UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Aspectos moleculares de nitrato redutase da
macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA):
Seqüenciamento do gene e estudo da expressão do RNA mensageiro**

Vanessa dos Reis Falcão

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Cabral de Oliveira

SÃO PAULO

07/08/2006

(sete de agosto de 2006)

"Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo ..."

Albert Einstein

Aos meus pais *Brigitta e Roque*, por todos os ensinamentos, por todo suporte e compreensão, pelo esforço que sempre fizeram para que um dia eu chegasse até aqui. O amor incondicional de vocês foi e é essencial.

Ao meu irmão *Dudu*, que sempre me perturbou nos momentos mais importantes, sem você me estressando certamente tudo seria mais fácil e sem graça. Você dá alegria à vida, foi sempre minha inspiração, minha referência de inteligência e de saber viver.

Ao meu namorado *Sam*, por sua paciência e amor, por todos os momentos que já vivemos e os muitos que ainda viveremos.

Obrigada por sempre acreditarem em mim! Amo vocês do fundo do meu coração!

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador e "paizão", Dr. Pio Colepicolo, cuja confiança e carinho foram essenciais nestes anos para o meu amadurecimento científico;

A minha querida co-orientadora e amiga, Dr. Mariana Cabral de Oliveira, por todo apoio, pelas discussões de cada detalhe, pelos ensinamentos que certamente foram essenciais nesta tese.

A amiga Dr. Patrícia de Fátima Lopes, pelos ensinamentos e confiança durante minha iniciação científica.

Ao meu grande amigo Rodrigo Louro, pelas conversas e apoio fundamentais no desenvolvimento desta tese;

As minhas amigas do coração, Angelita, Drica, Ka e Tha, vocês foram muito mais que companheiras de laboratório, muito mais que amigas, com vocês aprendi muito, muito da vida e muito de ciência, eu tenho orgulho de ter vocês como minhas amigas pra sempre. Em especial a Ka que caminha comigo desde a faculdade, amigona pra todos os momentos e todas as horas, nossas discussões sempre foram muito produtivas, esta tese não estaria pronta sem a tua dedicada ajuda.

Ao técnico e amigo Ed, pela ajuda valiosa em todos os momentos;

Aos tantos companheiros de laboratório, Ana, Anderson, Douglas, Ernani, Fabyana, Filmon, Heloísa, Humberto, Lígia, Maísa, Marcelo, Meron, Paula, Sara, Sidney, Teresa, Tona e Vânia, pela convivência e amizade;

Aos amigos da Faculdade de Química, Caio, Camila, Du, Lizandra, Massari, Revi, Iélou, e David, pela amizade se sempre, e em especial ao Pé, por sempre estar disposto a me ajudar.

Ao Dr. Richard Sayre, do *Dept. of Plant Cellular and Molecular Biology*, Ohio State University, pela colaboração científica e incentivo ao meu aprimoramento profissional;

Ao amigo Moacir pela convivência emocionante em Columbus, Ohio, pelas conversas e colaboração. Aos amigos de Columbus, Sathish, Elisa e Rosário, pelo apoio, pelo enriquecimento científico e pela amizade.

À Fapesp, pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho;

E por fim e em especial, meu obrigado à Deus, por tudo.

ABREVIATURAS

BSA: albumina sérica bovina
cDNA: DNA complementar
CHAPS: 3-([3-Cholamidopropil]dimetilamonio)-1propano-sulfonato
CsCl: cloreto de cério
dCTP: desoxicitosina trifosfato
(d)dNTP: (di)desoxinucleotídeo trifosfato
DEPC: dietilpirocarbonato
DNA: ácido desoxirribonucléico
EDTA: ácido etilenodiaminatetracético
ESTs: “ Expressed Sequence Tags”
EtOH: etanol ou álcool etílico
FAD: flavina adenina dinucleotídeo
GHCl: hidrocloreto de guanidina
IPG: gradiente de pH imobilizado
KOAc: acetato de potássio
MoCo: cofator de Molibdênio
MOPS: ácido 3-[N-Morpholino] propanosulfônico
NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) reduzida
NiR: nitrito redutase
NR: nitrato redutase
ORF: “open reading frame” ou fase de leitura aberta
pb: pares de bases
PCR: reação em cadeia da polimerase
PEG: polietilenoglicol
pl: ponto isoelétrico
PM: peso molecular
Ppb(m): partes por bilhão (milhão)
PVP: polivinilpirrolidona
RNA: ácido ribonucléico
mRNA: RNA mensageiro
rpm: rotações por minuto
RT: transcrição reversa
RT-PCR: PCR em tempo real
SDS: dodecil sulfato de sódio
TBE: tampão TRIS, Borato, EDTA
Tm: temperatura de fusão ou dissociação
TRIS: tris(hidroximetil)aminometano
TRIZOL[®]: isotiocianato de guanidina e fenol

RESUMO

No ambiente marinho a maior fonte de nitrogênio encontra-se na forma de nitrato, que é reduzido para incorporação à biomoléculas como aminoácidos e bases nitrogenadas. A enzima nitrato redutase (NR), responsável pela conversão de nitrato a nitrito, é a primeira enzima a participar do processo de assimilação de nitrogênio.

Gracilaria tenuistipitata é uma macroalga marinha de grande importância econômica explorada comercialmente para a produção de ágar, um ficocolóide de ampla aplicação industrial e biotecnológica. Esta alga tem seu crescimento limitado principalmente pela assimilação de nitrogênio do meio.

Em trabalhos anteriores envolvendo a NR de *G. tenuistipitata*, foram demonstradas as oscilações diárias de sua atividade e expressão protéica. Esses ritmos permaneceram mesmo em situações de luz constante, sendo assim regulados endogenamente pelo relógio biológico. Neste trabalho procuramos seqüenciar o gene de NR nesta alga e responder se a regulação de NR também ocorria na transcrição, estudando o ritmo diário dos níveis de expressão do RNA mensageiro.

Na biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata* identificamos e seqüenciamos os clones de NR por “primer walking”. Utilizando os mesmos primers desenhados, seqüenciamos também o gene da NR, que não

apresenta introns. Esta é a primeira descrição na literatura de uma NR sem introns e também do gene NR de algas vermelhas.

Observamos a oscilação diária da expressão do RNA mensageiro de NR. Esses dados nos permitem concluir que a regulação de NR em *G. tenuistipitata* também ocorre durante a expressão deste gene.

Em condições normais de claro-escuro há uma expressão basal de NR que pode ser atribuída a existência de dois genes de NR, um constitutivo e outro regulado; ou ainda a um único gene que tem sua expressão basal induzida.

Palavras-chave:

Nitrato redutase

Gracilaria tenuistipitata

Macroalga vermelha

Sequenciamento e expressão gênica

Ritmo biológico

ABSTRACT

In the marine environment, the major source of nitrogen is nitrate, which must be reduced before incorporation into organic compounds, such as amino acids and nitrogen bases (purines and pyrimidines). The first enzyme that participates in the nitrogen assimilation process is nitrate reductase (NR), which is responsible for the conversion of nitrate to nitrite.

Gracilaria tenuistipitata is a marine macroalga with a great economic importance, harvested for the production of agar, which has many uses in products from industry and biotechnology. Nitrogen is the limiting macronutrient of this alga's growth.

The previous biochemical characterization for NR in this alga demonstrated a diel oscillation of activity and protein expression. These rhythms have been conserved in the situation of continuous light being regulated by the biological clock. For a better understanding of the regulation of NR, we sequenced the NR gene and studied the genetic regulation of NR mRNA expression.

In a cDNA library of *G. tenuistipitata*, we identified and sequenced the NR clones, using the primer walking methodology. Using the same primers we also sequenced the gene that did not show introns. This is the first description in the literature of a NR gene for red algae and also of intron absence in NR genes.

A rhythm for NR mRNA expression was observed in a period of 24h.
In conclusion NR expression is also regulated at the transcription level.

There is a basal expression of the NR gene that could be related to two hypotheses: two NR genes, one constitutive and another regulated, or only one NR gene, which is continuously translated having, however, its expression regulated and enhanced.

Key-words:

Nitrate reductase

Gracilaria tenuistipitata

Red macroalgae

Gene sequence and expression

Biological rhythm

SUMÁRIO

ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As algas no ambiente marinho	1
1.2. <i>Gracilaria tenuistipitata</i>	3
1.3. O ágar - biossíntese, usos e produção	4
1.4. O metabolismo do nitrogênio e a enzima nitrato redutase	7
1.5. Mecanismos de regulação da NR	11
1.6. O Relógio Biológico	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS & MÉTODOS	23
3.1. Cultura da alga in vitro	23
3.2. Identificação dos clones de NR	24
3.3. Estudo dos clones identificados como homólogos de NR	29
3.3.1. Crescimento das culturas	29
3.3.2. Miniprep de DNA plasmidial	29
3.3.3. Seqüenciamento	30
3.3.4. Determinação do tamanho dos insertos	31
3.4. Seqüenciamento do gene NR	33
3.4.1. Extração de DNA de <i>G. tenuistipitata</i>	33
3.4.2. Amplificação do gene e seqüenciamento	34
3.5. Análises filogenéticas	34
3.6. Extração do RNA total de <i>G. tenuistipitata</i>	36
3.6.1. Extração com TRIZOL®	36
3.6.1.1. Quantificação do RNA	38
3.6.1.2. Eletroforese em gel de agarose com formaldeído	38
3.6.2. Otimização da extração de RNA	39

3.7. Northern Blot	41
3.7.1. Transferência gel-membrana	41
3.7.2. Crosslink ou bloqueio da membrana	42
3.7.3. Pré-hibridização	42
3.7.4. Hibridização	42
3.7.4.1. Construção da sonda	42
3.7.4.2. Revelação da imagem	43
3.8. PCR em tempo real (PCR quantitativa)	44
3.9. PCR semi-quantitativa	47
4. RESULTADOS	50
4.1. Identificação dos clones de NR na biblioteca de cDNA de <i>G. tenuistipitata</i>	50
4.2. Seqüência da NR de <i>G. tenuistipitata</i>	52
4.2.1. Seqüenciamento do gene NR	55
4.3. Análises Filogenéticas	56
4.5. Estudo da variação do mRNA de NR	68
4.5.1. Desenho e Construção da sonda homóloga	68
4.5.2. Northern Blot	70
4.5.3. RT-PCR	73
4.5.4. PCR semi-quantitativa	77
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	86
7. BIBLIOGRAFIA	88
ANEXO	101
APÊNDICE	
CURRICULUM VITAE	

1. INTRODUÇÃO

1.1. As algas no ambiente marinho

As algas formam um diverso grupo de organismos fotossintetizantes, variando na forma, desde células microscópicas simples até algas multicelulares com vários metros de comprimento. Suas estruturas celulares e seus pigmentos para a fotossíntese apresentam grande variação. Tradicionalmente, o estudo das algas, chamado de ficologia, investiga organismos fotossintéticos que não são briófitas ou plantas vasculares.

As algas são responsáveis pela alta taxa de fotossíntese do bioma marinho. Elas continuam sendo importantes produtoras de O_2 e matéria orgânica no ambiente oceânico e de água doce. Devido ao alto índice de fotossíntese, as algas mantêm o equilíbrio ecológico no bioma, incluindo manutenção do pH, salinidade e consumo de CO_2 . Elas sintetizam uma vasta quantidade de pigmentos (incluindo carotenóides, xantofilas e clorofilas, fundamentais para a captação de fótons e estabilização de membranas), vitaminas e antioxidantes, vários ácidos graxos saturados e poliinsaturados (importantes para a maturação de diversas larvas de peixes), aminoácidos, bases nitrogenadas, além da grande diversidade de polissacarídeos, tais como carragenana, proteoglicanos e ágar (Cardozo *et al.*, 2006a). Ainda, as algas são os biossintetizadores de moléculas sofisticadas capazes de absorver altas intensidades de radiação ultravioleta,

permitindo assim a sobrevivência de outros organismos simbiotes em regiões tropicais. Estas moléculas são chamadas genericamente de “mycosporine-like amino acids” (MAAs) (Cardozo *et al.*, 2006b).

As algas são consideradas a base da cadeia alimentar em todos os sistemas aquáticos, servindo de fonte de alimentos para moluscos em todos os estágios de crescimento, para o zooplâncton e para diferentes estágios de alguns crustáceos e espécies de peixes. O valor nutricional de uma espécie de alga depende de diferentes características, tais como formato e tamanho, digestibilidade e toxicidade, mas, o que parece ser determinante para estabelecer a qualidade de alimento transferido para outro nível trófico da cadeia é a sua composição química e bioquímica (níveis de ácidos graxos, esteróides, carotenóides, aminoácidos, açúcares, minerais e vitaminas). A importância das algas marinhas vai além do seu valor nutricional, pois também são responsáveis pela produção de aproximadamente 50% do O₂ e a maior parte de dimetil sulfeto liberado para a atmosfera, o qual na atmosfera induz a formação de nuvens (Gibson *et al.*, 1990; Nagalakshmi & Prasad, 1998; Rocha, 1992; Stefels & Van Boekel, 1993). É sabido que a presença das algas induz um aumento na biodiversidade marinha, pois além da fonte de alimento e transferência nutricional de micronutrientes, elas servem de abrigo e esconderijo para diversos organismos pequenos.

Finalmente, as algas têm sido consideradas como as grandes biorremediadoras de poluição ambiental marinha sendo capazes de estocar quantidades consideráveis de metais pesados em vacúolos e metabolizar,

através de enzimas especializadas, diversas substâncias orgânicas poluidoras como organoclorados, fenol e outros subprodutos ainda mais complexos provenientes de atividades industriais. Por sua pronta resposta ao estresse ambiental, muitas algas também são utilizadas como bioindicadores de poluição (Cardozo *et al.*, 2006a).

1.2. *Gracilaria tenuistipitata*

O gênero *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) inclui cerca de 150 espécies descritas, sendo uma típica macroalga vermelha com ciclo de vida trifásico. Há uma alternância isomórfica entre as gerações haplóide e diplóide, e uma terceira fase diplóide parasita da planta haplóide feminina (Crichtley *et al.*, 1993). Espécies do gênero *Gracilaria* são tipicamente encontradas em regiões entre-marés de áreas tropicais e subtropicais, e vêm sendo estudadas mundialmente pelo alto valor de mercado agregado aos ficocolóides (Lee *et al.*, 1999), tendo grande importância econômica por ser a principal fonte de extração de agaranas no mundo (Armisen, 1995). Este ágar presente nas paredes celulares apresenta uma ampla aplicação industrial e biotecnológica (Ching & Lin, 1989).

A macroalga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang *et al.* (Figura 1) é uma linhagem originária do sul da China que tem habilidade de crescer em salinidades que podem variar de 7 a 47‰ com um ótimo de crescimento a 21‰.

Figura 1. *Gracilaria tenuistipitata*.

G. tenuistipitata exibe uma grande tolerância a variações de temperatura e é resistente ao ataque de epífitas (Haglund & Pédersen, 1993). Como as demais espécies do gênero, produz elevada quantidade de agarocolóides, podendo chegar a 52,7% do peso seco (Macchiavello *et al.*, 1999), sendo que a fração de agarose é bem alta, despertando grande interesse econômico devido às aplicações biotecnológicas da agarose (Macchiavello, 1994).

1.3. O ágar - biossíntese, usos e produção

O ágar é o nome genérico dado a galactanas de macroalgas que contêm os resíduos de α -(1-4)-3,6-anidro-L-galactose e de β -(1-3)-D-galactose (Figura 2) com uma pequena proporção de esterificação por sulfato de até 6% (por massa).

Figura 2. Estrutura básica do ágar.

Embora a via biossintética dos polissacarídeos de ágar seja razoavelmente estabelecida (Hemmingson *et al.*, 1996), poucos dados estão disponíveis sobre os processos envolvidos na transformação dos carboidratos precursores, como glicose e manose, via D- e L-galactose, nas unidades individuais dos polissacarídeos do ágar (Goncalves *et al.*, 2002). Acredita-se que cadeias de resíduos alternados de D- e L-galactopiranosil sejam sintetizadas como moléculas precursoras no complexo de Golgi. A sulfatação de resíduos de L-galactopiranosil também ocorreria no complexo de Golgi em um estágio inicial da biossíntese, enquanto a ciclização e metilação do anel ocorreriam depois. Haveria a migração do complexo de Golgi para a matriz da parede celular onde então poderiam ocorrer outras modificações no polissacarídeo de ágar à medida que o tecido envelhece (Hemmingson *et al.*, 1996).

A qualidade e composição do ágar dependem de suas características físico-químicas específicas, mas são também fortemente relacionadas aos parâmetros ambientais (Daugherty & Bird, 1988), como crescimento e ciclo reprodutivo. Por exemplo, o ágar extraído de duas espécies de *Gracilaria* mostrou composição diferente entre as estações do ano (Marinho-Soriano, 2001). *G. gracilis* e *G. bursa-pastoris* apresentaram maior proporção por

peso seco de ágar durante a Primavera (30%) e o Verão (36%), enquanto uma menor proporção foi observada durante o Outono (19%) e o Inverno (23%) (Marinho-Soriano & Bourret, 2003).

O ágar de baixa qualidade é utilizado como espessante, estabilizante ou gelificante em diversos produtos alimentícios, tais como cervejas, vinhos, gelatinas, geléias, queijos, maionese, etc. As aplicações industriais incluem a fabricação de papéis, tintas e adesivos. O ágar de média qualidade é utilizado como substrato em meio de cultura de microorganismos, com as vantagens de se gelificar em baixas concentrações, ser pouco reativo com outras moléculas e resistir à degradação pelos microorganismos mais comuns (Paula *et al.*, 1997). São também importantes no campo médico/farmacêutico como emulsificante em cremes e loções, como agente laxativo, em supositórios, como excipiente em cápsulas e tabletes, e também como anticoagulante. O tipo altamente purificado e superior do mercado (as frações neutras chamadas agarose) é utilizado para separação em biologia molecular (eletroforese e cromatografia em gel). Recentemente diversos trabalhos citam o uso do ágar na terapia contra o câncer uma vez que este pode induzir apoptose destas células *in vitro* (Chen *et al.*, 2004).

A produção anual de ágar é de aproximadamente 10 mil toneladas, das quais metade provém de organismos do gênero *Gracilaria*. Estimou-se em 1989 que cerca de 5.000 toneladas de ágar eram processados a partir de 25.000 a 30.000 toneladas de *Gracilaria* coletada diretamente do mar no Chile, Argentina, Brasil e África do Sul, e de tanques na China e Taiwan (Santelices & Doty, 1989).

O constante aumento na demanda de mercado aliado à inexistência de manejo nos bancos naturais em muitos locais tem levado à diminuição das populações de *Gracilaria* e por isso, tem-se implementado o cultivo em tanques e em mar aberto (Chiang & Lin, 1989; Oliveira & Alveal, 1990; Santelices & Doty, 1989). Estudos revelaram que o crescimento, quantidade e qualidade de ágar neste gênero, devem ser limitados pela quantidade de nitrogênio disponível, pela taxa de absorção de nutriente do meio, e também pela variação das condições ambientais (Chiang & Lin, 1989; Macchiavello, 1994). Portanto, existe grande interesse na melhor compreensão dos mecanismos de nutrição e crescimento em *Gracilaria* (Crichtley 1993).

1.4. O metabolismo do nitrogênio e a enzima nitrato redutase

A maior fonte de nitrogênio no ecossistema marinho está na forma de nitrato (Nason, 1962 e 1963). Num modelo geral para plantas, o primeiro passo na via de assimilação do nitrato é a redução de nitrato a nitrito, catalisado pela enzima nitrato redutase (NR) usando NAD(P)H como agente redutor. O nitrito é então reduzido à amônia pela enzima nitrito redutase (NiR) usando ferredoxina reduzida como doador de elétrons. Subseqüentemente, a amônia é incorporada nos aminoácidos através da ação da glutamina sintetase e glutamato sintase (Yang & Midmore, 2005) (Figura 3). A redução do nitrato ocorre no citosol enquanto o nitrito é reduzido no cloroplasto (Wang *et al.*, 2000).

Figura 3. Assimilação do nitrato, redução de nitrato a nitrito e de nitrito a amônia, sendo então incorporada a biomoléculas pela glutamato sintetase.

A via de assimilação do nitrato é um processo biológico essencial, por ser a principal rota pela qual nitrogênio inorgânico é incorporado em compostos orgânicos. Portanto a atuação da NR é de fundamental importância na incorporação do nitrogênio inorgânico em moléculas orgânicas complexas como aminoácidos e nucleotídeos, sendo a etapa limitante nesse processo (Beevers, 1969).

A NR foi inicialmente caracterizada por Evans e Nason (1953) em *Arabidopsis thaliana*. Entretanto, acreditava-se na existência da NR desde o início do século quando Kastle e Elvove (1904), examinando extratos brutos de tubérculo de batata perceberam que o nitrato adicionado era reduzido a nitrito. Os autores sugeriram que aldeídos eram provavelmente os doadores de elétrons, pois com sua adição havia estímulo da reação. Desde então, a enzima NR tem despertado interesse na pesquisa científica.

A NR já foi isolada de vários organismos como plantas, algas, fungos e bactérias. A enzima pode apresentar variação nas massas moleculares:

200 kDa - NR de espinafre (Hewitt, 1975) e do dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* (Ramalho *et al.*, 1995); 500 kDa - NR da alga verde *Ankistrodesmus braunii* (De la Rosa *et al.*, 1980); 420 kDa - NR da alga vermelha *G. tenuistipitata* (Lopes, 2001); 220 kDa- NR da alga vermelha *Porphyra yezoensis* (Nakamura & Ikawa, 1993); e variação no número de subunidades (Solomonson & Barber, 1990): 2 subunidades de 100 kDa - espinafre (Hewitt, 1975), alga verde *Chorella vulgaris* (Solomonson *et al.*, 1975) e alga vermelha *P. yezoensis* (Nakamura & Ikawa, 1993); 8-9 subunidades de 58 kDa – alga verde *A. braunii* (De la Rosa *et al.*, 1981); 4 subunidades de 52 kDa - dinoflagelado *L. polyedrum* (Ramalho *et al.*, 1995); 4 subunidades de 110 kDa - alga vermelha *G. tenuistipitata* (Lopes, 2001).

A localização da NR é controversa podendo aparecer no citoplasma como em soja (Vaughan *et al.*, 1984), na alga verde *Chlamydomonas* (Fisher & Klein, 1988), no fungo *Neurospora crassa* (Roldan *et al.*, 1982), e nas plantas *Arabidopsis* e *Nicotiana* (Dalling *et al.*, 1972; Wallsgrove *et al.*, 1979), ou pode estar associada à membrana plasmática como em bactérias ou no cloroplasto como em *L. polyedrum* (Fritz *et al.*, 1996), *A. braunii* (Lopes-Ruis *et al.*, 1985) e *G. tenuistipitata* (Lopes, 2001).

As NR são classificadas em: (i) as específicas para NADH que ocorrem em plantas e algas; (ii) as específicas para NADPH em fungos; e, (iii) as biespecíficas para NAD(P)H que ocorrem em algumas plantas, principalmente em monocotiledôneas (Miyazaki *et al.*, 1991). Até o momento, todas as NR purificadas de eucariontes são proteínas multiméricas solúveis

e com um único tipo de subunidade. A NR contém três grupos prostéticos: molibdênio, flavina e heme (Adams & Mortenson, 1985) (Figura 4).

A NR é ativa como homodímero que reduz nitrato em uma reação irreversível NAD(P)H dependente, requerendo a participação dos cofatores heme-Fe (citocromo b_5), flavina adenina nucleotídeo (FAD), e molibdênio-pterina (MoCo) (Campbell, 2001). O monômero de NR é dividido em três regiões distintas:

Figura 4. Domínios estruturais da NR.

Durante a catálise, os elétrons são transferidos do NADH (ou NADPH) para o FAD, e então desviados para redução do citocromo b_5 e do MoCo. O átomo de Mo reduzido no domínio MoCo subsequente transfere dois elétrons para o nitrato, reduzindo-o a nitrito. Os elétrons são então transferidos do doador fisiológico de elétrons NAD(P)H para o nitrato através, sucessivamente, dos grupamentos FAD, heme e MoCo. Este fluxo de elétrons pode ser desviado por receptores artificiais de elétrons como citocromo c ou doadores artificiais de elétrons como viologênio reduzido ou flavina (Meyer *et al.*, 1995).

Uma segunda e controversa função da NR é a produção de óxido nítrico (NO) a partir de nitrito. O NO produzido pode ser um fator de estresse ou um potencial sinalizador dependendo da concentração celular (Sakihama

et al., 2002; Yamamoto *et al.*, 2003). Entretanto são necessários mais estudos para o entendimento de seu papel fisiológico em algas e plantas.

1.5. Mecanismos de regulação da NR

O nitrito produzido pela atividade da NR é tóxico para a célula e para evitar seu acúmulo, a expressão e a atividade da NR são fortemente reguladas por diversos fatores. O controle da expressão de NR tem-se revelado muito complexo. Dentre os fatores que podem agir como sinal para várias maneiras de regulação ou que podem influenciar diretamente na atividade da NR temos luz, oxigênio, dióxido de carbono, nitrato, e outros metabólitos, assim como o relógio biológico.

A atividade de NR é estimulada por luz em algas (Grant & Turner, 1969) e em tecidos de plantas (Beevers *et al.*, 1965). A periodicidade diurna da assimilação de nitrogênio por fitoplâncton foi primeiramente descrita por Goering *et al.* em 1964. Oscilações da atividade de NR relacionada com a alternância de luz/escuro, com um máximo de atividade ao redor de meio-dia e com mínimo à meia-noite foram descritas posteriormente para fitoplâncton (Eppley *et al.*, 1970).

A assimilação de nitrato está relacionada com o metabolismo de carbono. Em resposta às mudanças diurnas na fotossíntese, a expressão de NR e sua atividade variam durante o ciclo dia-noite em plantas (Lillo *et al.*,

2001; Stitt *et al.*, 2002). Durante o ciclo circadiano, os níveis do mRNA de NR freqüentemente aumentam ao final da noite ou no início do dia, e então diminuem, voltando a aumentar no final da noite (Scheible *et al.*, 1997; Geiger *et al.*, 1998). A atividade de NR geralmente atinge o máximo durante a primeira etapa do dia e diminui durante o resto do dia e noite (Figura 5).

Figura 5. Modelo para oscilação circadiana da nitrito redutase (NR) no período diurno com 12h claro (barras brancas) e 12h escuro (barras escuras) (Yang & Midmore, 2005).

Oscilações circadianas na expressão e atividade da NR têm sido demonstradas em muitas espécies de plantas. Em condições de claro constante, e assim, privadas da exata hora externa, as oscilações circadianas na expressão e atividade de NR persistem com períodos aproximados de vinte e quatro horas (Deng *et al.*, 1991; Pilgrim *et al.*, 1993;

Jones *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2004), indicando que estes ritmos são endógenos. A via pela qual o comportamento circadiano é regulado permanece não elucidada. É assumido que a presença de um relógio biológico central regule os ritmos circadianos, ou que as variações são um resultado do controle por “feedback” (Lillo & Ruoff, 1984; Lillo *et al.*, 2001; Luttge, 2003).

Os ritmos de atividade de NR e de expressão do mRNA de NR foram mantidos somente na luz contínua mas não no escuro para muitas espécies de plantas, como cevada *Hordeum vulgare* (Lillo, 1984), *N. plumbaginifolia* (Deng *et al.*, 1990), milho *Zea mays* (Lillo & Ruoff, 1989), *Arabidopsis* (McClung & Kay, 1994), e *Khalanchoë fedtschenkoi* (Lillo *et al.*, 1996).

A NR pode ser fosforilada em um sítio específico, e este conduz a uma ligação com proteínas 14-3-3 e à inibição da atividade de NR (MacKintosh *et al.*, 1995; Huber *et al.*, 1996). As proteínas denominadas 14-3-3 existem como famílias de proteínas que contêm isoformas altamente conservadas, mas individualmente distintas, em muitas espécies. Elas são proteínas ácidas solúveis que foram primeiramente descritas no cérebro de mamíferos e têm massa molecular aproximada de 30 kDa (Wu *et al.*, 1997). Acredita-se atualmente que estas proteínas estejam distribuídas em todos os eucariotos tendo envolvimento em diversos processos celulares devido à mediação nas interações proteína-proteína (Piotrowski & Oecking, 1998). Além disso, a fosforilação influencia a taxa de degradação da proteína NR (Kaiser e Huber, 1997; Cotelle *et al.*, 2000). Mais estudos são necessários antes de predizer a influência da fosforilação nos ritmos circadianos da

expressão de NR. Entretanto, a fosforilação é uma maneira universal de controlar o metabolismo celular, e pode também ser a solução da natureza para ajustar o tamanho do período das oscilações biológicas (Lillo *et al.*, 2001). Em plantas superiores, NR é rapidamente inativada/ativada por fosforilação/desfosforilação em resposta a estímulos ambientais ou diversos tratamentos. A atividade da NR pode ser regulada pelo mecanismo pós-traducional em apenas 5 a 20 minutos, dependendo da espécie (Riens & Heldt, 1992; Provan & Lillo, 1999; Lillo *et al.*, 2003). Açúcares, acidificação do citosol, e anaerobiose são fatores que ativam a NR em folhas e raízes (Provan & Lillo, 1999; Kaiser & Huber, 2001). Em folhas, a regulação da NR é fortemente acoplada à fotossíntese, e a sua inativação pós-traducional acontece quando a intensidade de luz é repentinamente diminuída ou as folhas são privadas de CO₂ (Kaiser & Brendle-Behnisch, 1991; Provan & Lillo, 1999). A relação próxima entre a regulação da NR e a fotossíntese pode ser importante para evitar o acúmulo de nitrito. A redução de nitrito a amônia utiliza ferredoxina reduzida, um produto da fotossíntese. Uma abrupta parada ou diminuição da fotossíntese poderia gerar o acúmulo de nitrito se a atividade da NR não fosse regulada (Lillo *et al.*, 2003; Lea *et al.*, 2004). É menos óbvio quais eventos fisiológicos poderiam levar a mudanças na atividade de NR nas raízes (Lillo *et al.*, 2004).

A disponibilidade de amônia como uma fonte alternativa de nitrogênio inibe o processo de assimilação de nitrato em bactérias (Pollock & Wainright, 1948), em fungos (Nicholas *et al.*, 1954), em plantas (Ferguson & Bollard, 1969), e também em algas (Syrett & Morris, 1963). Nestes casos a amônia é

preferencialmente assimilada quando ambos, nitrato e amônia, estão disponíveis.

A enzima NR pode ser inativada, e os níveis de expressão do mRNA de NR permanecerem altos e sem oscilações, indicando que a atividade catalítica da NR é necessária para repressão da transcrição do gene (Pouteau *et al.*, 1989). Durante a assimilação do nitrato, o nitrato é reduzido pela NR a nitrito e pela NiR a amônia, a qual é assimilada a glutamina (Gln), pela glutamina sintetase. Gln é uma candidata a estar envolvida no “feedback” negativo da expressão de NR, uma vez que foi observado que Gln oscila em *N. plumbaginifolia* em fase reversa ao mRNA de NR (Deng *et al.*, 1991). O aumento na concentração de Gln está relacionado ao decréscimo na transcrição do gene de NR, e vice-versa, também estabelecido para mutantes de tabaco (Scheible *et al.*, 1997). Entretanto, o mecanismo exato da inibição por Gln não foi ainda estabelecido e não necessariamente a própria Gln seja o efetor, mas algum produto derivado, ou dependente de Gln.

A atividade da NR é principalmente regulada pela viabilidade de nitrato e luz (Corzo & Niell, 1992; Ferretti *et al.*, 1995), podendo variar em resposta às condições de luz apresentando flutuações circadianas com maior atividade durante a fase de luz (Davison & Stewart, 1984; Ramalho *et al.*, 1995, Lopes *et al.*, 1997). O ritmo circadiano da atividade de NR já foi reportado nas algas vermelhas *Gracilaria tenuistipitata* (Lopes *et al.*, 1997), *Gracilariopsis tenuifrons* (Rossa, 1999), *Kappaphycus alvarezii* (Granbom *et al.*, 2004) e *Gracilaria chilensis* (Chow *et al.*, 2004).

Oscilações circadianas do mRNA de NR já foram demonstradas em *Zea mays* (Lillo & Ruoff, 1989), *Nicotiana plumbaginifolia* (Deng *et al.*, 1990), *Arabidopsis thaliana* (McClung & Kay, 1994) e *Lycopersicon esculentum* (Galangau *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1998).

Os genes de NR mostram similaridade substancial entre as seqüências, particularmente nos domínios funcionais, e uma larga variação do conteúdo GC na terceira posição dos códons, e também no número de introns. A posição dos introns é diferente entre fungos e plantas, mas conservada dentro destes grupos (Zhou & Kleinhofs, 1996). Nas algas verdes, *Chlorella vulgaris*, por exemplo, pode conter 18 introns (Dawson *et al.*, 1996), *Chlamydomonas reinhardtii* 15 e *Volvox carteri* 9. Os introns de NR podem ser utilizados para estudos filogenéticos entre espécies de um mesmo gênero. (Howarth & Baum, 2002).

O controle da NR em plantas parece ser muito complexo, pois muitos fatores como luz, disponibilidade de nitrato e amônia, bem como o relógio biológico, têm mostrado influenciar o nível de atividade da enzima. Lopes e colaboradores (1997 e 2002) mostraram oscilações dos níveis protéicos de NR e de sua atividade em *G. tenuistipitata*, como mostra a Figura 6.

Figura 6. Variação na concentração da proteína NR (A), e na atividade enzimática da NR (B) durante o ciclo circadiano (Lopes *et al.*, 1997 e 2002).

Quando comparado com plantas e microalgas, poucos estudos sobre a NR têm sido conduzidos em macroalgas, principalmente em algas vermelhas. Os trabalhos até hoje publicados em periódicos tratam em sua maioria da avaliação da atividade de NR, em poucos há a caracterização da enzima e nenhum estuda o gene NR e sua expressão.

1.6. O Relógio Biológico

Todos os organismos procariontes e eucariontes, incluindo os seres humanos, possuem um relógio biológico interno; sua função fundamental é controlar o período do dia no qual diferentes processos acontecem (Johnson & Hastings, 1986).

O relógio biológico é um mecanismo endógeno. Todos os organismos, desde os microorganismos até os seres humanos, quando isolados sem indicação da passagem de tempo, continuam suas atividades de dormir/acordar, exercício/repouso e outros ciclos inalterados (Zhong *et al.*, 1990). Os ritmos diários devem ser referidos como circadianos significando aproximadamente (*circa*) um dia (*dies*) (Pittendrigh, 1960; Aschoff, 1981; Hastings *et al.*, 1991).

Mesmo não se compreendendo o(s) mecanismo(s) molecular(es) dos osciladores, muitos modelos para o seu funcionamento têm sido propostos. Estes envolvem diferentes componentes, estruturas e funções celulares, tais como transcrição gênica, membranas e seus componentes, transporte iônico, fosforilação de proteínas, níveis de nucleotídeos cíclicos, mRNA e outros. Alguns autores sugerem uma ligação entre ciclos circadianos e ciclos de divisão celular (Edmunds, 1984).

Na microalga *Lingulodinium polyedrum*, por exemplo, foi observado um ritmo de bioluminescência, divisão celular, motilidade, fotossíntese, assimilação de nitrogênio e metabolismo oxidativo (Hastings *et al.*, 1991;

Homma & Hastings, 1989; Hollnagel *et al.*, 1996; Ramalho *et al.*, 1995; Roenneberg & Hastings 1991).

Para a maioria dos organismos, o sincronizador externo mais importante dos ritmos circadianos é o ciclo claro/escuro, mas outros fatores ambientais, como temperatura, ciclos de disponibilidade de alimento e fatores sociais também podem exercer funções regulatórias.

No ambiente natural, ritmos diários são condicionados a períodos de 24 horas por uma repetitiva alternância de luz e escuro. Estes ciclos de luz alimentam um oscilador endógeno circadiano, o qual diretamente sincronizará temporalmente vários processos bioquímicos e fisiológicos. Tal condicionamento temporal ocorre quando a luz de alguma maneira troca a fase do oscilador central, causando então uma mudança de fase do ritmo. A intensidade e direção da troca dependem exclusivamente da fase na qual a luz é aplicada sobre o organismo. Os organismos, em geral, têm a capacidade de alterarem suas fases. Isto ocorre quando pulsos de luz são aplicados em determinados momentos, nos quais os fotorreceptores celulares estejam preparados para captar os fótons de luz e transmitir ao oscilador.

Em diversos organismos estudados, com apenas um simples e curto pulso de luz no início do período de escuro (da ordem de segundos), ocorre atraso de fase em relação ao ciclo normal; um pulso de luz a partir do meio da noite resulta em um adiantamento de fase em relação ao ciclo normal. Este atraso de fase, no início da noite seria explicado como uma preparação do organismo para o período de escuro, enquanto que o adiantamento seria

a preparação do organismo para o período diurno. Esta mudança de fase nos ritmos circadianos difere para cada organismo estudado e está, provavelmente, relacionada aos diversos tipos de fotorreceptores.

A idéia de um relógio principal em cada organismo é atrativa, mas provavelmente uma simplificação do sistema. Embora existam semelhanças nos vários osciladores, a análise comparativa dos dados experimentais disponíveis sugere origens independentes dos osciladores intracelulares (Dunlap, 1999). A pressão seletiva causada pelo deslocamento diário de luz/escuro está constantemente agindo, e pode ter selecionado componentes reguladores para criar ritmos circadianos, não uma, mas muitas vezes dentro de um mesmo organismo. Há uma preferência na comunidade científica em usar um modelo de expressão que implica em um relógio central como um fato biológico. Entretanto, como indicado em especial por muitos biólogos, um relógio central não é um fato da vida, mas uma idéia. Uma ação neutra deveria analisar ritmos circadianos como fenômenos auto-sustentáveis em alternativa a idéia de controle pelo relógio central (Lillo *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este projeto procurou seqüenciar o gene NR de *G. tenuistipitata*, estabelecer uma metodologia eficiente na extração do RNA de algas ricas em polissacarídeos, e entender os aspectos moleculares que controlam a expressão da NR nesta alga.

O conhecimento da regulação da expressão de enzimas assimiladoras de nitrogênio em *G. tenuistipitata* é de fundamental importância na compreensão de possíveis mecanismos de controle exercidos na expressão gênica. Ainda, por ser uma alga de alto interesse econômico, o entendimento molecular do sistema de assimilação de nitrogênio pode contribuir significativamente para os cultivos em tanques e mesmo em fazendas litorâneas.

2.2. Objetivos específicos

- Identificação e seqüenciamento dos clones de NR na biblioteca diurna de DNA complementar (cDNA) de *G. tenuistipitata*;
- Seqüenciamento do gene de NR de *G. tenuistipitata*;
- Construção de uma sonda homóloga ao mRNA de NR, a partir desses clones;
- Isolamento e purificação de RNA total de *G. tenuistipitata* em condições padrão de cultura durante o ciclo claro/escuro e claro constante;
- Utilização da sonda para estudar a variação dos níveis de mRNA de NR no intuito de identificar a existência de um ciclo circadiano;

3. MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. Cultura da alga *in vitro*

A alga *G. tenuistipitata* proveniente de Haikou (China) foi coletada e isolada de contaminantes em 1993 pelo Dr. Eurico Cabral de Oliveira (IBUSP) e desde então é mantida em cultura no laboratório. A manutenção da cultura da alga foi feita em meio Von Stosch (Edwards, 1970) (Tabela 1) em água do mar estéril com salinidade de 21‰.

Tabela 1. Concentração de sais e vitaminas por litro de água do mar no meio Von Stosch.

Reagente	mg.L ⁻¹ H ₂ O _{mar}
NaEDTA.2H ₂ O	3,72
NaNO ₃	42,5
Na ₂ HPO ₄	10,75
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,278
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0198
Tiamina	0,25
Biotina	0,001
Cianocobalamina	0,001

Os frascos de cultura foram mantidos em incubadoras com fotoperíodo de 12 h claro (luz branca fluorescente, $90 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por 12 h escuro, temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e, sob aeração constante (Figura 7). As algas foram mantidas na proporção de 1g de alga em 200 mL de meio e as trocas foram realizadas semanalmente.

Figura 7. Imagem da incubadora com o cultivo de *G. tenuistipitata*.

3.2. Identificação dos clones de NR

A biblioteca diurna de cDNA de *G. tenuistipitata* foi construída pelos Drs. Pi Nyvall e Jonas Collen utilizando o *ZAP Express cDNA Synthesis Kit* e *ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit* da Stratagene, no laboratório do Professor Pio Colepicolo e seqüenciada no laboratório da

Professora Mariana Cabral de Oliveira no seqüenciador automático “377 DNA Sequencer” da ABI PRISMTM. Ao conjunto de seqüências de cDNA obtidas no momento da extração do RNA dá-se o nome EST (“Expressed Sequence Tags”). O projeto EST de *Gracilaria tenuistipitata* visou obter de maneira rápida uma quantidade relativamente grande de informações sobre o repertório genético desta alga.

A biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata* foi realizada com a alga na fase tetrasporofítica coletada na terceira hora de luz e cultivada segundo item 3.1. A biblioteca possui 3631 ESTs seqüenciadas no lado 5', que após um processo de “clusterização” formaram 2387 seqüências únicas. Das seqüências obtidas, 65% foram identificadas no GenBank através do BLASTX, das quais 10,7% são proteínas hipotéticas conservadas e os outros 35% são seqüências novas não identificadas.

O cultivo da bactéria foi realizado em placa de 96 poços com 1mL de meio de cultura CIRCLEGROW® (meio de cultura para *Escherichia coli*, projetado especificamente para aumentar a replicação do plasmídeo na cultura da bactéria), contendo Kanamicina ($0,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Em fluxo laminar foram inoculadas as bactérias no meio de cultura utilizando palitos de dentes autoclovados, as amostras foram incubadas no agitador com 300 rpm a 37°C por 22 h.

Para extração do DNA plasmidial (ou miniprep) as culturas foram centrifugadas a 4000 rpm, a 5°C por 6 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 240 μL de GTE (glicose 50 mmol.L^{-1} , Tris-HCL 25 mmol.L^{-1} pH 8,0 e EDTA 10 mmol.L^{-1}) por poço e a placa foi selada. A

placa foi colocada sob agitação durante 2 min e então centrifugada por 6 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado novamente 80 μL de GTE a cada poço da placa para ressuspender as células sob agitação por 2 min. Em uma nova placa de fundo U foi adicionado a cada poço 3 μL de RNase (10 mg.mL^{-1}), 60 μL da suspensão de bactérias e 60 μL de NaOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ /SDS 1%, a placa foi selada e invertida 10 vezes para misturar. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 10 min e então centrifugada até atingir 1000 rpm. Foi adicionado 60 μL de KOAc 3 mol.L^{-1} gelado em cada poço, misturado por inversão 10 vezes e incubado a temperatura ambiente por 10 min. Centrifugou-se até atingir 1000 rpm e removeu-se o selo para incubação a 90°C por 30 min. Da estufa a placa foi transferida direto para o gelo e deixada esfriar por 10 min, então centrifugada por 10 min a 4000 rpm e 20°C . Fixou-se uma placa de filtro sobre uma placa de fundo V, e transferiu-se todo o volume para a placa de filtro que foi centrifugada por 4 min a 4000 rpm e 20°C . A placa de filtro foi removida e descartada e adicionou-se ao filtrado 110 μL de isopropanol absoluto gelado, a placa foi selada e misturada por inversão 10-20 vezes. A seguir centrifugou-se por 45 min a 4000 rpm e 20°C e descartou-se o sobrenadante por inversão da placa; adicionou-se 200 μL de EtOH 70% gelado, centrifugou-se por 5 min a 4000 rpm e 20°C e descartou-se o sobrenadante. A placa foi deixada na estufa 37°C por 1 h e o precipitado ressuspensionado em 80 μL água ultra filtrada, a placa foi coberta com adesivo e deixada à temperatura ambiente “overnight”, sendo congelada em seguida.

Um gel de agarose 0,8% foi feito para verificar o sucesso da extração. Derreteu-se no micro-ondas a agarose em tampão TBE 1X pH 8,0 (Tris $0,45 \text{ mol.L}^{-1}$, Borato $0,45 \text{ mol.L}^{-1}$ e EDTA 10 mmol.L^{-1}). Foi adicionado $5 \mu\text{L}$ de brometo de etídeo (10 mg.mL^{-1}) para cada 100 mL de agarose dissolvida em TBE. A solução foi despejada numa cuba de eletroforese e aguardou-se a polimerização. Então as amostras foram adicionadas nos poços do gel contendo o tampão de carregamento 6X (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%, EDTA 50 mmol.L^{-1}) e também foi corrido marcador de peso molecular. O gel foi corrido a voltagem constante até a linha base do tampão percorrer 2/3 do gel e a seguir a imagem do gel foi captada por exposição a luz ultra violeta.

O DNA plasmidial extraído foi então amplificado numa PCR contendo $5 \mu\text{L}$ de DNA plasmidial (20 ng), $6 \mu\text{L}$ de água, $1 \mu\text{L}$ de primer (T3 ou T7 – Tabela 2) $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$, $6 \mu\text{L}$ de “save money” (tampão Tris com MgCl_2) e $2 \mu\text{L}$ de “big dye” (Taq polimerase, dNTPs e ddNTPs marcados com fluorescência; Applied Biosystems). A placa de 96 poços foi colocada no termociclador com o programa:

Para purificação da PCR, a cada poço da placa foi adicionado 26 μL da solução de NaOAc 120 mmol.L^{-1} , pH 5,2 em EtOH absoluto, a placa foi selada e colocada sob agitação por 20 min, então foi centrifugada por 40 min a 4000 rpm e 20°C e o sobrenadante foi removido. A seguir adicionou-se 200 μL de EtOH 70% a temperatura ambiente, centrifugou-se por 20 min a 4000 rpm e 20°C e retirou-se o sobrenadante invertendo a placa no papel absorvente. A placa foi então deixada para secar por 20 min a 37°C e congelada a -20°C. O precipitado foi ressuspendido em formamida e desnaturado e então aplicado no gel para seqüenciamento, que foi realizado no seqüenciador modelo ABI prism 377 DNA Sequencer da Applied Biosystems. A placa, o pente e os espaçadores do seqüenciador foram lavados com alconox e água ultra filtrada fervida por 35 min. O gel de poliacrilamida 4% com uréia 6 mol.L^{-1} em TBE 1X, foi aplicado imediatamente entra as placas inclinadas, usando uma seringa. Após polimerizado, as placas foram limpas com água ultra filtrada e o pente inserido no gel. Na cuba superior do seqüenciador foi colocado 650 mL de TBE 1X e na cuba inferior 700 mL de TBE 1X.

As seqüências de cDNA obtidas foram submetidas ao BLASTX (Altschul *et al.*, 1997), no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information), programa que gera as seis possíveis seqüências protéicas e compara as seqüências de proteínas obtidas com o banco de dados do GenBank e traz como resposta o grau de homologia da sua seqüência com as depositadas no banco (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.3. Estudo dos clones identificados como homólogos de NR

O re-seqüenciamento foi realizado no seqüenciador capilar automático da Applied Biosystem, modelo ABI PRISM 310 Genetic Analyser, o alinhamento das seqüências parciais obtidas foram feitas nos programas consed e ESSE. Foi utilizada a técnica de “primer walking”, que consiste em construir novos primers ao final de cada nova seqüência consenso, até obter a seqüência completa e de boa qualidade nos dois sentidos. Para isso os clones anotados como NR na biblioteca de ESTs de *G. tenuistipitata* passaram pelas seguintes etapas:

3.3.1. Crescimento das culturas

O meio foi preparado em tubos de ensaio com 2 mL de LB líquido (meio de cultivo para bactérias Luria-Bertani com bacto-triptona, extrato de levedura, NaCl e ágar) e 2 µL Kanamicina 50 µg/mL, e dentro do fluxo contaminou-se um palito de dente autoclavado na cultura de bactérias em estoque de glicerol e inseriu-se o palito no tubo que foi deixado crescer “overnight” (~16 h) no agitador a 37°C.

3.3.2. Miniprep de DNA plasmidial

Foi utilizado 1,5 mL da cultura em um tubo que foi centrifugado a 14000 rpm e 4°C por 10 min, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 150 µL da solução P1 (EDTA 5 mmol.L⁻¹ pH 8,0, Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0 e RNase 100 µL/mL) e agitou-se. A seguir adicionou-se 150 µL de P2 (NaOH 0,2 mol.L⁻¹ e SDS 1%) e misturou-se por inversão. Adicionaram-se

mais 150 μL de P3 (KOAc 3 mol.L^{-1} e ácido acético glacial 11,6%) e misturou-se por inversão. Centrifugou-se a 14000 rpm e 4°C por 15 min e transferiu-se o sobrenadante a um tubo novo; então se adicionaram 300 μL de isopropanol e misturou-se por inversão, centrifugou-se a 14000 rpm e 18°C por 15 min e descartou-se o sobrenadante. O tubo foi colocado no aparelho speed vac para secar e o precipitado foi ressuspendido em 20 μL de água ultra filtrada. Foram adicionados 12 μL de PEG-NaCl (PEG 8000 20%, NaCl 2,5 mol.L^{-1}) e deixado incubar em gelo por 1 h, a seguir foi centrifugado a 14000 rpm e 4°C por 15 min e o sobrenadante foi retirado com pipeta. Adicionou-se ao precipitado 250 μL EtOH 70% e centrifugou-se a 14000 rpm e 4°C por 10 min, descartou-se o sobrenadante por inversão e secou-se o precipitado sob vácuo. O precipitado foi então ressuspendido em 20 μL de água ultra filtrada e congelado. O sucesso da extração foi verificado em gel de agarose 0,7%.

3.3.3. Seqüenciamento

A PCR para seqüenciamento foi realizada conforme descrito no item 3.2. utilizando os primers desenhados para o clone 29 (Tabela 2) Para purificação foi adicionado ao tubo 80 μL de isopropanol 75%, colocado sob agitação por 20 min a temperatura ambiente e centrifugado a 13000 rpm por 25 min. O sobrenadante foi descartado, a seguir foram adicionados 250 μL de EtOH 70% para lavagem do precipitado, centrifugou-se a 13000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco sob vácuo.

Para desnaturação da seqüência adicionou-se ao tubo 20 µL de TSR (Template Supression Reagent), agitou-se, colocou-se para desnaturar a 96°C por 3 min e transferiram-se as amostras diretamente ao gelo. As amostras foram seqüenciadas no seqüenciador capilar automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser. A qualidade dos cromatogramas obtidos foi analisada pelo programa Chromas e as seqüências foram alinhadas no programa ESEE.

3.3.4. Determinação do tamanho dos insertos

Para analisar o tamanho dos insertos utilizamos as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, pois na construção da biblioteca os adaptadores possuíam seqüência palindrômica para essas enzimas.

A digestão do plasmídeo com estas enzimas foi processada em tubo contendo 6,4 µL de água ultra filtrada, 1 µL de tampão da enzima, 2 µL DNA plasmidial e 0,5 µL de *EcoRI* e 0,5 µL de *XhoI*. Os tubos permaneceram a 37°C por 3 a 4 h e então o tamanho dos insertos foi observado em gel de agarose 0,7%.

Tabela 2. Primers usados no seqüenciamento da NR e estudo da sua expressão gênica (F: forward , R: reverse , * pb no clone 29).

NOME	SEQÜÊNCIA 5'-3'	SENTIDO	LOCALIZAÇÃO*
T3	AAT.TAA.CCC.TCA.CTA.AAG.GG	F →	
T7	GTA.ATA.CGA.CTC.ACT.ATA.GGG.C	R ←	
NR01	GCG.GCT.TGG.TCA.ACA	F →	469-483
NR02	GCC.ACT.ACT.ATA.CTC.CCA.TCC	R ←	2572-2592
NR03	TCC.GAA.GTC.ATC.CGC.TC	F →	1875-1891
NR04	GGG.TCA.AGA.ACT.CCA.GC	R ←	1464-1481
NR05	AGG.TTT.GGT.CGG.CGG	R ←	1519-1533
NR06	TAT.CCT.TTG.GTT.GCG	R ←	1367-1381
NR07	GCC.AAT.GGA.AAT.AGA.ATG.C	R ←	453-471
NR08	CAG.TCA.CCA.GAA.CGG.AAT.C	R ←	906-924
NR08 (2)	GCT.CGG.CGT.CCA.CAT	R ←	979-993
NR09	AAG.CCG.TCG.GAG.AAT.TAC.T	F →	927-945
NR10	TCA.AGC.CAC.TTC.TTC.GG	R ←	1975-1991
NR11	AGA.AAG.GGC.GTT.TCA.TTG	F →	2318-2335
NR START	GGT.GAT.GAT.TTC.CGC.CAG	F →	8-25
NR STOP	GTG.AAA.ACC.ATG.ACG.AAA.CG	R ←	2770-2789
NR12	AGT.GGT.TGA.AGG.TAA.GGT.G	F →	1662-1680
NR13	CAG.CGT.GAA.GGT.CCC.AAG	R ←	2167-2184
18S5'	CAA.CCT.GGT.TGA.TCC.TGC.CAG.T	F →	
18S3'	GAT.CCT.TCT.GCA.GGT.TCA.CCT.ACG	R ←	
536R	GAA.TTA.CCG.CGG.CTG.CTG	R ←	

3.4. Seqüenciamento do gene NR

3.4.1. Extração de DNA de *G. tenuistipitata*

Foram macerados 50mg da alga em N₂ líquido, o extrato foi transferido para um tubo. Então foi adicionado 800µL de tampão de lise (Tris base 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0, EDTA 0,05 mol.L⁻¹, NaCl 0,2 mol.L⁻¹ e KOAc 2,5 mol.L⁻¹), 100 µL de Tween20 10%, 8 µL de proteinase K 20 mg.mL⁻¹ e 1 µL de RNase 10 mg.mL⁻¹. O tubo foi incubado por 1 h a temperatura ambiente e depois adicionado 350 µL fenol e 350 µL clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Misturou-se por inversão durante 3 min e centrifugou-se a 14000 rpm e -5°C por 2 min. A fase superior (aquosa) foi passada para outro tubo e foi adicionado 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Misturou-se por inversão durante 3 min e centrifugou-se a 14000 rpm e -5°C por 3 min. Retirou-se a fase superior (aquosa) e transferiu-se para um novo tubo onde se adicionou 0,6 volumes de álcool propílico e misturou-se por inversão. Então o tubo foi centrifugado a 14000 rpm e -5°C por 15 min e o sobrenadante descartado por inversão. Lavou-se com 500 µL de EtOH 70% e centrifugou-se a 14000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado seco sob vácuo por 10 min. Adicionou-se 200 µL água ultra filtrada para ressuspender.

3.4.2. Amplificação do gene e seqüenciamento

Amostras preparadas em 50 μL com concentrações finais de tampão 1X, MgCl_2 750 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, dNTP's 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ cada, taq Polimerase 1 U. μL^{-1} , 10 ng do DNA extraído e 200 nmol.L⁻¹ de cada primer foram submetidas ao seguinte programa no termociclador:

A PCR foi purificada usando colunas MicroSpin da Amersham Biosciences e analisada em gel de agarose 0,7%. O seqüenciamento foi realizado igual ao item 3.3.3, com uma única diferença, ao invés de se colocar o DNA plasmidial na PCR para seqüenciamento, colocou-se o resultado obtido da PCR.

3.5. Análises filogenéticas

A seqüência de aminoácidos gerada a partir da tradução *in silico* do gene que codifica para a NR de *Gracilaria tenuistipitata* foi alinhada e comparada com seqüências de outros organismos, incluindo uma alga

vermelha (*Porphyra*; sequência cedida por Y. Nakamura), algas verdes, plantas terrestres, diatomáceas, um ascomiceto e um oomiceto disponíveis no GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalW dentro do BioEdit (Hall, 1999).

A partir de um alinhamento inicial incluído a sequência completa das proteínas, regiões variáveis que poderiam ser alinhadas com ambigüidade e inserções/deleções (indels) foram removidas, gerando uma matriz de 18 seqüências com 631 posições. A partir dessa matriz de seqüências homólogas de aminoácidos foram geradas árvores através de diferentes métodos de reconstrução filogenética.

Todas as análises filogenéticas foram feitas no programa PAUP 4.0b8 (Swofford, 2000). As árvores foram inferidas a partir de dois métodos distintos: distância e máxima parcimônia. Para o método de distância, foi construída uma árvore de “neighbour-joining” (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com o modelo de substituição de Tamura & Nei (1993). A árvore de máxima parcimônia (MP) foi inferida por busca heurística e pelo algoritmo “stepwise addition”, com adição de seqüências ao acaso (10 replicatas) e rearranjadas pelo algoritmo “branch-swapping: tree bisection-reconnection” (TBR). Análises de “bootstrap” (Felsenstein, 1985) foram feitas com 2000 replicatas para os métodos descritos acima.

Para todas as análises, os valores de “bootstrap” foram considerados baixos até 70%, moderados de 71% a 90% e altos acima de 90%.

3.6. Extração do RNA total de *G. tenuistipitata*

Inicialmente optou-se pela extração do RNA total utilizando TRIZOL[®] por ser uma metodologia simples e rápida que permite processar simultaneamente um grande número amostras. O TRIZOL[®] é um reagente para isolamento do RNA total das células e tecidos, consistindo numa solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, é uma otimização do método de uma etapa para isolamento do RNA desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). Durante a homogeneização ou a lise da amostra, o TRIZOL[®] mantém a integridade do RNA ao romper as células e dissolver componentes das células. A adição do clorofórmio seguida pela centrifugação, separa a solução em uma fase aquosa e em uma fase orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa devido o caráter polar que lhe é conferido principalmente pelos grupamentos fosfato. O RNA é recuperado pela precipitação com álcool isopropílico.

3.6.1. Extração com TRIZOL[®]

Para homogeneizar a amostra, foi macerado 1g de alga em N₂ líquido para destruir os tecidos e lisar as células, então se adicionou 1,0 mL de TRIZOL[®] e agitou-se por 30 seg, incubou-se a amostra por 5 min de 15°C a 30°C para permitir a dissociação completa de complexos nucleoprotéicos, a seguir centrifugou-se a 13000 rpm por 10 min a 4°C, o precipitado era constituído de membranas extracelulares, polissacarídeos e DNA com alto peso molecular enquanto permaneceu em solução proteínas, DNA de baixo peso molecular e o RNA total. O sobrenadante foi então transferido para um

novo tubo. Adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIZOL[®], agitou-se os tubos por 15 seg e incubou-se a 15°C a 30°C por 2 a 3 min. Centrifugou-se as amostras a 13000 rpm por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em um rosado na fase inferior de fenol-clorofórmio, com uma interface, e uma fase aquosa superior incolor. O RNA permaneceu exclusivamente na fase aquosa. O volume da fase aquosa foi aproximadamente 60% do volume de TRIZOL[®] usado na homogeneização.

Para precipitação do RNA transferiu-se a fase aquosa para um tubo novo e adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropílico por mL de TRIZOL[®]. As amostras foram incubadas de 15°C a 30°C por 10 min e centrifugadas a 13000 rpm por 10 min a 4°C. O precipitado de RNA foi freqüentemente invisível antes da centrifugação, formou-se uma pelota gelatinosa no fundo do tubo. Removido o sobrenadante do tubo, o RNA precipitado foi lavado uma vez com 1,0 mL de EtOH 75% por mL de TRIZOL[®]. Agitou-se a amostra e centrifugou-se a 10000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado. O precipitado de RNA foi seco sob vácuo por 5 a 10 min sem centrifugação. É importante não deixar o RNA completamente seco porque diminui extremamente sua solubilidade. Ressuspendeu-se o precipitado em 50 µL de água tratada com DEPC, um inibidor de RNase, e incubou-se por 10 min a 55°C - 60°C para completa solubilização.

Para análise da amostra resultante foram aplicados dois procedimentos:

3.6.1.1. Quantificação do RNA

A amostra foi lida no espectrofotômetro Hitachi U-2000 ou no Genequant da Amersham Pharmacia Biotech com cubeta de quartzo em quatro comprimentos de onda do ultra-violeta, correspondente a absorbância dos seguintes compostos: 320 nm – ‘background’ (proteínas e ácidos nucleicos não absorvem neste comprimento de onda), 280nm – Aminoácidos aromáticos de proteínas, 260 nm – ácidos nucleicos (DNA e RNA) e 230 nm – impurezas como isotiocianato de guanidina e tampões. O valor de uma (1,0) absorbância resultante em 260 nm corresponde a $40 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de RNA. As relações 260/230 e 260/280 mostram as contaminações por carboidratos e proteínas, respectivamente. Essas relações devem mostrar o maior valor possível para que as contaminações sejam baixas. O valor comumente adotado para um bom resultado está entre 1,8 e 2,0. Antes do cálculo de concentração da amostra e das relações de contaminação, é descontado o valor obtido em 320nm para todos os comprimentos de onda, esta técnica dá uma estimativa da qualidade da amostra obtida.

3.6.1.2. Eletroforese em gel de agarose com formaldeído

Em um gel contendo 1% de agarose, 4% formaldeído em tampão de corrida MOPS 1X (solução de MOPS $20 \text{ mmol}.\text{L}^{-1}$, NaOAc $5 \text{ mmol}.\text{L}^{-1}$ e EDTA $1 \text{ mmol}.\text{L}^{-1}$ pH 7,2), foram aplicados $10 \mu\text{g}$ de RNA precipitado em $20 \mu\text{L}$ de tampão de amostra (MOPS 1X; formaldeído 6,5%; formamida 50%; $0,2 \mu\text{L}$ de brometo de etídeo $10 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$).

3.6.2. Otimização da extração de RNA

Para retirar o polissacarídeo da amostra, foi utilizado um método aplicado à *G. tenuistipitata* para extração de DNA (Bellorin *et al.*, 2002). Este método consistiu em ressuspender a amostra num volume maior (0,5 mL), adicionar 50 μL de EtOH 100%, incubar a amostra por 5 min a 4°C e centrifugar a 5000 rpm por 20 min a 4°C para precipitação dos polissacarídeos. Coletou-se o sobrenadante em um novo tubo e precipitou-se novamente o RNA com 55 μL de NaOAc 3 mol.L^{-1} pH 5,2 e 1210 μL de EtOH 100%, incubou-se por 30 min a -20°C e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 min a 4°C. Então se lavou o RNA duas vezes com 500 μL de EtOH 70% centrifugando a 12000 rpm por 5 min a 4°C e descartando o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 100 μL de água tratada com DEPC. No entanto esta metodologia também não foi muito eficiente e a amostra final continuava com consistência gelatinosa.

Então foram utilizadas metodologias diferentes aplicadas a plantas suculentas, ricas em polissacarídeos (Gehrig *et al.*, 2000), as variações estavam em adicionar ou não um primeiro passo de extração com hidrocloreto de guanidina – GHCl (GHCl 8 mol.L^{-1} , Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} , EDTA 20 mmol.L^{-1} e β -mercaptoetanol 50 mmol.L^{-1}) e aplicar 7 formas diferentes de extração de polissacarídeos. Essas formas de precipitar polissacarídeos foram:

1. EtOH na concentração de 30%
2. EtOH 20% e KOAc 0,5 mol.L^{-1}
3. KOAc 0,2 mol.L^{-1}

4. PEG 6000 2%
5. PEG 20000 2%
6. PEG 35000 2%
7. PVP 360000 2%

Assim a etapa de homogeneização mudava para, após macerar 1 g de alga em N₂ líquido, adicionar 1 mL de GHCl, e então era feito o tratamento para precipitação do ágar onde era adicionado um dos 7 reagentes. A amostra foi incubada por 10 min de 15°C a 30°C, centrifugada a 13000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante coletado em um novo tubo onde era então adicionado 500 µL de TRIZOL[®]. A amostra foi agitada por 30 seg e incubada por 5 min de 15°C a 30°C, adicionou-se 100 µL de clorofórmio que era então misturado por inversão e então tudo transcorria como a metodologia descrita no item 3.6.1 na etapa de separação de fases. Também foi feito o tratamento de precipitação dos polissacarídeos para o método de TRIZOL[®] padrão descrito no item 3.6.1 com adição dos 7 reagentes concomitantemente ao TRIZOL[®], sem o tampão de GHCl, e a diferença é que antes da primeira centrifugação a amostra ficava incubada 10 min de 15°C a 30°C.

As amostras foram analisadas pelas metodologias de estimativa da quantificação do RNA e da presença de contaminantes no espectrofotômetro (item 3.6.1.1), em gel de agarose 1% com formaldeído (item 3.6.1.2) e por Northern Blot com a sonda constitutiva construída para subunidade

ribossomal 18S. Os dados foram analisados estatisticamente por t-student com $p > 0,5$.

3.7. Northern Blot

Técnica utilizada para quantificar a expressão do RNA utilizando neste caso uma sonda de DNA radioativa com P^{32} .

Depois de extraído o RNA, foi feita a eletroforese em gel de agarose com formaldeído (item 3.6.1.2), o RNA foi então transferido para uma membrana para a hibridização. O procedimento tomado foi realizado a partir do manual da membrana de nylon carregada positivamente (N+) da Amersham Biosciences própria para transferência de ácidos nucleicos que são carregados negativamente pelo grupamento fosfato (PO_4^-).

3.7.1. Transferência gel-membrana

Dentro de uma cuba, colocou-se um suporte para transferência e sobre o suporte 2 folhas de papel 3MM molhadas com SSC 20X ($NaCl\ 3\ mol.L^{-1}$ e citrato de sódio $0,3\ mol.L^{-1}$) como ponte, as bolhas foram removidas com auxílio de uma pipeta, colocou-se acima o gel invertido, então a membrana N+, a seguir 3 folhas de papel 3MM molhados em SSC 20X e 3 folhas de papel 3MM secas, colocou-se papel absorvente com numa espessura total de 5 cm e um peso de 0,5 kg. O sistema foi deixado transferindo durante uma noite.

3.7.2. Crosslink ou bloqueio da membrana

Após desmontar o sistema no dia seguinte, a membrana foi lavada em SSC2X. O sucesso da transferência foi conferido no transiluminador. O RNA foi então fixado na membrana, colocando-se a mesma a 80°C por 2 h.

3.7.3. Pré-hibridização

A pré-hibridização foi realizada no forno hibridizador 'Tecne Hybridiser modelo HB-1D', um forno rotatório com temperatura controlada, utilizando a garrafa 'Techne modelo FHB11', com 25 mL de tampão de hibridização SSC5X; dodecil sulfato de sódio – SDS 0,5%; Solução de Denhardt's 5X (0,01% Ficoll 400; 0,01% PVP; 0,01% soro albumina bovina – BSA) e 500 µL de DNA de esperma de salmão desnaturado (DNA fragmentado para diminuir hibridização inespecífica).

3.7.4. Hibridização

Após 2 a 4 h em pré-hibridização foi então adicionada a sonda com concentração de 10^6 contagem por minutos por mL de tampão.

3.7.4.1. Construção da sonda

As sondas foram feitas utilizando o kit 'Ready-To-Go DNA Labeling Beads (-dCTP; Amersham Biosciences), com microtubos contendo o tampão liofilizado com dATP, dGTP, dTTP, "Klenow Fragment" e oligonucleotídeos. Adicionou-se ao kit de 25 ng a 50 ng do DNA molde desnaturado em 45 µL de água e 50 µCi de dCTP radioativo (alfa- P^{32}). O tempo de reação foi de 30 min e depois se purificou a sonda em uma coluna de Sephadex G-50.

A seqüência molde para construção da sonda foi feita através de PCR com o ciclo descrito na pág. 39. A sonda 18S foi construída a partir de primers degenerados desenhados em regiões de grande homologia para 18S de algas vermelhas (Tabela 2). A sonda de NR foi construída a partir dos primers desenhados durante o seqüenciamento.

3.7.4.2. Revelação da imagem

Depois de aproximadamente 16 h hibridizando, a membrana foi lavada por duas vezes com 25 mL de SSC2X e SDS 0,1% por 10 min a 37°C, e uma lavagem com 25 mL de uma solução SSC1X e SDS 0,1% por 15 min a 65°C. Após as lavagens a membrana foi exposta ao filme por 100 h a -70°C, ou ao cassete de 'phosphor screen'. A exposição do filme foi feita à baixa temperatura para diminuir a energia e direcionar a radiação. O cassete de 'phosphor screen' capta imagem de fósforo radioativo, a exposição foi de apenas 24 h e a leitura foi feita no aparelho de autoradiografia STORM da Amersham Biosciences. O resultado no filme foi visualizado através de revelação com revelador e fixador Polymax da Kodak. A intensidade das bandas resultantes foi analisada no software Imagequant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

A hibridização foi feita primeiramente com a sonda de NR e depois de lavar a membrana numa solução SDS 5% a 100°C para remover a sonda de NR, as membranas foram hibridizadas com a sonda de 18S. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA com $p > 0,5$.

3.8. PCR em tempo real (PCR quantitativa)

A técnica de RT-PCR tem como vantagens analisar um maior número de amostras sem a necessidade de se trabalhar com radioativo, que além do potencial mutagênico e cancerígeno, tem um custo elevado. RT-PCR é uma combinação da PCR convencional com uma detecção fluorescente do produto formado que permite acompanhar a reação e quantificar o produto por intensidade de fluorescência sem a necessidade de correr um gel para verificar o sucesso da reação após o término. Optamos pelo reagente SYBR green para determinar a relação de expressão entre os diferentes horários, um fluoróforo que hibridiza com as duplas fitas sintetizadas, assim quanto maior o número de cópias, maior a intensidade de fluorescência. O SYBR green é excitado em 494 nm e emite em 521 nm. A placa é então excitada por uma fonte de luz que é filtrada no comprimento de onda específico para excitação do fluoróforo que então emite luz que é filtrada e um detector capta a intensidade dessa emissão e fornece os dados ao programa do computador.

A interface do software que analisa os dados no computador nos mostra uma curva de amplificação exponencial onde a fluorescência de fundo deve ser desconsiderada. Esta fluorescência de fundo pode variar de análise para análise, sendo assim estabelece-se manualmente uma linha de base que delimita a emissão basal e une as réplicas num único ponto. Neste ponto onde as amostras cruzam a linha base, temos o C_t , que nos indica o

número de ciclos necessários para ter duplas fitas suficientes ligadas ao fluoróforo emitindo um sinal superior à emissão de fundo (Figura 8).

Figura 8. Curva de Amplificação padrão resultante da RT-PCR. C_t indica o número de ciclos no cruzamento da linha base.

Na curva resposta deve-se ficar atento para o número de ciclos do C_t , quanto maior o C_t , menor a sensibilidade da reação, onde devemos então aumentar a concentração de primers ou de molde para obter um C_t menor. A inclinação da porção linear também indica sensibilidade, quanto menor o ângulo de inclinação deste trecho menor a sensibilidade da reação e vice-versa, quanto maior mais sensível. A intensidade de fluorescência que o patamar da reação atinge, onde a reação está saturada, o sinal de fluorescência é constante e temos a intensidade máxima de fluorescência que indica o rendimento da reação. Para otimizar a reação devemos ter C_t maior que 15, número de ciclos onde ainda há muito ruído, o primer nunca

pode ser limitante da reação, assim deve-se testar várias concentrações de primer para ter o C_t próximo a 20 ciclos. Após o final da reação pede-se a curva de dissociação do produto que mostra a temperatura de “melting” ou dissociação (T_m), onde 50% do produto está desnaturado. O mesmo T_m para as réplicas e mesmo primer indica o mesmo produto formado. Uma única curva de T_m indica produto gerado sem contaminações.

A reprodutibilidade do experimento foi determinada por uma pipetagem precisa com desvio de C_t inferior a 0,2. A expressão do gene de interesse foi realizada em comparação a expressão de um gene constitutivo. Como para este experimento não poderíamos mais trabalhar com a expressão constitutiva do 18S, porque este provém do RNA ribossômico e nesta reação temos apenas o cDNA (DNA complementar) produto do mRNA, tivemos que escolher um novo gene constitutivo, buscando então na biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata*, optamos pela Actina.

Então o método consistiu em adicionar a 5 μg do RNA total extraído oligo dT ou primer reverse na concentração final de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ considerando os 20 μL de reação de RT-PCR. A mistura primer e molde com 5 μL foi aquecida a 70°C por 5 min e colocada em gelo, e então foi adicionado 15 μL do meio reacional contendo (tampão reacional Improm-II™ 1X, MgCl_2 3 mmol.L^{-1} , dNTPs 0,5 mmol.L^{-1} cada, inibidor de RNase 1U. μL^{-1} , e 1 μL da enzima transcriptase reversa Improm-II™ – concentrações finais para os 20 μL finais da reação). A reação foi realizada a 25°C por 5 min para anelamento dos primers, 42°C por 1 h para síntese do cDNA e 70°C por 15 min para término da reação, inativando a transcrição reversa.

Para RT-PCR usamos 10 ng do cDNA sintetizado em 5 μL , adicionamos 5 μL da mistura de cada par de primer (“forward” e “reverse”) de NR e Actina para uma concentração final de 400 nmol.L^{-1} , 600 nmol.L^{-1} , 800 nmol.L^{-1} ou 1000 nmol.L^{-1} , e adicionamos 10 μL do mix do reagente SYBR green (Applied Biosystems). Na reação as amostras foram colocadas a 50°C por 2 min e a 95°C por 10 min para ativar a AmpliTaq Gold DNA polimerase, a seguir 40 ciclos de 95°C por 30 seg e 60°C por 1 min.

Os 10 ng de molde são calculados considerando que cada fita de mRNA foi transcrita e se tornou um híbrido a um cDNA. Como partimos de 5 μg de RNA total, onde aproximadamente 2% é mRNA, temos 100 ng de mRNA e assim conseqüentemente de cDNA nos 20 μL de reação de RT-PCR, precisamos então diluir a amostra 2,5x para ter os 10 ng em 5 μL . As reações foram realizadas na máquina de RT-PCR da Applied Biosystems modelo 5700.

3.9. PCR semi-quantitativa

Este método consiste na quantificação da expressão relacional entre o mRNA de interesse e um controle interno, através de reações de RT e PCR onde as intensidades das bandas visualizadas em gel de agarose são quantificadas e comparadas. A reação deve estar na fase exponencial, porém a velocidade de reação pode ser diferente para cada par de primers, dependente principalmente do tamanho do produto. Para minimizar

este fator escolhemos produtos de tamanho semelhante, com aproximadamente 500 pb.

Nesta metodologia usamos a unidade ribossomal 18S como controle interno. Como 18S é fortemente expresso e constitutivo, usamos uma quantidade de primer limitante da reação, porém como todas as amostras partem da mesma concentração de RNA total isolado a proporção de produto de 18S gerada será limitada em todas as amostras mantendo os valores constantes para qualquer amostra.

Dentre os primers já desenhados para NR, foi escolhido o par NR9 e NR4 com um produto de aproximadamente 500 pb, e para o 18S foram utilizados os primers 18S5' e 536R também com um produto de 500 pb. A RT foi feita como descrita no item 3.8 e a cada 20 μL de reação de RT foram adicionados 80 μL do mix contendo (nas concentrações finais para os 100 μL : tampão 1x, MgCl_2 2 mmol.L^{-1} , dNTPs 0,2 mmol.L^{-1} , 5 U de taq polimerase e primers NR 500 nmol.L^{-1} e 18S 10 nmol.L^{-1} .

O ciclo da PCR foi:

Um controle de contaminação por DNA foi feito usando o RNA total isolado diretamente na reação de PCR. Para estabelecimento da fase exponencial uma amostra coletada nas últimas horas de escuro foi utilizada. Foram escolhidos para parada da reação preferencialmente os ciclos 20, 25 e 30 e o cálculo da relação de expressão foi feito através da diferença das intensidades entre 2 ciclos da NR sobre a diferença entre dois ciclos para 18S em suas fases exponenciais. Nem sempre os mesmo ciclos para NR eram usados uma vez que a concentração inicial do molde gerado pela RT era proporcional ao mRNA e variava de amostra para amostra, obtendo assim fase exponencial em diferentes ciclos. Pelo menos 3 pontos da fase exponencial foram utilizados para garantir a fidelidade dos dados, onde duas diferenças diferentes eram calculadas e as relações entre as diferenças calculadas resultavam na mesma razão entre NR/18S. Já para 18S usamos sempre os mesmos ciclos uma vez que este é um gene constitutivo. As amostras foram corridas em gel de agarose 1,5% e a densidade das bandas foram analisadas no programa Imagequant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação dos clones de NR na biblioteca de cDNA de *G.tenuistipitata*

Inicialmente foram identificados 3 clones de NR nas 32 placas da biblioteca: Gt01005E07, Gt01028E11 e Gt01029B08 (Figura 9).

		28E11	Score (bits)	E Value
Sequences producing significant alignments:				
gi 7432652 pir S72541	nitrate reductase (NADH) (EC 1.6.6.1...	187	2e-46	
gi 128187 sp P11605 NIA1_TOBAC	NITRATE REDUCTASE 1 (NR1) >g...	186	3e-46	
gi 66204 pir RDNTNT	nitrate reductase (NADH) (EC 1.6.6.1) ...	186	3e-46	
gi 730139 sp P39865 NIA1_PHAVU	NITRATE REDUCTASE 1 (NR-1) >...	183	2e-45	
gi 548359 sp P36859 NIA_PETHY	NITRATE REDUCTASE (NR) >gi 48...	182	3e-45	
		05E07	Score (bits)	E Value
Sequences producing significant alignments:				
gi 4336205 gb AAD17694.1 	(AF077372) cytochrome b5 reductas...	138	1e-32	
gi 6070342 dbj BAA85586.1 	(AB020034) NADH-cytochrome b5 re...	137	7e-32	
gi 6322146 ref NP_012221.1 	(NC_001141) cytochrome b reduct...	136	9e-32	
gi 17563928 ref NP_504638.1 	(NM_072237) NADH-cytochrome B5...	136	3e-31	
gi 17221690 gb AAL36459.1 AF205603.1	(AF205603) cytochrome ...	133	7e-31	
gi 15238025 ref NP_197279.1 	(NM_121783) NADH-cytochrome b5...	133	3e-30	
gi 19075352 ref NP_587852.1 	(NC_003421) putative nadh-cyto...	131	8e-30	
gi 730146 sp P39869 NIA_LOTJA	NITRATE REDUCTASE (NR) >gi 63...	130	2e-29	
gi 7432652 pir S72541	nitrate reductase (NADH) (EC 1.6.6.1...	130	2e-29	
gi 14735899 ref XP_046746.1 	(XM_046746) cytochrome b5 redu...	129	4e-29	
gi 7706455 ref NP_057327.1 	(NM_016243) cytochrome b5 reduc...	129	4e-29	
gi 548361 sp P36841 NIA_VOLCA	NITRATE REDUCTASE (NR) >gi 32...	129	5e-29	
gi 14041825 dbj BAB55002.1 	(AB061670) nitrate reductase [P...	129	5e-29	
		29B08	Score (bits)	E Value
Sequences producing significant alignments:				
gi 6573214 gb AAF17595.1 AF203033.1	(AF203033) nitrate redu...	159	2e-38	
gi 18913155 gb AAL79356.1 	(AY078279) assimilatory nitrate ...	155	3e-37	
gi 548361 sp P36841 NIA_VOLCA	NITRATE REDUCTASE (NR) >gi 32...	152	5e-36	
gi 730148 sp P39864 NIA_PHYIN	NITRATE REDUCTASE [NADPH] (NR...	141	2e-33	
gi 730140 sp P39868 NIA2_BRANA	NITRATE REDUCTASE, CLONE PBN...	139	2e-32	

Figura 9. Primeiros resultados do BLASTX para os clones identificados como NR na biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata*.

Os clones para NR identificados na biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata* foram re-seqüenciados no intuito de descobrir se eram partes do mesmo gene ou genes diferentes.

O tamanho dos três clones selecionados na biblioteca denominados 05, 28 e 29 foi analisado. Observou-se que o clone 29 foi o maior deles com ~2700 pb enquanto o clone 28 tinha ~1300 pb e o clone 05 ~900 pb (Figura 10).

Figura 10. Gel de agarose 0,7% com DNA plasmidial referente a cada um dos clones (28, 05 e 29) digeridos duplamente com *EcoRI* e *XhoI*. Na primeira coluna 1Kb é o marcador de peso molecular. As setas indicam o tamanho em pb de cada um dos insertos liberados. O plasmídeo sem o inserto tem 4,5 Kb e está indicado com a seta.

Estes clones foram então seqüenciados, primeiramente utilizando os primers T3 e T7 para as extremidades 5' e 3' respectivamente, pertencentes ao fagomídeo pBK-CMV, vetor de inserto do kit da Stratagene utilizado na construção da biblioteca. Após os primeiros alinhamentos a seqüência

consenso obtida foi utilizada para construção de primers internos para obtermos a seqüência completa, isto porque as seqüências obtidas pelo seqüenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyser tinham de 400 a 600 pb e os insertos eram superiores a este tamanho.

O seqüenciamento do clone 05 confirmou o resultado obtido inicialmente (Figura 9), de que este clone não possuía como primeira homologia uma NR como os outros dois clones. A NR aparece apenas em 8º lugar em grau de homologia para o clone 05 provavelmente devido à conservação do grupo prostético heme. Assim não foram feitas outras análises com o clone 5. A partir da seqüência consenso gerada do alinhamento dos clones 28 e 29, foram construídos novos primers ao final de cada seqüenciamento para caminharmos em direção ao centro até encontramos as seqüências pelos dois lados (5' e 3') na chamada técnica de “primer walking”. A continuidade dos seqüenciamentos mostrou que o clone 28 era um pedaço do clone 29 e continuou-se o seqüenciamento até obtermos a seqüência completa, de boa qualidade nos dois sentidos (fita sense e anti-sense).

4.2. Seqüência da NR de *G. tenuistipitata*

O seqüenciamento completo do clone 29 consiste numa seqüência com 2932 pb e compreendeu desde o “start” códon ao “stop” códon, mantendo intacta toda informação desta proteína.x. A seqüência obtida de

2932 pb codifica uma “Open Reading Frame” (ORF) ou fase de leitura aberta que contendo 910 aminoácidos, compreendendo a informação da região do nucleotídeo 12 ao 2744. Na mesma fase de leitura ainda existe a codificação de uma ORF com 42 aminoácidos na região final do clone 29, que se trata provavelmente de uma ORF espúria, degradada após a transcrição. As ORFs foram obtidas através da opção ORF Finder no site do NCBI. No site ainda foi possível identificar os grupos prostéticos (Figura 11), e a região em que estão codificados.

Figura 11. Identificação dos grupos prostéticos da proteína NR de *G. tenuistipitata* para a seqüência consenso obtida a partir do clone 29.

Foram construídos no total 16 primers (Tabela 2), realizadas 13 séries de seqüenciamentos que forneceram 76 seqüências, que passaram por 8 conjuntos de alinhamentos até finalizarmos e chegarmos ao consenso que compreendia o clone 29 inteiro (Figura 12). O BLASTX dessa seqüência consenso do clone 29 mostrou que este clone é realmente uma NR, com “E value” igual a zero, isto é, a possibilidade desta homologia ter sido obtida ao acaso é desprezível.


```

1  GGCACGAGGT GATGATTTC GCCAGTCTCA GCAGTTGGGA CCCCAACAAG AAGCCCGCAC
61  AATCGTCGTT AAAGAACACT CCGGAAGCTA CACCCGAGTC CTCTCTCCGG GCCGGCCAGT
121 TTTACAAGAA GACGAAGAAC AACCCCTCCA CCGAGTTGCA CCACGCAAG CCGCTCGCGT
181 GGACTCAATT CAAAAACGAC CTTGAAGCCG TGTTCAACAC TCGACACCAG CGTCTCGCCA
241 AGAACCACCA ATGTACCGAA GTCGACGTGC GCGACAAAAA CAGCCCGGAC GATTGGATTTC
301 CACGCCATCC CGACCTCGTT CGCCTCACCG GTAAACACCC GTTTAACTGC GAGCCGCCTA
361 TCGGTCAACT GTTGGACCAA GGCTTCTTCA CCCCTATTTT GCTGCATTAT GTTCGAAATC
421 ATGGAAGAGC GCCCAAGCTC GACTGGCACT CGCATTCTAT TTCCATTGCG GGCTTGGTCA
481 ACAAGCCGCT CACACTAAGC ATGGAGGAAT TGGTACAAC TCCAAGCGTC ACTTTGCCCG
541 TCACGCTAGT TTGTGCGGGA AACAGACGCA AAGAAGAGAA TATGGTCAAG CAGACCATAG
601 GATTACAGCTG GGGCTGTGCC GCACATGCTT GCAACTTGTG GACAGGCGTC AGACTTTCTC
661 ACCTTTTGGG ACTGGCCGGT ATCGACAAGA CCCAAGCTCG GCACGTGTGC TTTTCAGGCG
721 TGGCAAAAGA GGGACTGCCG AATGGCACTT ACGGCACTTC AATAGACATC GCAACCGCCC
781 TCGATCCGTA CGGAGAAGTT CTCATCGCCT ATGAACAGAA TCATACTAAA CTTTCATCCC
841 ACCATGGCTT CCCTGTGCGC GTGGTCATTC CTGGTTGGAT AGGCGGTAGA ATGGTGAAAT
901 GGTTAGATTG CGTTCTGGTG ACTGATAAGC CGTCGGAGAA TTACTACCAT TACTTTGACA
961 ACAGGATTCT ACCACCGCAT GTGGACGCCG AGCTGGCCAA GTCCGAAGGT TGGTGGTACA
1021 AGCCGGAATA CCTCTTCAAC CAGCTCAACA TCAATTCTGC CATTGTTTAC CCGGCGAACG
1081 GCGAGCGTCT GCAGCTCACT GCGCGTGGTG TATACCCAT TAAGGGCTAT CCGTACTCCG
1141 GTGGTGGGCG CAAAGTTACT CGTGTGAGA TATCTCTGGA TGGCGGAAAG ACATGGCAAC
1201 TCTGCAAAAT GGAATATCCG GAAGAACGTT ACAGTCATGC CCCCAAGTTT GGCAGGTACT
1261 ACTGTGGGAT GTTTTGGGAG TACACATTG ACAATTTCGT GTTTCTCAAC GTTGTGCGG
1321 GCGCCGGGGA GCTTCGATGC CGTGCTGGG ATGAGGCCAG TAACACGCAA CCAAAGGATA
1381 TTACATGGAA TCTTATGGGC ATGGGGAATA ACTGTCATT CACAGTCAAA GTCATTCCAA
1441 AGCAAATATC AGGTGGCTTT GCGCTGGAGT TCTTGACCC AACGGTGCCT GGTCCGGCGA
1501 GTGGGGGCTG GATGCTGCCG CCGACCAAA CTGTACCGAA TGGGGTTGCG AGCAGTGCTC
1561 CGCCAGTCAA ATCGGGAAGC GCGCCATCAT TGTCCACTAT GATCAAGTCT TTCACAATGA
1621 AGGACGTGGA GAAGCAAAAC TCCGAGGACT CCGCTTGGAT AGTGGTTGAA GGTAAGGTG
1681 ATGACGCCAC GCCATATCTG GAGGATCATC CGGGAGGCAA GGCATCCATT CTCATGAATG
1741 CTGGCCAGGA TGCAACTGAA GAGTTCTTGG CAATTCATTG GGACAAAGCG AAGAAAATGC
1801 TAGAGGATTA TTACATCGGT GAACTTGTAG CAGAAAAGAC AACTGCCAAC GGTACTTCTC
1861 ATGCTATACA TATTTCGAAG TCATCCGCTC AGCTGATGAG GGATGATCTT CCGAATCAAA
1921 ACCTCGACAC TATGGATAAG AGCACACATC GCACTGGTCT TGTCGCTCTA AACCCGAAGA
1981 AGTGGCTTGA GTTTGAACTT ATCGAGAAAA AAGAAGTTTC CCACGATACC AGACTATTCA
2041 AGTTCAAGTT GCCACACCT GAGCATGTGC TTGGTCTTCC GGTGGGATA CAGATTTTCG
2101 TCAAATCTGT GATTGATGAA AATCTTGTGA TGCGTGCGTA CACACCTGTG TCCTCTGACG
2161 ACGATCTTGG GACCTTCACG CTGTGCATCA AGGTGTACTT TGCAGGGGTG CACCCGAAAT
2221 TCCCCGAGGG AGGCAAAATG TCGCAACATA TGGAGGGAAT GGAGATTGGT GACATGCTCA
2281 AGGTGAAAGG CCCTCTTGGT CACTTTGAGT ACTTGGAGAA AGGGCGTTTC ATTGTGAAAG
2341 ATGTGGAAG AAAGGCGTCG AAGATCGGCC TTATTTGCGG GGGCACTGGA CTTACGCCCG
2401 CGTTCAGGT GATGAAGGCT GTGTACAAG ATCCAGAAGA TTACACGGAA ATATTCTGT
2461 TGTATGCCAA CCGAACGGAG CAGGACATTT TGATGCGCGA AGAACTGGAA AAGATGGCCG
2521 CGGAACGTGA AAACATTCAT GTTTGGTATA CACTTGACAA ACCGGGTGAC GGATGGGAGT
2581 ATAGTAGTGG CTTCATAAGC GAAGAGATGA TCCGAGTCA TATTCCTGCC CCTGGGGATG
2641 ATTGCTTCGT CGGAATGTGC GGTCCGCCAC CTATGATCAA CTTTGATGT ATCCCGAACC
2701 TCGAGAGGAT CGGCTTCGAA GCCGACCACT ATATGCAGTT CTGATGCAA ACTATGAGGA
2761 AATCGATTTC GTTTCGTCAT GGTTTTCACGA CGAGCAGGG CGTTTACTTT TCTTTTCGAT
2821 CCGAGGGAAA GCAGACATTT TGTTTTTTCG CTCGATACAA GTTGTACGGA AAACAAACAT
2881 GACGGTTGTA AAATACAAGT GAACTTTTAT TGACAAAAAA AAAAAAAAAA AA

```

Figura 12. Sequência consenso do clone 29 com 2932pb. Indicação dos primers "forward" em verde, "reverse" em azul e regiões com sobreposição dos primers em amarelo. Códon de início e término em negrito e sublinhado.

4.2.1. Seqüenciamento do gene NR de *G. tenuistipitata*

No intuito de obter a seqüência do gene e procurar possíveis introns foi realizada a amplificação e seqüenciamento do gene que codifica para a NR. É importante o estudo da presença de introns, pois podem ser um fator de regulação pós transcricional na variação da NR.

De posse dos primers para NR, partimos então para o seqüenciamento do gene de NR utilizando o produto de PCR obtido com os primers de NRSTART e NRSTOP e o DNA extraído de *G. tenuistipitata* como descrito nos item 3.4. No total foram realizadas cinco séries de seqüenciamentos que forneceram 33 seqüências, que passaram por quatro conjuntos de alinhamentos até chegarmos à seqüência consenso que compreendia o gene da NR. Quando comparado, o resultado obtido da seqüência gênica da NR e do seu cDNA (seqüência do clone 29) através do alinhamento no programa ESEE, pudemos observar que as duas seqüências consenso (a partir do cDNA e da PCR do gene) são idênticas evidenciando assim a ausência de introns no gene de NR.

4.3. Análises Filogenéticas

A seqüência de aminoácidos da NR de *Gracilaria tenuistipitata* foi alinhada e comparada com seqüências de outros organismos disponíveis no GenBank (Figura 13 A). A partir de um alinhamento inicial incluído a seqüência completa das proteínas, regiões variáveis que poderiam ser alinhadas com ambigüidade e inserções/deleções (indels) foram removidos, gerando uma matriz de 18 seqüências com 631 posições (Figura 13 B). A partir dessa matriz de seqüências homólogas de aminoácidos foram geradas árvores através de diferentes métodos de reconstrução filogenética.

As análises filogenéticas a partir dos métodos de distância (NJ) e máxima parcimônia (MP) deram resultados bastante similares. Na Figura 14 apresentamos apenas a árvore de máxima parcimônia, mas os valores de “bootstrap” para ambas as análises (MP e NJ) estão plotados nos ramos formados em comum. Em ambas as análises, as algas vermelhas (Rhodophyta) *Gracilaria* e *Porphyra* se agruparam com altos valores de bootstrap, assim com as algas verdes (Chlorophyta), as embriófitas com a briófito *Physcomitrella patens* como grupo basal das angiospermas e as diatomáceas. Não foi obtido suporte de “bootstrap” para o posicionamento do ascomiceto *Aspergillus nidulans*, nem para o oomiceto *Phytophthora infestans*.

Gt	KNHQCVDVDRDKNSPDDWIPR	HPDLVRLTGKHPFNCEIGQD	QFFTPISLHYVRNHGKAPKL	DWHSHSISIGGLVNKPLTLS	MEELVQLPVTLPVTLCAGN
Porphyra	KQHVAVDDRDKTPDNWIPR	HPDLVRLTGKHPFNCELSMD	QFITPPSLHFVRNHGAAPQL	SFDDHRLEVSGLVDTPLTLS	MEDILAMPVTIPVTLCAGN
Cvulgaris	LHLPVVLDADKGTKEWIPR	HPDLVRLTGRHFPNVEPSRE	SYITPPSLHYVRNHGAVPQI	KWEEHRLAVNGLVSAPTFT	MDDILAMPVDVTCTLCAGN
Creinhard	QHVLVDKRDQDTPDNWVRR	DPRIILRLTGRHPLNCEMSVQ	YFITPPAVHFVRNHGAAPRI	RWDEHRIEINGLVNKPLTLT	MDELVALPVTFPVTLCAGN
Vcarteri	VHVPVDDKKDQDTPDNWVRR	DPRIILRLTGRHPLNCEMDVE	YFITPPAVHFVRNHGAAPRI	PWAEHRIEINGLVDPKPLFLT	MDELVALPITFPVTLCAGN
Dtertiole	LHVPTLDAKDKGTADAWIPR	DPRIILRLTGRHPLNCEMHDA	AFITPPSIHYVRNHGPAPRI	RWEEHRLQINGLVERPMTLT	MDEIVAMPVTIPVTMVCAGN
Ppatens	AEIPIVDERDKGTSDDWIPR	HPDLVRLTGRHFPNCELSMD	AFLTPTSLHYVRNHGAVPRA	SWDDWKIEISGLVKRPTFT	MNDILRFPRELVTLCAGN
Nbenthami	SELEPHDTRDEGTADNWIER	NFSMIRLTGKHPFNSELNRH	HFITPVPLHYVRNHGVPVPGK	TWDDWTVEVTGLVKRPMKFT	MDQLVNFPRELVTLCAGN
Ntabacum1	SELEPHDSRDEGTADNWIER	NFSMIRLTGKHPFNSELNRH	HFITPVPLHYVRNHGVPVPGK	TWDDWTVEVTGLVKRPMKFT	MDQLVNFPRELVTLCAGN
Ntabacum	SELEPHDTRDEGTADNWIER	NFSMIRLTGKHPFNSELNRH	HFITPVPLHYVRNHGVPVPGK	TWDDWTVEVTGLVKRPMKFT	MDQLVNFPRELVTLCAGN
Lesculent	TELEPHDTRDEGTADNWIER	NFSMIRLTGKHPFNSELSRH	HFITPVPLHYVRNHGVPVPA	SWSDWTVEVTGLVKRPMKFT	MDQLVNFPREFPVTLCAGN
Gmax	TEVESFDPRDDGTSDDWIPR	NSSLVRLTGKHPFNSELPRH	HFITPVPLHYVRNHGVPVPA	RWEDWTVEVTGLVTRPTCFT	MEQLLHFPREFPATLVCAGN
Athaliana	SDLEPLDPRDESTADSWIQR	NSSMLRLTGKHPFNSELPRH	HFITPVPLHYVRNHGAVPKA	NWSDWSIEITGLVKRPAKFT	MEELISFPREFPVTLVCAGN
Zmays	LANLGQSVRDEGTVDWVPR	SQSLIRLTGKHSNLGELPRR	HFITPVPRHYVRNHGVPVPRG	DWATWTVEVTGLVRRPRALT	MDELARFPLELVTLCAGN
Ptricornu	IFDVPADYRDVGTDPDEWVPR	DGRLVRLTGKHPNLVELAIQ	HFITPSSLHYVRNHGACPKL	SWKQHTVCVGGKLVNALELS	MDEIVAEPRELVTLCAGN
Cfusiform	YKDLDPDHRDLKTPDEWIPR	DGRLVRLTGRHFPNVEPSEK	TFITPSSLHYVRNHGACPLR	TWEDHTLLGGDVTHKMELT	MDELVAGPRELVTLCAGN
Pinfestan	ASDIDPRDVGTPDEWVPR	HPDLVRLTGRHFPNSELKYA	SEFITPMALHYVRNHGVPVPR	EWDTHTFSDGLVKKPRTFG	MNELVTQEVTEPVLVCAGN
Anidulans	PSKEPVLSDKTTDPDSHVPR	DPRLIRLTGVHPFNVELTAQ	QFLTPELFFYVRNHGVPVPHV	DIPNWELRIEGLVEKPITLS	FKQILQYDITAPITLCAGN

Gt	RRKEENMVKQTIGFSWGCAA	HACNLWTGVRLSHLLELAAR	HVCFSGKEGLPNGTYGTSID	IATALDPYGEVLIAYEQNHT	KLHPDHGFPVRVVIPGWIGG
Porphyra	RRKEQNMVKQTIGFSWGAAA	TSCNFWTGVRRLDVLEKAAAR	HVCFVGCDLPGGKYGTSID	LATAMDQFGEVMLAYEQNGI	RLTPDHGAPLRVVIPGWIGG
Cvulgaris	RRKEENMVKQTIGFNWGPSC	TGCSTWTGVRVSDLLQRCAR	HVCFRGKGELPKGSYGTSVT	WVKAMDPASDVILAYQNGR	LLTPDHGYPLRLIIPGYIGG
Creinhard	RRKEENMLKKSIGFNWGPCA	TSTTYWTGVRLRDLQHAAR	FVCFRGKGELPRGSYGTSLT	YAKAMDPASDVIIAYKQNGR	WLTPDHGFPVRIIIPGFIGG
Vcarteri	RRKEENMLKKSIGFNWGPCA	TSTTYWTGVRLRDLLLAAN	FVCFRGKGELPRGSYGTSLT	YAKAMDPSSDVIIAYKQNGR	WLTPDHGFPVRMIIPGFIGG
Dtertiole	RRKEENMHKKSIGFNWGPCA	VSTSYWTGVKLSDLLKHVVK	HVCFVGQGELPAGTYGTSMP	MGKAMDPANDVLIAYKQNGR	WLNVDHGFPVRTIIPGYIGG
Ppatens	RRKEENIVKQSIGFNWGAAA	VSTSIWRGVRLCDILRHCAL	YVCFEGAEILPGGTYGTSIT	IDTAMDKAQDVLLAYQONGQ	CLEPDHGFPVRLIIPGYIGG
Nbenthami	RRKEQNMVKQTIGFNWGAAA	VSTTIWRGVPLRALLRRCAL	NVCFEGADTLPGGKYGTSIK	KEFAMDPARDIIIVAYMQNGE	KLTPDHGFPVRMIIPGFIGG
Ntabacum1	RRKEQNMVKQTIGFNWGAAA	VSTTIWRGVPLRALLKRYAL	NVCFEGADVLPGGKYGTSIK	KEFAMDPARDIIIVAYMQNGE	KLAPDHGFPVRMIIPGFIGG
Ntabacum	RRKEQNMVKQTIGFNWGAAA	VSTTIWRGVPLRALLKRCAL	NVCFEGADVLPGGKYGTSIK	KEFAMDPARDIIIVAYMQNGE	KLAPDHGFPVRMIIPGFIGG
Lesculent	RRKEQNMVKQTIGFNWGAAA	VSTTVWRGVPLRALLKRCAL	NVCFEGSDVLPGGKYGTSIK	KEFAMDPARDIIIVAYMQNGE	MLSPDHGFPVRMIIPGFIGG
Gmax	RRKEQNMVKQSIGFNWGAAA	ISTSVWRGVPLRLLKSCAL	HVCFEGAEDLPGGKYGTSIL	REVALDPSRDIILAYMQNGE	PLSPDHGFPVRMIIPGFIGG
Athaliana	RRKEQNMVKQTIGFNWGSAG	VSTSLWKGIPLSEILRRCAL	NVCFEGAEDLPGGKYGTSIK	KEMAMDPARDIIILAYMQNGE	LLTPDHGFPVRVIVPGFIGG
Zmays	RRKEQNMVRQTLGFNWGPAG	VSTSVWRGARLSVLRRCAL	FVCFEGAEDLPGGKYGTSIT	REVALDPTMDVMLAYQONGG	PLLPDHGFPVRLIVPGCTAG
Ptricornu	RRKEQNMIRQTIGFNWGPSC	VSTSVWKGVLRLDLLRAGK	HVEFIGVEDLPNNKYGTSVP	LARAMNPAYDILIAEQNGE	VLQPDHGYPVRLIIPGYIGG
Cfusiform	RRKEQNMIRQTIGFSWGPCG	VSTNVYKGVLLRDLLIKAGK	HVEFIGVEDLPNNKYGTSIP	LSRAMNAAVDVMVAWEANGE	RLLPDHGYPVRLIIPGYIGG
Pinfestan	RRKEQNMIKKTIGFSWGAAAG	CSTAETGTVPLHVLLTACAQ	WWWFEGIEDLPHDKYGTICIR	ASTELDPECVDLVAVKANGE	LLGPDHGFPVRLIVPGHIGG
Anidulans	RRKEQNTVRKSKGFSWGSAA	LSTALFTGPMMAIIKSAAK	YVCMEGADNLPGNGYGTSIK	LNWAMDPNRGIMLAHKMNGE	DLRPDHGRPLRAVVPQGIGG

Gt	RMVKWLDSVLVTDKPSENYY	HYFDNRILSEGWWYKPEYLF	NQLNINSAIVYPANGERLQL	GAGVYTIKGYAYSGGGRKVT	RVEISLDGGKTWQLCKLDYP
Porphyra	RMVKWLTGVSVTAEESQEHY	HFHDNRIMSEGWWYKREYLF	NQLNINSAISSPANGELMSL	GAGVYTLKGYAYSGGGRKVT	RVEVSVDDGGKTWLLATLDHP
Cvulgaris	RMIKWLEEITVTEVESQNY	HFHDNRVLSEGWWYKPDFII	NDLNVQSAIGYPAHEEVVPL	AAGTYAVRGYAYCGNGNKII	RCEVSLDDGKSWRLGSVTHE
Creinhard	RMVKWLSEITVMDTESQNFY	HFMDNRVLKEGWYKPEFII	NDLNINSAMARPWDELVPL	ANRPYTIKGYAYAGGGRKII	RCEVSLDDGKTWRLGDIQRF
Vcarteri	RMVKWLSEITVTEVESQNFY	HFMDNRVLEEGWWYKPEFII	NDLNINSAVARPWDEVVRL	ANKPYTMRGYAYAGGGRKII	RCEVSLDDGKTWRLGDIQRF
Dtertirole	RTIKWLCTIKVQEQESSNHY	HYMDNRVLKEGWYKPEYII	NDLNINSAIARPWDEVVML	SNQPYTVKGYAYAGGGHKII	RCEISLDGGKSWRLANIRRF
Ppatens	RMVKWLNKIEVTTQESGNYY	HFHDNRVLAEGWWYRPDYII	NQLNINSAITSPAHEALPV	LQESYIVKGYAYSGGGRKVT	RVEVSLNDGKSWILCDLKHP
Nbenthami	RMVKWIKRIIVTTQESDSYY	HFKDNRVLTEAWWYKPEYII	NELNINSVITTPCHEEILPI	TQRPYTLRGYSYSGGGKKVT	RVEVTLDDGETWQVSTLDHP
Ntabacum1	RMVKWIKRIIVTTQESDSYY	HFKDNRVLTEAWWYKPEYII	NELNINSVITTPCHEEILPI	TQRPYTLRGYSYSGGGKKVT	RVEVTLDDGETWQVCTLDHP
Ntabacum	RMVKWIKRIIVTTQESDSYY	HFKDNRVLTEAWWYKPEYII	NELNINSVITTPCHEEILPI	TQRPYTLRGYSYSGGGKKVT	RVEVTLDDGETWQVSTLDHP
Lesculent	RMVKWLKRIVTTQESSEYY	HYKDNRVLAEAWWYKPEYII	NELNINSVITTPCHEEILPI	TQRPYTLRGYAYSAGGGKKVT	RVEVTLDDGETWSVCTLDHP
Gmax	RMVKWLKRIIVTTDQSQNY	HYKDNRVLAQAWWYKPDYII	NELNINSVITTPCHEEILPI	TQMPYFIRGYAYSAGGGKVT	RVEVTLDDGETWQVCTLDGP
Athaliana	RMVKWLKRIIVTPQESDSYY	HYKDNRVLSEAWWYKPEYII	NELNINSVITTPGHAEILPI	TQKPYTLKGYAYSAGGGKKVT	RVEVTLDDGGDTWSVCELDHQ
Zmays	RMVKWLKRIVVAPAESDNYY	HYRDNRFLAEGWWYKPEYVI	NEMNTNSVITTPAHNEFLPI	TQRIYTMKGFAYSAGGGKKVT	RVEVTLDDGGENWLLCELDHP
Ptricornu	RMIKWLKYINVIPHEPKNHY	HYHDNRILQGGWWYKPEYIF	NELNINSAIAPDHNETLSI	IAKTYDVTGYAYTGGGRLIT	RVEISVDGGIHWELAKRERK
Cfusiform	RMIKWLKEINVIDHETKNHY	HYHDNRILKGQWWYKPEYIF	NELNINSAIASPLHDEELPI	IDKSYNVSGYAYTGGGRMIT	RVEVSTDGGIHWELATLDRK
Pinfestan	RMVKWLERIHVSDHESSNHH	HIMDNRVLAEGWWSKSPYAI	MELNVNAVVLPNHDDLAL	DIETYTIKGYAYSAGGGRRVI	RVEVTLDDGASWQLARIIYH
Anidulans	RSVKWLKKLIITDAPSDNWW	HIYDNRVLQNPSWWRDEYAI	YDLNVNSAAYVPQHKETLDL	ARPFYTAAGYAYAGGGRRIT	RVEISLDKGKSWRLARIEYA
Gt	EEAPKFGRYYCWMFWEYTID	NFVFLNVAELRCRAWDEASN	TQPKDITWNLMGMGNCHFT	VKVIPKQILEFLHPTPGPAS	WMLSFTMKDVEKQNSSESAW
Porphyra	EEAPSYGRYYCWCWFWEYTID	KFALLNAAEVLVRAWDEGNN	TQPAKLTWNLMGMGNNCYFR	VTVAPKQSLFLHPTPGPAE	WMPTYTMEEVAKHDTEEDSW
Cvulgaris	GQPTGYGKHGWVWWSLEVP	IAELLTTPEIICRAWDSMN	TQPNFTFTWNVMGMNNCSYR	VKIHPRQTLQFEHPTAGPTV	WMNSFTMAEVETHTTMSAW
Creinhard	EEPNEYGKHWCWVHWTLEVN	TFDFLSAKEVLCRAWDETMN	TQPAVITWNLMGMNNCYFR	IKIHPEVDLRFQHPAELGDK	WREQYTL EEVAEHASEESCW
Vcarteri	EKPNEYGKYWCWVHWSLDVM	TFDFLNAKEVLLRAWDETMN	TQPAIITWNVMGMNNCYFR	IKIHQPVDLRFQHPAELGER	WREQYTMEEVAAHNTEESCW
Dtertirole	AEPNEYGKHWCWVHWDIEVS	VFDFVVFKEMLLRAWDETQN	TQPALLTWNVMGMNNCHFR	VLLHPFKDVRFQHPAEVGEL	WREEFTMEEVAEHTSPESAW
Ppatens	EEPTRYGKYWCWCFWQINVD	VLDLLKCKEIVVRAWDAAMN	TQPQHLIWNVMGMNNCWFR	VKIGITKSLTFDHPTGNQTG	WMVQIKLSEVRKHQKADSCW
Nbenthami	EKPTKYGKYWCWCFWSLEVE	VLDLLSAKEIAVRAWDETLN	TQPEKLIWNVMGMNNCWFR	VKMNVCKPIVFEHPTGNQSG	WMAMYSMSEVRKHSSADSAW
Ntabacum1	EKPTKYGKYWCWCFWSLEVE	VLDLLSAKEIAVRAWDETLN	TQPEKLIWNVMGMNNCWFR	VKMNVCKPIVFEHPTGNQSG	WMAMYSMSEVRKHSSADSAW
Ntabacum	EKPTKYGKYWCWCFWSLEVE	VLDLLSAKEIAVRAWDETLN	TQPEKLIWNVMGMNNCWFR	VKMNVCKPIVFEHPTGNQSG	WMAMYSMSEVRKHSSADSAW
Lesculent	EKPTKYGKYWCWCFWSLEVE	VLDLLSAKEIAVRATDETLN	TQPEKLIWNVMGMNNCWFR	VKMNVCKPIVFEHPTGNQSG	WMAMYSMSEVRKHSSADSAW
Gmax	EKPNKYGKYWCWCFWSVEVE	VLDLLGAREIAVRAWDEALN	TQPEKLIWNVMGMNNCWFR	VKTNVCRPIVFEHPTGNQSG	WMATYTMSEVRRHNNADSAW
Athaliana	EKPNKYGKFWCWCFWSLDVE	VLDLLSAKDVAVRAWDESN	TQPDKLIWNLMGMNNCWFR	IRTNVCKPIVFEHPTGNQSG	WMAMYSISEVRKHNTADSAW
Zmays	EKPTKYGRYWCWCFWSIDVE	LIDLLACKEIAVRAWQSLN	TQPEFLTWNLMGMMTNCWFR	VKVNVCRLAFEPVTNQPQ	WMAQFTMSEVRKHASQDSAW
Ptricornu	EQPTDYGMWYCWWTWNNYEVK	VADLVGAKEIICRAWDESNN	PQPVVPTWNLMGMNNQAFR	VKVHMDKTRFEHPTGQQTG	WMTIFTMEEIEKHNTTEEDCW
Cfusiform	EMPTEHDMYWCWVWWDYELK	VADLVGCKEIIWCRAWDESNN	CQPIHPTWNLMGMNNQVFR	LKVHMDKKFRFEQPTGQLAG	WMTTFTMEEIRKHNTTEEDCW
Pinfestan	ERPSKYGKMWCWVHYELAAP	MSSLLCAREVCRAWDSMN	LMPAFPTWNVMGMNNPWYR	VKIHHEQDLRFEHPTGNQKG	WMTLIFADEVAKHNSKKSCW
Anidulans	EDGTLYGACFCWSFWSLDIP	VSELASSDALLVRAMDEALS	LQPKDMYWSVLGMMNNPWFR	VKITNENGLLFEHPTTGSSG	WMEIIDLEEFKKNSSDERPW

Gt	IVVEGKVYDATPYLEDHPGG	KASILMNAGQDATEEFLAIH	SDKAKKMLEDYYIGELVAEG	LVALNPKKWLEFELIEKKEV	SHDTRLFKFKLPTPEHCLGL
Porphyra	IVVHNKVYDCTPFLKDHPGG	GASIVMNAGADCTEEFDAIH	STKAKGMLDDYYIGELAIEA	PVALNPKKWVHFPLIQKEEL	SHDTRRFRFGLPTEGHRGLGL
Cvulgaris	FVVDGKVYDATPFLKDHPGG	ADSILLVAGTDATDEFNAIH	SLKAKKQLLEYIGELAEIE	LVALNPRKRQSFKLIEKEAL	SHNTRRFRFALQSPQHRFGL
Creinhard	FVHEGRVYDATPYLNDHPGG	AESILITAGADATDEFNAIH	SSKAKAMLAQYYIGDLVASP	LVVLTGRAKVKLPLVERIEL	NRNTRIFRFGLPSPQHRIGL
Vcarteri	FVHGKGVYDATPYLDEHPGG	AESILIVAGADATDEFNSIH	SSKAKAMLAQYYIGDLVASP	LVVLNPRQKVKLPLIERIEL	NRNTRIFRFGLPSPQHRIGL
Dtertiole	FVHEGKVYDATPFLEDHPGG	PDSILIATGADATEDFNIAIH	SKKAKNMLKDYIGELVASS	LITLNPREDKVPKLAEIEV	SHNTRIFRFGLPSPKHILGL
Ppatens	IIVRNKVYDCTPFLDDHPGG	ADSILINGGTDSTEEFDAIH	SAKAQAMLEEYYIGDLVASR	PVALNPRERLPFRLIEKETL	SHDVRRLRFALQSENHVLGL
Nbenthami	IIVHGHYDATRFLKDHPGG	TDSILINAGTDCTEEFDAIH	SDKAKKLEDFRIGELITTR	SVALIPREKIPCKLIDKQSI	SHDVRKFRFALPSEDQVLGL
Ntabacum1	IIVHGHYDATRFLKDHPGG	SDSILINAGTDCTEEFDAIH	SDKAKKLEDFRIGELLTTR	SVALIPREKIPCKLIDKQSI	SPDVRKFRFALPSEDQVLGL
Ntabacum	IIVHGHYDATRFLKDHPGG	TDSILINAGTDCTEEFDAIH	SDKAKKLEDFRIGELITTR	SVALIPREKIPCKLIDKQSI	SHDVRKFRFALPSEDQVLGL
Lesculent	IIVHGHYDASRFLKDHPGG	VDSILINAGTDCTEEFDAIH	SDKAKKLEDFRIGELITTR	SVALIPREKIPCKLVDKQSI	SHDVRKFRFALPSEDQVLGL
Gmax	IIVHGHVYDCTRFLKDHPGG	TDSILINAGTDCTEEFEAIIH	SDKAKQMLEDYRIGELTTTR	SVALNPREKIPCKLISKTSI	SHDVRLFRFALPSDDLMLGL
Athaliana	IIVHGHYDCTRFLKDHPGG	TDSILINAGTDCTEEFEAIIH	SDKAKKLEDYRIGELITTK	NIALVPREKIPVRLIEKTSI	SHDVRKFRFALPSEDQQLGL
Zmays	IIVHGHVYDCTAFLKDHPGG	ADSILINAGTDCTEEFDAIH	SDKAKELLDTRYIGDLVTP	VIALSPREKVPCLVARTVL	SRDVRLFRFALPSSGQVLGL
Ptricornu	IIVKDRVYDCTEYLELHPGG	IDSIVINGGADSTEDFVAIH	STKATKMLEKYYIGQLDKSN	ALALNPKKKTFFRLQNKITL	SRDSYLLDFALPSPKHVLGL
Cfusiform	IIVNNRVYDCTEYLELHPGG	TDSIVINAGATEDDEFVAIH	SMKATKMLEKYYIGDLDTAN	KLALNPRKKTQFRLQNKIVL	SRDSFMLDFALPTPQHVLGL
Pinfestan	FICRDLVYDATPFLDEHPGG	ATSILLCGGTDCTDEFESIH	STKAWQMLKKYICIGRCSST	DVALKGRTKVPIVLISREVV	SHDARIFKFALPAKDLRLGL
Anidulans	FVVNGEVYDGTAFLEGHPGG	AQSIISAAGTDASEEFLEIH	SETAKKMMPDYHIGTLDKAR	PTFLTPKAWTKATLTKKTSV	SSDTHIFTLSLEHPSQALGL

Gt	PVGYHMFVKSVIDENLVMRA	YTPVSSDDDLGFTLICKIVY	FAPKFPGGKMSQHMEGMEIG	DMLKVKGPLGHFEYLEKGRF	VKDVERKASKIGLICGGTGL
Porphyra	PVGFMFLAATIEGSMVMRA	YTPTSSDAQLGFDLVKIVY	FAPKFPGGKLTQYMEEMSLG	DEIRVKGPLGHIEYRGRGEM	IDGKPRTVSALTGLMAGSGI
Cvulgaris	PVGKHVFLYAKVDGELVMRA	YTPSSSDDQLGYFELVVKIY	FAPRFPGGKMSQYLEGMAIG	DFMEVKGPLGHVHYKGRGSY	LDGTPHSASRISMIAGGTGI
Creinhard	PVGKHVFVYAQVGGENVMRA	YTPISGDEEKGRDLMLIKVY	FKASYPGGKMSQHFDLSAIG	DCLEFKGPLGHFVYNGRGSY	LNGKVTHASHMSFVAGGTGI
Vcarteri	PVGKHVFYATYATINGENVMRA	YTPISGDEELGRDLMLIKVY	FAPAFPGGKMSQHFESELRIG	DTVEFKGPLGHFVYDGRGSY	LNGKLHHATHMSFVAGGTGI
Dtertiole	PTGRHLFVYAQIHGEVVARA	YTPISCDDDVGRDLMLIKVY	GPPAFPGGKMSQHLDSPKIG	DEIMVKGPVGHFTYEGKGKY	VNGKNKVAQMSMLAGGTGI
Ppatens	PVGKHILLSATINGKFCMRA	YTPISNDDDVGYFELVVKIY	YKSKFPGGKMSQYLDLRLIG	DTIDVKGPVGHIVYEGKGHF	INGKSKFVKKVSMLAGGTGI
Nbenthami	PVGKHIFLCAVIDDKLCMRA	YTPTSTIDEVGYFELVVKIY	FKPKFPGGQMSQYLDLRLIG	SFLNVKGPLGHIEYQGGKGF	VHGKQKFAKKLAMIAGGTGI
Ntabacum1	PVGKHIFLCAVIDDKLCMRA	YTPTSTIDEVGYFELVVKIY	FKPKFPGGQMSQYLDLRLIG	SFLNVKGPLGHIEYQGGKGF	VHGKQKFAKKLAMIAGGTGI
Ntabacum	PVGKHIFLCAVIDDKLCMRA	YTPTSTIDEVGYFELVVKIY	FKPKFPGGQMSQYLDLRLIG	SFLNVKGPLGHIEYQGGKGF	VHGKQKFAKKLAMIAGGTGI
Lesculent	PVGKHIFLCATVDDKLCMRA	YTPTSTVDEVGYFELVVKIY	FKPKFPGGQMSQYLDLRLIG	AFLDVKGPLGHIEYQGGKGF	VHGKQKFAKKLAMIAGGTGI
Gmax	PVGKHIFLCATVDEKLCMRA	YTPTSSVHEVGYFDLVVKVY	FKPKFPGGIMSQYLDLRLIG	SVLDVKGPLGHIEYTGKGNF	VHGKPRFATRLAMLAGGTGI
Athaliana	PVGKHVFVCANINDKLCMRA	YTPTSAIDAVGHIDLVLVKVY	FKPRFPGGKMSQYLDLRLIG	SMIDIKGPLGHIEYKGGKGF	VSGKPKFAKKLAMIAGGTGI
Zmays	PVGKHIFVCASIDGKLCMRA	YTPTSSVDEVGHFDLLVKVY	FRTKFPGGKMSQYLDLRLIG	AHVDVKGPLGHVEYVGRGGF	IDGKPRKAGRLAMVAGGSGI
Ptricornu	PTGKHMFIISALINGEMVLR	YTPISSNYDIGCVKVFVKAY	RPERFPGGKMSQYLDQINV	DYVDMRGFPVGEFEYSANGSF	IDAEPFCATRFNMLAGGTGI
Cfusiform	PTGKHMFMASAVINGETVLR	YTPISSNYDVGCVKFVVKAY	RPERFPGGKMSQYVDNLKIG	DVMDFRGFPVGEFEYVADGNF	LDGEECHGTKFNMVAGGTGI
Pinfestan	PIGNHVFLYAKINGKTAVRA	YTPISSDEDRGFVSFLIKVY	FAPVHPGGKMSQYLDLRLIG	QQIQIKGPLGHFTYYGDNF	LETTNFHAYKFGFVAGGTGI
Anidulans	PTGQHLMLKTSSSSGSIIRS	YTPISPSDQLGMVDILIKIY	AEPSIPGGKMTALDTLPLG	SVIECKGPTGRFEYLDGRV	ISGERFVKFSFVMICGGTGI

Gt	TPAFQVMKAVYKDPEDYTEI	FLLYANGFEAD
Porphyra	TPFYQILQAVMADPEDKTEL	YLIYKNGYAAE
Cvulgaris	TPMLQVIKAVLKDPKDTTQL	SLLYANGYKPE
Creinhard	TPCYAVIKAALRDPEDNTKL	ALLFANGYSKD
Vcarteri	TPCYAVIKAALRDPEDKTQI	SLVFANGYSKE
Dtertiole	TPILQVLEAVLKDKEDPTCM	SLIYANGYSKE
Ppatens	TPMYQVIRAIIVSDPEDQTQI	CLLYSNKFDS
Nbenthami	TPIYQVMQAILKDPEDDTEM	YVVYANGYDIK
Ntabacum1	TPVYQVMQAILKDPEDDTEM	YVVYANGYDIK
Ntabacum	TPVYQVMQAILKDPEDDTEM	YVVYANGYDIK
Lesculent	TPVYQVMQSILKDPEDDTEM	YVVYANGYDIK
Gmax	TPIYQVVQAILKDPEDCTEM	HVVYANGYDTQ
Athaliana	TPIYQIIQSILSDPEDETEM	YVVYANGYNVK
Zmays	TPIYQVIQAVLRDPEDKTEM	HLVYANKHQLD
Ptricornu	TPVMQIAAEILRNPQDPTQM	SLIFACWSQKG
Cfusiform	TPCMQIAAEILRHPLDNTQI	SLIFAAGHKKS
Pinfestan	TPVYQVMRAILEDADQTKV	ALIYCVNYDLK
Anidulans	TPVFQVLRAVMQDEQDETKC	VMLDGNWKEE

Figura 13 A. Alinhamento da seqüência parcial, incluindo os domínios MoCo em vermelho, Cyt-b5 em verde, FAD em azul e parte do domínio NAD em marrom para os aminoácidos de NR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. Gt	0.0000																	
2. Porphyra	0.7582	0.0000																
3. Cvulgaris	1.1036	1.0345	0.0000															
4. Creinhardt	1.1388	1.1474	0.9026	0.0000														
5. Vcarteri_	1.1702	1.1303	0.8585	0.2373	0.0000													
6. Dtertiolec	1.1740	1.2241	0.9433	0.6610	0.6705	0.0000												
7. Ppatens	1.1160	1.0104	0.9857	1.1059	1.0775	1.0435	0.0000											
8. Nbenthamia	1.1654	1.0932	1.0991	1.2009	1.2225	1.1517	0.7574	0.0000										
9. Ntabacum1	1.1688	1.1174	1.1128	1.1997	1.2211	1.1553	0.7544	0.0487	0.0000									
10. Ntabacum_2	1.1653	1.0986	1.1030	1.2040	1.2262	1.1529	0.7567	0.0142	0.0343	0.0000								
11. Lesculentu	1.1685	1.1267	1.1249	1.2007	1.2099	1.1573	0.7778	0.1172	0.1146	0.1054	0.0000							
12. Gmax	1.1400	1.0634	1.0851	1.1806	1.1557	1.1583	0.7487	0.3462	0.3439	0.3432	0.3172	0.0000						
13. Athaliana	1.2121	1.1309	1.1543	1.1936	1.2058	1.1595	0.7978	0.3445	0.3648	0.3512	0.3547	0.4287	0.0000					
14. Zmays	1.2145	1.1373	1.1564	1.1775	1.2027	1.1940	0.8813	0.6287	0.6273	0.6325	0.6219	0.6125	0.6546	0.0000				
15. Ptricornut	1.3344	1.2559	1.2183	1.2929	1.2846	1.1846	1.1707	1.2346	1.2159	1.2261	1.2207	1.1900	1.2033	1.1897	0.0000			
16. Cfusiformi	1.3555	1.2883	1.3078	1.2706	1.2729	1.2113	1.2247	1.2661	1.2576	1.2610	1.2671	1.2322	1.2690	1.2972	0.4661	0.0000		
17. Pinfestans	1.4033	1.4173	1.3175	1.2426	1.2534	1.3237	1.1912	1.2333	1.2271	1.2279	1.2326	1.2043	1.2479	1.3071	1.4219	1.4086	0.0000	
18. Anidulans_	1.5119	1.5595	1.6044	1.5947	1.6448	1.5674	1.5302	1.5128	1.4962	1.5032	1.5330	1.5117	1.5087	1.5987	1.6899	1.7533	1.6530	0.0000

Figura 13 B. Matriz de distância das seqüências incluídas no alinhamento utilizado para as análises filogenéticas (seqüência parcial, incluindo os domínios MoCo, Cyt-b5, FAD e parte do domínio NAD): 1. *Gracilaria tenuistipitata* (esse trabalho); 2. *Porphyra* (seqüência cedida por Y. Nakamura); 3. *Chlorella vulgaris* (AAC49460); 4. *Chlamydomonas reinhardtii* (AAF17595); 5. *Volvox carteri* f. *nagariensis* (CAA45497); 6. *Dunaliella tertiolecta* (AAL79356); 7. *Physcomitrella patens* (BAE19755); 8. *Nicotiana benthamiana* (BAE46746); 9. *Nicotiana tabacum* 1 (CAA32216); 10. *Nicotiana tabacum* 2 (CAA32217); 11. *Lycopersicon esculentum* (CAA32218); 12. *Glycine max* (AAD19790); 13. *Arabidopsis thaliana* (NP177899); 14. *Zea mays* (P49102); 15. *Phaeodactylum tricornutum* (AAV66996); 16. *Cylindrotheca fusiformis* (AAY59538); 17. *Phytophthora infestans* (P39864); 18. *Aspergillus nidulans* FGSC (XP658610).

Figura 14. Árvore de máxima parcimônia (MP) a partir de uma matriz de seqüências de aminoácidos para a NR com 631 posições. Os valores de bootstrap efetuados para 2000 replicatas estão indicados nos ramos (de MP acima do ramo e de NJ abaixo do ramo). As setas indicam a posição dos valores de “bootstrap”, quando não couberam nos ramos.

4.4. Extração do RNA total de *G. tenuistipitata*

Como *G. tenuistipitata* é um organismo rico em polissacarídeos, desde o princípio optamos por tentar uma metodologia de extração de RNA sem o uso de kits comerciais que utilizam colunas para purificação, uma vez que o ágar entupiria estas colunas. A extração baseada unicamente no uso do TRIZOL[®] resulta em uma amostra de consistência gelatinosa, provavelmente devido à presença de polissacarídeos como o ágar, uma vez que proteína e DNA eram ausentes nestas amostras. A viscosidade impedia que a amostra fosse aplicada no gel para verificar o sucesso da extração. Assim passamos a otimizar o método a partir de processos descritos na literatura para precipitação dos polissacarídeos e descontaminação do RNA total isolado (Item 3.6.2).

No experimento, foi usada sempre a mesma massa fresca de alga para extração (1g) e foi analisado sempre o mesmo volume de amostra, assim as diferenças observadas foram resultantes das diferentes metodologias de extração. A sonda escolhida foi a 18S por ser constitutiva (RNA transcrito sempre na mesma concentração) e assim garantir que a variação observada fosse unicamente devido as diferentes metodologias de extração. Também foi escolhida por ser uma subunidade ribossomal, e o RNA ribossômico constitui aproximadamente 85% do RNA total, gerando uma banda intensa proporcional ao RNA total isolado.

As amostras tratadas anteriormente com o tampão de GHCl, apresentaram uma melhor extração por apresentarem bandas mais definidas

como pode ser observado na Figura 15, gerando assim imagens melhor resolvidas nas análises de Northern blot (Figura 16). Apesar de visualmente parecer que a extração só com TRIZOL[®] gera maior quantidade de RNA por massa fresca de alga, a análise no espectrofotômetro mostra que a variação na concentração não foi significativa entre os tratamentos (Tabela 3 e Figura 17 C).

Tabela 3. Análise dos parâmetros de qualidade (260/230 nm e 260/280 nm) e quantidade de RNA obtido através dos diferentes tratamentos no espectrofotômetro.

GHCI	260/230	260/280	RNA (ng/ μ L)
Controle	0,41 $\pm$ 0,12	1,87 $\pm$ 0,02	293 $\pm$ 45
EtOH 30%	0,45 $\pm$ 0,10	1,85 $\pm$ 0,03	411 $\pm$ 134
EtOH 20%	0,29 $\pm$ 0,06	1,98 $\pm$ 0,07	237 $\pm$ 33
KOAc 0,2M	0,39 $\pm$ 0,01	1,82 $\pm$ 0,05	397 $\pm$ 63
PEG 6000	0,24 $\pm$ 0,05	1,78 $\pm$ 0,03	205 $\pm$ 92
PEG 20000	0,27 $\pm$ 0,05	1,75 $\pm$ 0,05	291 $\pm$ 13
PEG 35000	0,26 $\pm$ 0,05	1,81 $\pm$ 0,08	249 $\pm$ 125
PVP	0,38 $\pm$ 0,08	1,88 $\pm$ 0,04	290 $\pm$ 38
TRIZOL [®]	260/230	260/280	RNA (ng/ μ L)
Controle	0,44 $\pm$ 0,21	1,82 $\pm$ 0,09	239 $\pm$ 114
EtOH 30%	0,10 $\pm$ 0,02	1,75 $\pm$ 0,06	161 $\pm$ 110
EtOH 20%	0,22 $\pm$ 0,03	1,84 $\pm$ 0,07	357 $\pm$ 123
KOAc 0,2M	0,45 $\pm$ 0,02	1,86 $\pm$ 0,05	407 $\pm$ 23
PEG 6000	0,38 $\pm$ 0,11	1,76 $\pm$ 0,01	280 $\pm$ 40
PEG 20000	0,60 $\pm$ 0,26	1,82 $\pm$ 0,03	343 $\pm$ 64
PEG 35000	0,93 $\pm$ 0,50	1,87 $\pm$ 0,07	451 $\pm$ 202
PVP	0,49 $\pm$ 0,27	1,80 $\pm$ 0,06	291 $\pm$ 39

Figura 15. Imagem no transiluminador das diferentes extrações em triplicata. Extração com TRIZOL[®] (A) e extração com GHCl seguido de TRIZOL[®] (B).

Figura 16. Imagem da autoradiografia do Northern blot com a sonda 18S para as diferentes extrações em triplicata. Extração com TRIZOL[®] (A) e extração com GHCl seguido de TRIZOL[®] (B).

Figura 17. Resultado das diferentes extrações com GHCI seguido de TRIZOL[®] (barras pretas) e apenas TRIZOL[®] (barras brancas) para contaminação por proteínas (A) e por carboidratos (B), e concentração do RNA total isolado no espectrofotômetro (C) e com a sonda 18S por Northern blot (D). Análise estatística pelo t-student com $p < 0,05$.

Analisando todos os parâmetros em conjunto (contaminação por proteínas, por polissacarídeos e maior concentração de RNA total) apresentado na Figura 17, o tratamento prévio com GHCl e KOAc $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ foi o melhor método para remoção dos polissacarídeos e apresentou menores desvios entre as réplicas, sendo na relação 260/230 significativamente menor apenas ao tratamento com TRIZOL[®] + KOAc $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (porém TRIZOL[®] resultou em bandas menos definidas), e na relação 260/280 não há variação significativa entre as amostras com baixa contaminação por proteínas para todas as extrações.

O resultado do Northern blot analisado no Imagequant mostra que o tratamento só com TRIZOL[®] realmente isola uma maior quantidade de RNA para o controle e no tratamento com KOAC $0,2 \text{ M}$, provavelmente, isso ocorre porque o TRIZOL[®] gera bandas mais largas.

Assim para continuação do projeto, optou-se por utilizar, na extração do RNA total, o tratamento prévio com tampão GHCl e KOAc $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ para retirar os polissacarídeos.

4.5. Estudo da variação do mRNA de NR

O estudo da variação dos níveis de mRNA de NR foi realizado durante o ciclo claro escuro no intuito de identificar a ritmicidade desse mRNA. Primeiramente, a técnica utilizada foi de Northern blot, e para isso tivemos que construir uma sonda homóloga ao mRNA da NR de *G. tenuistipitata*.

4.5.1. Desenho e Construção da sonda homóloga

A sonda foi construída a partir do clone 29. Para seleção das fitas moldes foi feita a combinação de todos os primers construídos (Tabela 4), e selecionamos aqueles que gerariam uma sonda que não contivesse domínios conservados com outras proteínas como o grupamento heme, FAD e NAD, priorizando as combinações seqüências de regiões não conservadas ou do cofator de molibdênio.

Inicialmente, escolhemos a combinação de primers NR03 e NR10 que gera um produto de 116pb, compreendendo a região de 1875-1991 do clone, localizado entre os domínios heme e de ligação com FAD, na região “hinge 2”. Essa opção foi selecionada por não apresentar homologia com nenhuma seqüência já descrita no BLASTX. Também foram escolhidas aleatoriamente algumas sondas menores de 500pb, principalmente próximas ao início e término da seqüência, por serem regiões menos conservadas. As sondas selecionadas em amarelo na tabela 6 estão relacionadas à região prostética heme, presente em outras proteínas, e assim foram descartadas. As sondas construídas nas regiões terminais também foram descartadas por estarem

presentes em regiões prostéticas conservadas em outras proteínas, os sítios de ligação de FAD e NAD. Assim, inicialmente, foi priorizada a construção das sondas selecionadas em vermelho e azul, homólogas a região de molibdênio.

Tabela 4. Análise das possíveis sondas utilizando-se das combinações dos primers desenhados durante o sequenciamento da NR (Tabela 2). R - primers “reverse” (coluna 1), F - primers “forward” (linha 1). Em colorido as possíveis sondas selecionadas, cada cor (vermelho, amarelo, verde e marrom) representa o domínio conservado de NR na seqüência de aminoácidos no clone 29.

Primers R/F	NRSTART	NR01	NR09	NR12	NR03	NR11
NR07	463					
NR08	916	455				
NR06	1323	912	454			
NR04	1473	1012	554			
NR05	1525	1064	606			
NR10	1983	1522	1064	329	116	
NR13	2176	1715	1257	522	309	
NR02	2584	2123	1665	930	717	274
NRSTOP	2781	2320	1862	1127	914	471

O resultado de hibridização em Northern blots para as sondas de NR construídas a partir dos moldes selecionados de 500 pb apresentou baixo reconhecimento. Então se optou por sondas maiores que 500 pb, no intuito de aumentar a sensibilização de resposta ao mRNA da NR. Neste sentido, foi dada preferência a maior sonda com 2781 pb (em azul na Tabela 4), que compreende a seqüência completa da NR e foi gerada utilizando os primers NR START e NR STOP.

Como controle do experimento, foi utilizada a sonda constitutiva 18S (descrita na etapa de hibridização da técnica de Northern blot, item 3.5.2), construída com o kit Ready-to-go a partir da fita molde preparada por PCR com primers desenhados para regiões conservadas em algas vermelhas.

4.5.2. Northern Blot

Devido à dificuldade de padronização da técnica, em que apenas tínhamos sucesso na hibridização controle com 18S, algumas mudanças metodológicas foram conduzidas para aumentar a sensibilidade na hibridização com NR. Nesse intuito, aumentamos a concentração do RNA total de 10 µg para 20 µg, tentamos induzir a expressão da NR aumentando a concentração de NO_3^- de 0,5 mmol.L⁻¹ para 5 mmol.L⁻¹ (Zhen & Oaks, 1994), mas em ambas tentativas não tivemos sucesso.

As condições adequadas que confirmaram o ritmo da expressão do mRNA de NR (Figura 19) foi estabelecida mantendo a concentração de RNA total em 10 µg e de NO_3^- de 0,5 mmol.L⁻¹, e mudando as condições hibridização, para uma baixa “estringência”, com o abaixamento da temperatura de 65°C para 37°C, a adição de formamida 50% em solução de

hibridização e com a diminuição do número de lavagens pós-hibridização da membrana de 3 para apenas 1 lavagem de 5 min. Foram utilizados 10 µg de RNA total extraído com a metodologia otimizada e hibridizado contra a sonda constitutiva 18S e contra a sonda contendo a seqüência inteira da NR (Figura 18).

Figura 18. Imagens do RNA extraído no transiluminador (A) e do resultado do Northern blot para as sondas 18S (B) e NR (C) para uma das réplicas das algas processadas na primeira hora de luz e assim por diante a cada 3 horas durante o período de 24 h nos períodos de claro (barras brancas) e escuro (barra preta).

Embora seja possível observar que a extração de RNA total nos diferentes horários de coleta apresentam níveis diferentes de concentração, quando normalizados pelos níveis do controle 18S (que refletem essa variação), evidenciam a variação da expressão do mRNA da NR, como pode ser observado na Figura 19 uma oscilação do mRNA de NR, em que há uma maior concentração do transcrito durante a fase de claro.

Figura 19. Ritmo da expressão do mRNA de NR obtido para as triplicatas experimentais de Northern blot, com a intensidade relativa em pixels da sonda de NR pela sonda de 18S analisadas no programa Imagequant. Estatisticamente analisado por ANOVA com $p < 0,05$.

A expressão máxima do mRNA de NR ocorre entre a sétima e a décima hora de luz, com um aumento de aproximadamente 2 vezes na expressão comparado aos níveis basais de expressão.

Para análises mais precisas e confirmação dos dados obtidos com a técnica de Northern blot, passamos a utilizar a técnica de RT-PCR.

4.5.3. RT-PCR

Para utilizar o oligo dT como iniciador da transcrição reversa, procuramos outro gene constitutivo na biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata* e selecionamos a Actina. A sequência da Actina foi submetida ao BLASTX e BLASTN para evitar construir primers para regiões homólogas em outras espécies ou a outros genes. Utilizamos o programa Primer Express da Applied Biosystems para seleção dos primers tanto para Actina como para NR (Tabela 5). Estes primers deveriam gerar um produto pequeno e de tamanho semelhante para garantir mesma intensidade de fluorescência por dupla fita sintetizada, uma vez que o SYBR green hibridiza aleatoriamente a duplas fitas em função do tamanho da sequência. Um produto pequeno é vantajoso por diminuir o tempo de extensão na reação de PCR. Para NR tomou-se o mesmo cuidado na seleção da região amplificada, evitando regiões de grupos prostéticos.

Com os primers construídos, o experimento de otimização da RT-PCR foi iniciado. Para isso extraímos um volume grande de RNA total a partir de uma amostra coletada na sétima hora de luz, onde foi estimado pelos resultados de Northern blot haver uma maior expressão de NR e assim evitar a não identificação do produto de NR por baixa expressão.

Tabela 5. Características dos primers construídos (*F – “forward” e R – “reverse”). Região de início e término, tamanho em pares de bases (pb), temperatura de dissociação, porcentagem GC e seqüências das bases.

	início/fim	pb	Tm (°C)	%GC	seqüência
NR F*	1283/1305	23	58	39	CACCATTGACAATTCGTGTTTC
NR R*	1346/1330	17	59	65	GGCACGGCATCGAAGCT
Produto NR	1283/1330	64	79-84	59	CACCATTGACAATTCGTGTTTC TCAACGTTGCT GCGGGCGCCGGGG AGCTTCGATGCCGTGCC
Actina F*	90/111	22	59	45	GCCCAAACAAAAGGGTATCATG
Actina R*	153/136	18	60	67	GGCAGCGTCTCCGACGTA
Produto Actina	90/153	64	79-84	59	GCCCAAACAAAAGGGTATCATG GTGCGGCACGG GCCAGAAGGATGAGTAC GTCGGAGACGCTGCC

O RNA total resultante obteve baixa contaminação por carboidratos e proteínas, com relações $260/230 = 2,36$ e $260/280 = 1,89$. Como controle, uma reação de PCR diretamente com o RNA total extraído era realizada para garantir a ausência de DNA contaminante. Isso porque o DNA contaminante serviria de molde na reação de PCR ao invés do cDNA sintetizado.

A amplificação funcionou para os dois primers com produtos de Tm diferentes (Figura 20), caracterizando e diferenciando os produtos, no entanto tivemos problemas com a formação de dímeros de primers, tanto para NR como para Actina (Figura 21).

Figura 20. Curvas de dissociação para os produtos de NR e Actina na RT-PCR evidenciando Tm diferente para os produtos gerados.

Figura 21. Formação de dímeros para os primers de NR (barras listradas) e Actina (barras brancas) que são amplificados a partir do ciclo 25 da RT-PCR, independente da concentração de primers na reação.

No entanto, a formação de dímeros não impediu a amplificação dos cDNAs sintetizados, com Ct menores que os de formação dos dímeros. Isto pode ser devido ao fato que na presença do molde, o anelamento primer-molde tem preferência à formação dos dímeros. Mas outro problema foi que as reações de RT-PCR para actina não amplificavam produto algum, e foi impossível normalizar os dados. Passamos assim a utilizar a técnica de PCR semi-quantitativa.

4.5.4. PCR semi-quantitativa

Devido à formação de dímeros passamos a PCR semi-quantitativa, e primeiramente foi estabelecida a fase exponencial da reação com uma amostra aleatória, sem darmos importância ao horário de coleta da alga. A reação otimizada para os primers de 18S e NR está apresentada nas Figuras 22 e 23.

Figura 22. Imagem do gel de agarose 1,5% para a PCR semi-quantitativa de 18S e NR. Os números abaixo das bandas indicam os ciclos de parada da reação em triplicata e C indica o controle para a amostra de RNA após 40 ciclos mostrando que não há contaminação por DNA na amostras.

Figura 23. Intensidade das bandas da Figura 22 analisadas no Imagequant para NR (quadrado) e 18S (triângulo) durante os ciclos da PCR semi-quantitativa para as amostras em triplicata.

É possível observar que a fase exponencial estava entre os ciclos 20 e 30 e utilizamos estes ciclos preferencialmente para análise.

Num intervalo de 48 horas, a alga foi coletada a cada 4 horas e o RNA total foi extraído segundo o protocolo otimizado com GHCl e KOAc 0,2 mol.L⁻¹.

Todas as amostras foram verificadas quanto a contaminação por DNA através da PCR a partir do RNA extraído e nenhum produto foi gerado, garantindo a ausência de DNA nas amostras.

Estas amostras foram então submetidas à reação de RT e a PCR semi-quantitativa e os dados gerados estão apresentados nas Figuras 24.

Figura 24. Relação da expressão de NR pelo controle interno 18S para um período de 48 horas. A fase de claro está representada pela barra branca e de escuro pela barra preta.

O mRNA de NR é fortemente expresso nas últimas horas de escuro e no restante do dia se mantém com expressão praticamente basal, com pequenas variações (Figura 24). O ritmo é repetido a cada 24 horas sendo a intensidade de expressão aproximadamente 3 vezes maior que a basal nas últimas horas da noite.

Comparativamente aos dados de Northern blot, há um ritmo de expressão do mRNA de NR em *G. tenuistipitata*, embora os máximos de expressão sejam diferentes nas duas técnicas.

5. DISCUSSÃO

O estudo de NR é de grande importância, uma vez que esta enzima é a primeira no processo de assimilação de nitrogênio, principal macronutriente limitante do crescimento de algas (Macchiavello, 1994).

O controle molecular da atividade da NR tem-se revelado muito complexo e tem sido foco de pesquisa pelo potencial de melhora do processo de cultivo, bem como da produtividade, pela intervenção nos processos limitantes ao crescimento de algas (Solomonson & Barber, 1990).

Análises genéticas dos genes de NR em plantas mostraram que a regulação acontece principalmente no nível transcricional. Uma vez que para *G. tenuistipitata* já haviam sido demonstradas as variações circadianas na concentração de NR e em sua atividade, ambas controladas pelo relógio biológico, a análise da variação dos níveis diários do mRNA se fez de extrema importância.

Nesse intuito foram identificados e seqüenciados os clones de NR na biblioteca diurna de cDNA de *G. tenuistipitata*, onde três clones foram identificados e após análises do seqüenciamento mais detalhado, chegou-se a seqüência completa de NR, do “start” ao “stop” códon. A obtenção da seqüência completa era esperada, uma vez que o clone 29 tem aproximadamente 2700 pb (ou 900 aminoácidos), e as seqüências de NR depositadas no Genbank para NR de bactérias, algas verdes e plantas superiores, têm entre 800-900 aminoácidos. Os domínios foram

caracterizados e se mostraram conservados em relação à NR de outros organismos, o BLASTX mostrou que a NR de *G. tenuistipitata* tem 51, 50 e 50% de identidade (68, 68, 67% de similaridade) com as NRs da alga verde *Chlorella vulgaris*, e com as angiospermas *Nicotiana tabacum* e *Lycopersicon esculentum*, respectivamente. Em plantas, a homologia de seqüência de aminoácidos encontrada entre as NR varia de 65 a 85%. Entre plantas e fungos, a homologia é inferior a 40% e entre plantas e algas 45% (Miyazaki *et al.* 1991; Cannons *et al.*, 1991).

O seqüenciamento gênico da NR de *G. tenuistipitata* caracterizou-se pela ausência de introns, diferentemente de todos os genes de NR descritos na literatura (Zhou & Kleinhofs, 1996). Sendo assim esta tese apresenta a primeira seqüência de NR sem a presença de introns e é também a primeira seqüência de NR descrita para algas vermelhas (Rhodophyta). A ausência de introns na NR de *G. tenuistipitata* pode ser uma característica do genoma deste organismo como um todo, ou até de algas vermelhas, mas não há biblioteca genômica para esta alga ou outras algas vermelhas para concluirmos isso, assim como pode ser mera característica deste gene para esta alga.

Embora a NR não seja utilizada usualmente como um marcador molecular para análises filogenéticas, a partir de um alinhamento inicial com a seqüência completa das proteínas, foi gerada uma matriz parcial, incluindo principalmente os domínios MoCo, Cyt-b5, FAD e parte do domínio NAD. A inclusão apenas dessas regiões mais conservadas permitiu a obtenção de resultados bastante coerentes com o que é estabelecido para outros

marcadores mais utilizados, como o SSU rDNA (Baldauf, 2003). A NR não apresenta sinal filogenético suficiente para recuperar divergências muito antigas como é o caso da monofilia de Chlorophyta e embriófita (Baldauf, 2003). Entretanto, o uso das seqüências de aminoácidos dos domínios conservados da proteína NR permitiu demonstrar a monofilia de grupos bem estabelecidos como as algas vermelhas (Rhodophyta); as algas verdes (Chlorophyta), as embriófitas com a briófitas *Physcomitrella patens* como grupo basal das agiospermas e as diatomáceas (Bacillariophyta). A não obtenção de suporte de “bootstrap” para o posicionamento do ascomiceto *Aspergillus nidulans*, nem para o oomyceto *Phytophthora infestans* está relacionado ao fato da NR não ser um marcador filogenético adequado para recuperar divergências muito antigas, já que os oomycetos e os ascomicetos fazem parte de linhagens filogeneticamente muito distintas dentro dos eucariotos (Baldauf, 2003).

A seqüência gênica completa da NR em uma alga vermelha é uma ferramenta importante para o estudo da NR de outras macroalgas. A partir da informação contida nesta seqüência foi possível a confecção de sondas e primers para estudos da variação da expressão do gene de NR em *G. tenuistipitata*.

A extração do RNA de um organismo rico em polissacarídeos pode ser bastante complexa, como podemos observar pelo grande número de artigos na literatura que tentam minimizar este problema (Gehrig *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002; Zeng & Yang, 2002). A dificuldade de uso de kits comerciais pela presença de colunas que entopem com a grande concentração de

polissacarídeos, limita as metodologias utilizadas para extração de RNA destes organismos, deixando a disposição apenas metodologias como a do TRIZOL[®] (Chomczynski & Sacchi, 2006) e do cloreto de cério (CsCl) (Chirgwin *et al.*, 1979). Sendo assim houve a necessidade da otimização da extração de RNA para *G. tenuistipitata* e esta tese oferece um procedimento utilizando TRIZOL[®], GHCl e KOAc. O método desenvolvido é rápido e simples com apenas 3 h de duração, principalmente quando comparado aos métodos utilizando CsCl que tem a duração média de 20 h, e é de baixo custo quando comparado às extrações com CsCl e com os kits comerciais. Além disto, este método otimizado torna a amostra livre de contaminantes como proteínas e DNA e minimiza a contaminação por polissacarídeos. A amostra resultante pôde ser utilizada em diversas análises como RT-PCR e Northern blot.

De posse do RNA total isolado livre de contaminantes, e da sequência de NR de *G. tenuistipitata*, passamos aos estudos da variação do mRNA de NR nesta alga. Os resultados obtidos em Northern blot e PCR semi-quantitativa mostraram claramente a oscilação dos níveis de mRNA de NR num período de 24 h. Embora a determinação precisa do horário de máxima expressão seja dúbia, uma vez que nos resultados de Northern a expressão máxima foi observada no meio da fase de claro e nos resultados de PCR semi-quantitativa este pico apareceu nas últimas horas de escuro, é evidente um ritmo na expressão deste gene. Este intervalo entre os horários dos picos pode ter fonte em diversos fatores como: diferentes horários de coletas, diferentes intervalos de coleta, saturação de imagens, imprecisão de

métodos e principalmente na estabilidade do mRNA. É sabido que RNAs são altamente instáveis e facilmente degradáveis, e mesmo com todos os cuidados de manipulação, taxas divergentes de degradação podem ter ocorrido entre as amostras.

A ritmicidade observada para o mRNA de NR corrobora a resultados anteriormente produzidos no laboratório (Lopes, 2001), em que há apenas um pico para os níveis protéicos e atividade da NR de *G. tenuistipitata* no período de 24 h.

Os picos máximos de expressão do mRNA de NR obtidos neste trabalho são condizentes com os dados da literatura onde os níveis do mRNA de NR freqüentemente aumentam ao final da noite ou no início do dia, e então diminuem, voltando a aumentar no final da noite (Scheible *et al.*, 1997; Geiger *et al.*, 1998).

Este intervalo de picos máximos de transcrição durante as últimas horas de escuro e tradução e atividade da proteína no meio da fase de claro, é mantido por muitas plantas como descrito por Matt e colaboradores (2001).

Galangau e colaboradores (1988) demonstraram que os níveis de mRNA de NR, quantidade de proteína e atividade apresentam oscilação diurna em *Nicotiana tabacum* e *Lycopersicon esculentum*.

Devido à observação de uma expressão do gene de NR em todas as horas do dia, mesmo que em níveis basais, existe a possibilidade da existência de um único gene de NR em *G. tenuistipitata* que teria sua expressão constante e em alguns momentos do dia, teria a transcrição induzida, aumentando o conteúdo total dos mRNA de NR. No entanto, como

trabalhamos com uma região conservada de molibdênio da NR em nossos experimentos, podemos também ter observado este comportamento devido a existência de dois genes de NR, como descrito para *Nicotiana tabacum* (Vaucheret *et al.*, 1989), em que um gene seria constitutivo e o outro possuiria um regulador de sua expressão.

Para dar continuidade ao trabalho, poderiam ser estudadas as variações da expressão em condições de luz constante, uma vez que a luz é o principal fator externo regulador ou sincronizador de ritmos biológicos, e assim avaliar o ritmo circadiano e o controle exercido pelo relógio biológico.

6. CONCLUSÕES

► A biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata* apresenta 2 clones para NR localizados nas placas 28 e 29 nas posições E11 e B08 respectivamente. O clone da placa 28 é parte do clone da placa 29. A técnica de “primer walking” foi eficaz no seqüenciamento do clone de NR e possibilitou a identificação de um clone com 2932pb compreendendo desde o “start” ao “stop” códon, informação da região do nucleotídeo 12 ao 2744, mantendo intacta toda informação desta proteína. O clone também possui uma região 3' não traduzida e a cauda de poli A. Estes dados são de extrema importância para o reconhecimento da regulação da expressão gênica de NR em macroalgas.

► O seqüenciamento genético mostrou que não há introns no gene de NR de *G. tenuistipitata* sendo esta a primeira seqüência de NR descrita para uma alga vermelha, e o primeiro gene de NR que não possui introns. A proteína NR de *G. tenuistipitata* com 910 aminoácidos tem 51, 50 e 50% de identidade (68, 68, 67% de similaridade) com *Chlorella vulgaris*, *Nicotiana tabacum* e *Lycopersicon esculentum*, respectivamente.

► A metodologia mais eficiente para extração do RNA total de *G. tenuistipitata*, minimizando a contaminação por polissacarídeos, utilizou GHCl, TRIZOL[®] e KOAc.

► No estudo da variação da expressão do mRNA de NR foram utilizadas as técnicas de Northern blot, RT-PCR e PCR semi-quantitativa. Os resultados inferem que certamente há uma ritmicidade do mRNA de NR, com oscilação diária e pico de expressão entre as últimas horas de escuro e as primeiras horas de claro. Uma vez que existe uma variação na expressão do gene de NR em *G. tenuistipitata*, a regulação da NR ocorre na transcrição.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.W.; Mortenson, L.E. (1985). Mo Reductases: Nitrate Reductase and Formate Dehydrogenase. *In: Molybdenum Enzymes*. Spiro, T.G. [Ed.]. Princeton University, John Wiley & Sons, NY, 519-593.
- Adhiya, J.; Cai, X-H.; Sayre, R.T.; Traina, S. (2002). Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 210: 1-11.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Armisen, R. (1995). World-wide use and importance of *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* 7: 231-243.
- Aschoff [Ed.] (1981). *Handbook of Behav. Neurobiol. Biol. Rhythms*. Plenum Publ. Co.
- Baldauf, S.L. (2003). The deep roots of eukaryotes. *Science* 300: 1703-1706.
- Beevers, L.; Schrader, L.E.; Flesher, D.; Hageman, R.H. (1965). Role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiology*, 40(4): 691-698.
- Bellorin, A.; Oliveira, M.C.; Oliveira, E.C. (2002). Phylogeny and Systematics of the marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on small subunit rDNA and ITS sequences of Atlantic and Pacific Species. *J. Phycol.* 38: 551-563.
- Berges, J.A.; Franklin, D.J.; Harrison, P.J. (2001). Evolution of an artificial seawater medium: Improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *J. Phycol.* 37: 1138-1145.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1-2): 248-254.
- Cai, X-H.; Logan, T.; Gustafson, T.; Traina, S.; Sayre, R.T. (1995). Applications of eukaryotic algae for the removal of heavy metals from water. *Molec. Mar. Biol. Biotech.* 4: 338-344.

- Cai, X-H.; Brown, C.; Adihya, J.; Traina, S.; Sayre, R.T. (1998). Heavy metal binding properties of wild type and transgenic algae (*Chlamydomonas* sp.). *In: New Developments in Marine Biotechnology*. Le Gal, Y.; Halvorson, H. [Eds.]. Plenum Press, 199-202.
- Cai, X-H.; Brown, C.; Adihya, C.; Traina, S.; Sayre, R.T. (1999). Growth and heavy metal binding properties of transgenic algae (*Chlamydomonas reinhardtii*) expressing a foreign metallothionein gene. *Int. J. Phytoremediation* 1: 53-65.
- Campbell, W.H. (2001). Structure and function of eukaryotic NAD(P)H : nitrate reductase. *Cellular And Molecular Life Sciences* 58 (2): 194-204.
- Cannons, A.C.; Iida, N.; Solomonson, L.P. (1991). Expression of a cDNA clone encoding the haem-binding domain of *Chlorella* nitrate reductase. *The Biochemical Journal* 278 (1): 203-209.
- Cardozo, K.H.M.; Guaratini, T.; Barros, M.P.; Falcão, V.R.; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; Campos, S.; Torres, M.A.; Souza, A.O.; Colepicolo, P.; Pinto, E. (2006a). Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C*. no prelo.
- Cardozo, K.H.M.; Carvalho, V.M.; Pinto, E.; Colepicolo, P. (2006b). Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2): 253-258.
- Carrette, O.; Burkhard, P.R.; Sanchez, J.; Hochstrasser, D.F. (2006). State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nature Protocols* 1(2): 812-823
- Chen, Y.H.; Tu, C.J.; Wu, H.t. (2004). Growth-inhibitory effects of the red alga *Gelidium amansii* on cultured cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 180–184.
- Chiang, Y.M., Lin, J.L. (1989) Nitrate uptake by nitrogen-starved plants of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*. *Jpn J. Phycol.* 37: 187-193.
- Chirgwin, J.M.; Przybyla, A.E.; MacDonald, R.J.; Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294–5299.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162(1): 156-159.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 1(2): 581-585.

- Chow, F.; de Oliveira, M.C.; Pedersen, M. (2004). In vitro assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*. *J. Plant Physiol.* 161(7): 769-776.
- Collen, J.; Pinto, E.; Pedersen, M.; Colepicolo, P. (2003). Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45 (3): 337-342.
- Corzo, A.; Niell, F.X. (1992). Inorganic nitrogen metabolism in *Ulva rigida* illuminated with blue light. *Mar Biol* 112: 223–228.
- Cotelle, V.; Meek, S.E.M.; Provan, F.; Milne, F.C.; Morrice, N.; MacKintosh, C. (2000). 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells *Embo Journal* 19 (12): 2869-2876.
- Crichtley, A.T. (1993). *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales): an economically important agarophyte. In: Seaweed cultivation and marine ranching. Ohno, M.; Crichtley, M. [Eds]. Jica, Yolosuka, Japan, 89-112.
- Dalling, M.J.; Tolbert, N.E.; Hageman, R.H. (1972). Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. I. Spinach and tobacco leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 283: 505-512.
- Daugherty, K.B.; Bird, T.K. (1988). Salinity and temperature effects on agar production from *Gracilaria verrucosa* strain G-16. *Aquaculture* 75: 105-113.
- Davison, I.R.; Stewart, W.D.P. (1984). Studies on nitrate reductase activity in *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. II. The role of nitrate availability in the regulation of enzyme activity. *J Exp Mar Biol Ecol* 79: 65-78.
- Dawson, H.N.; Pendleton, L.C.; Solomonson, L.P.; Cannons, A.C. (1996). Cloning and characterization of the nitrate reductase-encoding gene from *Chlorella vulgaris*: structure and identification of transcription start points and initiator sequences. *Gene* 171(2): 139-145.
- De la Rosa, M.A.; Diez, M.A.; Vega, J.M.; Losada, M. (1980). Purification and properties of assimilatory nitrate reductase from *Ankistrodesmus braunii*. *Eur. J. Biochem.* 106: 249-256.
- De La Rosa, M.A.; Vega, J.M.; Zumft, W.G. (1981). Composition and structure of assimilatory nitrate reductase from *Ankistrodesmus braunii*. *J. Biol. Chem.* 256: 5814-5819.
- Deng, M.; Moureaux, T.; Leydecker, M.T.; Caboche, M. (1990). Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* 180: 257-261.

- Deng, M-D.; Moureaux, T.; Cherel, I.; Boutin J-P.; Caboche, M. (1991). Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. *Plant Physiol. Biochem.* 29: 239–247
- Dinev, N.; Mitova, I. (1996). Heavy metals (Cr, Ni, Cd) and some physiological changes in sunflower plants. *Pochvoznanie, Agrokhimiya i Ekologiya. Soils Science and Strategy for Sustainable Agriculture* 31(3): 74-75.
- Dunlap, J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96 (2): 271-290.
- Edmunds (1984). *Adv. in Microbial Physiol.* 25: 61.
- Edwards, P. (1970). Illustrated guide to sea weeds and sea grasses, in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contr. Mar. Sc., Austin* 15: 1-228.
- Eppley, R.W.; Packard, T.T.; MacIsaac, J.J. (1970). Nitrate reductase in Peru Current phytoplankton. *Marine Biology* 6(3): 195-199.
- Evans, H.J.; Nason, A. (1953). Pyridine nucleotide nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiology* 28 (2): 233-254.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.
- Ferguson, A.R.; Bollard, E.G. (1969). Nitrogen metabolism of *Spirodela oligorrhiza*. I. Utilization of ammonium, nitrate, and nitrite. *Planta* 88 (4): 344-352.
- Ferretti, M.; Merlo, L.; Passera, C.; Ghisi, R. (1995). Influence of irradiance on enzymes of sulphate and nitrate assimilation pathways in maize leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 33:111–114.
- Fischer, P.; Klein, U. (1988). Localization of nitrogen assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 88: 947-952.
- Fritz, L.; Stingher, C.G.; Colepiccolo, P. (1996). Immunolocalization of nitrate reductase in the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* (Pyrrophyta). *J. Phycol.* 32: 632-637.
- Galangau, F.; Danielvedele, F.; Moureaux, T.; Dorbe, M.F.; Leydecker, M.T.; Caboche, M. (1988). Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol.* 88 (2): 383-388.

- Gehrig, H.H.; Winter, K.; Cushman, J.; Borland, A.; Taybi, T. (2000). An Improved RNA Isolation Method for Succulent Plant Species Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 369-376.
- Geiger, M.; Walch-Liu, P.; Engels, C.; Harnecker, J.; Schulze, E.D.; Ludewig, F.; Sonnewald, U.; Scheible, W.R.; Stitt, M. (1998). Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 21 (3): 253-268.
- Gekeler, W.; Grill, E.; Winnacker, E-L.; Zenk, M.H. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archiv. Microbiol.* 150: 197-202.
- Gibson, J.A.E.; Garrick, R.C.; Burton, H.R.; Mctaggart, A.R. (1990). Dimethylsulfide and the alga *phaeocystis-pouchetii* in antarctic coastal waters. *Marine Biology* 104 (2): 339-346.
- Goering, J.J.; Dugdale, R.C.; Menzel, D.W. (1964). Cyclic diurnal variations in the uptake of ammonia and nitrate by photosynthetic organisms in the sargasso sea. *Limnol. Oceanogr.* 9 (3): 448-451.
- Goncalves, A.G.; Ducatti, D.R.; Duarte, M.E.; Noseada, M.D. (2002). Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. *Carbohydr. Res.* 337: 2443-2453.
- Granbom, A.; Chow, F.; Lopes, P.F.; de Oliveira, M.C.; Colepiccolo, P.; de Paula, E.J.; Pedersen, M. (2004). Characterisation of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). *Aquatic Botany* 78 (4): 295-305.
- Grant, B.R.; Turner I.M. (1969). Light-stimulated nitrate and nitrate assimilation in several species of algae. *Comp. Biochem. Physiol.* 29 (3): 995-1004.
- Grill, E.; Winnacker, E-L.; Zenck, M. (1985). Phytochelatins: The principle heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230:674-676.
- Guerinot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 190-198.
- Haglund, K.; Pedersen, M. (1993). Outdoor pond cultivation of the subtropical marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* in brackish-water in Sweden - growth, nutrient-uptake, cocultivation with rainbow-trout and epiphyte control. *J. Appl. Phycol.* 5 (3): 271-284.

- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hastings, J.W.; Rusak, B.; Boulos, Z. (1991). Circadian rhythms: the physiology of biological timing. *In: Offprint from neural and integrative animal physiology.* Prosser, L.D. [Ed.]. Wiley-Liss, 435-456.
- Hemmingson, J.A.; Furneaux, R.H.; MurrayBrown, V.H. (1996). Biosynthesis of agar polysaccharides in *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan et Oliveira. *Carbohydr. Res.* 287: 101-115.
- Hewitt, E.J. (1975). Assimilatory nitrate-nitrite reduction, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26: 73-100.
- Hollnagel, H.C.; Di Mascio, P.; Asano, C.S.; Okamoto, O.K.; Stringher, C.G.; Oliveira, M.C.; Colepicolo, P. (1996). The effect of light on the biosynthesis of b-carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 29(1): 105-110.
- Homma, K.; Hastings, J.W. (1989). Cell growth kinetics, division asymmetry and volume control at division in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*: a model of circadian clock control of the cell cycle. *J. Cell Sci.* 92 (2): 303-318.
- Howarth, D.G.; Baum, D.A. (2002). Phylogenetic utility of a nuclear intron from nitrate reductase for the study of closely related plant species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23(3): 525-528.
- Howe, G.; Merchant S. (1992). Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 98:127-136.
- Hu, C.G.; Honda, C.; Kita, M.; Zhang, Z.; Tsuda, T.; Moriguchi, T. (2002). A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter* 20(1): 69/1-69/7.
- Huber, S.C.; MacKintosh, C.; Kaiser, W.M. (2002). Metabolic enzymes as targets for 14-3-3 proteins. *Plant Mol.Biol.* 50: 1053-1063.
- Johnson, C.H.; Hastings, J.W. (1986). The elusive mechanism of the circadian clock. *Am. Scientist* 74 (1): 29-36.
- Jones, T.L.; Tucker, D.E.; Ort, D.R. (1998). Chilling delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reductase activity in tomato. *Plant Physiol.* 118(1): 149-158.

- Kaiser, W.M.; Brendle-Behnisch, E. (1991). Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. I. Modulation in vivo by CO₂ availability. *Plant Physiol.* 96: 363-367.
- Kaiser, W.M.; Huber, S.C. (1997). Correlation between apparent activation state of nitrate reductase (NR), NR hysteresis and degradation of NR protein. *J Exp Bot* 48 (312): 1367-1374.
- Kaiser, W.M.; Huber, S.C. (2001). Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Bot.* 52 (363): 1981-1989.
- Kastle, J.H.; Elvove, E. (1904). On the reduction of nitrates by certain plant extracts and metals, and the accelerating effect of certain substances on the process of reduction *Am. Chem. J.* 31: 606-639.
- Kevresan, S.; Petrovic, N.; Popovic, M.; Kandrak, J. (1998). Effect of heavy metals on nitrate and protein metabolism in sugar beet. *Biol. Plant.* 41(2): 235-240.
- Lane, T.W.; Morel, F.M.M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *PNAS* 97: 4627-4631.
- Lea, U.S.; ten Hoopen F.; Provan, F.; Kaiser, W.M.; Meyer, C.; Lillo, C. (2004). Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and roots tissue. *Planta* 219 (1): 59-65.
- Lee, J.G.; Ahner, B.A.; Morel, F.M.M. (1996). Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environ. Sci. Technol.* 30:1814-1821.
- Lee, T.M.; Chang, Y.C.; Lin, Y.H. (1999). Differences in physiological responses between winter and summer *Gracilaria tenuistipitata* (Gigartinales, Rhodophyta) to varying temperature *Bot. Bul. Acad. Sin.* 40 (1): 93-100.
- Lillo, C. (1984). Circadian rhythmicity of nitrate reductase-activity in barley leaves. *Physiol. Plant.* 61 (2): 219-223.
- Lillo, C.; Ruoff, P. (1984). A minimal model of light-induced circadian rhythms of nitrate reductase activity in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 62(4): 89-92.
- Lillo, C.; Ruoff, P. (1989). Unusually rapid light-induced nitrate reductase messenger-rna pulse and circadian oscillations. *Naturwissenschaften* 76 (11): 526-528.

- Lillo, C.; Smith, L.H.; Nimmo, H.G.; Wilkins, M.B. (1996). Rhythms in magnesium ion inhibition and hysteretic properties of nitrate reductase in the CAM plant *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Physiol. Plant.* 98 (1): 140-146.
- Lillo, C.; Meyer, C.; Ruoff, P. (2001). The nitrate reductase circadian system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. *Physiol. Plant.* 125 (4): 1554-1557.
- Lillo, C.; Lea, U.S.; Leydecker, M-T.; Meyer, C. (2003). Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in constitutive activation of the enzyme in vivo and nitrite accumulation. *The Plant Journal* 35: 566-573.
- Lillo, C.; Meyer, C.; Lea, U.S.; Provan, F.; Olstedal, S. (2004). Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *J. Exp. Bot.* 55(401): 1275-1282.
- Lopes, P.F.; Oliveira, M.C.; Colepicolo, P. (1997). Circadian fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 33: 225-231.
- Lopes, P.F. (2001). Caracterização Bioquímica e Regulação da Nitrato Redutase na Macroalga Marinha *Gracilaria tenuistipitata*. Tese de Doutorado. Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- Lopes, P.F.; Oliveira, M.C.; Colepicolo, P. (2002). Characterization and daily variation of nitrate reductase in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295: 50-54.
- Lopez-Ruiz, A.; Roldan, J.M.; Veebelen, J.P.; Diez, J. (1985). Nitrate reductase from *Monoraphidium braunii*. *Plant Physiol.* 78: 614-618.
- Luttge, U. (2003). Circadian rhythmicity: is the "biological clock" hardware or software? *Progress in Botany* 64: 277-319.
- Macchiavello, J. (1994). Tolerância fisiológica e características do agar de cinco espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Macchiavello, J.; Saito, R.; Garofalo, G.; Oliveira, E.C. (1999). A comparative analysis of agarans from commercial species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) grown in vitro. *Hydrobiologia* 399: 397-400.
- Mackintosh, C.; Douglas, P.; Lillo, C. (1995). Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*spinacia-oleracea*) leaves. *Plant Physiol.* 107 (2): 451-457.

- Marinho-Soriano, E. (2001). Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta Gracilariaceae). *J. Biotechnol.* 89: 81–84.
- Marinho-Soriano, E.; Bourret, E. (2003). Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae Rhodophyta). *Bioresour. Technol.* 90, 329–333.
- Mcmurry, L.; Hastings, J.W. (1972). No desynchronization among 4 circadian-rhythms in unicellular alga, *Gonyaulax-polyedra*. *Science* 175 (4026): 1137&.
- Mehta, S.K.; Gaur, J.P. (1999). Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.* 143: 253-259.
- Meyer, C.; Gonneau, M.; Caboche, M.; Rouze, P. (1995). Identification by mutational analysis of 4 critical residues in the molybdenum cofactor domain of eukaryotic nitrate reductase *Febs Letters* 370 (3): 197-202.
- Miyazaki, J.; Juricek, M.; Angelis, K.; Schnorr, K.M.; Kleinhofs, A.; Warner, R.L. (1991). Characterization of the association of nitrate reductase with barley (*Hordeum vulgares*) root membranes. *Mol. Gen. Genet.* 228: 329-334.
- Nagalakshmi, N.; Prasad, M.N.V. (1998). Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: Protective role of free radical scavengers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (5): 623-628.
- Nakamura, Y.; Ikawa, T. (1993). Purification and Properties of NADH:Nitrate Reductase from the Red Alga *Porphyra yezoensis*. *Plant and Cell Physiology* 34 (8): 1239-1249.
- Nason, A. (1962). Symposium on metabolism of inorganic compounds II. *Bact. Rev.* 26: 16-41.
- Nicholas, D.J.D.; Nason, A.; McElroy, W.D. (1954) *J. Biol. Chem.* 202: 655-674.
- Nriagu, J.O.; Pacyna, J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of the air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.
- Oliveira & Alveal (1990). *In: Introduction to Applied Phycology*. Akatsuka, I. [Ed]. SPB Acad Publ bv, The Hague, 553.

- Paula, E.J.; Plastino, E.M.; Berchez, F.A.; Oliveira, M.C. (1997). *Algas: Apostila do curso "Morfologia e taxonomia de criptógamas"* do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Petrovic, N.; Richter, R.; Kastory, R. Effect of lead, cadmium, mercury, and iron on the performance of nitrate reductase in sugar beet. *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk* 40 (10): 103-105.
- Pilgrim, M.L.; Caspar, T.; Quail, P.H.; McClung, C.R. (1993). Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. *Plant Mol.Biol.* 23(2): 349-364.
- Pinto, E.; Sigaud-Kutner, T.C.S.; Leitao, M.A.S.; Okamoto, O.K.; Morse, D.; Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39 (6): 1008-1018.
- Piotrowski, M.; Oecking, C. (1998). Five new 14-3-3 isoforms from *Nicotiana tabacum*: Implications for the phylogeny of plant 14-3-3 proteins. *Planta* 204 (1): 127-130.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 25: 159-184.
- Pollock, M.R.; Wainwright, S.D. (1948). The relationship between nitratase and tetrathionase adaptation and cell growth *British Journal Of Experimental Pathology* 29 (3): 223-240.
- Pouteau, S.; Cherel, I.; Vauchert, H.; Caboche, M. (1989). Nitrate reductase messenger-rna regulation in *nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutants. *Plant Cell* 1 (11): 1111–1120.
- Provan, F.; Lillo, C. (1999). Photosynthetic post-translational activation of nitrate reductase. *J. Plant Physiol.* 154: 605-609.
- Rai, L.C.; Singh, A.K.; Mallick, N. (1991). Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 137(4): 419-424.
- Ramalho, C.B.; Hastings, J.W.; Colepicolo, P. (1995). Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *Lingulodinium polyedrum* is due to changes in cellular protein levels. *Plant Physiol* 107:225-231.
- Raskin, I.; Kumar, P.N.; Dushenkov, S.; Salt, D.E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 285-290.

- Riens, B.; Heldt, H.W. (1992). Decrease of nitrate reductase activity in spinach leaves during light±dark transitions. *Plant Physiol* 98: 573-577.
- Rocha, A.A. (1992). *Algae and Environment: A General Approach*, 34.
- Roenneberg, T.; Hastings, J.W. (1991). Are the effects of light on phase and period of the *Gonyaulax* clock mediated by different pathways?. *Photochem. Photobiol.* 53(4): 525-533.
- Roldan, J.M.; Verbelen, J.P.; Butler, W.L.; Tokuyasu, K.T. (1982). Intracellular localization of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* 70: 872-874.
- Rossa, M.M. (1999). A luz como fator de regula-c*ao da atividade enzim!atica da nitrato redutase (NR) e super!oxido dismutase (SOD) em *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta). Tese de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Rubinelli, P.; Siripornadulsil, S.; Gao-Rubinelli, F.; Sayre, R.T. (2002). Cadmium and iron-stress inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for H43 protein function in iron assimilation. *Planta* 215:1-13.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evolution* 4: 406-425.
- Sakihama, Y.; Nakamura, S.; Yamasaki, H. (2002). Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol.* 43 (3): 290-297.
- Santelices, B.; Doty, M.S. (1989). A review of *Gracilaria* farming. *Aquaculture* 78 (2): 95-133.
- Scheible, W-R.; GonzaÂles-Fontes, A.; Morcuende, R.; Lauerer, M.; Geiger, M.; Glaab, J.; Gojon, A.; Schulze, E-D.; Stitt, M. (1997). Tobacco mutants with a decreased number of functional nia genes compensate by modifying the diurnal regulation of transcription, post-translational modification and turnover of nitrate reductase. *Planta* 203: 304-319.
- Solomonson, L.P.; Lorimer, G.H.; Hall, R.L.; Borchers, R.; Bailey, J.L. (1975). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-nitrate reductase of *Chorella vulagaris*. *J. Biol. Chem.* 250: 4120-4127.
- Solomonson, L.P.; Barber, M.J. (1990). Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Ann. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:225-253.

- Song, B.; Ward, B.B. (2004). Molecular characterization of the assimilatory nitrate reductase gene and its expression in the marine green alga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 40(4): 721-731.
- Stefels, J.; Vanboekel, W.H.M. (1993). Production of DMS from dissolved DMSP in axenic cultures of the marine-phytoplankton species *Phaeocystis* sp. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 97 (1): 11-18.
- Stitt, M.; Muller, C.; Matt, P.; Gibon, Y.; Carillo, P.; Morcuende, R.; Scheible, W.R.; Krapp, A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 53 (370): 959-970.
- Swofford, D.L. (2000). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Syrett, P.J.; Morris, I. (1963). The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Specialized Section on Enzymological Subjects 67: 566-575.
- Sze, P. (1998). A biology of the algae, 3rd ed. WCB/McGraw Hill Publishers, 259.
- Tamura, K.; Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.
- Tucker, D.E.; Allen, D.J.; Ort, D.R. (2004). Control of nitrate reductase by circadian and diurnal rhythms in tomato. *Planta* 219 (2): 277-285.
- Vaucheret, H.; Kronenberger, J.; Rouze, P.; Caboche, M. (1989). Complete nucleotide sequence of the two homologous tobacco nitrate reductase genes. *Plant Mol.Biol.* 12(5): 597-600.
- Vaughn, K.C.; Duke, S.O.; Funkhouser, E.A. (1984). Immunochemical characterization and localization of nitrate reductase in norflurazon-treated soybean cotyledons. *Physiol. Plant.* 62(3): 481-484.
- Venkatramana, S.; Veeranjanyulu, K.; Das, V.S.R. Heavy metal inhibition of nitrate reductase. *Indian Journal of Experimental Biology* 16(5): 615-616.
- Visviki, I.; Rachlin, J.W. (1994). Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: Effects on ultrastructure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 154-162.
- Wallsgrave, R.M.; Lea, P.J.; Huffaker, R.C. (1979). Distribution on the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf Cell. *Plant Physiol.* 63: 232-236.

- Wang, R.; Guegler, K.; LaBrie, S.T.; Crawford, N.M. (2000). Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell* 12(8): 1491-1509.
- Wu, K.; Rooney, M.F.; Ferl, R.J. (1997). The *Arabidopsis* 14-3-3 multigene family. *Plant Physiol.* 114 (4): 1421-1431.
- Xue, H-B.; Stumm, W.; Sigg, L. (1988). The binding of heavy metals to algal surfaces. *Wat. Res.* 22: 917-926.
- Yamamoto, A.; Katou, S.; Yoshioka, H.; Doke, N.; Kawakita, K. (2003). Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. *Journal of General Plant Pathology* 69(4): 218-229.
- Yang, Z.J.; Midmore, D.J. (2005). A model for the circadian oscillations in expression and activity of nitrate reductase in higher plants. *Ann. Bot.* 96 (6): 1019-1026.
- Zeng, Y.; Yang, T. (2002). RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20(4): 417/1-417/5.
- Zhen Li, X., Oaks, A. (1994) Induction and Turnover of Nitrate Reductase in *Zea mays*. *Plant Physiol.* 106:1145-1149.
- Zhong, Z.J.; Troll, W.; Koenig, K.L.; Frenkel, K. (1990). Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res.* 50(23): 7564-7570.
- Zhou, J.; Kleinjohs, A. (1996). Molecular evolution of nitrate reductase genes. *J. Mol. Evol.* 42(4): 432-442.

ANEXO

Foi realizado um experimento piloto em triplicata com a alga cultivada segundo item 3.1 por dois dias para aclimatização e transferida para uma situação de luz constante com intensidade total de $90 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ no período de 24h. A comparação dos dados obtidos quando a alga foi submetida a luz constante e em ciclo claro-escuro (Figura 25), sugerem que há um controle endógeno na expressão do mRNA de NR em *G. tenuistipitata*, onde temos um primeiro pico com intensidade semelhante na “suposta” nona hora de escuro e então vemos um arrastamento de fase com máximos de expressão próximos a sexta hora de luz com repetição após 24h, apresentando um ritmo circadiano.

Novos experimentos por períodos superiores às 48h de exposição à luz e com intervalos mais curtos de coleta deveriam ser realizados para confirmar estes resultados.

Figura 25. Relação da expressão de NR pelo controle interno 18S para um período de 48 horas para amostras em triplicata com intervalos de 4 horas entre as coletas em ciclo claro (barra branca) e escuro (barra preta) (A) ou situação de claro constante (B).

APÊNDICE

Durante o doutorado também foi proposta a avaliação dos efeitos tóxicos de poluentes metálicos na expressão protéica de *G. tenuistipitata*, dando um enfoque especial à variação da enzima NR. Para avaliar a possível variação na expressão de NR e de outras proteínas em situações de estresse por metais, foram realizados géis bidimensionais. Uma vez que a técnica consiste em uma dimensão de localização isoeletrica e outra de separação por peso molecular, características conhecidas para NR de *G. tenuistipitata*, com pI 6,7 e subunidades de PM 110kDa, sua localização seria relativamente fácil em géis 2D.

Os organismos vivos requerem quantidades traço de alguns metais pesados essenciais como cobre, manganês, cobalto, níquel, ferro, selênio e zinco, para atividade de seu metabolismo. Estes metais funcionam como cofatores em enzimas, catalisam reações de óxido-redução, estabilizam estrutura de proteínas, e mediam interações protéicas. Uma vez que metais essenciais traço estão frequentemente presentes em baixa quantidade (<0,1% na crosta terrestre) ou ocorrem na forma de complexos insolúveis, ligantes especializados em alta afinidade por metais e transportadores de alta afinidade ou dependentes de energia são necessários pra provir metais essenciais traço e manter o metabolismo ativo (Guerrinot, 2000). A absorção de metais traço pode ser complicada pelo fato de muitos metais pesados tóxicos, como cádmio, mercúrio e chumbo competirem com os metais

essenciais (Guerrinot, 2000; Raskin *et al.*, 1994). Metais pesados tóxicos prejudicam o metabolismo mesmo em baixas concentrações, da ordem de ppb (partes por bilhão) a ppm (partes por milhão) (Nriagu & Pacyna, 1988). Tais elementos promovem diversos efeitos prejudiciais: formação de interações entre as proteínas e o metal; alteração do estado redox do organismo; geração de espécies reativas de oxigênio; inibição de síntese protéica e de pigmentos, crescimento, divisão celular, taxa respiratória e fotossíntese; modificações morfológicas; redução da biodiversidade; e também dano direto ao DNA e outras biomoléculas (Visviki & Ravhlen, 1994).

Enquanto o metabolismo de metais traço tem sido extensivamente investigado em plantas, organismos aquáticos ou marinhos têm recebido uma atenção consideravelmente menor (Raskin *et al.*, 1994). Organismos aquáticos freqüentemente crescem em ambientes pobres em metais traço (Howe & Merchant, 1992). Por exemplo, os níveis de cobre e ferro em água do mar são normalmente 0,1 ppb e 0,6 ppb, respectivamente. Metais pesados tóxicos como cádmio e cromo podem estar presentes em concentrações iguais ou superiores.

Algas devem não somente ter sistemas de alta afinidade por metais traço essenciais, mas também devem ser capazes de excluir ou detoxificar metais pesados tóxicos. Pesquisas no campo da genética mostraram que as algas são fontes de novos elementos genéticos envolvidos no metabolismo de metais, apresentando um potencial para aplicação biológica (Rubinelli *et al.*, 2002).

As algas podem tolerar ou metabolizar metais pesados tóxicos por uma variedade de mecanismos, incluindo seqüestro dos metais pela parede celular (Adhiya *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 1995, 1998, 1999; Xue *et al.*, 1988); síntese de pequenas moléculas de baixo peso molecular, como ascorbato, glutatona, piridinina, fitoquelatinas e prolina, que protegem contra o efeito tóxico dos metais pesados; super expressão de transportadores dos metais essenciais traço para compensar a entrada dos metais tóxicos (Rubinelli *et al.*, 2002), exclusão dos metais pesados da célula como conjugados (Lane & Morel, 2000; Lee *et al.*, 96); e reciclagem e reparo dos danos aos componentes sensíveis aos metais pesados (Gekeler *et al.*, 1988; Grill *et al.*, 1985; Mehta & Gaur, 1999).

Recentemente Collen e colaboradores (2003) descreveram os efeitos das concentrações sub-letais dos íons metálicos cobre e cádmio no metabolismo de oxigênio reativo em *Gracilaria tenuistipitata*, onde 0,2 ppm de Cu^{+2} ou 1 ppm de Cd^{+2} causaram uma diminuição no crescimento da alga em 60% e aumentaram os níveis de lipoperoxidação e de oxidação protéica, indicando um aumento do estresse oxidativo em algas na presença de metais poluentes. Ainda, o cobre apresentou um efeito mais tóxico que o cádmio, induzindo a atividade de enzimas antioxidantes como catalase, acorbato peroxidase e superóxido dismutase, na tentativa de suprimir os efeitos deletérios dos radicais de oxigênio gerados.

Um dos grandes problemas no cultivo das algas é gerado por poluentes marinhos que entram no mar por várias vias de acesso. Entre os poluentes mais nocivos ao meio ambiente, os metais pesados são os mais

abundantes e são adquiridos pelos organismos diretamente de ambientes contaminados ou indiretamente através da cadeia alimentar.

Hoje como consequência do aumento gradativo da poluição ambiental, organismos marinhos incluindo algas são expostos a diferentes contaminantes, os quais apresentam graus variados de toxicidade. Várias fontes destes elementos surgiram influenciando a sua ciclagem natural e conseqüentemente a sua disponibilidade aos diferentes processos biológicos.

O acúmulo de metais pode aumentar através da cadeia alimentar marinha. Este fato é bastante negativo, pois os metais pesados são rapidamente assimilados pelos organismos e retidos por longos períodos em seus tecidos, o que determina grandes fatores de concentração. *G. tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia é uma espécie que apresenta grande tolerância a fatores ambientais e é de fácil crescimento *in vitro*, servindo como um bom organismo modelo para várias análises.

Metais pesados são um dos principais poluentes acumulados no ambiente. Eles podem induzir um estresse direto ou indireto nos organismos submetidos à exposição em praticamente todos os processos fisiológicos e metabólicos (Kevresan *et al.*, 1998). Estes poluentes podem induzir significativamente um aumento do estresse oxidativo intracelular (Pinto *et al.*, 2003) e inibir a atividade de NR mesmo em baixas concentrações numa relação dose dependente em plantas (Venkatramana *et al.*, 1978; Petrovic *et al.*, 1987) e em algas (Rai *et al.*, 1991). A redução na atividade de NR foi

descrita como o melhor indicativo do efeito tóxico de metais pesados *in vivo* para plantas (Dinev & Mitova, 1996).

Com o intuito de avaliar os efeitos de metais pesados poluentes sobre a expressão protéica de *G. tenuistipitata*, inclusive a variação de NR, a alga foi submetida às concentrações de 1 ppm e 5 ppm de Cd^{+2} e 1 ppm de Cu^{+2} . A eletroforese em gel bidimensional de poliacrilamida (2D-PAGE) é o método mais popular e mais versátil de separação de proteínas dentre as tecnologias de proteômica, onde simultaneamente se detecta e quantifica até mil proteínas na mesma imagem do gel. (Carrete *et al.*, 2006).

Para eliminar a possibilidade de contaminação pelos metais selecionados em água do mar optamos por trabalhar com um meio artificial e aparentemente o método de extração mostrou o mesmo perfil bidimensional de distribuição protéica independentemente do meio de cultura (água do mar artificial ou natural) utilizado para o crescimento da alga. Não foi possível identificar nos resultados um “spot” de 110 kDa, correspondente a massa das subunidades de NR para esta alga. No entanto observamos que os metais cádmio e cobre diminuíram a expressão protéica por inibição da síntese e/ou por oxidação das proteínas que levam a sua degradação, como já demonstrado por Collen e colaboradores (2003), que evidenciaram a ocorrência de oxidação protéica nesta alga tratada com os mesmos metais.

Os experimentos de proteômica foram realizados no laboratório do Professor Richard Sayre, no Departamento de Biologia Celular e Molecular de plantas na Ohio State University. Para evitar a possível presença de poluentes provenientes do meio ambiente, que pudessem interferir o

experimento, as algas foram cultivadas em água do mar artificial modificada de Berges e colaboradores (2001). Uma vez que a solução de Von Stoch, contendo os nutrientes necessários, metais e vitaminas, foi adicionada ao meio, a água do mar artificial consistia nos sais: NaCl 0,43 mol.L⁻¹, KCl 9,3 mmol.L⁻¹, CaCl₂.2H₂O 10 mmol.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 25 mmol.L⁻¹, MgCl₂.6H₂O 23 mmol.L⁻¹ e NaHCO₃ 2,0 mmol.L⁻¹. Uma análise de proteômica controle em água do mar natural foi realizada para comparação com as proteínas expressas em água do mar artificial.

Para o experimento em água do mar artificial decidimos utilizar cádmio e cobre segundo as concentrações descritas por Collen e colaboradores (2003), de 1 ppm de Cd⁺² e 0,2 ppm de Cu⁺² para 1 g de *G. tenuistipitata* cultivada em 1L de meio de cultura. Para obtermos uma quantidade de proteína suficiente na análise de géis bidimensionais trabalhamos com 5g da alga e sendo assim foi utilizado 5 ppm de Cd⁺ (44,5 µmol.L⁻¹) e 1 ppm de Cu⁺² (15,7 µmol.L⁻¹). Para comparar o efeito na concentração do cádmio, utilizamos também 1 ppm de Cd⁺² (8,9 µmol.L⁻¹). Como fonte de Cd⁺² foi utilizado cloreto de cádmio hidratado (CdCl₂.21/2H₂O) e de Cu⁺², sulfato de cobre (CuSO₄).

Para estabelecimento do período de coleta foi feita uma curva de crescimento (em água do mar natural) sob condições padrões (item 3.1) através da pesagem da massa úmida de alga em função do tempo de cultivo. A coleta foi estabelecida no sexto dia, e o meio de cultivo foi renovado e a alga passou por 48 h de aclimação e 96 h de tratamento com o metal pesado.

Após as 96 h em presença dos metais, as amostras foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido. Foram então ressuspensas em 2,5 mL de tampão Tris 10 mmol.L⁻¹ pH8,0 com acetato de magnésio 5 mmol.L⁻¹, e então sonicadas por 2 min a 30% de intensidade em gelo com intervalos de 10 seg entre os pulsos, para uma melhor lise celular. As amostras foram então centrifugadas a 12000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e neste ponto estimamos o conteúdo protéico utilizando-se do método de Bradford (1976), utilizando como referência a curva padrão de BSA. O conteúdo protéico é precipitado com TCA 10% (ácido tricloro acético) em acetona, mais β-mercaptoethanol 0,07%, por 45 min a -20°C. Então foram novamente centrifugadas a 12000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Lavou-se o precipitado por duas vezes com acetona acrescida de β-mercaptoethanol 0,07% e gelada. As amostras então foram secadas a temperatura ambiente e ressuspensas em tampão Tris 30 mmol.L⁻¹, uréia 7 mol.L⁻¹, tiouréia 2mmol.L⁻¹, CHAPS 4%, com pH final de 8,5.

A concentração final das amostras era de 10 µg.µL⁻¹ de proteína. Em todas as soluções foi adicionado um coquetel inibidor de proteases (Sigma). As amostras foram acrescidas de 0,5% de tampão gradiente de pH imobilizado (IPG - contendo os anfolitos) pH 3-10 e aplicadas à tira de IPG com o mesmo gradiente de pH. As tiras foram incubadas por 12 h a temperatura ambiente para hidratação. Então a eletroforese da primeira dimensão foi realizada no IPGphor (Amersham) a 15°C por 60 kV.h, usando o programa 300 mV, 15 min; 500 mV, 30 min; 1000 V, 60 min; 8000 V, 7 h.

Após o término da localização isoeletrica as tiras foram removidas e equilibradas usando primeiro uma solução de Tris 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8; uréia 6 mol.L⁻¹; glicerol 30%; SDS 2% e ditioeritritol 2% por 12 min e depois em solução contendo Tris 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8; uréia 6 mol.L⁻¹; glicerol 30%; SDS 2%; iodoacetamida 2,5% e azul de bromofenol 0,5% por 5 min. A seguir as tiras foram enxaguadas e aplicadas sobre géis de poliacrilamida [acrilamida 13%; piperazina 0,42% diacrilamida (PDA)] e cobertas com agarose 0,5%. Os SDS-PAGE foram corridos a 8°C e 30 mA por gel utilizando o aparato de multicubas Criterion (Bio-Rad). Os géis foram corados com SyproRuby.

As imagens foram analisadas no software PDQuest da Bio-Rad. As análises foram feitas criando-se conjuntos para as triplicatas, dentro de um conjunto os “spots” são comparados, é calculado a média e os desvios. A correção da imagem de fundo é descontada para cada imagem. Os conjuntos dos diferentes tratamentos são comparados, a média do primeiro conjunto recebe valor arbitrário de 1 e então é comparada com o mesmo “spot” no outro conjunto em relação à média, os desvios também são considerados na significância dos resultados.

Primeiramente, foi determinado o melhor período para tratamento e coleta da alga com metais através das curvas de crescimento (Figura 26).

Figura 26. Curva de crescimento para a macroalga *G. tenuistipitata* obtida pelo aumento da massa fresca de alga em função do tempo de cultura em água do mar natural. Fases de crescimento lag (I), log (II e III) e fase estacionária.

Podemos observar na Figura 26 quatro estágios de crescimento: **I.** Fase de adaptação com crescimento linear nos 6 primeiros dias, **II.** Fase exponencial com maior coeficiente angular, **III.** Fase exponencial em declínio, **IV.** Fase estacionária. A partir do 15º dia observou-se a presença de epífitas (cianofíceas e dinoflagelados) no meio de cultura, e também uma queda da taxa de crescimento (Fase III). A partir destes resultados estabeleceu-se que as coletas ocorreriam entre 6 e 12 dias.

Após as 96h de exposição da alga aos metais pesados, as proteínas foram extraídas (item 3.10) e os primeiros géis gerados mostraram que as proteínas de *G. tenuistipitata* se concentravam entre o pl 4 e 7 e peso molecular até 100kDa (Figura 27).

Figura 27. Géis 2D para amostras controle cultivadas por 96h em água do mar natural (A) e artificial (B). Em linha temos a localização isoelétrica das proteínas por seu pI e em coluna a separação destas por seu peso molecular em gel de poliacrilamida.

A comparação entre os meios de cultura, usando água do mar artificial ou natural apresentou géis sem diferença aparente do conteúdo protéico.

Então foram feitos géis em triplicata para os 3 tratamentos, Cd^{+2} 1ppm, Cd^{+2} 5 ppm e Cu^{+2} 1ppm, e o controle (Figura 28), mas com a primeira dimensão, de localização isoeletrica, usando tiras de gradiente de pH entre 4 e 7 e na segunda dimensão a corrida teve o tempo reduzido já que não tínhamos proteínas de grande peso molecular.

Foram estabelecidos 3 graus diferentes de comparação, “spots” que teriam intensidades 5x maior ou a menor entre os tratamentos, 4x ou 3x (Tabela 6). Obviamente, quanto menor a variação desejada, maior o número de proteínas que apresentam a expressão alterada.

Figura 28. Imagens dos géis com as amostras tratadas com metais pesados por 96h. Conjunto de triplicatas A – controle (água do mar artificial), B – Cd^{+2} 1ppm, C – Cd^{+2} 5ppm e D – Cu^{+2} 1ppm. Circulado em vermelho está a região em foco da Figura 30.

Tabela 6. Número de “spots” significativamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$) fazendo a comparação entre o conjunto das triplicatas para cada tratamento, levando em consideração o número de vezes que os “spots” são maiores ou menores na intensidade em pixels.

Comparação	Número de “spots” significativamente diferentes considerando a intensidade de pixels		
	5x ou 1/5	4x ou 1/4	3x ou 1/3
Controle x Cd^{+2} 1ppm	2	3	7
Controle x Cd^{+2} 5ppm	0	1	2
Controle x Cu^{+2} 1ppm	2	3	7
Cd^{+2} 1ppm x Cd^{+2} 5ppm	3	5	9
Cd^{+2} 1ppm x Cu^{+2} 1ppm	0	1	5
Cd^{+2} 5ppm x Cu^{+2} 1ppm	2	5	11

Foi criada uma Figura “master” (Figura 29) contendo todos os “spots” presentes nos géis gerados para escolha dos selecionados para identificação por espectrometria de massa (Tabela 7).

Na Figura 30 a proteína circulada na Figura 28 tem sua expressão variada, passando a ser menos expressa nos tratamentos com metais, diminuindo com cádmio e praticamente desaparecendo com cobre.

Figura 29. Figura “master” contendo todas as proteínas encontradas dentre os géis gerados, indicadas coma seta vermelha estão aquelas com alteração de até 5 vezes na expressão selecionadas para identificação (Tabela 7).

Tabela 7. Características dos “spots” selecionados pelas setas indicativas na Figura 29. Peso molecular, ponto isoelétrico, e intensidade média em pixels para cada “spot” obtido nos diferentes tratamentos.

seta	“spot”	kDa	pI	Cd ⁺² 1ppm	Cd ⁺² 5ppm	Controle	Cu ⁺² 1ppm
1	3201	23,2	4,70	866,7	5040,9	3185,5	74,4
2	3501	48,05	4,70	3402,1	6195,7	7896,7	1004,6
3	3603	52,71	4,78	160,2	6808,2	6209,5	11,9
4	3702	73,92	4,69	622,3	607,5	849,4	18,3
5	5603	52,28	5,46	317,2	2521,3	2257,3	65,5
6	6204	24,69	5,64	376,4	988,2	963,2	70,3
7	7406	35,69	5,92	1733,5	2189,9	540,5	754,3

Figura 30. Variação de intensidade do spot 3501 (seta 2 na Figura 29) em relação ao tratamento dado em triplicata (colunas), para controle (A); Cd^{+2} 1ppm (B); Cd^{+2} 5ppm (C); e Cu^{+2} 1ppm (D).

A análise da variação dos “spots” nos diferentes tratamentos mostrou que em geral o cádmio 5 ppm não promove alteração na expressão protéica em relação ao controle enquanto a concentração de 1ppm tem um efeito maior que a de 5ppm promovendo uma diminuição no conteúdo protéico, assim como cobre 1ppm.

De posse apenas da biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata* não foi possível estimar as possíveis proteínas somente pelo peso molecular e pl teóricos, uma vez que era necessária a seqüência gênica completa para determinação de PM e pl e na biblioteca de cDNA temos apenas a anotação para seqüências parciais.

Cobre parece exercer um efeito mais deletério na alga que cádmio, não somente pelos valores da concentração inibitória de 50% do crescimento, mas também por promover a variação de um número maior de proteínas na alga.

Para dar continuidade ao trabalho os “spots” com variação de 5 vezes em sua intensidade serão analisados por espectrometria de massas em colaboração com os Professores Norberto P. Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e Carlos Block da EMBRAPA.

Pudemos concluir que *G. tenuistipitata* em presença de metais poluentes apresentou variação na expressão protéica analisadas em géis bidimensionais. Cádmio e cobre são um fator de estresse para *G. tenuistipitata*, promovendo a alteração no conteúdo protéico da alga, sendo cobre um metal pesado de poder mais deletério para alga que cádmio, e em

geral há uma tendência de diminuição e desaparecimento das proteínas na alga exposta aos metais, pela provável inibição de síntese ou degradação protéica.

CURRICULUM VITAE

NOME: Vanessa dos Reis Falcão

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO: São Paulo, 24 de novembro de 1979.

EDUCAÇÃO:

Colégio Dante Alighieri – (1986 - 1996)

Instituto de Química da USP – São Paulo – SP (1998 - 2001)

Bacharel em Química com atribuições biotecnológicas e industriais

Instituto de Química da USP – São Paulo – SP (1998 - 2003)

Licenciada em Química

OCUPAÇÃO:

Bolsista de doutorado FAPESP (2002-2006)

PUBLICAÇÕES:

Carvalho, A.M.; Neto, A.M.P.; Tonon, A.P.; Pinto, E.; Cardozo, K.H.M.; Brigagão M.R.P.L.; Barros, M.P.; Torres, M.A.; Magalhães, P.; Campos, S.C.G.; Guaratini, T.; Sigaud-Kutner, T.C.S.; **Falcão, V.R.**; Colepicolo, P. (2004). Circadian protection against oxidative stress in marine algae. *Hypnós* (1): 142-157.

Cardozo, K.H.M.; Guaratini, T.; Barros, M.P.; **Falcão, V.R.**; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; Campos, S.; Torres, M.A.; Souza, A.O.; Colepicolo, P.; Pinto, E. (2006). Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C.* (no prelo).

Rajamani, S.; Siripornadulsil, S.; **Falcao, V.R.**; Torres, M.; Colepicolo, P.; Sayre, R.T. (2006). Phycoremediation of heavy metals using transgenic microalgae. In: *Transgenic Microalgae as Green Factories*. Emilio Fernandes, Aurora Galvan, Rosa Leon, eds. Landes Press (no prelo).

Falcão, V.R.; Tonon, A.P.; Oliveira, M.C.; Colepicolo, P. (2006). RNA isolation method for polysaccharide rich algae: agar producing *Gracilaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA). (submetido a Plant Mol. Biol. Report).

Falcão, V.R.; Louro, R.; Oliveira, M.C.; Colepicolo, P. (2006). Molecular Characterization of the assimilatory nitrate reductase gene and its daily expression in the marine red algae *Gracilaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA). (em preparação).

Falcão, V.R.; Oliveira, M.C.; Sayre, R.T.; Colepicolo, P. (2006). Proteomics of the red alga, *Gracilaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA) under heavy metal stress. (em preparação).