, L. R. Characterization of three members of the multigene family coding isoforms of the chlorophyll-a/b binding protein Lhcb1 in spinach. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 130, p. 167-176, 2007.

ROTHSCHILD, L. J. The evolution of photosynthesis...again? **Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences**, London, v. 363, p. 2787-2801, 2008.

RUJITER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. F. M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. 6, e45, p. 1-12, 2009.

SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M. Climate Change 2007: The physical science basics. **The fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)**. Disponível em: < www.ipcc.ch/ >. Acesso em: 10 dez. de 2009.

SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Nature**, London, v. 337, p. 229-234, 2002.

STRAND, A. Plastid-to-nucleus signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, Corvallis, v. 7, p. 621-625, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed., Porto Alegre: Artmed, 2003.

TANS, P. **Trends in Atmospheric Carbon Dioxide** – Mauna, Loa, NOAA/ESRL. Disponível em: < www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/ >. Acesso em: 10 de dez. 2009.

TAYLOR, W. Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 211-233, 1989.

TIMPERIO, A. M.; D'AMICI, G. M.; BARTA, C.; LORETO, F.; ZOLLA, L. Proteomics, pigment composition and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 13, p. 3695-3710, 2007.

VOTHKNECHT, U. C.; WESTHOFF, P. Biogenesis and origin of thylakoid membranes. **Biochemistry Biophysics Acta**, Amsterdam, v. 1541, p. 91-101, 2001.

WANG, M.; WANG, G.; JI, J.; WANG, J. The effect of pds gene silencing on chloroplasts pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 177, p. 222-226, 2009.

WATSON, B. S.; ASIRVATHAM, V. S.; WANG, L.; SUMMER, L. W. Mapping the proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, p. 1104-1123, 2003.

WECKWERTH, W.; LOUREIRO, M. E.; WENZEL, K.; FIEHN, O. Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 20, p. 7809-7814, 2004.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects :why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 13, p. 19-50, 1995.

XU, Y.; JOHNSON, C. H. A clock and light regulated gene that links the circadian oscillator to LHCB gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1411-1425, 2001.

ZHANG, X.; CHEN, Y.; WANG, Z.; CHEN, Z.; GU, H.; QU, L. Constitutive expression of CIR1 (RVE2) affects several circadian-regulated processes and seed germination in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Heslington, v. 51, p. 512-525, 2007.

ZHU, X. G.; LONG, S. P.; ORT, D. R. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, p. 153-159, 2008.

ZIVY, M.; VIENNE, D. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, p. 575-580, 2000.