CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO A LEGHEMOGLOBINA DE SOJA NO INTERIOR DE MITOCÔNDRIAS E CLOROPLASTOS

ANA LÚCIA BONNA DELNERI
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. **MÁRCIO DE C. SILVA FILHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Outubro – 2001

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

Delneri, Ana Lúcia Bonna

Caracterização de plantas transgênicas expressando a Leghemoglobina de Soja no interior de mitocôndrias e cloroplastos / Ana Lúcia Bonna Delneri. - Piracicaba, 2001.

85 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Batata transgênica 2. Engenharia genética 3. Fumo transgênico 4.
Melhoramento genético vegetal 5. Metabolismo vegetal I. Título

633.491
CDD 634.527

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

Aos meus pais,
irmãos e irmãs

OFEREÇO

Ao Armando e ao Léo,
que tanto amo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente :

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho pela orientação, amizade e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi e ao Alexandre Dias T. Costa, ambos do Depto de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas (NMCE), Unicamp, pela participação na obtenção de resultados e pela amizade.

À Marli K. M. Soares, do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ – USP, pela realização dos cortes histológicos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela amizade, paciência e incentivo em todos os momentos.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ – USP

Aos funcionários do Setor de Biblioteca Central e do Departamento de Genética da ESALQ – USP, pelos auxílios prestados.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Hemoglobinas vegetais.....	3
2.2 Complexos respiratórios da membrana mitocondrial interna.....	6
2.3 Estresse oxidativo em plantas.....	9
2.4 Direcionamento de proteínas para organelas.....	10
2.4.1 Direcionamento de proteínas às mitocôndrias.....	10
2.4.2 Direcionamento de proteínas aos cloroplastos.....	11
2.5 Giberelina em plantas.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Leghemoglobina de soja direcionada às mitocôndrias de fumo.....	17
3.1.1 Material vegetal.....	17
3.1.2 Construção gênica.....	17
3.1.3 Vetores bacterianos.....	18
3.1.4 Cepas bacterianas.....	18
3.1.5 Meios de cultura.....	19

3.1.6 Transformação de plantas.....	33
3.1.7 Caracterização molecular das plantas transgênicas.....	33
3.1.7.1 Extração de DNA total e PCR.....	34
3.1.7.2 Extração de proteínas totais e Western-blotting.....	35
3.1.8 Isolamento de mitocôndrias.....	36
3.1.9 Estudo da função mitocondrial.....	37
3.1.9.1 Determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial.....	37
3.1.9.2 Oxidação de β - NADH.....	38
3.2 Leghemoglobina de soja direcionada aos cloroplastos de batata.....	37
3.2.1 Material vegetal.....	38
3.2.2 Micropropagação <i>in vitro</i>	39
3.2.3 Transferência para a casa de vegetação.....	39
3.2.4 Caracterização molecular das plantas transgênicas.....	40
3.2.4.1 Isolamento de cloroplastos.....	40
3.2.4.2 Western-blotting.....	41
3.2.5 Avaliações fenotípicas.....	41
3.2.6 Tratamento com GA ₃	41
3.2.7 Cortes histológicos.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Leghemoglobina de soja direcionada às mitocôndrias de fumo.....	30
4.1.1 Obtenção de plantas transgênicas.....	30
4.1.2 Análise molecular das plantas transgênicas.....	30
4.1.2.1 "Screening" por PCR.....	30
4.1.2.2 Western-blotting.....	44
4.1.2.3 A preseqüência da subunidade β da F ₁ -ATP sintetase direciona a leghemoglobina ao interior das mitocôndrias.....	45
4.1.3 Análise da função mitocondrial.....	46

4.1.3.1 Potencial elétrico ($\Delta\Psi$) da membrana mitocondrial.....	46
4.1.3.1.1 Resposta à adição de ADP.....	46
4.1.3.1.2 Resposta à adição de ATP e BSA.....	47
4.1.3.1.3 Resposta à adição de substratos e inibidores.....	49
4.1.3.2 Oxidação de β - NADH.....	51
4.2 Leghemoglobina de soja direcionada aos cloroplastos de batata.....	53
4.2.1 O peptídeo de trânsito da Rubisco direciona a leghemoglobina ao interior dos cloroplastos.....	53
4.2.2 Avaliações fenotípicas.....	55
4.2.2.1 Altura das plântulas e comprimento dos internós.....	55
4.2.2.2 Tratamento com GA ₃	56
4.2.2.3 Tamanho das células.....	57
4.2.2.4 Tuberização.....	58
5 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
APÊNDICE.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP = adenosina di-fosfato

Ant.A = antimicina A

ATP = adenosina tri-fosfato

BHAM = ácido benzo-hidroxâmico

BSA = soro de albumina bovina

EDTA = etilenodiamina tetra acetato dissódico

FCCP = carbonil cianide trifluorometoxifenilhidrazona

GA = giberelina

HEPES = ácido N(2-hidroxietil) piperazine N (2-etanosulfurônico)

kDa = kilo Dalton

Lb = leghemoglobina

Lb⁺² = leghemoglobina no estado ferroso

Lb⁺³ = leghemoglobina no estado férrico

Lba = gene da leghemoglobina de soja

Lba = leghemoglobina de soja

mito = mitocôndria

NAD(P)H = nicotinamida adenina binucleotídeo (fosfato), forma reduzida

NADH = nicotinamida adenina binucleotídeo, forma reduzida

Oligo = oligomicina

PBS = tampão fosfato salino

PCR = reação de polimerase em cadeia

P_i = fosfato inorgânico

PUMP = proteína desacopladora das mitocôndrias de plantas

(p/v) = peso/volume

PVP = polivinil pirrolidona

ROS = espécies reativas de oxigênio

rot = rotenona

rpm = rotações por minuto

Rubisco = ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase

SDS = sódio dodecil sulfato

Succ = succinato

TBS = tampão Tris salino

T-DNA = DNA de transferência

Tris = Tris(hidroximetil)aminometano

Tween = polioxietilenosorbitol

CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO A LEGHEMOGLOBINA DE SOJA NO INTERIOR DE MITOCÔNDRIAS E CLOROPLASTOS

Autora: ANA LÚCIA BONNA DELNERI

Orientador: Prof. Dr. MÁRCIO DE C. SILVA FILHO

RESUMO

O oxigênio atua como substrato ou cofator numa série de reações bioquímicas do metabolismo primário e secundário das plantas. Várias estratégias têm sido utilizadas no sentido de interferir neste metabolismo aeróbico, visando, entre outras possibilidades, reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). A fim de alterar a disponibilidade de oxigênio no interior da organela, foram produzidas plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) expressando a leghemoglobina de soja no interior das mitocôndrias. Para tanto, as plantas foram transformadas, via *Agrobacterium tumefaciens*, com uma construção quimérica, onde o gene da Lba de soja foi fusionado a uma seqüência de direcionamento mitocondrial. A expressão do gene quimérico foi assegurada pela presença do promotor constitutivo 35S, do vírus do mosaico da couve-flor. A proteína foi corretamente importada e processada no interior das mitocôndrias. Entretanto, não foi possível detectar alterações significativas na função mitocondrial. Numa segunda etapa do presente trabalho, plantas

transgênicas de batata (*Solanum tuberosum* cv Bintje) expressando a leghemoglobina de soja no interior dos cloroplastos, foram caracterizadas do ponto de vista molecular e fenotípico. Observou-se que as plantas apresentaram um fenótipo semelhante àquelas deficientes na biossíntese de giberelina.

CHARACTERIZATION OF TRANSGENIC PLANTS EXPRESSING A SOYBEAN LEGHEMOGLOBIN INTO MITOCHONDRIA AND CHLOROPLASTS

Author: ANA LÚCIA BONNA DELNERI

Adviser: Prof. Dr. MÁRCIO DE C. SILVA FILHO

SUMMARY

Oxygen acts as a cofactor or substrate in many biochemical processes in both primary and secondary plant metabolism. Several attempts have been made to alter this aerobic metabolism, specially to decrease the reactive oxygen species (ROS) levels. In order to alter oxygen availability inside the organelle, tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants expressing the soybean leghemoglobin inside mitochondria were obtained and further characterized. Therefore, tobacco cells were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* *ti*-derived vector, carrying a chimeric construct made by the fusion of the soybean *Lba* encoding gene and a mitochondrial targeting sequence. The gene construct was equipped with the strong constitutive 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the 3' non-translated region from Rubisco from pea. Analysis of transgenic plants revealed that the protein was correctly imported and processed inside the organelle. However, no difference was detected on mitochondrial function. In addition, transgenic potato (*Solanum tuberosum* cv

Bintje) plants expressing soybean leghemoglobin inside the chloroplasts were molecular and morphologically characterized, suggesting a typical gibberellin deficient phenotype.

1 INTRODUÇÃO

O oxigênio, substrato essencial para o metabolismo respiratório, passa através da membrana plasmática para todos os compartimentos subcelulares, atuando como substrato ou cofator em várias reações bioquímicas do metabolismo primário e secundário das plantas. Uma forma de acelerar os processos dependentes de oxigênio é aumentar seu fluxo no interior das plantas. Uma estratégia para aumentar a difusão de oxigênio no interior das células é a introdução de proteínas com alta afinidade por esta molécula. As leghemoglobinas de plantas são hemoproteínas que participam do processo simbiótico de fixação de nitrogênio nas leguminosas e apresentam alta afinidade por oxigênio. Nos nódulos das raízes dessas plantas, a leghemoglobina facilita a difusão de oxigênio das células da raiz para a membrana do bacterióide.

O desenvolvimento das técnicas de engenharia genética, tornou possível a transferência de genes entre espécies incompatíveis do ponto de vista reprodutivo. Além disso, a fusão de fragmentos de DNA que codificam seqüências de direcionamento específicas com genes de diferentes origens, possibilitou o endereçamento de proteínas aos vários compartimentos subcelulares, criando condições para alterar processos metabólicos.

Com o objetivo de interferir no metabolismo aeróbico das plantas, a partir da alteração da pressão parcial de oxigênio no interior das organelas, foram produzidas plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) e batata (*Solanum tuberosum*) expressando a leghemoglobina de soja no interior das mitocôndrias e cloroplastos, respectivamente. Espera-se que a caracterização das plantas

transgênicas de fumo e batata contribua para um melhor entendimento sobre a complexa rede associada ao metabolismo energético das plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hemoglobinas vegetais

As hemoglobinas (Hbs) vegetais são proteínas que estão amplamente distribuídas em plantas superiores. De forma semelhante às mioglobinas de vertebrados, essas proteínas apresentam alta afinidade por oxigênio. Por comparação de seqüência, padrões de expressão e propriedades cinéticas de associação/dissociação, as Hbs podem ser divididas em dois grandes grupos. O primeiro grupo é formado pelas hemoglobinas simbiotes, que são predominantemente encontradas nas células infectadas de nódulos fixadores de nitrogênio nas raízes de leguminosas e não leguminosas, onde sua função é facilitar o transporte de oxigênio. O segundo grupo é representado pelas Hbs não simbiotes e parece ser o ancestral (Arredondo-Peter et al., 1998). Este grupo é mais amplamente distribuído no reino vegetal e, geralmente, apresenta afinidade mais alta pelo oxigênio do que o grupo simbiote (Arredondo-Peter et al., 1998).

A principal função das Hbs simbiotes está relacionada à difusão de oxigênio dentro dos tecidos infectados (Appleby, 1988). Uma vez que a nitrogenase produzida pelo bacterióide perde rapidamente a atividade em presença de oxigênio molecular, a hemoglobina, que possui alta afinidade pela oxidase terminal do bacterióide, proporciona um rápido bombeamento do oxigênio pelo citoplasma das células da raiz, evitando danos à nitrogenase (Becana & Klucas, 1992). A função desta Hb simbiote seria, portanto, facilitar a difusão do oxigênio das células infectadas para a membrana peribacterióide,

por onde ele se difundiria, até alcançar a oxidase terminal do bacterióide (Appleby, 1984).

Dentre as Hbs simbiotes de leguminosas, as leghemoglobinas (Lbs) são as mais estudadas. As Lbs são proteínas de aproximadamente 16 kDa, pertencem a uma pequena família multigênica (Brisson & Verma, 1982) e são codificadas por genes que apresentam três íntrons. O primeiro e terceiro íntrons estão em posições similares às dos íntrons de genes de Hb de vertebrados, sugerindo que as hemoglobinas vegetais e animais são derivadas de um ancestral comum (Appleby, 1988). Ji e col. (1994) descreveram três hemoproteínas modificadas derivadas da Lba (Lbam1, Lbam2, Lbam3).

Apenas a leghemoglobina reduzida (Lb^{+2}) é capaz de ligar-se ao oxigênio. A abundância de certos metabólitos nos nódulos da raiz, incluindo radicais superóxidos (Rigaud & Puppo, 1977), podem oxidar a Lb^{+2} , formando Lb^{+3} , que não se liga ao oxigênio, principalmente se o pH intra-nodular estiver ligeiramente ácido (Ji et al, 1992). Para a manutenção da forma ativa reduzida da leghemoglobina (Lb^{+2}), a célula conta com sistemas enzimáticos e não enzimáticos (Becana & Klucas, 1992), dentre eles o NAD(P)H, o ascorbato, a glutathione reduzida e a cisteína (Ji et al, 1992). Além disso, foi isolado de nódulos de soja, um c-DNA que codifica uma leghemoglobina redutase férrica (FLbR), cuja função seria a manutenção da leghemoglobina no estado ferroso (Ji et al., 1994).

As leghemoglobinas são as proteínas mais abundantes nos nódulos das raízes. Elas representam cerca de 25% das proteínas solúveis totais nas células infectadas e conferem uma cor avermelhada aos nódulos (Arredondo-Peter et al., 1998). Segundo Hill (1998), para realizar adequadamente sua função na difusão de oxigênio, a concentração dessa proteína deve ser elevada o suficiente para criar um gradiente onde a Lb se associe ao oxigênio mais rapidamente que sua taxa de difusão. Além disso, o autor estima que a relação Lb/O_2 nos nódulos esteja em torno de 10.000 vezes,

ou seja, ela é 300 vezes superior à relação mioglobina/O₂ nas células do músculo cardíaco.

Num artigo bastante recente, Kawashima e col. (2001) descrevem a existência de múltiplas hemoglobinas simbiotes em ervilha, que podem ser agrupadas em dois tipos que diferem em afinidade por oxigênio e localização celular. A presença desses dois tipos de leghemoglobinas com diferentes afinidades por oxigênio poderia servir para criar e manter o gradiente de oxigênio através do tecido do nódulo.

Anderson e col. (1996) isolaram um gene que codifica uma hemoglobina não simbiote em soja. Os autores sugerem que esta proteína funcione de forma a facilitar a difusão intracelular do oxigênio para as mitocôndrias, em células que demandam grande quantidade de energia.

A presença de hemoglobina não simbiote em diversas plantas, incluindo monocotiledôneas (Taylor et al, 1994), sugere que esta proteína contribua para o crescimento e desenvolvimento, de uma forma que vai além de sua função no processo de fixação do nitrogênio. Nie & Hill (1997) mostraram que a expressão do gene da hemoglobina em aleurona de cevada é grandemente influenciada pela disponibilidade de ATP no tecido. Sowa e col. (1998) sugerem que as hemoglobinas não simbiotes tenham por função manter o “status” energético da célula em condições de hipoxia ou sob alta demanda de energia. Lira-Ruan e col. (2001) reportam um aumento na síntese de Hb em plantas de arroz submetidas a condições de estresse (hipoxia), resultado que corrobora o que foi previamente sugerido por Sowa e col. (1998). Os autores acreditam que as Hbs tenham função tecido-específica relacionada ao metabolismo ou ao “status” metabólico de um determinado órgão.

A expressão da hemoglobina bacteriana de *Vitreoscilla* em tabaco, mostrou um aumento de crescimento devido, ao menos em parte, a um aumento na quantidade de clorofila nessas plantas transgênicas. O aumento no estoque de ATP e oxigênio devidos à hemoglobina, os quais são usados em vários estágios da biossíntese de clorofila, pode ser a causa indireta dessa

aceleração de crescimento e desenvolvimento (Holmberg et al, 1997). Entretanto, resultados contrastantes foram observados em função da expressão da leghemoglobina de soja no citossol e nos cloroplastos de plantas transgênicas de fumo (Barata et al., 2000), onde nenhuma alteração significativa foi detectada. Por outro lado, o direcionamento da mesma leghemoglobina de soja aos cloroplastos de batata, promoveu importantes alterações no crescimento e desenvolvimento das plantas (Chaparro-Giraldo et al., 2000). Portanto, este tema ainda é objeto de controvérsia.

2.2 Complexos respiratórios da membrana mitocondrial interna

A mitocôndria é a principal organela responsável por gerar ATP para a célula. Isto é feito através da fosforilação oxidativa, por meio de uma via enzimática localizada na membrana mitocondrial interna (Figura 1). Esta via é subdividida em cadeia transportadora de elétrons, formada pelos complexos enzimáticos I, II, III, IV e ATP sintetase ou complexo V. Os elétrons entram na cadeia transportadora via complexo I (NADH-desidrogenase) ou via complexo II (succinato desidrogenase). Eles passam através da ubiquinona para o complexo III (citocromo c redutase) e através do citocromo c para o complexo IV (citocromo c oxidase) para finalmente chegar ao oxigênio, formando água. Os complexos I, III e IV associam o transporte de elétrons à liberação de prótons H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, resultando um gradiente eletroquímico. Este gradiente provê a energia potencial necessária para a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato (Boyer, 1997), num mecanismo que acopla o transporte de elétrons à fosforilação oxidativa.

Além dessa cadeia transportadora principal, as mitocôndrias de plantas apresentam outros componentes transportadores de elétrons na membrana interna que não são encontrados em mitocôndrias de outros organismos. Entre eles há uma série de NAD(P)H desidrogenases distintas daquela do complexo I, que transferem elétrons diretamente para o “pool” de

ubiquinona e uma via de oxidação alternativa (AOx), que transfere elétrons da ubiquinona reduzida para o oxigênio, sem passar pelo complexo IV (Figura 1). Nestes casos, não há liberação de prótons e a energia livre é liberada na forma de calor, não sendo utilizada para a síntese de ATP (Douce et al., 1989). A oxidase alternativa (AOx) é resistente ao cianeto mas sensível a ácidos hidroxâmicos como BHAM e, por representar uma oxidase terminal não-protomotiva, é capaz de diminuir significativamente o gradiente eletroquímico.

As mitocôndrias de plantas apresentam, além desses sistemas dissipadores de energia, uma proteína semelhante à proteína desacopladora (UCP) encontrada em mitocôndrias do tecido adiposo marrom de mamíferos, e que é responsável pela produção de calor. Essa proteína recebeu o nome de proteína mitocondrial desacopladora de plantas (PUMP) (Vercesi et al., 1995) (Figura 1) e suas propriedades e funções são semelhantes à UCP (Vercesi et al., 1995; Jezec et al., 1996, 1997), com a diferença de que a PUMP não transloca Cl^- . Em presença de ácidos graxos, a PUMP leva ao desacoplamento entre transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, que é restabelecido por ATP (inibidor alostérico da PUMP) e BSA (quelante de ácidos graxos).

Skulachev (1999) propõe um modelo para o mecanismo de desacoplamento promovido pela PUMP onde ela seria um carreador de ânions de ácidos graxos para o exterior da mitocôndria, os quais atravessariam a membrana mitocondrial de volta à matriz na forma protonada, por um mecanismo de “flip-flop”. Este ciclo fútil resulta no transporte indireto de um H^+ para cada ciclo, com conseqüente desacoplamento mitocondrial (Garlid et al., 2000).

Figura 1 - Representação esquemática da cadeia respiratória da membrana mitocondrial interna de plantas superiores. Proteínas envolvidas no transporte de elétrons comuns a plantas e animais estão em azul e representam os complexos respiratórios I, II, III e IV, além do "pool" de Ubiquinona (UQ) e da citocromo c (Cit c). As proteínas específicas de plantas estão em verde (Aox, oxidase alternativa; Pump, proteína mitocondrial desacopladora de plantas; NADH desid., NADH desidrogenase) e, em laranja, as proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (complexo ATP sintetase).

2.3 Estresse oxidativo em plantas

O aparecimento dos seres aeróbicos foi um marco na evolução, pois o emprego do oxigênio proporcionou um aumento considerável na extração de energia dos alimentos consumidos. Entretanto, dada a sua configuração eletrônica, a molécula de oxigênio tem forte tendência a receber um elétron de cada vez formando, durante as reações, espécies intermediárias de oxigênio altamente reativas (Eltner, 1982).

Um dos principais mecanismos pelos quais as plantas sofrem danos em condições ambientais adversas é o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$). O superóxido e o H_2O_2 podem inativar diretamente várias macromoléculas, mas é o $OH^{\bullet}$ gerado pelo encontro desses dois radicais que contribui para a principal toxicidade, interagindo instantaneamente com proteínas, lipídeos e DNA, causando rápido dano à célula (Inzé & Van Montagu, 1995).

A mitocôndria constitui o maior sítio gerador de ânion superóxido. Durante a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, estima-se que de 1 a 5% deles desviem de sua rota, resultando na formação de $O_2^{\bullet-}$. Portanto, qualquer mecanismo que diminua a eficiência de acoplamento da cadeia transportadora de elétrons pode aumentar a produção de superóxidos (Green & Reed, 1998). A redução parcial do oxigênio, com a conseqüente formação deste radical, pode ocorrer tanto com a NADH desidrogenase quanto com o complexo ubiquinona-citocromo b da cadeia respiratória (Rich & Bonner, 1978). Entretanto, as mitocôndrias desenvolveram um eficiente sistema enzimático e não enzimático contra a ação desses subprodutos da fosforilação oxidativa.

Como representantes do aparato enzimático de proteção aos efeitos das ROS mitocondriais, encontram-se a glutathione redutase, superóxido desmutase e glutathione peroxidase. O sistema de proteção não enzimático é

formado pelo NAD(P)H, vitaminas E e C e glutathione, entre outros (Alscher et al., 1997).

A hipótese de que as enzimas antioxidantes são fatores na prevenção do estresse oxidativo é baseada nas seguintes evidências: a) a atividade das enzimas é aumentada quando as plantas são submetidas às condições de estresse; b) o pré-tratamento das plantas quanto a um tipo de estresse pode aumentar a tolerância a diferentes tipos de estresse; c) plantas selecionadas para resistência a ROS têm níveis elevados de expressão de enzimas relacionadas à proteção contra o estresse oxidativo (Allen, 1995).

Em condições fisiológicas, os sistemas oxidante e antioxidante encontram-se em equilíbrio. Entretanto, em condições de estresse, a produção de ROS é aumentada, desencadeando uma série de alterações oxidativas na mitocôndria. Estas alterações podem levar à permeabilização da membrana interna, acarretando um aumento da área da matriz mitocondrial e a subsequente ruptura da membrana externa (Skulachev, 1996). Essa ruptura libera no citossol uma série de proteínas localizadas no espaço intermembranas, podendo induzir a apoptose em núcleos isolados (Scarlet & Murphy, 1997).

2.4 Direcionamento de proteínas para organelas

2.4.1 Direcionamento de proteínas às mitocôndrias

Acredita-se que as mitocôndrias tenham resultado de um evento endossimbionte, em que uma célula eucariótica primitiva capturou uma célula procariótica, resultando em ganho de funções específicas (Gray & Doolittle, 1982). Durante a evolução, contudo, muitos dos genes dessa organela foram perdidos ou transferidos para o núcleo (Baldauf & Palmer, 1990). A maioria das proteínas mitocondriais é codificada no núcleo, sintetizada como um grande precursor por ribossomos citossólicos e, então, transportada para a organela.

Os precursores geralmente contêm uma extensão amino-terminal que direciona a proteína para a membrana alvo e é removida após a importação (Chaumont et al, 1990).

A seqüência de direcionamento mitocondrial (chamada de preseqüência) é rica em aminoácidos básicos e hidroxilados e, normalmente, faltam aminoácidos ácidos e polares. Sua estrutura secundária é prevista como sendo uma α -hélice anfifílica, que confere especificidade ao processo de importação (Boutry et al, 1987; Schmitz & Lonsdale, 1989; Silva-Filho et al, 1996; Silva-Filho, 1999).

2.4.2 Direcionamento de proteínas aos cloroplastos

A maior parte das proteínas cloroplásticas é também codificada por genes nucleares e sintetizada no citossol sob a forma de precursores. Estes precursores apresentam na extremidade amino-terminal uma seqüência de direcionamento, chamada de peptídeo de trânsito, que é responsável pela translocação do precursor ao interior da organela (de Boer & Weisbeek, 1991).

Este processo de importação de proteínas é específico (Boutry et al., 1987; Silva-Filho et al., 1996) entretanto, em alguns casos, esta especificidade não foi observada (Huang et al., 1990; Hurt et al., 1986; Pfaller et al., 1989 e Silva-Filho et al., 1997). Recentemente, Chabregas e col. (2001) demonstraram que a proteína TH11 de *Arabidopsis* é direcionada simultaneamente às mitocôndrias e cloroplastos. Em alguns casos, o peptídeo de trânsito não é capaz de introduzir uma proteína "repórter" no interior dos cloroplastos, havendo a necessidade de aminoácidos presentes na extremidade amino-terminal da proteína madura para eficiente importação (Kavanagh et al., 1988 e Silva-Filho et al., 1996).

As observações de que o peptídeo de trânsito, bem como a preseqüência mitocondrial, são capazes de transportar proteínas estrangeiras ao interior das organelas, abrem novas perspectivas no estudo dos processos

biológicos que ocorrem dentro dessas organelas. Novas proteínas podem ser ali introduzidas com o objetivo de alterar a fisiologia das plantas como, por exemplo, melhorar a fotossíntese, gerar plantas resistentes a herbicidas, além de proporcionar um vasto campo de trabalho no entendimento de fenômenos biológicos tão importantes para o funcionamento das plantas.

2.5 Giberelina em plantas

Giberelinas são fatores de crescimento essenciais para o crescimento normal das plantas e que afetam uma grande variedade de processos de desenvolvimento. A giberelina estimula a produção de α -amilase pelas células do aleurona (em cereais), levando à germinação; substitui a exposição a longos períodos de frio ou de luz, necessários para o florescimento de algumas espécies; induz a extensão do caule pelo alongamento dos internós e promove o desenvolvimento dos frutos. Em batata, a aplicação de giberelina tem um efeito inibitório sobre a tuberização (Jackson & Prat, 1996).

Existem atualmente mais de 100 giberelinas identificadas, mas apenas poucas delas são biologicamente ativas. Uma característica estrutural importante que determina a atividade biológica é a 3β -hidroxilação. As giberelinas parecem levar à uma resposta biológica via interação específica com um receptor e, uma vez que limitações estruturais interferem na atividade biológica, é de se supor que a interação receptor:GAs seja altamente específica (Richards et al., 2001).

A biossíntese de giberelina inicia nos plastídeos com a ciclização do geranyl-geranyl difosfato (GGDP) (Figura 2, passos 1 e 2). Numa segunda etapa, oxidações promovidas pelo citocromo P-450, levam à formação das giberelinas inativas GA_{12} e GA_{53} (Figura 4, passos 3 a 7). Na 3ª e última etapa da biossíntese, uma série de dioxigenases e hidroxilases solúveis promovem a oxidação de GA_{12} e GA_{53} em giberelinas ativas (GA_1 e GA_4), que podem ser

inativadas pela hidroxilação do carbono 2 β (Figura 2, passos 8 a 10) (Hedden & Kamiya, 1997).

Esta via de síntese é ativada e desativada em diferentes estágios do desenvolvimento e em diferentes órgãos, em resposta a estímulos endógenos e ambientais. O acúmulo de giberelinas ativas resulta na produção de um repressor transcricional que limita a produção das enzimas 20-oxidase e 3 β -hidroxilase, num mecanismo de “feed-back” negativo (Hedden & Kamiya, 1997) e da enzima desativadora 2 β -hidroxilase (Thomas et al., 1999). Além disso, fatores como o fotoperíodo e a temperatura podem modificar o metabolismo da giberelina, alterando o fluxo em passos específicos da via de síntese (Hedden & Kamiya, 1997). O controle fotoperiódico da tuberização em batata também parece resultar de alterações no metabolismo da giberelina, já que mutantes de *S. tuberosum* ssp. *andigena* com bloqueio na via de síntese de giberelina podem tuberizar em dias longos como em dias curtos (van den Berg et al., 1995).

Diversos trabalhos tem sido realizados com mutantes deficientes na síntese de giberelina ou na resposta a giberelina, com intuito de estudar a regulação do crescimento e do desenvolvimento das plantas (Reid & Ross, 1993). Estes trabalhos mostraram que o nível endógeno de GA está diretamente relacionado com o crescimento: níveis elevados de GA são associados a plantas altas, enquanto níveis reduzidos são associados ao nanismo. Além disso, foram identificados vários mutantes com alterações na percepção ou na sinalização de giberelina. Muitos desses mutantes apresentam fenótipo semelhante àquele dos mutantes deficientes na síntese de GA porém, a aplicação de giberelina exógena não é capaz de restaurar o fenótipo selvagem nesses mutantes.

Estudos realizados com a família de proteínas GAI e RGA, identificadas inicialmente em *Arabidopsis*, tem auxiliado no esclarecimento do mecanismo de sinalização da giberelina.

Figura 2 - Via principal do metabolismo das giberelinas (GAs) em plantas superiores, mostrando a localização subcelular de cada etapa (plastídeos, endomembranas e citoplasma). O grupo funcional que é introduzido ou modificado em cada passo está em vermelho e as GAs biologicamente ativas estão marcadas em verde (Adaptado de Hedden & Phillips, 2000).

O mutante *gai* de *Arabidopsis* apresenta uma série de características fenotípicas dos mutantes deficientes em GA. Entretanto, esta mutação é semi-dominante, seu fenótipo não é revertido pela aplicação de GA e as plantas apresentam níveis mais elevados de GA endógena que as selvagens.

Peng e col. (1997), mostraram que a proteína GAI mutante (*gai*) apresenta uma deleção de 17 aminoácidos na região N-terminal e que esta deleção confere uma resposta reduzida à GA por parte dos mutantes, sugerindo que a região N-terminal da proteína seja crucial para uma resposta normal à giberelina. Além disso, identificaram um outro mutante do mesmo locus, capaz de restaurar parcialmente o fenótipo de mutantes deficientes em GA. Assim, o primeiro mutante apresenta uma resposta reduzida à GA, devido a uma proteína com estrutura alterada, enquanto a segunda mutação leva à perda de função da proteína conferindo baixa requisição de GA.

Para conciliar as observações descritas acima, Harberd e col. (1998) propõem um modelo onde a proteína GAI atua como um repressor da resposta mediada por GA. Em resposta à giberelina, a proteína GAI deixa de atuar como repressor, permitindo o crescimento da planta. Num trabalho recente, Richards e col. (2001) ampliaram este modelo, incluindo a proteína RGA, cuja função parece se sobrepor à GAI (Figura 3).

Figura 3 - Modelo para a regulação do crescimento das plantas em resposta a GA. As proteínas GAI e RGA reprimem o crescimento em resposta a GA. Em presença de giberelina (via um intermediário da via de sinalização), o crescimento é desreprimido. O mutante *gai* não reconhece a via de sinalização de GA. Quando a ação repressora de GAI é perdida mas RGA permanece ativa, a giberelina ainda é necessária para desreprimir o crescimento porém, em menor quantidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Leghemoglobina de soja direcionada às mitocôndrias de fumo

3.1.1 Material vegetal

Por apresentarem protocolo de transformação e regeneração padronizados, plantas de *Nicotiana tabacum* cv SRI foram utilizadas na transformação gênica.

3.1.2 Construção gênica

O fragmento β , que representa a seqüência de direcionamento mitocondrial da subunidade β da F_1 -ATP sintetase (Boutry & Chua, 1985), foi amplificado do plasmídeo SK(+) β cat (Silva-Filho et al., 1997) por reação de polimerase em cadeia (PCR). Para tanto, foram sintetizados os seguintes "primers": 5'- GTAAAACGACGGCCAGT -3', que manteve o sítio de restrição *Hind*III na extremidade 5' do fragmento e, 5'- CCCGAATTCGCTAGAGGCCGCTGCGGAGG -3', que substituiu o sítio *Hind*III por um sítio *Eco*RI na extremidade 3', para facilitar a clonagem posterior.

Depois de amplificado por PCR, o fragmento foi digerido com *Hind*III e *Eco*RI e inserido nos sítios correspondentes do plasmídeo SK(-) Bluescript (Stratagene), resultando o plasmídeo SK(-) β .

O gene *lba*, da leghemoglobina simbiote de soja, foi retirado do plasmídeo SK(+) *rbcS lba* (Barata et al., 2000) por restrição com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, e inserido nos sítios correspondentes do plasmídeo SK(-) β , resultando o plasmídeo SK(-) β -*lba*. A fidelidade da construção foi verificada por seqüenciamento.

3.1.3 Vetores bacterianos

O vetor pBluescript (Stratagene) foi utilizado durante as etapas de clonagem.

O plasmídeo binário Bin2-35S*cat*E9' (Chaumont et al., 1994), capaz de replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium tumefaciens* foi usado na transformação de fumo. Este plasmídeo contém o gene *nptII* que codifica para neomicina fosfotransferase e confere resistência a canamicina em plantas, as extremidades do T-DNA, o promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor e a seqüência 3' não traduzida da Rubisco, contendo o sítio de poliadenilação (E9'). O plasmídeo Bin2-35S*cat*E9' foi digerido com *HindIII* e tratado com a "Klenow" DNA-polimerase para tornar a extremidade lisa. Imediatamente depois, foi digerido com *BamHI* para liberar o gene cloranfenicol acetiltransferase (*cat*). Paralelamente, o plasmídeo SK(-) β -*lba* foi digerido com *Clal*, tratado com "Klenow" DNA-polimerase e novamente digerido com *BamHI*, liberando o gene quimérico β -*lba*. Este fragmento foi inserido no sítio correspondente do plasmídeo binário, produzindo o vetor de transformação de planta Bin2-35S β *lba*E9' (Figura 4).

3.1.4 Cepas bacterianas

Nas etapas de clonagem foi usada a cepa de *Escherichia coli* JM 109 (Yanisch-Perron et al., 1985).

Para a transformação de plantas a cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, foi utilizada (Hoekema et al., 1983).

Figura 4 - Representação esquemática da construção gênica 35SβlbaE9'. A sequência de nucleotídeos e aminoácidos da pré-sequência β é mostrada abaixo do esquema. A região de ligação "linker", que precede o códon de iniciação da leghemoglobina, é mostrada em negrito. A seta vertical representa o ponto de clivagem entre a pré-sequência e a proteína madura. O desenho não está em escala.

3.1.5 Meios de cultura

Para crescimento de *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizado o meio de Luria-Bertani (LB), composto de 1% (p/v) de bacto-triptona (DIFCO), 0,5% (p/v) de extrato de levedo (DIFCO), 1% (p/v) de NaCl, pH 7.5, acrescido de 0,01% (p/v) de canamicina (para *E. coli*) e 0,01%

(p/v) de rifampicina (para *A. tumefaciens*). Quando necessário, 0,8% de bacto-agar (DIFCO) foi adicionado ao meio.

Para a transformação e crescimento das plantas, o meio de Murashige & Skoog (1962) foi adquirido da SIGMA e suplementado com 2% (p/v) de sacarose e 0,8% (p/v) de ágar. Foi também utilizado o meio MSACKC, que consiste no meio básico MS, acrescido de 2×10^{-5} % (p/v) de ácido indol acético, 0,04% (p/v) de carbenicilina, 0,01% (p/v) de canamicina e 0,04% (p/v) de cefotaxime.

3.1.6 Transformação de plantas

Discos foliares de cerca de 1 cm² foram colocados em placas contendo meio MS e perfurados com uma agulha estéril previamente imersa numa cultura fresca de *Agrobacterium tumefaciens*. Após três a quatro dias os discos foram transferidos para meio MS contendo os antibióticos cefotaxime e carbenicilina. A partir de 15 dias após a transferência para o meio MSACKC, surgiram as primeiras plântulas por organogênese direta. O enraizamento foi favorecido pela transferência das plântulas para meio contendo ácido indol acético.

3.1.7 Caracterização molecular das plantas transgênicas

Na caracterização molecular das plantas transgênicas, utilizou-se a técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para verificação da presença do transgene. A presença da proteína Lba foi verificada por imunodeteção usando-se anticorpo policlonal anti-Lba (gentilmente cedido por Dr. Gautam Sarath, University of Nebraska, USA).

3.1.7.1 Extração de DNA total e PCR

As plantas regeneradas em meio de seleção foram analisadas através de reação por PCR. Para tanto, o DNA foi extraído segundo o protocolo descrito por Edwards e col., (1991). Discos foliares foram coletados usando a própria tampa do tubo estéril Eppendorf e macerados sem adição de tampão. Foram adicionados 400 μ L de tampão de extração (200 mM de Tris HCl pH 7.5, 200 mM de NaCl, 25 mM de EDTA e 0,5% de SDS) e os tubos foram agitados por 5 segundos. O extrato foi, então, centrifugado por 1 minuto a 13.000 x g (em microcentrifuga) e 300 μ L do sobrenadante foram transferidos para novos tubos Eppendorf. A este sobrenadante foram adicionados 300 μ L de isopropanol e a solução resultante foi deixada em repouso por 2 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 5 minutos a 13.000 x g (em microcentrifuga), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido (depois de seco) em 100 μ L de 1X Tris EDTA (TE), composto de 10 mM Tris HCl pH 7.6 e 1mM de EDTA pH 8.0. O DNA obtido foi utilizado nas reações de PCR, usando os seguintes primers:

Primer leg 1: 5'-CCCGAATTCAGAAATATGGTTGC-3'

Primer leg 2: 5'-CCCGGATCCTACTAATTATGCC-3'

As condições utilizadas na reação, após otimização, foram: 5,0 μ L do DNA extraído, 0,6 μ L de dNTP 2,5 mM, 1 unidade de Taq DNA polimerase (GIBCO), 5,0 μ L de tampão de reação 10X e 40 pmoles de cada "primer". A reação de amplificação foi composta de 35 ciclos, cada um constituído de desnaturação (95 °C por 45 segundos), anelamento (55 °C por 45 segundos) e alongamento (73 °C por 150 segundos). Os produtos da PCR foram examinados em Minigel de agarose (1%), submetido a 80 volts por 30 minutos.

3.1.7.2 Extração de proteínas totais e Western Blotting

Para detectar a expressão da leghemoglobina de soja nas plantas de fumo transformadas, realizou-se a extração e quantificação de proteínas totais das plantas.

Para a extração de proteínas totais, cerca de 1 g de folha fresca foi macerada em nitrogênio líquido e misturada a 2,5 mL de tampão de extração composto de 0,1 M de Tris-Cl pH 7.6 e 0,1% (p/v) de ácido ascórbico. Ao descongelar, o extrato foi recolhido em tubos Eppendorf e centrifugado por 2 minutos a 13.000 x g em microcentrífuga. O sobrenadante foi recolhido em novos tubos e armazenado a -80 °C para análises posteriores.

O teor de proteína no extrato foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976), modificado para ensaio em placas de ELISA, onde 200 µL de reagente de Bradford (50 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolvidas em 25 mL de etanol, aos quais adiciona-se 50 mL de ácido fosfórico, completando-se o volume com água para 500 mL) foi adicionado a 2 µL de extrato para reagir por 5 minutos. A concentração protéica das amostras foi determinada via espectrofotômetro, com base na densidade óptica a 595 nm, tomando-se como base a regressão linear de uma curva padrão construída com soro de albumina bovina (BSA), em concentrações de proteína variando de 2,0 a 12,0 g.L⁻¹.

Depois de quantificadas, 10 µg de proteína de cada amostra foram solubilizadas em 80 mM de Tris-Cl, 2% (p/v) de SDS, 10% (p/v) de glicerol, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 1% (p/v) de dithiothreitol (DTT), pH 6.8, denaturadas por 15 minutos a 55 °C e separadas eletroforéticamente por SDS em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970), com voltagem constante de 100 V/gel. As proteínas foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad) empregando-se o sistema de transferência elétrica semi-seca (Towbin et al., 1979) com TransBlot((Bio-Rad) a 15 V por 15 minutos.

Logo após a transferência, a membrana foi lavada, sob agitação, com cerca de 30 mL de tampão fosfato salino (PBS), composto de 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 30,2 mM de NaH_2PO_4 , 1,8 mM de KH_2PO_4 , pH 7.4 durante 5 minutos. Em seguida, a membrana foi saturada com uma solução de 5% (p/v) de leite em pó desnatado e 0,2% (v/v) de Tween 20 em tampão tris salino (TBS). A membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos em TBS + 0,1% (v/v) de Tween 20 (TBS-T), e incubada por 1 hora com anticorpo anti-leg, em TBS-T (diluição 1:1.000). Depois de novamente lavada por 3 vezes de 10 minutos com TBS-T, a membrana foi novamente incubada por 1 hora com anticorpo anti-goat IgG conjugado com a fosfatase alcalina (SIGMA) na diluição 1:10.000 em TBS-T. Mais uma vez, a membrana foi lavada por 3 vezes de 10 minutos com TBS-T e revelada com o produto FAST BCIP/NBT (SIGMA), conforme recomendações do fornecedor.

3.1.8 Isolamento de mitocôndrias

O isolamento de mitocôndrias de fumo foi realizado de acordo com Silva-Filho e col., (1996). Cerca de 30 g de folhas foram homogeneizadas em liqüidificador com 200 mL de tampão de homogeneização, composto de 0,33 M de sacarose, 50 mM de Tris Cl, pH 7.2, 0,2% (p/v) de BSA, 0,2% (p/v) de polivinil pirrolidona insolúvel (PVPP) e 0,04% de 2-mercaptoetanol. O homogeneizado foi filtrado em duas camadas de papel Miracloth e centrifugado a 1.300 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi recolhido em outro tubo e centrifugado a 14.900 x g por 15 minutos. O precipitado foi dissolvido em 2 mL de tampão de suspensão, composto de 0,4 M de Manitol, 10 mM de KH_2PO_4 , pH 7.2, 1% de BSA e colocado sobre dois gradientes de Percoll (6 mL de Percoll 45% (v/v), 0,25 M de sacarose, 2% de BSA e 9 mL de Percoll 21% (v/v), 0,25 M de sacarose, 2% de BSA). O gradiente foi centrifugado a 20.000 rpm por 30 minutos em rotor SW28 (Beckman). Após a centrifugação, a fração enriquecida de mitocôndrias foi coletada na interface das duas camadas de

Percoll. Para eliminação do Percoll, esta fração foi várias vezes diluída em 30 mL de tampão de suspensão sem BSA e centrifugada a $13.800 \times g$ por 4 minutos. O precipitado final, que constitui a fração mitocondrial, foi dissolvido em 50 μL de tampão de suspensão sem BSA e a concentração de proteína foi determinada pelo método do biureto (Gornall et al., 1949).

3.1.9 Estudo da função mitocondrial

Esta etapa do trabalho foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Anibal E. Vercesi no Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas (NMCE), Universidade Estadual de Campinas.

3.1.9.1 Determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial

O potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi$) foi medido utilizando-se a sonda fluorescente safranina (5 μM), com comprimento de onda de excitação de 495 nm e de emissão de 586 nm (Holden and Sze, 1989), em um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F4010. Danos à membrana mitocondrial, os quais implicam queda do potencial de membrana, levam ao desligamento da safranina, com conseqüente queda de absorbância, que é proporcional à queda do potencial de membrana. O meio de reação continha 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de Hepes (pH 7.2), 0,33 mM de EGTA, 2,5 mM de P_i e 1 mM de MgCl_2 e 200 μM de propanolol foi adicionado para inibir o canal aniônico da membrana interna (Beavis and Vercesi, 1992). Em alguns experimentos foi adicionado 0,2% (p/v) de BSA para manter a respiração acoplada ou 1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de oligomicina para inibir a atividade da F_0F_1 -ATP sintetase. Como substrato respiratório foi usado 10mM de succinato. Em cada experimento foi utilizada 0,5 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ de mitocôndria isolada.

3.1.9.2 Oxidação de β - NADH

A oxidação de NADH foi avaliada pela fluorescência de β - NADH, com comprimento de onda de excitação de 366 nm e de emissão de 450 nm (Fagian et al., 1990). O meio de reação foi o mesmo utilizado no item 3.1.9.1 porém, o EGTA foi retirado e foi adicionado 50 μ M de Ca^{2+} para ativar as NADH-desidrogenases. No início de cada experimento foi adicionado 1 μ M de antimicina A, 72 μ M de β - NADH e 0,25 mg.mL^{-1} de mitocôndria isolada. O experimento foi realizado em atmosfera normal e em atmosfera de nitrogênio. O meio de reação com antimicina A foi colocado em uma cuveta e, dentro dela, foi borbulhado nitrogênio puro por 10 minutos. Após a desaeração, uma pequena tampa foi adaptada ao topo da cuveta, de modo a não deixar nenhum espaço livre.

3.2 Leghemoglobina de soja direcionada aos cloroplastos de batata

3.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas de batata (*Solanum tuberosum*) cv. Bintje (IAC), previamente transformadas com o gene quimérico *rbcS-lba*, via *Agrobacterium tumefaciens* (Chaparro-Giraldo et al., 2000) e plantas controle, não transformadas. Esta construção (*rbcS-lba*) foi desenvolvida por Barata e col., (2000) e foi baseada no plasmídeo binário Bin2-35ScatE9', onde o gene *cat* foi substituído pelo gene *lba*, da leghemoglobina de soja, precedido da sequência de direcionamento cloroplástica da Rubisco de ervilha (*rbcS*), originando o plasmídeo Bin2-35S*rbcS-lba*E9' (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática da construção gênica *rbcS-lba*. O gene *nptII* confere resistência a canamicina; 35S é um promotor constitutivo viral; *rbcS* é a seqüência de direcionamento cloroplástica ligada ao gene da leghemoglobina (*lba*) por uma região de ligação (link) de 4 amino ácidos e E9 é a região 3' não transcrita da rubisco. O desenho não está em escala.

3.2.2 Micropropagação *in vitro*

As plantas foram propagadas por nós (microestacas), em tubos de ensaio com 10 mL de meio MS suplementado com 2% (p/v) de sacarose e um único explante por tubo, ou em frascos maiores com 40 mL de meio MS com 2% (p/v) de sacarose e quatro explantes por frasco. Este material foi colocado em sala de crescimento por, pelo menos, 4 semanas, com temperatura (24 ± 2 °C) e fotoperíodo (16/8 hs) controlados.

3.2.3 Transferência para a casa de vegetação

Antes da transferência para a casa de vegetação, as plântulas passaram por um período de aclimação, onde foram deixadas em sala de crescimento por 2 semanas em frascos com substrato orgânico autoclavado.

Transferidas para a casa de vegetação e plantadas em vasos de 3 litros, as plantas foram adubadas semanalmente durante toda a cultura. Os tubérculos foram produzidos 80 dias após a transferência.

3.2.4 Caracterização molecular das plantas transgênicas

Foi verificada a presença da proteína Lba em frações enriquecidas de cloroplastos, utilizando a técnica de Western-blotting.

3.2.4.1 Isolamento de cloroplastos

O isolamento de cloroplastos de batata foi realizado de acordo com Silva-Filho e col., 1996. Cerca de 10 g de folhas foram homogeneizadas em liqüidificador com 100 mL de tampão de homogeneização, composto de 0,33 M de sacarose, 50 mM de Tris Cl, pH 8.0, 0,2% (p/v) de BSA, 0,2% (p/v) de polivinilpirrolidona insolúvel (PVPP) e 0,04% de 2-mercaptoetanol. O produto foi filtrado em duas camadas de papel Miracloth e 1 mL foi recolhido em tubo Eppendorf e estocado a -20 °C (fração de homogeneizado - H). O restante do filtrado foi centrifugado a 1.300 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 2 mL de tampão de suspensão, composto de 0,4 M de Manitol, 10 mM de KH₂PO₄, pH 7.2, 1% de BSA e colocado sobre dois gradientes de Percoll em um tubo "Corex" (4mL de Percoll 80% (v/v), 0,25 M de sacarose e 4,8 mL de Percoll 40% (v/v), 0,25 M de sacarose). O gradiente foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos em rotor ST-H50T (Sorvall). Após a centrifugação, a fração enriquecida de cloroplastos foi coletada na interface das duas camadas de Percoll. Para eliminação do Percoll, esta fração foi várias vezes diluída em 1 mL de tampão de suspensão sem BSA e centrifugada a 1.300 x g por 3 minutos. O precipitado final, que constitui a fração de cloroplastos, foi ressuscitado em 100µL de tampão de suspensão sem BSA e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

3.2.4.2 Western-blotting

A eletroforese das frações enriquecidas de cloroplastos (C) e das frações de homogeneizado (H), bem como a imunodeteção da leghemoglobina nestas frações foram realizadas conforme descrito no item 3.1.7.2.

3.2.5 Avaliações fenotípicas

Os caracteres fenotípicos foram avaliados em transformantes independentes de batata transgênicas (B1, B2, B3) e tipo selvagem (plantas não transformadas). As características comprimento do caule e comprimento dos internós foram avaliadas em plântulas de 2 e 4 semanas, micropropagadas *in vitro*, em ensaios com delineamento inteiramente casualizado. Neste estudo foram utilizadas quatro unidades experimentais por genótipo, sendo cada valor representado pela média dos valores obtidos em três plantas.

Tubérculos foram colhidos de plantas mantidas em cultura *in vitro* por 6 meses e também a partir de plantas adultas (80 dias após a transferência para a casa de vegetação). No primeiro caso, foram avaliadas 8 plantas por genótipo e no segundo caso, 10 plantas por genótipo.

3.2.6 Tratamento com GA₃

A aplicação de giberelina ativa (GA₃) exógena foi realizada sobre plantas recém transferidas para a casa de vegetação. Uma planta de cada evento de transformação (B1, B2 e B3) e uma não transformada (WT) foram borrifadas com 100 µM de GA₃ uma vez por semana, durante 2 semanas. Como controle, outro grupo igual de plantas (B1, B2, B3 e WT) foi borrifado com água.

3.2.7 Cortes histológicos

O 6º internó de plantas de batata transformadas (B1, B2 e B3) e não transformadas (WT) crescidas *in vitro* por 4 semanas, foi retirado e fixado em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Para melhor fixação, as amostras foram colocadas em uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em uma série etanólica e infiltradas em resina de glicol metacrilato. Secções de 5 µm foram cortadas e coradas com 0,05% de azul de toluidina O (Sakai, 1973) e as lâminas montadas em resina sintética "Entellan".

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Leghemoglobina de soja direcionada às mitocôndrias de fumo

4.1.1 Obtenção das plantas transgênicas

Discos foliares de *Nicotiana tabacum* foram transformados com um vetor derivado do plasmídeo *ti* de *Agrobacterium tumefaciens* contendo a construção quimérica β -*lba*. Várias plântulas foram regeneradas em meio MS contendo o antibiótico canamicina (agente seletivo), sugerindo a origem transgênica das mesmas.

Depois de enraizadas, essas plântulas R₀ foram transferidas para a casa de vegetação, juntamente com plantas não transformadas (WT) que serviram de controle.

4.1.2 Análise molecular das plantas transgênicas

4.1.2.1 “Screening” por PCR

Do processo de transformação e regeneração foram obtidas várias plantas resistentes a canamicina, potencialmente transgênicas.

Para detectar a presença do T-DNA nestas plantas, o DNA foi extraído e procedeu-se a análise por PCR. Seis transformantes independentes apresentaram o fragmento amplificado de 465 pb correspondente ao gene da

leghemoglobina (Figura 6), comprovando a inserção do gene no genoma dessas plantas.

Figura 6 - Análise por PCR das plantas parentais regeneradas obtidas da transformação via *A. tumefaciens* (geração R₀). Marcador de peso molecular - 100 pb DNA (coluna 1), controle negativo (coluna 2), fragmento *lba* amplificado das plantas transgênicas (colunas 3 – 8).

4.1.2.2 Western Blotting

A confirmação da presença do fragmento de DNA correspondente ao gene da leghemoglobina não assegura que o mesmo esteja sendo transcrito, uma vez que o T-DNA pode inserir-se em regiões de heterocromatina, que apresentam normalmente baixa expressão gênica. Como forma de verificar a presença da proteína, as 6 plantas transformadas foram analisadas por Western blotting (Figura 7). Das 6 plantas que continham o T-DNA, 5 expressaram o gene *lba* (Figura 7, colunas 3 – 7).

A imunodeteção revelou a presença de uma banda ligeiramente superior ao peso molecular esperado, referente à proteína Lba, de 16 kDa. A diferença existente entre o peso molecular das bandas é provavelmente devida à existência de 4 resíduos de amino ácidos correspondentes à região de ligação entre a sequência de direcionamento mitocondrial e a proteína Lba.

As plantas da geração R_0 expressando a leghemoglobina foram autofecundadas, produzindo a geração R_1 que apresentou segregação mendeliana do tipo 3:1, sugerindo a presença de apenas um inserto funcional. As análises de função mitocondrial foram realizadas com plantas homozigotas da geração R_2 . Para tanto, todas as plantas obtidas em R_1 foram analisadas previamente por Western blotting.

Figura 7 - Imunodeteccção da leghemoglobina em plantas de fumo. Extrato protéico de nódulos de soja (coluna 1), proteína total de planta não transformada (coluna 2), proteína total de plantas transgênicas (colunas 3 – 8).

4.1.2.3 A preseqüência da subunidade β da F_1 -ATP sintetase direciona a leghemoglobina ao interior das mitocôndrias

A fim de verificar se a leghemoglobina havia sido corretamente importada e processada nas mitocôndrias, procedeu-se ao fracionamento subcelular e à imunodeteccção da proteína em frações enriquecidas de mitocôndrias (Figura 8). A análise por Western blotting em plantas transformadas mostrou que a leghemoglobina está sendo expressa no interior das mitocôndrias.

Figura 8 - Imunodeteção da leghemoglobina em frações enriquecidas de mitocôndrias (colunas 2 – 5). Extrato protéico de nódulos de soja (coluna 1), planta não transformada WT (coluna 2), plantas transgênicas (colunas 3 – 5).

4.1.3 Análise da função mitocondrial

A fim de detectar possíveis alterações fisiológicas e/ou bioquímicas decorrentes da presença de uma proteína com alta afinidade por oxigênio no interior das mitocôndrias, uma série de experimentos foi realizada.

4.1.3.1 Potencial elétrico ($\Delta\Psi$) da membrana mitocondrial

4.1.3.1.1 Resposta à adição de ADP

Mitocôndrias isoladas de folhas de fumo (transgênico e selvagem) foram incubadas em meio de reação contendo BSA [0,2% (p/v)], safranina (5 μ M) e succinato (10 mM). A formação do potencial elétrico ($\Delta\Psi$) foi acompanhada em fluorímetro e foi possível observar que, na presença de BSA, tanto as mitocôndrias de plantas selvagens quanto as de plantas transgênicas exibem um potencial suficiente para fosforilar o ADP adicionado (0,2 mM) (Figura 9 a e b).

Figura 9 - Potencial de membrana de mitocôndrias ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) isoladas de plantas não transformadas (a) e transgênicas (b), analisadas em meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de Hepes (pH 7.2), $0,33 \text{ mM}$ de EGTA, $2,5 \text{ mM}$ de P_i , 1 mM de MgCl_2 e $200 \text{ }\mu\text{M}$ de propanolol. A esse meio foi adicionado $0,2\%$ (p/v) de BSA, $5 \text{ }\mu\text{M}$ de safranina e 10 mM de succinato. ADP ($0,2 \text{ mM}$), oligomicina ($1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) e FCCP ($1 \text{ }\mu\text{M}$), foram adicionados onde indicado.

Esta característica mostra que, mesmo após o estresse causado pelo isolamento e apesar da presença do transgene, as mitocôndrias mantêm suas funções normais. A adição de oligomicina ($1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) em b, inibidor da síntese de ATP, bloqueia a fosforilação e restaura o potencial ao nível anterior, refletindo a integridade física e fisiológica dessas mitocôndrias.

4.1.3.1.2 Resposta à adição de ATP e BSA

A figura 10 mostra o comportamento do potencial elétrico ($\Delta\Psi$) da membrana mitocondrial em resposta à adição de ATP ($0,5 \text{ mM}$) e BSA [$0,1\%$ (p/v)], quando as mitocôndrias são incubadas em meio contendo safranina ($5 \text{ }\mu\text{M}$), oligomicina ($1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) (inibidor da $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATP}$ sintetase) e atractilósídeo

(10 μ M) (inibidor do carreador ADP/ATP), usando succinato (10nM) como substrato respiratório.

Figura 10 - Potencial de membrana de mitocôndrias (0,5 mg.mL⁻¹) isoladas de plantas não transformadas, analisadas em meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de Hepes (pH 7.2), 0,33 mM de EGTA, 2,5 mM de P_i, 1 mM de MgCl₂ e 200 μ M de propanolol. A esse meio foi adicionado oligamicina (1 μ g.mL⁻¹), atractilósídeo (10 μ M), safranina (5 μ M) e succinato (10mM). ATP (0,5 mM), BSA (0,2%) e CN⁻ (1,5 mM), foram adicionados onde indicado.

Observa-se que a adição de BSA leva a um aumento significativo do potencial elétrico transmembrânico ($\Delta\Psi$) bem como a adição de ATP. A presença de uma proteína desacopladora (PUMP) em mitocôndrias de folhas de tabaco pode explicar este aumento de potencial observado.

De forma semelhante ao que ocorre com a proteína desacopladora de mamíferos (UCP1), a PUMP leva ao desacoplamento por permitir a saída de ácidos graxos da matriz mitocondrial para o citossol. Esses ácidos graxos retornam à matriz carregando prótons H⁺ (Garlid et al., 1996).

Assim, a adição de BSA, um quelante de ácidos graxos, impede a reentrada dos prótons H^+ , permitindo um aumento do potencial.

O aumento de potencial observado quando da adição de ATP pode ser explicado pela ativação da succinato desidrogenase, já que o succinato é utilizado como substrato, ou pelo fato de que o ATP é um inibidor alostérico da atividade da PUMP, permitindo um acoplamento adicional (Vercesi et al., 1997).

4.1.3.1.3 Resposta à adição de substratos e inibidores

A presença de uma proteína capaz de se ligar a átomos de oxigênio poderia desencadear alterações na homeostase mitocondrial, afetando o fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória. Para avaliar a integridade da cadeia respiratória, as mitocôndrias foram incubadas em meio contendo safranina (5 μM) e α -cetoglutarato (10 mM), um substrato de sítio I. Uma diminuição na fluorescência da safranina indica a formação de um pequeno potencial elétrico que é apenas parcialmente inibido por rotenona (2 μM) (Figura 11). Essa inibição apenas parcial confirma a existência de NADH desidrogenases insensíveis a rotenona em mitocôndrias vegetais (Soole & Mensz, 1989). A adição de succinato (10 mM), substrato de sítio II, induz a formação de um potencial elétrico significativamente maior, que é altamente inibido por antimicina A (1 μM). Neste ponto, embora a cadeia respiratória esteja inibida, o fluxo de elétrons ainda é permitido através da oxidase alternativa, que não é sensível aos inibidores da via do citocromo como cianeto, antimicina ou mixotiazol (Vanlerberghe & McIntosh, 1997).

As mitocôndrias de fumo são também capazes de respirar com o substrato de sítio IV, TMPD/ascorbato (0,2 mM/0,1 mM), sendo a respiração finalmente inibida pelo protonóforo FCCP (1 μM). O potencial de membrana também é sensível ao cianeto de potássio (2 mM). (Figura 11).

Mitocôndrias isoladas de plantas transgênicas (Figura 11b) não mostraram diferenças significativas em relação às isoladas de plantas não transformadas (Figura 11a), indicando que a presença da leghemoglobina não afeta o fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória.

Figura 11 - Potencial de membrana de mitocôndrias ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) isoladas de plantas não transformadas (a) e transgênicas (b), analisadas em meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de Hepes (pH 7.2), $0,33 \text{ mM}$ de EGTA, $2,5 \text{ mM}$ de P_i , 1 mM de MgCl_2 , $200 \text{ } \mu\text{M}$ de propanolol. A esse meio foi adicionado $5 \text{ } \mu\text{M}$ de safranin e 10 mM de α -cetoglutarato. Rotenona ($2 \text{ } \mu\text{M}$), Succinato (10 mM) Antimicina A ($1 \text{ } \mu\text{M}$) TMPD/ascorbato ($0,2 \text{ mM}/0,1 \text{ mM}$) e FCCP (μM) foram adicionados onde indicado.

4.1.3.2 Oxidação de β - NADH

A expressão da hemoglobina não-simbionte de cevada no citoplasma de células de milho, resultou na manutenção do “status” energético dessas células, mesmo na presença de uma atmosfera de nitrogênio ou do inibidor da respiração, antimicina A (Sowa et al., 1998). Os autores sugerem que, sob condições limites de oxigênio, as plantas promovem um fluxo glicolítico através da oxidação de NADH, resultando um aumento de fosforilação a nível de substrato. Sugerem, também, que a hemoglobina poderia se associar a uma flavoproteína, criando um complexo capaz de oxidar NADH, de forma semelhante à proteína Hmp de *Escherichia coli* (Poole et al., 1997).

Para verificar se a expressão da leghemoglobina nas mitocôndrias poderia facilitar o processo de oxidação de NADH, foram realizados experimentos com mitocôndrias isoladas de plantas transgênicas e não transformadas. A taxa de oxidação de NADH na presença de antimicina A, que inibe o fluxo de elétrons pela cadeia respiratória, foi acompanhada em fluorímetro, em atmosfera normal e em atmosfera de nitrogênio.

Não foi possível detectar nenhuma diferença na taxa de oxidação de NADH por mitocôndrias isoladas de plantas transgênicas e de plantas não transformadas em atmosfera normal (Figura 12A, traços a e b, respectivamente) e em atmosfera de nitrogênio (Figura 12B, traços c e d, respectivamente)

Figura 12 - Oxidação de β - NADH exógeno por mitocôndrias isoladas de plantas transgênicas e não transformadas. As mitocôndrias ($0,25 \text{ mg/mL}^{-1}$) foram analisadas em meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de Hepes (pH 7.2), $50 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} , 2,5 mM de P_i , 1 mM de MgCl_2 e $200 \mu\text{M}$ de propanolol. A este meio foi adicionado antimicina A ($1 \mu\text{M}$) e β - NADH (72 mM). Em A, oxidação de β - NADH por mitocôndrias de plantas transgênicas (traço a) e não transformadas (traço b), em condições atmosféricas normais. Em B, oxidação de β - NADH por mitocôndrias de plantas transgênicas (traço c) e não transformadas (traço d) em condições de anoxia.

Estes resultados indicam que a leghemoglobina não é capaz de doar elétrons para as NADH-desidrogenases mitocondriais e estão de acordo com os resultados obtidos em células de milho transformadas com hemoglobina de cevada (Sowa et al., 1998), confirmando que enzimas mitocondriais não estão envolvidas na manutenção do “status” energético em condições de hipoxia. A via da oxidase alternativa também não está envolvida, já que a presença, no meio de reação, de 1,5 mM de ácido benzo-hidroxâmico (BHAM), um inibidor da oxidase alternativa, não alterou os resultados obtidos nessas condições experimentais (dado não mostrado).

4.2 Leghemoglobina de soja direcionada aos cloroplastos de batata

A transformação de plantas de batata (*S. tuberosum*, cv. Bintje) com o gene da leghemoglobina de soja direcionado aos cloroplastos, resultou uma série de transformantes independentes, sendo três escolhidos para caracterização (B1, B2, B3). Foi observado nas plantas transformadas um fenótipo anão e um aumento na tuberização *in vitro* (Chaparro-Giraldo, 1999).

4.2.1 O peptídeo de trânsito da Rubisco direciona a leghemoglobina ao interior dos cloroplastos

A fim de verificar a localização subcelular da leghemoglobina, procedeu-se ao fracionamento subcelular de folhas de fumo transgênicas e não transformadas (WT) e imunodeteção da proteína em frações enriquecidas de cloroplastos (Figura 13). Deste fracionamento, foi obtido um homogeneizado total (H) e, por centrifugação diferencial e purificação em gradiente de Percoll, uma fração de cloroplastos (C).

Análises de Western blotting mostraram que a leghemoglobina foi corretamente importada nos cloroplastos. O enriquecimento da Lba na fração enriquecida de cloroplastos foi relativamente baixo, mas isto é esperado pois,

uma vez que as proteínas cloroplásticas do mesófilo foliar representam 50% da proteína total das folhas, o enriquecimento só pode ser, no máximo, de 2 vezes (Silva-Filho et al., 1997). Como esperado, o tamanho da proteína madura no interior dos cloroplastos é ligeiramente maior do que os 16 kDa da Lba dos nódulos de soja, devido a presença de 5 aminoácidos na região de ligação entre a sequência de direcionamento e o gene *lba*.

Figura 13 - Imunodeteção da leghemoglobina em frações subcelulares de plantas transgênicas (Tra – colunas 3 e 4) e controle (WT – colunas 2 e 3). A análise de Western blotting foi realizada com 30 µg de proteína do homogeneizado (H – colunas 2 e 4) e da fração de cloroplastos (C – colunas 3 e 5). Extrato protéico de nódulos de soja (*lba* – coluna 1)

O peptídeo de trânsito da Rubisco vem sendo utilizado com sucesso na importação de várias proteínas para os cloroplastos (Barata et al., 2000, Boutry et al., 1987 ; Wan et al., 1996). Entretanto, Dieryck et al (1997) não conseguiram acumular a hemoglobina humana em cloroplastos de tabaco, apesar de utilizarem a sequência de direcionamento da Rubisco. Provavelmente a proteína foi degradada nas folhas pois a proteína foi observada em raízes e sementes das plantas transformadas.

4.2.2 Avaliações fenotípicas

Uma série de avaliações fenotípicas foram realizadas com o objetivo de verificar as possíveis causas da indução do nanismo apresentado pelas plantas transformadas.

4.2.2.1 Altura das plântulas e comprimento dos internós

Plantas transgênicas de batata (B1, B2, B3) e plantas controle (não transformadas - WT), micropropagadas *in vitro* a partir de segmentos nodais, foram avaliadas e fotografadas com 2 semanas (Figura 14a) e novamente avaliadas à 4 semanas. As avaliações consistiram na medida (em mm) da altura total das plantas (Figura 14b), bem como na medida (em mm) de seus internós (Figura 15).

Figura 14 - a) Plantas de batata transgênicas (B1, B2, B3) e controle (WT) crescidas *in vitro* por 2 semanas. b) Altura das plantas transgênicas (B1, B2, B3) e controle (WT) crescidas *in vitro* por 2 e 4 semanas. Os valores representam as médias de 4 repetições $\pm$ desvio padrão, sendo cada repetição representada pela média da altura de 3 plantas.

Figura 15 - Comprimento dos internós de plantas de batata transgênicas (B1, B2, B3) e controle (WT), avaliadas com 2 (a) e com 4 semanas (b). Os valores representam as médias de 4 repetições, sendo cada repetição representada pela média de 3 plantas.

Os resultados mostraram que o fenótipo anão se manifesta desde o início do desenvolvimento e que ele é devido, principalmente, a um encurtamento dos internós nas plantas transgênicas (Figura 15). O mesmo fenótipo é apresentado por mutantes deficientes na biossíntese de giberelina (Carrera et al., 2000; Reid & Ross, 1993), sugerindo que estas plantas possam apresentar, também, deficiência na síntese desse hormônio.

4.2.2.2 Tratamento com GA₃

Um ensaio biológico onde se pulverizou ácido giberélico em plantas transgênicas foi realizado para avaliar a deficiência hormonal (Figura 16). A aplicação de 100 μ M de GA₃ sobre plantas transformadas promoveu a restauração do fenótipo selvagem, o que é esperado para plantas deficientes em giberelina (Coles et al, 1999; Valkonen et al, 1999), reforçando a hipótese acima.

Figura 16 - Aplicação de 100 μ M de GA_3 sobre a planta transgênica B1 (ao centro). À direita, planta transgênica B1 borrifada com água. À esquerda, planta controle (WT) borrifada com água.

4.2.2.3 Tamanho das células

A análise de cortes histológicos do 6^o internó de plantas transgênicas e plantas controle revelou uma acentuada diminuição no tamanho das células (Tabela 1 e figura 17), sendo as de plantas transgênicas cerca de 44% menores. Este foi mais um resultado a corroborar a suspeita de deficiência na biossíntese de giberelina por parte das plantas de batata que expressam a leghemoglobina nos cloroplastos.

Tabela 1. Comprimento das células de plantas transgênicas (B1, B2, B3) e plantas controle (WT). Os dados representam a média de aproximadamente 100 células e o respectivo desvio padrão (σ).

	WT	B1	B2	B3	$\bar{X}$ Tra
Média (μm)	6.48	4.35	3.46	3.08	3.61
σ (μm)	1.41	1.51	0.92	1.07	1.07

Figura 17 - Corte longitudinal do sexto internó de planta controle (a) e transgênica (b). A barra representa 10 μm .

4.2.2.4 Tuberização

Em batata (*Solanum tuberosum*), é sabido que altos níveis de giberelina retardam ou inibem a tuberização. Em dias curtos, a síntese de giberelina ativa diminui, sendo esta uma condição que favorece a tuberização (Hammes & Nel, 1975). Da mesma forma, o uso de inibidores da biossíntese de

giberelina como o paclobutrazol e o ancimídol, podem promover este processo (Jackson & Prat, 1996).

Resultados preliminares (Chaparro-Giraldo, 1999) mostraram que, *in vitro*, plantas de batata expressando a leghemoglobina nos cloroplastos, apresentavam um aumento na tuberização. A Figura 18 mostra a produção de tubérculos em plantas de batata transgênicas (B1, B2, B3) e controle (WT), mantidas *in vitro* por 3 meses. Foi verificado que, inclusive em casa de vegetação, as plantas transgênicas produziram maior número de tubérculos em relação às controle (Figura 19). Durante o verão, quando os dias são longos e o processo de tuberização é inibido, as plantas transgênicas tuberizaram, enquanto as controle não produziram nenhum tubérculo (dado não mostrado). Mais uma vez, esses resultados sugerem que as plantas transgênicas apresentam deficiência de giberelina ativa e que os níveis devem ser realmente baixos pois seu efeito indutor se sobrepõe ao efeito inibitório dos dias longos.

Figura 18 - Tuberização *in vitro* de plantas de batata. Número total de tubérculos colhidos em 8 plantas controle (WT) e 8 plantas de cada transformante (B1, B2, B3).

Figura 19 - Quantidade de tubérculos produzidos por plantas adultas, 3 meses após transferência para casa de vegetação. Batatas colhidas de 10 plantas controle (canto superior direito), 10 plantas B1 (à esquerda) e 10 plantas B2 (canto inferior direito).

Trabalhando com plantas de batata expressando o “anti-sense” do gene *StGA20ox1*, que codifica uma GA 20-oxidase, enzima que cataliza reações de oxidação na biossíntese de giberelina e que é regulada pelo comprimento do dia, Carrera e col. (2000), observaram que as plantas apresentavam baixos níveis de giberelina ativa e eram capazes de tuberizar precocemente em dias curtos. Entretanto, em dias longos, as plantas transformadas não apresentaram nenhum tubérculo, mesmo após 100 dias na casa de vegetação, indicando que a redução nos níveis de GA ativa obtida pela expressão do “anti-sense” não foi suficiente para se sobrepor aos efeitos inibitórios de dias longos, o que ocorreu com as plantas de batata transformadas com a Lba de soja.

Visto que os resultados apontam na mesma direção, isto é, que essas plantas apresentam pequena quantidade de GA ativa, resta investigar de

que forma a leghemoglobina estaria interferindo na biossíntese de GA? É difícil imaginar que a Lba esteja interferindo diretamente nas reações de síntese de GA pois, apesar das primeiras reações ocorrerem nos plastídeos, para onde foi direcionada a leghemoglobina, elas não são reações de oxidação. A segunda e terceira etapas da via de síntese de GA envolvem uma série de oxidações, mas têm lugar nas membranas do retículo endoplasmático e no citossol respectivamente, e não nos cloroplastos. Pode-se especular, entretanto, que a provável alteração nos níveis de GA seja um efeito indireto da presença da Lba nos plastídeos.

Nas células infectadas de nódulos fixadores de nitrogênio em leguminosas, onde é encontrada naturalmente a leghemoglobina, encontramos também uma proteína cuja função é estocar temporariamente átomos de ferro. Esta proteína, fitoferritina, é normalmente encontrada em plastídeos (verdes e não verdes), é formada por 24 subunidades e pode armazenar, em sua cavidade central, até 4.500 átomos de ferro. Foi mostrado que nos nódulos das raízes de leguminosas, o nível de fitoferritina diminui com o aparecimento da nitrogenase e da leghemoglobina, mostrando que o ferro estocado nas fitoferritinas é dispensado para a síntese de moléculas ferro-dependentes, como é a leghemoglobina (Briat et al., 1999).

Nas plantas de batata que expressam a leghemoglobina nos cloroplastos, talvez esteja ocorrendo uma competição por átomos de ferro ou ainda pelo grupo heme. As fitoferritinas teriam seu estoque diminuído, em virtude da presença da leghemoglobina, tornando menor a disponibilidade de ferro para a síntese de enzimas como as GA 20-oxidases, que se ligam a este metal.

Evidentemente, a quantificação dos níveis de GA nas plantas (análises em curso no laboratório do prof. Peter Hedden, Bristol University, UK) poderá trazer informações importantes sobre em que momento da rota metabólica há uma interferência no processo.

5 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados, conclui-se que:

- A leghemoglobina de soja pode ser importada e corretamente processada no interior de mitocôndrias e cloroplastos, quando fusionada a seqüências de direcionamento adequadas.
- O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória e a fosforilação permanecem normais em mitocôndrias de plantas transgênicas e de plantas controle, mesmo após o estresse causado pelo isolamento e apesar da presença do transgene.
- A proteína desacopladora (PUMP) está presente na membrana interna de mitocôndrias de fumo.
- A leghemoglobina não é capaz de doar elétrons para as NADH-desidrogenases mitocondriais.
- NADH-desidrogenases mitocondriais não estão envolvidas na manutenção do “status” energético das células em condições de hipoxia.
- Plantas de batata expressando a leghemoglobina de soja nos cloroplastos apresentam um fenótipo típico de plantas deficientes na biossíntese de giberelina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R.D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. **Plant Physiology**, v.107, p.1049-1054, 1995.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.224-233, 1997.

ANDERSON, C.R.; JENSEN, E.O.; LLEWELLYN, D.J.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J. A new hemoglobin gene from soybean. A role for hemoglobin in all plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.93, p.5682-5687, 1996.

APPLEBY, C.A. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. **Annual Review of Plant Physiology**, v.35, p.443–478, 1984.

APPLEBY, C.A.; BOGUZS V.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J. A role for hemoglobins in all plants roots? **Plant Cell and Environment**, v.11, p.359-367, 1988.

ARREDONDO-PETER, R.; HARGROVE, M.S.; MORAN, J.F.; SARATH, G.; KLUCAS, R.V. Plant hemoglobins. **Plant Physiology**, v.118, p.1121–1125, 1998.

BALDAUF, S.L.; PALMER, J.D. Evolucionary transfer of the chloroplast *tufA* gene to the nucleus. **Nature**, v.344, p.262-265, 1990.

BARATA, R.M.; CHAPARO-GIRALDO, A; CHABREGAS, S.M; GONÇALES R.; LABATE C.A.; AZEVEDO, R.A.; GAUTAM, S.; LEA P.J.; SILVA-FILHO M.C. Target of the soybean leghemoglobin to tobacco chloroplasts: effects on aerobic metabolism in transgenic plants. **Plant Science**, v.155, p.193-202, 2000.

BEAVIS, A.D.; VERCESI, A.E. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.3079-3087, 1992.

BECANA, M.; KLUCAS, R.V. Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants. **Plant Physiology**, v.97, p.1217-1221, 1992.

BOUTRY, M.; CHUA, N-H. A nuclear gene encoding the beta subunit of the mitochondrial ATP synthase in *Nicotiana plumbaginifolia*. **The EMBO Journal**, v.4, p.2159-2165, 1985.

BOUTRY, M.; NAGY, F.; POULSEN, C.; AOYAGI, K.; CHUA, N-H. Targeting of bacterial chloramphenicol acetyltransferase mitochondria in transgenic plants. **Nature**, v.238, p.340-342, 1987.

BOYER, P.D. The ATP synthase – A splendid molecular machine. **Annual Review of Biochemistry**, v.66, p.717-749, 1997.

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

- BRIAT, J-F.; LOBRÉAUX, S.; GRIGNON, N.; VANSUYT, G. Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. **CMLS Cell and Molecular Life Sciences**, v.56, p.155-166, 1999.
- BRISSON, N.; VERMA, D.P.S. Soybean leghemoglobin gene family: Normal, pseudo and truncated genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.9, p.4055-4059, 1982.
- CARRERA, E.; BOU, J.; GARCIA-MARTINEZ, J.L.; PRAT, S. Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. **The Plant Journal**, v.22, n.3, p.247-256, 2000.
- CHABREGAS, S.M.; LUCHE, D.D.; FARIAS, L.P.; RIBEIRO, A.F.; SLUYS, M.A.; MENK, C.F.M.; SILVA-FILHO, M.C. Dual targeting properties of the N-terminal signal sequence of *Arabidopsis thaliana* TH11 protein to mitochondria and chloroplasts. **Plant Molecular Biology**, v.0, p.1-12, 2001.
- CHAPARO-GIRALDO, A.; BARATA R.M.; CHABREGAS, S.M; AZEVEDO, R.A.; SILVA-FILHO M.C. Soybean leghemoglobin target to chloroplasts influences growth and development of transgenic plant. **Plant Cell Reports**, v.19, p.961-965, 2000.
- CHAPARRO-GIRALDO, A. Efeitos pleiotrópicos em plantas transgênicas de batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Bintje associados à expressão da leghemoglobina de soja no interior dos cloroplastos. Piracicaba,1999. 103p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” – Universidade de São Paulo.

- CHAUMONT, F.; O'RIORDAN, V.; BOUTRY, M. Protein transport into mitochondria is conserved between plant and yeast species. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.16856-16862, 1990.
- COLES, J.P.; PHILLIPS, A.L.; CROKER, S.J.; GARCIA-LEPE, R.; LEWIS, M.J.; HEDDEN, P. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. **The Plant Journal**, v.17, n.5, p.547-556, 1999.
- DE BOER, A.D.; WEISBEEK, P.J. Chloroplast protein topogenesis, import, sorting and assembly. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1071, p.221-253, 1991.
- DOUCE, R.; NEUBERGER, M. The uniqueness of plant mitochondria. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.371-414, 1989.
- EDWARDS, A.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.1349, 1991.
- ELSTNER E.F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual Review of Plant physiology**, v.33, p.73-96, 1982.
- FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; MARTINS, I.S.; VERCESI, A.E. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.19955-19960, 1990.

- GARLID, K.D.; JABUREK, M.; JEZEK, P.; VARECHA, M. How do uncoupling protein uncouple? **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.1459, p.383-389, 2000.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAWID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v.177, p.751–766, 1949.
- GRAY, M.W.; DOOLITTLE, W.F. Has the endosymbiont hypothesis been proven? **Microbiological Review**, v.46, p.1-42. 1982.
- GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v.281, p.1309-1312, 1998.
- HAMMES P.S.; NEL, P.C. Control mechanisms in the tuberization process. **Potato Research**, v.18, p.262-272, 1975.
- HARBED, N.P.; KING, K.E.; CAROL, P.; COWLING, R.J.; PENG, J. Gibberellin: inhibitor of an inhibitor of...? **BioEssays**, v.20, p.1001-1008, 1998.
- HEDDEN, P.; KAMYIA, Y. Gibberellin Biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.431-460, 1997.
- HEDDEN, P.; PHILLIPS, A.L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. **Trends in Plant Science**, v.5, n.12, p.523-530, 2000.
- HILL, R.D. What are hemoglobins doing in plants? **Canadian Journal of Botany**, v.76, p.707–712. 1998.

HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A. A binary plant vector strategy based on separation *vir* and T-region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, v.303, p.179-180, 1983.

HOLDEN, M.J.; SZE, H. **Plant Physiology**, v.91, p.1296-1302, 1989.

HOLMBERG, N.; LILIUS, G.; BAILEY, J.E.; BÜLOW, L. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. **Nature Biotechnology**, v.15, p.244-247, 1997.

HUANG, J.; HACK, E.; THORNBURG, W.; MYERS, A.M. A yeast mitochondrial leader peptide functions *in vitro* as a dual targeting signal for both chloroplast and mitochondria. **The Plant Cell**, v.2, p.1249-1260, 1990.

HURT E.C.; SOLTANIFAR, N.; GOLDSMITH-CLERMONT, M.; ROCHAIX, J.D.; SCHATZ, G. The cleavable presequence of an imported chloroplast protein directs attached polypeptides into yeast mitochondria. **The EMBO Journal**, v.5, p.1343-1350, 1986.

INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current opinion in Biotechnology**, v.6, p.153-158, 1995.

JACKSON, S.D.; PRAT, S. Control of tuberisation in potato by gibberellins and phytochrome B. **Physiologia Plantarum**, v.98, p.407-412, 1996.

JEZEC, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.32743-32748, 1996.

- JEZEC, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.24272-24278, 1997.
- JI, L.; BECANA, M.; KLUKAS, R.V. Involvement of molecular oxygen in the enzyme-catalyzed NADH oxidation and ferric leghemoglobin reduction. **Plant Physiology**, v.100, p.33-39, 1992.
- JI, L.; BECANA, M.; SARATH, G.; KLUKAS, R.V. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding ferric leghemoglobin reductase from soybean nodules. **Plant Physiology**, v.104, p.453-459, 1994.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- KAVANAGH, T.A.; JEFFERSON, R.A.; BEVAN, M.W. Targeting a foreign protein to chloroplast using fusions to the transit peptide of a chlorophyll a/b binding. **Molecular and General Genetics**, v.215, p.38-45, 1988.
- KAWASHIMA, K.; et al. Two types of pea leghemoglobin genes showing different O₂-binding affinities and distinct patterns of spatial expression in nodules. **Plant Physiology**, v.125, p.641-651, 2001.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

- LIRA-RUAN, V.; SARATH, G.; KLUCAS, R.V.; ARREDONDO-PETER, R. Synthesis of hemoglobins in rice (*Oryza sativa* var. Jackson) plants growing in normal and stress conditions. **Plant Science**, v.161, p.279-287, 2001.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.267-275, 1951.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NIE, X.; HILL, R.D. Mitochondrial respiration and hemoglobin gene expression in barley aleurone tissue. **Plant Physiology**, v.114, p.835-840, 1997.
- PENG, J.; CAROL, P.; RICHARDS, D.E.; KING, K.E.; COWLING, R.J.; et al. The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. **Genes Development**, v.11, p.3194-3205, 1997.
- PFALLER, R.; PFANNER, N.; NEUPERT, W. Mitochondrial protein import. Bypass of proteinaceous surface receptors can occur with low specificity and efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.34-39, 1989.
- POOLE, R.K.; ROGERS, N.J.; D'MELLO, R.A.; HUGHES, M.N.; ORII, Y. *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp) reduces cytochrome c and Fe(III)-hydroxamate K by electron transfer from NADH via FAD: sensitivity of oxidoreductase activity to haem-bound dioxygen. **Microbiology**, v.143, p.1557-1565, 1997.

- REID, J.B.; ROSS, J.J. A mutant-based approach, using *Pisum sativum*, to understanding plant growth. **International Journal of Plant Science**, v.54, p.22-34, 1993.
- RICH, P.R.; BONNER, W.D. The site of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.188, p.207-213, 1978.
- RICHARDS, D.E.; KING, K.E.; AIT-ALI, T.; HARBERD, N.P. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.67-88, 2001.
- RIGAUD, J.; PUPPO, A. Effect of nitrite upon leghemoglobin and interaction with nitrogen fixation. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.497, p.702-706, 1977.
- SAARI, L.L.; KLUKAS, R.V. Ferric leghemoglobin reductase from soybean root nodules. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.231, p.102-113, 1984.
- SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of parafilm embedded plant material using toluidine blue 01. **Stain Technology**, v.48, p.247-249, 1973.
- SCARLET, J.L.; MURPHY, M.P. Release of apoptogenic protein from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition. **FEBS Letters**, v.418, p.282-286, 1997.

SCHIMITZ, U.K.; LONSDALE, D.M. A yeast mitochondrial presequence functions as a signal for targeting to plant mitochondria *in vivo*. **The Plant Cell**, v.1, p.783-791, 1989.

SILVA-FILHO, M. C. Translocation of a reporter protein into mitochondria is mediated by a chloroplast transit peptide and follows a normal import route. **Journal fo Plant Physiology**, v.154, p.51-54, 1999.

SILVA-FILHO, M. C.; WIEERS, M.C.; CHAUMONT, F.; FLUGGE, U.I.; BOUTRY, M. Differential *in vitro* and *in vivo* targeting properties of the transit peptide of a chloroplast envelope inner membrane protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.15264-15269, 1997.

SILVA-FILHO, M. DE C.; CHAUMONT, F.; LETERME, S.; BOUTRY, M. Mitochondria and chloroplast targeting sequences in tandem modify protein import specificity in plant organelles. **Plant Molecular Biology**, v.30, p.769-780, 1996.

SKULACHEV, V.P. Anions carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.31, p.431-445, 1999.

SKULACHEV, V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? **FEBS Letters**, v.397, p.7-10, 1996.

SOOLE, K.L.; MENZ, R.I. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.27, p.397-406, 1995.

- SOWA, A.W.; DUFF, S.M.G.; GUY, P.; HILL, R.D. Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.95, p.10317-10321, 1998.
- TAYLOR E.R.; NIE, X.Z.; MACGREGOR, A.W.; HILL, R.D. A cereal hemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under aerobic conditions. **Plant Molecular Biology**, v.24, p.853-863, 1994.
- THOMAS, S.G.; PHILLIPS, A.L.; HEDDEN, P. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.96, p.4698-4703, 1999.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.76, p.4350-4354, 1979.
- VALKONEN, J.P.T.; MORITZ, T.; WATANABE, K.N.; ROKKA, V-M. Dwarf (di)haploid *pito* mutants obtained from a tetraploid potato cultivar (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) via anther culture are defective in gibberellin biosynthesis. **Plant Science**, v.149, p.51-57, 1999.
- van den BERG, J.H.; SIMKO, I.; DAVIES, P.J.; EWING, E.E.; HALINSKA, A. Morphology and [¹⁴C] gibberellin A₁₂ metabolism in wild-type and dwarf *Solanum tuberosum* ssp. *Andigena* grown under long and short photoperiods. **The Plant Physiology**, v.146, p.467-473, 1995.

VANLERBERGHE, G.C.; McINTOSH, L. Alternative oxidase: From gene to function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.703-734, 1997.

VERCESI, A.E.; CHAIMOVICH, H.; CUCCOVIA, I.M. A plant uncoupling mitochondrial protein, PUMP. **Recent Research of Development Plant Physiology**, v.3, p.85–91, 1997.

VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**, v.375, p.24, 1995.

WAN, J.; BLAKELEY, S.D.; DENNIS, D.T.; KO, K. Transit peptides play a role in the preferential import of proteins into leucoplasts and chloroplasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.31227-31233, 1996.

YANISH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pCU19. **Gene**, v.33, p.103-109, 1985.

APÊNDICE

(artigo submetido à publicação)

Targeting of an oxygen-high-affinity protein to mitochondria does not interfere on mitochondrial function in transgenic tobacco plants

Running title: Targeting of an oxygen-high-affinity protein to mitochondria

Ana Lúcia B. Delneri¹, Alexandre Dias T. Costa² and Marcio C. Silva-Filho^{1*}

¹ Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 83, 13400-970 Piracicaba, SP, Brazil

² Laboratório de Bioenergética, (NMCE) Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal – 6111, 13084-970 Campinas, SP, Brazil

* mdcsilva@esalq.usp.br

To whom correspondence should be addressed

Abstract

Oxygen is an essential molecule for respiration and also participates in both primary and secondary metabolism of plant cells. Under limiting oxygen concentrations, plants change their metabolism to oxidize NADH to maintain energy status of the cell. Therefore, several attempts have been made to alter the aerobic metabolism of plants. In the present work, *Nicotiana tabacum* plants were transformed with a chimeric gene, consisting of a symbiotic soybean leghemoglobin cDNA (*lba*) fused to the mitochondrial targeting signal sequence of the F₁-ATPase β subunit gene from *Nicotiana plumbaginifolia*. The gene product was efficiently imported and correctly processed inside the organelle. Analysis of mitochondrial function revealed that electron transport through mitochondrial respiratory chain and β -NADH oxidation under anoxic conditions were unaffected by the presence of the leghemoglobin. Benzohydroxamic acid, inhibitor of the alternative pathway, had also no effect on β -NADH oxidation. Our results suggest that tobacco mitochondria expressing lb are probably not involved on β – NADH oxidation and in the maintenance of the energy status of cells under hypoxia.

Keywords: Leghemoglobin, mitochondrial function, respiratory chain, β -NADH oxidation

Abbreviations

ADP = adenosine 5'-di-phosphate

BHAM = Benzohydroxamic acid

BSA = bovine serum albumin

Cat = chloramphenicol acetyltransferase

FCCP = carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazine

Hbs = hemoglobins

HEPES = N (2-hydroxyethyl) piperazine N (2-ethanesulfuronic)

P_i = inorganic phosphate

ROS = reactive oxygen species

Introduction

Environmental stress is the major limiting factor in plant productivity. Much of the injury to plant caused by stress exposure is associated with oxidative damage at the cellular level [2]. The role of reactive oxygen species (ROS) in plant stress damage is indicated by the increased production of ROS and the increased oxidative damage in tissues during stress.

Mitochondria are the major source of superoxide anion production in cells. During transfer of electrons to molecular oxygen, 1 to 5% of the electrons in the respiratory chain lose their way because ubiquinones and cytochrome b family (in complex III) do not retain the partially reduced oxygen intermediates in their active sites, resulting in the formation of $O_2^{\cdot-}$ [9]. During oxidative stress, ROS production is increased, leading to an alteration of the mitochondrial inner membrane [23].

Under normal conditions, the supply of oxygen may limit metabolic activity and the potential productivity of crop plants, becoming a source of environmental stress. Recent developments in plant biotechnology have provided simple means to determine the effects of modified intracellular oxygen concentrations. One approach is to introduce genes encoding proteins that modify oxygen concentration and/or its transport inside the cell, such as plant hemoglobins (Hbs) [7]. Hbs are widely distributed in higher plants and falls into two broad groups; the nonsymbiotic Hbs and the symbiotic-type, called leghemoglobins (Lb) [4, 15]. Lb has a very high affinity to oxygen and is

specifically synthesized in the root nodules of nitrogen-fixing plants. Its function is associated to increase the diffusion of O_2 to the respiring bacterioids, protecting O_2 damage to nitrogenase [3].

Recently, transgenic tobacco plants expressing functional different hemoglobins have been produced [7, 12, 16]. Several effects of bacterial hemoglobin expression were observed, including enhanced growth and altered metabolite production, in transgenic plants [16], in contrast to the expression of the soybean leghemoglobin (Lb) in tobacco cytosol and chloroplasts [5], where no phenotypic effect was detected. Interestingly, the same leghemoglobin expressed in potato chloroplasts produced increased tuberization and reduced growth [10]. Working with cultured maize cells transformed with a barley hemoglobin gene, Sowa et al. [22] showed that those cells maintain the energy status when exposed to low oxygen tensions and antimycin A, probably by means different from oxidative phosphorylation.

In the present work, targeting of heterologous Lb to tobacco mitochondria was performed to determine whether Lb can be correctly imported and processed inside the organelle, and to examine its effects on mitochondrial function and physiology. We also performed experiments to test if a leghemoglobin could facilitate NADH oxidation being located nearby mitochondrial dehydrogenases.

Materials and methods

Gene construction

DNA manipulations were performed essentially as previously described [19]. The construct assembling the F₁-ATPase β -subunit presequence and LB were made as follows.

The SK(+) β -cat plasmid carries the sequence encoding for the first 60 amino acid residues of the mitochondrial F₁-ATPase- β [20]. Using polymerase chain reaction, specific restriction sites were added to the flanking regions of the presequence encoding region. Synthetic primers provided with *Hind*III and *Eco*RI sites were as follows. The β 1 upstream primer was 5'-CCCGAATTCGCTAGAGGCCGCTGCGGAGG and the β 2 downstream primer was 5'-GTAAAACGACGGCCAGT.

After polymerase chain reaction amplification, the fragment was digested with *Hind*III and *Eco*RI and inserted into the corresponding sites of SK(-) Bluescript (Stratagene), resulting in the SK(-) β plasmid.

The leghemoglobin-encoding sequence was isolated by *Bam*HI and *Eco*RI digestion of plasmid SK(+)*rbcS-Lb* [5]. This fragment was inserted into the corresponding sites of the SK(-) β plasmid, previously digested with the same enzymes, resulting in the SK(-) β -*Lb* plasmid. The authenticity of the construct was verified by sequencing.

To prepare the chimeric construct for tobacco transformation, Bin2-35S*catE9'* [20] was digested with *Hind*III and treated with Klenow DNA polymerase so that the end was filled in. Immediately after, the plasmid was digested with *Bam*HI, releasing the chloramphenicol acetyltransferase encoding sequence (*cat*). In parallel, the SK(-)- β -*Lb* plasmid was digested with *Cl*aI, filled in with Klenow DNA polymerase and further digested with *Bam*HI, to release the chimeric gene β -*Lb*. This fragment was inserted into the corresponding sites of the modified Bin2-35S*catE9'* vector, producing the plant transformation vector Bin2-35S β -*LbE9'*.

Plant transformation

Transformation experiment was performed with *Nicotiana tabacum* as previously described [6, 11]. Regenerated plants were selected for kanamycin resistance.

Plant material and growth conditions

Seeds of SRI Petite Havana *Nicotiana tabacum* lines were sown in a commercial substrate and sprayed with commercial fertilizer once a week. Plants were growth in a glasshouse under a photoperiod of 14/10 h day/night and a temperature of 20/35°C. For mitochondrial function analyses, about 30 g

from fully expanded leaves from control and three independent S₂ transformants were used.

Fractionation of tobacco cells

Mitochondrial fraction of control and transgenic plants were obtained as previously described [8] with minor modifications. Leaf material (30 g) was homogenized in a blender with 200 mL of 0,33 M sucrose, 50 mM Tris-CL pH 7.2, 0,2% (w/v) bovine serum albumin (BSA), 0,04% (w/v) 2-mercaptoethanol and 0.2% (w/v) insoluble polyvinylpyrrolidone (PVP). After filtration through two layers of Miracloth, the homogenate was centrifuged for 3 min. at 1.300 x g and the supernatant was further centrifuged for 15 min. at 14.900 x g. The pellet was carefully suspended in 2 mL of the suspension medium [0,4 M Mannitol, 10 mM KH₂PO₄, pH 7.2, 1% (w/v) BSA], layered onto a two-step Percoll gradient [6 mL 45% Percoll, 0,25 M sucrose, 2% (w/v) BSA and 9 mL 21% Percoll, 0,25 M sucrose, 2% (w/v) BSA] and centrifuged for 30 min. at 20.000 rpm in a Beckman SW28 rotor. The interface enriched in purified mitochondria was recovered. This fraction was then washed twice in the suspension buffer depleted of BSA.

The protein concentration was determined by modifications of the Biuret method [14], with bovine serum albumin used as standard.

Western blot analysis

After SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and immunodetected with antibodies raised against purified leghemoglobin (1/1000), followed by an anti-goat IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemicals Co).

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) and β -NADH oxidation

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) was assayed in a Hitachi Spectrofluorometer F4010 through the fluorescence of safranin O (5 μ M), using excitation and emission wavelengths of 495 and 586 nm, respectively [1]. β -NADH oxidation was measured using excitation and emission wavelengths of 360 and 450 nm, respectively, in the same fluorometer [13]. The reaction medium contained 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes (pH 7,2), 2,5 mM P_i , 0,33 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$ and 200 μ M propranolol. In the experiments of β -NADH oxidation, EGTA was omitted and 50 μ M Ca^{2+} was added to the medium. To create an anoxic atmosphere, the medium was added to the cuvette and then bubbled with pure N_2 for 10 minutes. A small cap was fixed to the top of the cuvette after deaeration of the medium, leaving no empty space.

Results and discussion

The F₁-ATPase β subunit presequence targets the soybean leghemoglobin into mitochondria

The F₁-ATPase β -subunit presequence (β) has been used successfully to introduce foreign proteins into mitochondria *in vivo* [5, 11]. In the present work, a gene construct was prepared to direct translocation of the soybean leghemoglobin (Lb) into tobacco mitochondria (*Figure 1*). The β -subunit presequence (β) was fused to the soybean leghemoglobin encoding gene [17]. The construct (β -Lb) retained the whole β targeting sequence and was followed by four amino acids residues of the mature protein to allow proper cleavage of the presequence that might have required the surrounding residues. The chimeric gene was placed under the control of the 35S transcriptional promoter of cauliflower mosaic virus and the 3'-untranslated region of the small subunit Rubisco from pea [21]. This gene was introduced into tobacco, using an *A.tumefaciens* T_i plasmid-derived vector.

In order to verify the subcellular localization of Lb, mitochondrial-enriched fractions from leaves were obtained by differential centrifugation and subjected to immunodetection. Western blot analysis of transgenic plants showed that leghemoglobin was targeted and correctly processed inside the mitochondria (*Figure 2*). As expected the size of mature Lb observed for β -Lb inside the

mitochondria was slightly larger than the control. This difference can be accounted by the presence of four amino acids residues from the linker region.

Leghemoglobin does not alter the electron flow through the respiratory chain

The presence of an exogenous protein able to retain oxygen atoms could trigger changes in mitochondrial homeostasis, affecting the flow of electrons through the respiratory chain complexes. To evaluate the integrity of the respiratory chain, mitochondria (0,4 mg/mL) were isolated from leaves of transgenic plants and incubated in the reaction medium (see Materials and Methods) in the presence of α -ketoglutarate (10 mM), a complex I substrate. A small decrease in safranine fluorescence was seen upon addition of tobacco leaves mitochondria, indicating that a transmembrane electric potential was built (Figure 3). Rotenone (2 μ M) was able to inhibit the electron flow, indicating the presence of rotenone-sensitive NADH-dehydrogenases in the mitochondrial preparation. Succinate (10 mM), a complex II substrate, was able to restore the rotenone-poisoned $\Delta\Psi$, and the respiratory chain could be blocked again upon the addition of antimycin A (1 μ M). Tobacco mitochondria were then able to respire on TMPD/ascorbate, a complex IV substrate, being finally inhibited by the protonophore FCCP (1 μ M). The $\Delta\Psi$ was also sensitive to potassium cyanide (2 mM) (Figure 3). Mitochondria isolated from wild type plants showed no significant difference to the ones isolated from transgenic plants, indicating that the presence

of leghemoglobin was not substantially affecting the electron flow through the respiratory chain complexes. As expected, both mitochondria were able to phosphorylate ADP, in an oligomycin-sensitive manner (data not shown).

Mitochondria from Lb-transformed plants are not able to oxidize exogenous β - NADH

The expression of a barley hemoglobin in the cytoplasm of maize cells resulted in the maintenance of the energy status of these cells even in the presence of a nitrogen atmosphere or the mitochondrial respiration inhibitor antimycin A [22]. The authors suggested that under limiting oxygen conditions, plants would turn their metabolism towards fermentation to oxidize the necessary NADH to maintain the glycolytic substrate phosphorylation. Additionally, the barley hemoglobin could associate with a flavoprotein, creating a complex capable of oxidizing NADH, in a manner analogous to Hmp protein of *Escherichia coli* [18]. Hence, the authors concluded that the expression of barley hemoglobin in maize cells under low oxygen tensions (or poisoning of mitochondria) could maintain their energy status by an alternate mechanism for mitochondrial oxidative phosphorylation [22].

In order to verify whether the expression of a leghemoglobin inside the mitochondria could facilitate the process of NADH oxidation, we performed experiments with isolated mitochondria from transgenic and untransformed plants.

The rate of oxidation of externally added β – NADH was followed fluorimetrically in the presence of antimycin A (1 μ M) under normal atmosphere conditions or under nitrogen. *Figure 4* shows the fluorescence decrease of the reduced form of β – NADH. We were not able to detect any difference between the rates of oxidation of the pyridine compound by transformed or wild-type mitochondria under normal atmosphere (panel A, lines a and b, respectively) nor under nitrogen atmosphere (panel B, lines a and b, respectively).

From these results, we conclude that soybean leghemoglobin was not capable to donate electrons to mitochondrial NADH dehydrogenases. These results agree with the data obtained with maize cells and barley hemoglobin [22], confirming that mitochondrial enzymes are not involved in the maintenance of energy cell status under low oxygen tensions. The alternative oxidase pathway was also not involved, as seen by the lack of effect of its specific inhibitor benzohydroxamic acid (data not shown). Again, these data are in line with the observations of Sowa et al. [22], because an altered alternative oxidase activity activating substrate phosphorylation through glycolysis would increase CO₂ levels, which was not observed.

Thus, we conclude that the expression of a soybean leghemoglobin inside mitochondria does not alter electron flow through the respiratory chain complexes nor ADP phosphorylation, reflecting the lack of phenotypic effects on plants. Our results confirm previous observation [22], by showing that even when the oxygen supplier protein was very near from the mitochondrial respiratory

complexes or from the NADH dehydrogenases, these enzymes were not able to utilize the oxygen retained by the leghemoglobin. These results support the hypothesis that maintenance of energy cell status under low oxygen concentrations (or mitochondrial poisoning), observed upon barley hemoglobin expression, occurs by another mechanism different from mitochondrial oxidative phosphorylation, probably by generating ATP through substrate level phosphorylation [22].

Legends of Figures

Figure 1. Schematic representation of the chimeric construct (β -Lb). The nucleotides and amino acids sequence of β presequence is shown below the scheme. Linker amino acids residues are in bold and the putative processing site is marked by an arrow. Drawing is not to scale.

Figure 2. Immunodetection of Lb in mitochondrial fraction. Western blot analysis was carried out on 10 μ g proteins of mitochondrial fraction from transgenic plants (lanes 3 to 5) and from WT plant (lane 2). A soybean Lb protein extract (0,1 μ g) was used as a control (lane 1).

Figure 3. Electron flow through respiratory chain of transgenic plants. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) was measured as described in Materials and Methods. Mitochondria (mito - 0,25 mg.mL⁻¹) were added to the medium in the presence of 10 mM α - ketoglutarate. Rotenone (rot - 2 mM), succinate (succ - 10 mM), antimycin A (ant A - 1 mM), TMPD/ascorbate (TMPD/asc - 0,1 mM/2 mM) and FCCP (1 mM) were added where indicated.

Figure 4. Exogenous β - NADH oxidation by Lb and wild type mitochondria. Mitochondria (0,25 mg.mL⁻¹) were incubated in the presence of antimycin A (1 mM), and β - NADH (72 mM). Panel A shows mitochondria from transgenic (trace a) and wild type (trace b) plants oxidizing β - NADH under normal atmosphere conditions. Panel B shows transgenic (trace c) and wild type (trace d) mitochondria oxidizing β - NADH under hypoxia.

References

- [1] Akerman K.E., Wikstrom M.K., Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential, *FEBS Lett.* 68 (1976) 191 – 197.
- [2] Allen R.D., Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants, *Plant Physiol.* 107 (1995) 1049 – 1054
- [3] Appleby C.A., Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35 (1984) 443 – 478.
- [4] Arredondo-Peter R., Hargrove M.S., Moran J.F., Sarath G., Klucas R.V., Plant hemoglobins, *Plant Physiol.* 118 (1998) 1121 – 1125.
- [5] Barata R.M., Chaparro A., Chabregas S.M., Gonzles R., Labate C.A., Azevedo R.A., Sarath G., Lea P.J., Silva-Filho M.C., Targeting of the soybean leghemoglobin to tobacco chloroplasts: effects on aerobic metabolism in transgenic plants, *Plant Sci* 155 (2000) 193 – 202.
- [6] Bevan M., Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 8711 – 8721.
- [7] Bulow L., Holmberg N., Lilius G., Bailey J.E., The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 21 – 24.
- [8] Boutry M., Nagy F., Poulsen C., Aoyagi K., Chua N.-H., Targeting of bacterial chloramphenicol acetyl-transferase to mitochondria in transgenic plants, *Nature* 328 (1987) 340 – 342.

- [9] Cardoso S.M., Pereira C., Oliveira C.R., Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress, *Free Rad. Biol. Med.* 26 (1998) 3 – 13.
- [10] Chaparro-Giraldo A., Barata R.M. Chabregas S.M., Azevedo R.A., Silva-Filho M.C., Soybean leghemoglobin targeted to potato chloroplasts influences growth and development of transgenic plants, *Plant Cell Reports* 19 (2000) 961 – 965.
- [11] Chaumont F., Silva-Filho M.C., Thomas D., Leterme S., Boutry M., Truncated presequences of mitochondrial F₁-ATPase β -subunit from *Nicotiana plumbaginifolia* transport CAT and GUS proteins into mitochondria of transgenic tobacco, *Plant Mol. Biol.* 24 (1994) 631 – 641.
- [12] Dieryck W., Pagnier J., Poyart C., Maarden M.C., Gruber V., Bournat P., Baudino S., Merot B., Human hemoglobin from transgenic tobacco, *Nature* 386 (1997) 29 – 30.
- [13] Fagian M.M., Pereira-da-Silva L., Martins I.S., Vercesi A.E., Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus prooxidants, *J Biol Chem.* 265 (1990) 19955-19960.
- [14] Gornall A.G., Bardawill C.J., Dawid M.M., determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751 – 766.

- [15] Hill R.D., What are hemoglobins doing in plants?, *Can. J. Bot.* 76 (1998) 707 – 712.
- [16] Holmberg N., Lilius G., Bailey J.E., Bulow L., Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolic production, *Nat. Biotech.* 15 (1997) 244 – 247.
- [17] Hyldig-Nielsen J.J., Jensen E.O., Paludan K., Wilborg O., Garret R., Joergensen P., Marcker K.A., The primary structure of two leghemoglobin genes from soybean, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 689 – 701.
- [18] Poole R.K., Rogers N.J., D'mello R.A., Hughes M.N., Orii Y., *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp) reduces cytochrome c and Fe(III)-hydroxamate K by electron transfer from NADH via FAD: sensitivity of oxidoreductase activity to haem-bound dioxygen, *Microbiology* 143 (1997) 1557-1565.
- [19] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989, pp. 1.25 – 1.31.
- [20] Silva-Filho M.C., Chaumont F., Leterme S., Boutry M., Mitochondrial and chloroplast targeting sequence in tandem modify protein import specificity in plant organelles, *Plant Mol. Biol.* 30 (1996) 769 – 780.
- [21] Silva-Filho M.C., Wieers M.C., Flugge U.-I., Chaumont F., Boutry M., Different in vitro and in vivo targeting properties of the transit peptide of a chloroplast envelope inner membrane protein, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15264 – 15269.

- [22] Sowa A.W., Duff S.M.G., Guy P.A., Hill R.D., Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 10317 – 10321.
- [23] Vercesi A.E., Chaimovich H., Cuccovia I.M., A plant uncoupling mitochondrial protein, PUMP, *Recent Res. Devel. Plant Physiol.* (1997) 85 – 91.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4