BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

t: 19.620

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Kraci... ..

NAO LILACS

Dedalus

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
REGULAÇÃO DA NITRATO REDUTASE
NA MACROALGA MARINHA**
Gracilaria tenuistipitata
(RHODOPHYTA)

PATRÍCIA DE FÁTIMA LOPES

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

SÃO PAULO
2001

T
574 1905
8642

DEDALUS - Acervo - CQ

30100003887

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
/ Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L864c Lopes, Patrícia de Fátima
Caracterização bioquímica e regulação da nitrato redutase
na macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta)
/ Patrícia de Fátima Lopes. -- São Paulo, 2001.
163p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Colepicolo Neto, Pio

1. Enzimologia 2. Proteína : Purificação : Bioquímica
I. T. II. Colepicolo Neto, Pio, orientador.

574.1925 CDD

**"Caracterização Bioquímica e Regulação da
Nitrato Redutase na Macroalga Marinha
Gracilaria tenuistipitata (RHODOPHYTA)"**

PATRÍCIA DE FÁTIMA LOPES

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em
Ciências - Área: Bioquímica.*

Aprovado por:

Prof. Dr. PIO COLEPICCOLO NETO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA
IQ - USP

Profa. Dra. IOLANDA MIDEA CUCCOVIA
IQ - USP

Profa. Dra. ESTELA MARIA PLASTINO
IB - USP

Profa. Dra. MARIE ANNE VAN SLUYS
IB - USP

SÃO PAULO
13 DE JUNHO 2001.

**"Quem combate monstruosidades deve cuidar
para que não se torne um monstro.
E se você olhar longamente para um abismo,
o abismo também olha dentro de você".
Nietzsche, Além do Bem e do Mal**

Dedico esta tese a meus pais Luís e Lúcia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Pio Colepicolo pela orientação nesses longos anos. Obrigada pelas oportunidades e principalmente por acreditar na minha competência. E, muito obrigada pela sua amizade, Chefe!

Agradeço ao Prof. Lawrence Fritz e todo seu pessoal (Brian, Mônica, Liz, Kyung) que tão bem me receberam no seu laboratório de microscopia eletrônica na Northern Arizona University. That was a great time!

Agradeço ao Ed e a Sandra, pelo suporte técnico e também pela amizade nesses longos anos.

Aos amigos do Lab com quem dividi a maior parte da minha vida. Àqueles que já não estão mais no Lab: Cristina S. Asano, Maísa Brigagão, Keith Okamoto, Daniela Sankievcz. E àqueles ainda presentes: Ernani, Cely, Tona, Teresa, Adriana, Marcelo, Helô. E às queridas alunas de iniciação científica Karina, Jacque, Fabi, Vanessa e Maíra. Foi muito bom conhecer vocês!

Em especial ao meu pupilo favorito Ulisses com quem pude compartilhar o estresse dos experimentos circadianos e as “eletroforevers”....Valeu Uli!

Agradeço também ao companheirismo e amizade de nosso quase estagiário Léo. Você é um amigo maravilhoso, obrigada por tudo!

Ao meu amigo Valdemir, companheiro de todas as horas desde o primeiro dia de aula na graduação!

Ao pessoal querido da SBBq, Viviane, Wellington e Cynthia pelo excelente trabalho, caráter e pela grande amizade.

Ao Chico e ao Jailton, eternos companheiros da hora derradeira de entrega de relatórios.

Ao laboratório dos Prof. Terra e Profa. Clélia que sempre esteve de portas abertas quando necessitamos. Em especial ao Plínio e ao Alexandre que tanto me ajudaram nas determinações de pI....

Ao laboratório do Prof. Dorry, no qual fiz a minha primeira iniciação científica e onde fiz grandes amigos: Euclides, Zildinha, Wilton, Eric.

Aos amigos da orgânica (blocos 5 e 11): Regina, Bóia, Fabiano, Neidinha, Lauri, Beth.

Ao Prof. Flávio Henrique da UFSCar e seus alunos com os quais tive o prazer de realizar alguns cursos e muitos churrascos. Dri e Aninha, vocês são muito especiais!

A Prof. Mariana C. Oliveira do IB-USP com quem iniciei os primeiros passos na bioquímica de macroalgas. Obrigada pelo apoio todos esses anos. E também aos seus alunos, Dani e Marcelo.

A Cidinha, minha companheira inseparável desde os tempos do CRUSP. Conseguimos querida!

Em especial agradeço a minha irmã Eliane pela ajuda nas correções e pela paciência. E agradeço em especial também a minha família pela paciência e compreensão nesta etapa final. Obrigada.

Agradeço as agências financiadoras FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro durante toda a pós-graduação e no doutorado sanduíche, respectivamente.

ÍNDICE

Abreviaturas -----	11
Resumo -----	13
Abstract -----	15
1. Introdução -----	17
1.1. A alga: <i>Gracilaria tenuistipitata</i> -----	17
1.2. Metabolismo do Nitrogênio-----	19
1.3. Nitrato Redutase: a enzima propulsora do processo de assimilação de nitrogênio-----	21
1.4. Relógio biológico-----	32
2. Objetivos-----	43
3. Material e Métodos-----	44
3.1. Reagentes-----	44
3.2. Cultivo e coleta de <i>Gracilaria</i> -----	46
3.3. Caracterização bioquímica da enzima NR-----	46
3.3.1. Extração de proteína total-----	46
3.3.2. Conteúdo protéico-----	47
3.3.3. Ensaio enzimático para NR-----	47
3.3.4. Determinação de condições ótimas para o ensaio da NR e caracterização bioquímica-----	48
3.3.5. Atividade da NR em diferentes porções do talo da alga-----	51
3.3.6. Indução da atividade da NR-----	51
3.3.7. Absorção de nitrato do meio de cultura-----	51
3.3.8. Determinação da existência de oscilação diária na atividade da NR-----	52
3.3.9. Purificação da NR de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> -----	53
3.3.9.1. Tampões utilizados-----	54
3.3.9.2. Preparação do extrato destinado a purificação-----	54
3.3.9.3. Cromatografia em “Q-Sepharose Fast Flow”-----	54
3.3.9.4. Cromatografia em Sephacryl S-300 HR-----	55
3.3.9.5. Cromatografia em resina Affigel-blue-----	55

3.3.9.6. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS-----	56
3.3.10. Preparação de anticorpos policlonais contra NR-----	57
3.3.11. Teste dos anticorpos policlonais produzidos em coelho após imunização do mesmo com NR comercial ou NR purificada de <i>G. tenuistipitata</i> -----	57
3.3.11.1. “Dot Blot”-----	57
3.3.11.2. “Western blots”-----	58
3.3.11.2.1. Transferência de proteínas de géis de poliacrilamida para membrana-----	59
3.3.11.2.2. Imunodeteção com anticorpos contra NR de milho-----	59
3.3.12. Teste dos anticorpos monoclonais produzidos contra NR purificada de <i>Porphyra yezoensis</i> -----	60
3.3.12.1. Imunodeteção utilizando anticorpos monoclonais anti-NR de <i>P. yezoensis</i> -----	60
3.3.12.2. Titulação dos anticorpos monoclonais feitos contra NR de <i>P. yezoensis</i> -----	61
3.3.13. Estudo do efeito de moduladores sobre a NR-----	61
3.3.13.1. Efeito da adição de amônio ao meio de cultura sobre a atividade da enzima NR e sobre a quantidade da proteína NR -----	62
3.3.13.2. Efeito da qualidade de luz sobre a atividade da NR e sobre a quantidade da proteína NR -----	62
3.3.13.3. Efeito da qualidade de luz sobre a atividade da NR e sobre a quantidade da proteína NR quando se tem mesma irradiância para cada tipo de luz-----	63
3.3.14. Localização intracelular da NR-----	65
3.3.14.1. Indução da síntese da NR-----	65
3.3.14.2. Fixação das células-----	65
3.3.14.3. Desidrataçãoápice fixado-----	67

3.3.14.4. Infiltração da resina no ápice-----	68
3.3.14.5. Microscopia óptica-----	68
3.3.14.6. Anticorpos a serem utilizados-----	68
3.3.14.7. Técnica de Imunofluorescência-----	69
3.3.14.7.1. Preparação das lâminas de vidro-----	69
3.3.14.7.2. Montagem das lâminas com os cortes-----	69
3.3.14.7.3. Protocolo de imunofluorescência-----	69
3.3.14.8. Técnica de imunomarcção utilizando partículas de ouro como marcador-----	70
3.3.14.8.1. Preparação das telas de níquel-----	70
3.3.14.8.2. Cortes ultrafinos-----	70
3.3.14.8.3. Protocolo de imunomarcção utilizando partículas de ouro como marcador-----	71
3.3.14.9. Recuperação do antígeno-----	72
4. Resultados-----	73
4.1. Caracterização bioquímica da enzima NR-----	73
4.2. Indução da atividade da NR-----	82
4.3. Absorção de nitrato do meio-----	83
4.4. Determinação da existência de oscilação diária na atividade da NR-----	84
4.5. Purificação da enzima NR -----	86
4.6. Teste dos anticorpos policlonais produzidos em coelho após imunização do mesmo com NR comercial de milho ou NR purificada de <i>G.</i> <i>tenuistipitata</i> -----	92
4.6.1. “Dot Blot”-----	92
4.6.2. “Western blot” -----	94
4.7. Teste dos anticorpos monoclonais produzidos contra NR de <i>P. yezoensis</i> -	95
4.7.1. “Western blot” -----	95
4.8. Estudo do efeito de moduladores sobre a NR-----	99
4.8.1. Efeito da adição de amônio ao meio de cultura sobre a atividade da enzima NR e sobre a quantidade NR-----	99

4.8.2. Efeito da qualidade de luz sobre a atividade da enzima NR e sobre a quantidade da proteína NR-----	102
4.8.2.1 Iluminando-se a alga com luzes de diferentes comprimentos de onda e diferentes irradiâncias-----	102
4.8.2.2. Iluminando-se a alga com mesma irradiância para cada tipo de luz-----	105
4.9. Localização intracelular da NR-----	109
4.9.1. Fixação das células-----	109
4.9.2. Técnica de Imunofluorescência-----	117
4.9.3. Técnica de imunomarcção utilizando partículas de ouro como marcador-----	118
4.9.4. Recuperação do antígeno-----	120
5. Discussão-----	124
6. Considerações Finais-----	141
7. Referências bibliográficas-----	143
8. Curriculum vitae-----	161

ABREVIATURAS

BSA: soroalbumina bovina

CAPS: ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfônico

Cit c: citocromo c

CT: circadian time (tempo circadiano, fotoperíodo claro:escuro)

DTT: ditioneitol

EB: extrato bruto

EDTA: ácido etileno diamino tetraacético

Da: Dalton

DCPIP: diclorofenolindofenol

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

h: hora

LD: light/dark (claro/escuro)

LL: light/light (luz constante)

ME: microscopia eletrônica

min: minuto

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)

NED: n- naftil etilenodiamina

NR: nitrato redutase

NiR: nitrito redutase

NRP: proteína nitrato redutase

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PI: proteína inibidora

PMSF: fenil metil sulfonil fluoreto

PVP: polivinilpirrolidona

PVDF: difluoreto polivinilideno hidrofóbico

rpm: revoluções por minuto

SDS: sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida contendo SDS

SULFA: sulfanilamida

t: tonelada

TBS: tampão salino Tris

TBS-T: tampão salino Tris contendo Tween 20

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

VS: von Stosch

ZT: Zeitgeber time (tempo Zeiteber)

RESUMO

A alga marinha *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia (Gracilariales, Rhodophyta) tem grande importância econômica por ser a principal fonte para a produção de ficocolóides. Esta linhagem tem sido extensivamente cultivada em tanques ou diretamente no mar na China e Taiwan por exibir grande tolerância a variação de fatores ambientais.

A maior fonte de nitrogênio no oceano está na forma de nitrato que é o principal fator limitante no crescimento das macroalgas. A assimilação de nitrogênio é um processo que ocorre em duas etapas catalisadas sequencialmente pelas enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR), respectivamente. A NR catalisa a redução de nitrato a nitrito usando NAD(P)H como fonte doadora de elétrons. O nitrito é reduzido a amônio (pela NiR) e é imediatamente assimilado em compostos orgânicos nitrogenados, como aminoácidos e bases nitrogenadas. A NR é considerada o primeiro passo regulador no processo de assimilação de nitrato.

Neste trabalho descrevemos a oscilação circadiana da atividade da NR bem como do seu conteúdo protéico em *G. tenuistipitata*. A atividade da NR e os níveis da proteína NR apresentam um pico no meio do dia em algas mantidas sob regime de claro:escuro (12:12h). A atividade de NR é 30 vezes maior durante o período de claro em algas crescendo sob condições de luz:escuro, e o nível protéico de NR é cerca de 40 vezes maior em extratos do período de claro. A oscilação observada está sob controle do relógio biológico uma vez que a flutuação da atividade da NR persiste após 10 dias sob condições de claro constante. Nenhuma oscilação na atividade de NR foi encontrada quando a alga foi mantida sob escuro constante, demonstrando que a luz é um fator de grande importância no controle desta enzima.

Experimentos de absorção de nitrato do meio realizados em culturas de algas crescendo sob condições de claro:escuro mostrou que a absorção de nitrato ocorre preferencialmente no período noturno, ocorrendo o pico máximo de absorção no meio da noite. Daí concluímos que os processos de assimilação de nitrato e tomada do mesmo do meio estejam ocorrendo de maneira independente.

A NR de *G. tenuistipitata* pertence a classe das NRs específicas para o NADH, com constante de Michaelis-Menten aparente de 95 μM . O K_M aparente para o nitrato foi estimado em 197 μM , valor esse razoável com os descritos para outras algas. A focalização isoeétrica revelou que a NR é uma proteína básica com pI de 8,66.

A NR desta espécie foi purificada em 4 etapas: cromatografia de troca iônica, precipitação com sulfato de amônio, filtração em gel e cromatografia de afinidade em resina Affigel-blue. A proteína não desnaturada apresenta massa molecular de aproximadamente 420 kDa, e 4 subunidades idênticas de 110 kDa, baseado em SDS-PAGE.

A localização intracelular da NR de *G. tenuistipitata* foi examinada utilizando técnicas de imunofluorescência e “immuno-gold” e revelaram que a NR está associada com os cloroplastos.

SUMMARY

The marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang *et* Xia) is economically important, being the main source for the production of phycocolloids. This strain is extensively cultivated in ponds in southern China and Taiwan and exhibits a wide tolerance to environmental factors.

The major source of nitrogen in the ocean is in the form of nitrate being the main limiting macroalgal production. The nitrogen assimilation process occurs in a two-step reaction catalyzed by 2 enzymes working sequentially, nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR). NR catalyzes the reduction of nitrate to nitrite using NAD(P)H as electron donor. Nitrite is reduced to ammonium (by NiR) and it is immediately assimilated in organic nitrogen compounds, such as amino acids and bases. NR is considered the first and regulatory step in this assimilating process.

We report the circadian oscillation of NR activity as well as NR protein content in *G. tenuistipitata*. Both NR activity and NR protein levels peaks at midday in algae maintained under light:dark cycle (12:12h). The NR activity is 30 fold higher in light period for alga growing under light-dark conditions, and the NR protein level is about 40 fold higher in extracts from the light period. The oscillation observed is under biological clock control since the fluctuation of NR activity persists after 10 days under constant light conditions. No oscillation in the NR activity is found when the algae were maintained under constant dark condition.

The experiments on nitrate uptake carried out in algae growing under light:dark conditions had shown that the absorption peaks at the middle of the dark periods. So we can conclude that the process of nitrate assimilation and nitrate uptake is occurring in such an independent ways.

NR from *G. tenuistipitata* is a NADH specific enzyme with Michaelis-Menten apparent constant of 95 μM . The apparent K_M for nitrate was estimated to be 197 μM , which is reasonable with the values described to another algae. The isoelectric focusing revealed NR is a basic protein with pI of 8.66.

The NR from was purified in four steps: ion exchange chromatography, ammonium sulfate precipitation, gel filtration chromatography, and Affigel-blue affinity column. Non-denaturated protein shows a molecular mass of about 420 kDa, and 4 identical subunits of 110 kDa, based on SDS-PAGE.

The intracellular localization of NR in *G. tenuistipitata* was examined by applying both immunofluorescence and immunogold methods revealing NR associated with chloroplasts.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A alga: *Gracilaria tenuistipitata*.

A taxonomia do grupo das algas vermelhas é pobremente compreendida. Só do gênero *Gracilaria* mais de 150 espécies têm sido nomeadas, e a interpretação do gênero tem sido descrita como caótica (Bird & Rice 1990). A existência de polimorfismo e variação genética dentro de uma única espécie aumentou a confusão a cerca das espécies descritas (Critchley 1993). Grande progresso, entretanto, tem sido atingido nos últimos anos na compreensão da biologia celular das algas vermelhas particularmente em nível estrutural devido ao refinamento nas metodologias de fixação e infiltração de tecidos (Murray & Dixon 1992).

Segundo Pueschel (1990) as algas vermelhas possuem características celulares que são distintas de quaisquer outros eucariotos, incluindo: cloroplastos distintos por não apresentarem organização em tilacóides empilhados e por terem grânulos de pigmentos associados nos chamados ficobilissomos; depósitos de grânulos de amido no citoplasma; padrões não usuais de associação do complexo de Golgi a outras organelas celulares; ausência completa de cílios ou flagelos, dentre outras.

Gracilaria (Florideophycideae, Gracilariales) é uma típica alga vermelha com três fases de vida. Há uma alternância isomórfica entre as gerações haplóide e diplóide, embora sejam geneticamente distintas (Critchley 1993). Este gênero tem grande importância econômica por ser fonte de extração de ficocolóides (ágar-ágar) que apresentam uma larga aplicação industrial e biotecnológica (Chiang & Lin 1989). Estimou-se em 1989 que cerca de 5.000 toneladas (t) de ágar eram processados a partir de 25.000 a 30.000 t de *Gracilaria* coletada diretamente do mar no Chile, Argentina,

Brasil e África do Sul, e de tanques na China, Taiwan e Ilha Hainan (Santelices & Doty 1989).

O constante aumento na demanda de mercado aliado à inexistência de manejo de cultura tem levado à diminuição das populações desta macroalga nos bancos naturais e por isso tem-se implementado o cultivo em tanques e mesmo em mar aberto (Santelices & Doty 1989; Chiang & Lin 1989; Oliveira & Alveal 1990). Estudos recentes têm revelado que o crescimento, quantidade e qualidade de ágar, neste gênero, devem ser limitados pela quantidade de nitrogênio disponível, pela taxa de absorção do meio, bem como 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* (Critchley 1993).

A macroalga em estudo, *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia (Figura 1) é uma linhagem originalmente 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‰. Esta espécie exibe uma grande tolerância a variações de temperatura e é resistente ao ataque de epífitas (Haglund & Pedersén 1992). Como as demais espécies do gênero tem alta produção de agarocolóides, sendo que nesta espécie a fração de agarose é bem alta, despertando grande interesse econômico devido as aplicações biotecnológicas da agarose (Macchiavello 1994).

Figura 1. *Aspecto geral do talo de G. tenuistipitata.* O talo desta alga é alongado e com muitas ramificações. Seu diâmetro varia, tendo calibre maior nas porções mais velhas do talo.

1.2. Metabolismo do Nitrogênio

O nitrogênio inorgânico da biosfera é convertido a sua forma biologicamente ativa tanto pela fixação do nitrogênio molecular quanto pela assimilação de nitrato. A fixação do nitrogênio é realizada por certos procariotos (cianobactérias) e por bactérias fixadoras de nitrogênio em associação simbiótica com organismos fotossintetizantes, entretanto, a fixação de nitrogênio molecular via nitrogenases representam cerca de 1% do total de nitrogênio incorporado em compostos orgânicos (Adams & Mortenson 1985). Estima-se que cerca de 25% da energia produzida pela fotossíntese é gasta no processo de assimilação de nitrogênio, evidenciando o fundamental papel biológico desse processo. Grandes esforços têm sido direcionados a incorporação de genes de fixação de nitrogênio no genoma de plantas, mas nenhum sucesso foi alcançado (Solomonson & Barber 1990).

O nitrogênio é o nutriente mais frequentemente limitante na produção de macroalgas (Lobban & Harrison 1994), e o nitrato representa sua forma inorgânica mais abundante no ambiente marinho (Nason 1962,1963; Solomonson & Barber 1990). A redução de nitrato à amônia é um processo fisiológico fundamental em algas, plantas, fungos e uma variedade de bactérias (Adams & Mortenson 1985; Crawford & Campbell 1990; Crawford 1995), pois o nitrato absorvido não é diretamente assimilado nas vias biossintéticas devendo ser reduzido à amônia. A conversão de nitrato à amônia compreende duas etapas dependentes das enzimas metalo-protéicas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR).

Na primeira etapa o nitrato é reduzido a nitrito pela NR, e, em seguida, o nitrito é reduzido a amônia pela nitrito redutase (NiR). Ambas as reações utilizam NAD(P)H como doador de elétrons (Solomonson & Barber 1990). A amônia, altamente tóxica, é rapidamente assimilada em biomoléculas nitrogenadas. A reação de redução do nitrato ocorre como mostrado no esquema 1 abaixo:

Esquema 1. Redução de Nitrato a Amônia. A redução de nitrato a amônia é um processo que envolve duas etapas catalisadas pelas enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR), ambas dependentes de NAD(P)H como fonte doadora de elétrons.

A NR é a primeira enzima na via de assimilação do nitrogênio e revela-se de extrema importância por regular a velocidade de redução do nitrato (Solomonson & Barber 1990). Dessa forma a NR é considerada limitante no crescimento e desenvolvimento dos organismos que assimilam nitrato e por essa razão tem sido alvo de intensivo estudo dirigido à elucidação das propriedades relacionadas a sua atividade catalítica e regulação.

1.3. Nitrato Redutase (NR): a enzima propulsora do processo de assimilação de nitrogênio.

Acreditava-se na existência da NR desde o início do século quando Kastle & Elvove (1904), examinando extratos brutos de tubérculo de batata perceberam que o nitrato adicionado era reduzido a nitrito. Eles sugeriram erroneamente 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 e assume-se que tenha papel de fundamental importância para bactérias, fungos, algas e plantas.

Nos organismos várias proteínas distintas reduzem nitrato a nitrito e por isso são designadas de nitrato redutases (NR). Estas formas de NRs ditas assimilatórias são estruturalmente distintas das NRs dissimilatórias de organismos que usam nitrato como aceptor de elétrons alternativo ao O₂. As NRs podem ser classificadas em dois principais tipos. Um dependente do nucleotídeo de piridina que é encontrado em organismos eucariontes; o outro tipo é dependente de ferredoxina e é encontrado em procariontes. Estas últimas são encontradas em cianobactérias e são monômeros (~ 80 kDa) dependentes de ferredoxina (Nakamura *et al.* 1994). Embora as NR dissimilatórias

ocorram principalmente em procariotos elas também podem ocorrer em eucariotos (Berges 1997). Trataremos por NR somente as formas assimilatórias.

A enzima nitrato redutase (NR; EC 1.6.6.1), inicialmente caracterizada por Evans e Nason (1953) em *Glycine max* (soja) é um complexo contendo vários grupos prostéticos, e que utiliza NAD(P)H como substrato redutor (Caboche & Rouzé 1990; Solomonson & Barber 1990; Crawford & Campbell 1990; Crawford 1995). As NRs isoladas de diferentes fontes revelaram ser proteínas multiméricas de alto peso molecular. Cada monômero possui três grupos prostéticos: FAD, heme (citocromo b557), e um cofator Mo-pterina, com estequiometria 1:1:1 por subunidade (Crawford & Campbell 1990). Dois elétrons são transferidos cataliticamente do NAD(P)H para o nitrato obedecendo a seguinte ordem de passagem pelos grupos redox: FAD, heme, Mo-pterina (Caboche & Rouzé 1990).

Além da atividade total NAD(P)H:nitrato redutase a enzima catalisa algumas atividades parciais *in vitro* quando o fluxo de elétrons é desviado por aceptores ou doadores artificiais, e envolvem um ou mais grupos prostéticos da enzima (Caboche & Rouzé 1990). Tais atividades parciais têm sido divididas em 2 classes: (i) atividade “diaforase”; (ii) atividade “redutora de nitrato”. A atividade diaforase usa NAD(P)H como doador de elétrons e inclui as atividades de NADH:ferrocianeto redutase, NADH:citocromo c redutase, e NADH: diclorofenolindofenol redutase. A atividade redutora de nitrato usa nitrato comoceptor final e inclui as atividades de flavina reduzida:nitrato redutase, metil viologênio reduzido:nitrato redutase, e bromofenol-blue reduzido:nitrato redutase (Solomonson & Barber 1990). No esquema 2 o diagrama indica os grupos prostéticos e as reações de transferência de elétrons relacionadas as várias atividades da NR.

Esquema 2. Interação entre os doadores e aceptores de elétrons com a nitrato redutase. As várias reações de transferência de elétrons que compreendem a atividade total e as atividades parciais associadas a nitrato redutase estão mostradas junto aos grupos prostéticos individuais requeridos para cada uma das atividades. Em azul estão descritas as atividades redutoras de nitrato, e em verde, as atividades diaforase (que utilizam NADH como doador de elétrons). Modificado de Solomonson & Barber 1990. Legenda: DCPIP: diclorofenolindofenol, cit c: citocromo c.

As NRs são classificadas de acordo com o doador de elétrons em: (i) específicas para NADH: ocorrem em plantas (dicotiledôneas) e algas; (ii) específicas para NADPH: ocorrem em fungos; (iii) biespecíficas, utilizam NADH ou NADPH; ocorrem em algumas algas e plantas, principalmente em monocotiledôneas (Miyazaki *et al.* 1991).

Existe uma grande variação nas massas moleculares da holoenzima NR nos diversos organismos. É relatada uma variação desde 200 kDa, para a NR de espinafre (Hewitt 1975) até 500 kDa para a enzima da alga verde *Ankistrodesmus braunii* (De la Rosa *et al.* 1980). A mesma variação é encontrada para tamanho e número de subunidades, o que resulta em vários modelos estruturais complexos (Solomonson &

Barber 1990). A enzima NR de *Chlorella vulgaris* foi a primeira a ser caracterizada até sua homogeneidade e a subunidade tem aproximadamente 100 kDa (Solomonson *et al.* 1975). Resultados similares foram obtidos para NRs de *Neurospora* e cevada (Kuo *et al.* 1980; Pan & Nason 1978), mas no dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*) caracterizou-se uma subunidade de 52 kDa (Ramalho *et al.* 1995) e em *Ankistrodesmus braunii* a subunidade era de ~ 58 kDa (De la Rosa *et al.* 1981).

Uma comparação entre as regiões altamente conservadas em sequência de aminoácidos de NR com outras enzimas, tais como citocromo b₅ humano (contém FAD) e sulfito oxidase (contém heme e Mo-pterina), permite que as NR de eucariotos sejam subdivididas em 6 regiões: região N-terminal variável, região conservada do Mo, região “hinge 1” menos conservada, região contendo cyt-b, região “hinge 2” menos conservada, e a região contendo FAD. Experimentos envolvendo proteólise limitada indicam que a NR de plantas consiste de 3 domínios funcionais que contêm FAD, heme e Mo-pterina (Rouzé & Caboche 1992; Nakamura *et al.* 1993).

Regiões “hinge” têm sítios proteolíticos para clivagem com tripsina e protease V8 de *Staphylococcus aureus* (Rouzé & Caboche 1992). NR de *Chlorella vulgaris* tem a composição de domínios diferente daquela apresentada por plantas. Um domínio contém FAD e outro, o heme e a Mo-pterina (Solomonson *et al.* 1986). Provavelmente sua região “hinge” entre o citocromo b e Mo-pterina não tem sítios para clivagem com tripsina. No esquema 3 podemos observar a estrutura e as diferentes regiões da NR de plantas.

Esquema 3. Estrutura e propriedades da NR de plantas. Neste modelo hipotético de uma molécula de NR dimérica, os sítios onde ocorrem a doação e recepção de elétrons para a atividade NADH:NR, bem como as atividades enzimáticas parciais, são mostrados em uma subunidade (esquerda); na outra subunidade (direita), as principais características estruturais estão indicadas: os três domínios catalíticos com seus respectivos grupos prostéticos, o domínio amino-terminal (envolvido na interação entre as subunidades), e os grupos amino e carboxi das extremidades da cadeia polipeptídica. Modificado de Caboche & Rouzé 1990.

Entre plantas, a homologia de sequência 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 a alga verde unicelular *Chlorella vulgaris*, é de 45% (Miyazaki *et al.* 1991; Cannons *et al.* 1991).

O controle da expressão 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 celular da NR pode sofrer regulação em nível de transcrição, tradução, degradação, inativação reversível por substratos ou proteínas regulatórias, entre outros (Solomonson & Barber 1990; Crawford & Campbell 1990; Crawford 1995). Alguns dos modos de regulação que servem como controles potenciais da atividade da NR estão ilustrados no Esquema 4.

A atividade total de NR em tecidos fotossintéticos parece estar sob controle metabólico, ou seja, induzida em resposta a nitrato ou ausência de amônia e reprimida por amônia e seus metabólitos (Solomonson & Barber 1990). O amônio é um dos compostos mais importantes na regulação da assimilação de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, tais como nitrato, nitrito, bases nitrogenadas e aminoácidos. Sua regulação parece operar em três níveis distintos: (i) inibindo enzimas chave como a NR; (ii) pelo bloqueio nos processos de transporte; e (iii) pelo controle da quantidade de enzimas assimilatórias pela diminuição ou aumento do “turnover” destas proteínas (Franco *et al.* 1988). A indução da atividade da NR por exposição a nitrato bem como sua inibição por amônia tem sido corroborada há anos e é considerada uma resposta universal tanto em plantas como em algas e fungos, sendo a alteração da atividade decorrente da indução de expressão gênica (Rigano *et al.* 1974; Redinbaugh & Campbell 1991; Crawford 1995). A disponibilidade de anticorpos específicos para NR permitiu a demonstração em milho e cevada da indução da atividade da NR envolvida com a síntese *de novo* de proteínas (Somers *et al.* 1983; Remmler & Campbell 1985).

Esquema 4. Modos de regulação da NR. Os vários potenciais modos de regulação da nitrato redutase indicados incluem regulação da síntese da enzima por efetores positivos (como nitrato e luz) e por efetores negativos derivados da amônia (como a glutamina). A incorporação do cofator Mo-pterina é considerada um passo limitante para a expressão total da atividade da NR; inativação reversível da NR por hidroxilamina, cianeto e condições de escuro (fosforilação e ligação de proteína inibidora), e ativação por luz e CO₂. Modificado de Solomonson *et al.* (1990).

A luz consiste em um importante sinal de regulação para atividade da NR, bem como da sua expressão. Um aumento diário, induzido por luz, dos níveis de RNAm de NR, proteína e atividade da NR foi observado em vários organismos (Ramalho *et al.* 1995; Lillo 1994; Pilgrim *et al.* 1993; Gao *et al.* 1992; Deng *et al.* 1990). Experimentos com diferentes qualidades de luz revelaram que tanto luz azul quanto luz branca levaram à ativação da NR, enquanto luz vermelha promoveu inativação da enzima NR (Aparicio *et al.* 1976; Lillo 1994; Ninnemann 1995). Tal comportamento seria devido à existência de diferentes tipos de receptores de luz localizados nas membranas dos cloroplastos. A transdução de sinal em cadeia de diversos receptores de luz numa célula poderia interagir parcialmente numa complexa rede de cooperação e controle. Exemplos tanto de independência quanto de interação na cadeia de transdução de sinais de luz azul e de luz vermelha foram descritos em mutantes de plantas por Chory (1993). O desenvolvimento de pesquisa sobre fotorreceptores de luz azul e luz vermelha durante os últimos anos foi acelerado e ampliado pelas possibilidades de utilização de métodos de biologia molecular aliados a estratégias de bioquímica, espectroscopia e genética (Ninnemann 1995).

Em algas vermelhas a captação de luz é realizada primariamente por um grupo de proteínas pigmentadas que fazem parte de um complexo macromolecular chamado ficobilissomo, no qual o principal pigmento associado à proteína responsável pela captação da luz é a R-ficoeritrina. A luz captada por estes complexos-antena é direcionada para a clorofila *a* localizada na região central do complexo. Os constituintes deste tipo de complexo de captação da luz são estruturalmente muito diferentes dos polipeptídeos de outros complexos-antena descritos para plantas e outras algas marinhas e de água doce. Sendo assim a resposta a diferentes condições ambientais mediadas por

esse complexo de captação de luz pode diferir da resposta apresentada pelos outros complexos (Grossman *et al.* 1993).

Outro aspecto da regulação da NR envolve ritmos circadianos. Galangau *et al.* (1988) demonstraram que o nível RNAm de NR, quantidade de proteína e atividade da NR apresentava marcada oscilação diurna em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*). Deng *et al.* (1990) observaram variações similares em plantas de tabaco transferidas para condições de claro constante, indicando um ritmo circadiano na expressão do gene de NR. Em escuro constante os níveis de RNAm de NR continuaram a mostrar oscilação rítmica enquanto a atividade e quantidade de proteína diária perderam as variações e diminuíram a níveis baixos após 20 h. Essa diminuição substancial na quantidade de proteína e atividade de NR em escuro contínuo em folhas de tabaco é similar aos resultados descritos para cevada, sementes de milho e arábida (Somers *et al.* 1983; Remmler & Campbell 1985; McClung & Kay 1994). O desaparecimento de RNAm de NR em folhas de tabaco e tomate sujeitas a escuro constante por um longo período implica que a luz é requerida para transcrição ou estabilidade do RNAm (Deng *et al.* 1990). O sistema de oscilação da NR será abordado com maior detalhamento no próximo item no qual será tratado o tema relógios biológicos.

A atividade da NR também pode ser regulada por mecanismos de modificação pós-tradução. A fosforilação reversível está bem caracterizada em plantas e é um mecanismo rápido e reversível. A atividade da NR é rapidamente reduzida de 3 a 10 vezes quando as plantas são transferidas para o escuro ou para baixa taxa de dióxido de carbono (Huber *et al.* 1992). Quando a luz é ligada ou níveis normais de dióxido de carbono são restaurados, a atividade da NR também é restaurada. A regulação da NR

pela taxa de CO₂ na célula mostra a íntima relação existente entre o processo de redução de nitrato e fotossíntese.

A inativação da NR é mediada por fosforilação em espinafre, arábida, milho; e têm-se mostrado ocorrer por fosforilação em serinas, produzindo peptídeos multifosforilados quando digeridos com tripsina (Kaiser & Spill 1991; MacKintosh 1992). A reativação da NR está correlacionada com a desfosforilação destes peptídeos e pode ser bloqueada por inibidores de proteínas fosfatases (MacKintosh 1992). Portanto, a fosforilação desempenha um importante papel na modulação rápida e reversível da atividade da NR em resposta a sinais de luz e carbono. Estudos recentes têm sugerido que a fosforilação da NR é necessária mas não suficiente para acarretar inativação da enzima. A regulação da NR de espinafre por fosforilação da Ser-543 é um processo de 2 estágios: primeiro, a Ser-543 da NR é fosforilada por uma quinase dependente de Ca²⁺ e, então, a NR-fosforilada interage com uma proteína inibidora (PI) na presença de cátions divalentes produzindo um complexo (MacKintosh *et al.* 1995; Bachmann *et al.* 1995). A PI foi identificada como sendo membro das proteínas chamadas 14-3-3 (Bachmann *et al.* 1996a, Moorhead *et al.* 1996). Estas proteínas existem como famílias que contêm isoformas altamente conservadas, mas individualmente distintas, em muitas espécies. Elas são proteínas ácidas solúveis que foram originalmente 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). A associação de proteínas 14-3-3 com o sítio regulatório de fosforilação da NR de espinafre leva a redução da desfosforilação da Ser-543 por proteínas fosfatases endógenas, inativando a NR. Diferentes isoformas da proteína 14-3-3 de espinafre diferem na habilidade de ligar-se e inativar a NR fosforilada

(Bachmann *et al.* 1996b). Tais evidências foram encontradas também em *Arabidopsis*, que tem uma família 14-3-3 multigênica com 10 isoformas da proteína 14-3-3 isoladas e caracterizadas (Wu *et al.* 1997) e em tabaco que apresenta cinco isoformas da proteína 14-3-3 (Piotrowski & Oecking 1998).

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 (Solomonson & Barber 1990). Devido a esse fato, a genética molecular da NR tem sido intensivamente investigada em muitas espécies de plantas, fungos e em algas (principalmente algas verdes unicelulares), mas poucos trabalhos referem-se a NR de macroalgas marinhas. Em *Nicotiana*, *Hordeum* (cevada) e *Aspergillus* dois *loci* foram caracterizados como o gene estrutural da NR enquanto em *Arabidopsis* pelo menos 3 *loci* já foram identificados (Cheng *et al.* 1988). Embora muito já se conheça sobre o gene da NR e sua regulação nestes organismos pouco é sabido a respeito do mesmo em algas vermelhas. Um estudo minucioso funcional do gene codificador da NR é extremamente importante no estudo da sua estrutura, função e regulação.

Outro ponto importante sobre a fisiologia da NR é com relação a sua localização. Há muita controvérsia a respeito da localização intracelular da NR. Evidências bioquímicas indicam que a NR de plantas superiores encontra-se no citoplasma (Dalling *et al.* 1972; Wallsgrove *et al.* 1979). Estudos recentes sobre a compartimentalização da NR revelam em *Chlamydomonas* (Fischer & Klein 1988), por abordagem bioquímica, e em *Glycine max* (Vaughn *et al.* 1984), por técnicas de imunofluorescência, que a NR localiza-se no citoplasma. Todavia, existem indicações de que a NR estaria localizada nos cloroplastos, junto a nitrito redutase que é a próxima enzima na conversão de nitrato a amônia (*Spinacia oleraceae*, Kamachi *et al.* 1987;

Ankistrodesmus braunii, Lopez-Ruiz *et al.* 1985). Em 1993, Fritz *et al.* mostraram que no dinoflagelado *Gonyaulax polyedra* a NR está presente nos cloroplastos. Foi demonstrada também a presença da enzima em membranas plasmáticas de *Neurospora crassa* e em raízes de sementes de cevada (Roldan *et al.* 1982; Ward *et al.* 1988). Ninnemann (1995) discute o possível papel de fotorreceptor para estas NR localizadas na membrana, além do transporte e redução do nitrato.

1.4. Relógio biológico.

A habilidade dos organismos procariotos e eucariotos em exibir ritmos circadianos endógenos e adaptação diária e periódica a eventos luminosos é freqüentemente associada a um oscilador central. Esse oscilador é denominado relógio biológico e é de grande importância para a sobrevivência e evolução das espécies, pois torna possível a temporização dos diversos processos metabólicos num mesmo organismo (Edmunds 1988).

As variações de intensidade de luz e temperatura foram cruciais na origem e evolução do relógio biológico, todavia o mecanismo de regulação do ritmo é endógeno e trabalha independentemente dos ritmos ambientais. A sincronização do relógio biológico e ciclo solar é necessária para que o horário do relógio e o horário local coincidam (Johnson & Hastings 1986). A natureza endógena dos ritmos diários foi descoberta através da manutenção de organismos sob condições de iluminação e temperatura constantes (livre-curso) e observação de algum fenômeno comportamental ou bioquímico. O período de repetição do fenômeno em estudo sob condições de livre-curso foi de aproximadamente 24 h e por isso usa-se o termo circadiano, do latim *circa*:próximo e *dian*:dia, para ritmos de 22 a 26 h (Halberg 1959). Durante os

experimentos de livre-curso deve-se assegurar que o organismo não esteja recebendo nenhum sinal externo (Zeitgeber) que possa ser utilizado no acerto do relógio biológico.

Muitos ritmos circadianos têm sido estudados em seres humanos como o sono-vigília, a variação de temperatura corporal, variação da função renal, síntese e liberação de hormônios na corrente sanguínea, etc (Johnson & Hastings 1986). Além dos circadianos, outros ritmos têm sido descritos, por exemplo: os ritmos circamensais (menstruação), ritmos circanuais (floração de algumas plantas, migração de pássaros e peixes), e o ritmo circalunar, sincronizado com as fases da lua (Aschoff 1981; Hastings *et al.* 1991).

A tabela 1 relaciona os principais ritmos biológicos descritos até o momento, sendo o circadiano o mais estudado por ter duração relativamente curta e ser de fácil observação.

Tabela 1. *Período de duração dos ritmos biológicos*

RITMO	PERÍODO
Ultradianos	Inferior a 24 h
Infradiano	Superior a 24 h
Circadiano	± 24 h
Circanual	Próximo de 1 ano
Circalunar	Próximo de 28 dias
Circamaré	Próximo de 12,4 h
Circamensal	Próximo de 1 mês

O relógio biológico também está relacionado com diversas desordens chamadas cronopatologias. Nos países nórdicos, durante o inverno, as pessoas ficam expostas a longos períodos de escuro e o tratamento das depressões devido às estações do ano é

realizado por exposição à luz em diferentes períodos do dia (Lewy *et al.* 1987; Wehr 1979). Outra cronopatologia bem conhecida é o “jet lag”, experimentado em vôos transmeridianos. O “jet lag” causa desorganização temporal interna e dificuldade de adaptação ao novo horário afetando humor, sono, sistemas digestivo e cardiovascular, etc. Trabalhadores de turno também estão sujeitos a disfunção temporal interna e quando esta desorganização é cronicamente mantida o indivíduo pode ter sua saúde debilitada, com o surgimento de úlceras, estresse e, inclusive, redução na expectativa de vida. Tem-se sugerido ainda que o relógio biológico esteja intimamente relacionado com o processo de envelhecimento (Aschoff 1981, Hastings *et al.* 1991).

Os primeiros trabalhos com a genética dos ritmos biológicos (na frequência circadiana) foram realizados no começo da década de 30 por Bunning e Kalmus que trabalharam com a periodicidade diária da movimentação das folhas primárias do feijão (*Phaseolus multiflorus*) e o ritmo de eclosão de drosófila (*Drosophila melanogaster*), respectivamente (Bunning 1935; Kalmus 1934). Já nesta época apareceram as primeiras sugestões de determinação poligênica para ritmicidade biológica.

Estas mesmas idéias foram retomadas por Pittendrigh, no fim da década de 60, desta vez trabalhando com uma outra espécie de drosófila, a *Drosophila pseudoobscura*. Pittendrigh (1967) descreveu a existência de linhagens precoces e tardias relativas à distribuição diária da emergência do adulto. Praticamente na mesma época, Rensing trabalhando com 26 diferentes mutantes de *D. melanogaster*, mostrou que o cromossomo X tem um papel muito importante na determinação dos padrões circadianos de consumo de oxigênio (Rensing *et al.* 1968). Mostrou também que deve haver a contribuição de cromossomos autossômicos neste padrão genético.

A rápida evolução no campo da biologia molecular tem trazido novas ferramentas para a investigação dos mecanismos de controle do relógio biológico. Os

estudos de ritmos biológicos através da abordagem por técnicas de genética molecular têm sido desenvolvidos de forma corrente em três sistemas biológicos: *Drosophila* (Jackson 1983; Konopka 1987), o fungo *Neurospora* (Lakin-Thomas *et al.* 1990) e a alga *Chlamydomonas* (Feldman 1983; Mergenhagen 1984). A identificação de genes que parecem ter crucial importância na ritmicidade circadiana em *Drosophila* e *Neurospora* tem levado muitos pesquisadores a procurar pelos seus homólogos em mamíferos (Sangoram *et al.* 1998; Sun *et al.* 1997, Vitaterna *et al.* 1994; Zylka *et al.* 1998). Os resultados têm indicado que em mamíferos o relógio circadiano seja regido de modo similar.

Em termos gerais, os genes relógio têm que satisfazer os seguintes critérios (Aronson *et al.* 1994):

- (i) a ausência da proteína-relógio deve levar a arritmicidade;
- (ii) a proteína deve apresentar ritmo circadiano, mesmo na ausência de “Zeitgebers” (= sinais externos);
- (iii) a fase do ritmo deve ser alterada pelos “Zeitgebers”;
- (iv) a manipulação dos níveis protéicos deve mudar a fase do ritmo.

Em *Drosophila* a identificação do locus *per* (“period”) começou inicialmente com a caracterização e isolamento de mutantes de período *per^l*, *per^s* e *per⁰* por Konopka e Benzer (1971) sendo definido como longo, curto ou arritmico (sob condições de livre-curso), respectivamente. Posteriormente, mostrou-se que esses alelos afetam ritmos ultradianos, de aproximadamente 1 min, relacionados à emissão de som pelas asas do macho durante a corte sexual (Kyriacou & Hall 1980).

Dois ritmos circadianos têm sido estudados em função da sua regulação pelo gene *per*: o da emergência dos adultos e os ciclos de atividade e repouso de animais

adultos. As mutações descritas, que afetam o gene *per*, estão num *locus* do cromossomo X, onde diferentes alelos são responsáveis pela expressão fenotípica de períodos circadianos curtos, longos e mesmo arrítmicos. Um segundo gene relógio, o *tim* (“timeless”), foi isolado por mutagênese (Gekakis *et al.* 1995; Rutila *et al.* 1996) e mostrou não somente ser crucial no comportamento rítmico da mosca, como também para manutenção da ritmicidade do gene *per* (Price *et al.* 1995; Sehgal *et al.* 1994). Os níveis de RNAm de *tim* e proteína TIM oscilam circadianamente e em fase com RNAm de *per*, sendo a degradação de TIM ativada por luz (Hunter-Ensor *et al.* 1996; Reppert & Sauman 1995; Sehgal *et al.* 1995). As proteínas PER e TIM formam heterodímeros que são capazes de entrar no núcleo e inibir a transcrição dos seus respectivos genes (Gekakis *et al.* 1995; Zeng *et al.* 1996). A ausência de um dos dois acarreta na ausência de ritmo do outro. Há ainda, dois outros *loci* do mesmo cromossomo X que estariam envolvidos com outras características temporais, o gene *clock* (*clk*) e o *andante* (Hall & Rosbash 1988; Konopka 1987).

A descoberta recente do gene relógio *double time* (*dbt*) esclareceu o papel da fosforilação da proteína PER no seu ajuste rítmico e degradação (Kloss *et al.* 1998). A ausência da proteína DBT leva ao acúmulo de PER não fosforilado no citoplasma (Price *et al.* 1998), e não é formado o complexo heterodimérico com TIM e, conseqüentemente, ocasiona arritmicidade. Duas outras mutações em *Drosophila*, *clock* (*clk*) e *cycle* (*cyc*) identificaram os ativadores da transcrição de *per* e *tim*. Homozigose para o locus *clock* gerou atividade locomotora de ritmo longo ou arrítmico. Os produtos protéicos de *clock* e *cycle* formam heterodímeros que ativam a transcrição de *per* e *tim*. A transcrição do gene *clock* é rítmica, enquanto os níveis de RNAm de *cyc* permanecem constantes durante um período de 24 h. O gene *clock* codifica um fator de transcrição com propriedade de ligar-se ao DNA em uma região e à proteína PER, em outra,

regulando assim sua transcrição. A proteína CYC tem propriedade funcional similar à de CLOCK, e em homozigose, também leva a arritmicidade (Young 2000).

Um outro gene relógio isolado em *Drosophila* é o gene *cryptochrome* (*cry*). Ele está envolvido na recepção de sinais luminosos e transmissão dos mesmos para o relógio por formação de complexo com TIM (Ceriani *et al.* 1999). Esse gene apresenta grande similaridade com os receptores de luz azul de plantas.

O mapeamento genético do sistema circadiano só foi possível e produtivo através da utilização de técnicas de análise de frequência mutacional, as quais mostraram que mutações pontuais influenciam as características dos diversos ritmos circadianos estudados. Esta abordagem foi facilitada pelo emprego de organismos geneticamente mais simples como algas, fungos e insetos.

Nos mamíferos, sendo os roedores os estudados com mais frequência, a análise de mutantes é tremendamente dificultada, seja pela sua inexistência, seja pela própria dificuldade de se ter um número razoável de indivíduos, em cada geração, que permita uma análise genética confiável. Em 1988 foi feita a primeira descrição de um mutante de ritmo em um vertebrado (hamster): a mutação ocorreu em um único *locus* cromossômico, chamado *tau*, e afeta o tamanho do período circadiano da atividade (Ralph & Menaker 1988). O ritmo circadiano de atividade do mutante tem um período de apenas 20 h, sendo esta característica parcialmente dominante. Ainda não se sabe até que ponto esta mutação afetou outras características fisiológicas, comportamentais, ou mesmo o desenvolvimento do organismo como um todo. A clonagem do *locus tau* revelou que a mutação afeta a sequência da caseína quinase. Essa mutação *tau* no hamster é causada pela substituição de um aminoácido e a quinase mutante não é capaz de ligar-se a proteínas PER e fosforilá-las. Então, *tau* é um ortólogo do gene relógio *double time* de drosófila (Young 2000).

Ortólogos de cada um dos genes relógio de *Drosophila* têm sido identificados no genoma de ratos e do ser humano por análises de PCR e Microarrays. Em rato incluem-se:

- três genes *per*: *mPer1*, *mPer2*, *mPer3*, que exibem oscilação cíclica dos níveis de RNA no núcleo supraquiasmático. Os transcritos destes genes inibem a transcrição de *mPer1*, e o produto de *mPer2* promove a ativação do gene *Bmal1*. Uma variante *Per1* foi encontrada em humanos (Tei *et al.* 1997).

- dois genes *cry* (criptocromo): *mCry1*, *mCry2*, oscilam em alguns tecidos;

- 1 gene *mclock*: ativador do gene *mPer* como parte de um heterodímero com o produto de *Bmal1*. Ativa a transcrição de *Cry1* e *Cry2*.

- 1 gene *tim*: intimamente relacionado ao *tim* de *Drosophila*, mas sua função ainda é desconhecida por haver importantes diferenças com relação à função do mesmo na mosca. TIM não oscila circadianamente, não se associa fisicamente com PER e não tem sua degradação ativada por luz. Tal fato revela a possibilidade de ter havido diferentes especializações dos genes relógio durante a evolução (Young 2000). Um homólogo de *tim* também foi encontrado em seres humanos.

- *Bmal1*: ortólogo a *cyc* de *Drosophila*; CYC ativa a transcrição de *per1*.

Com base nos estudos em cianobactéria, fungo, drosófila e ratos, acredita-se que o mecanismo oscilador circadiano central consista de um ou mais “loops” de retroalimentação transcricional. Embora os mecanismos de oscilação sejam conservados, os componentes do oscilador em cianobactéria e *Neurospora* têm pequena similaridade de sequência entre si e com aqueles de *Drosophila* e ratos. Em contraste, os componentes do oscilador de *Drosophila* e mamíferos mostram alto grau de

similaridade, uma propriedade que tem gerado avanços recentes na compreensão do oscilador.

O fato de terem sido encontrados em mamíferos vários homólogos dos genes relógio de *Drosophila* indica que parte dos mecanismos de manutenção dos ritmos circadianos tenha sido preservada evolutivamente. Todavia, ainda é cedo para realizarmos comparações entre os relógios biológicos de animais e de plantas. Trabalhos realizados com *Synechococcus* (Kondo & Ishiura 2000, Johnson & Golden 1999) têm revelado nesta cianobactéria 3 *loci* relevantes (*kaiA*, *kaiB*, *kaiC*), cujas proteínas estão fisicamente associadas e autorregulam a expressão gênica e o ritmo molecular circadiano. Nenhum desses genes tem, no entanto, similaridade com aqueles genes de relógio de *Drosophila* e mamíferos identificados até o momento. Isto sugere que os relógios circadianos possam ter evoluído independentemente ao menos duas vezes na evolução, gerando os mecanismos encontrados em *Drosophila* e mamíferos, e os mecanismos do relógio no reino vegetal (Young 2000).

A expressão celular do relógio biológico, mais precisamente a organização dos componentes envolvidos na geração persistente dos processos rítmicos mantêm-se ainda incógnita. Caracterizar proteínas circadianas que são ativas em diferentes períodos do dia, e isolar "proteínas-relógio" que controlam a expressão subsequente têm sido o objetivo de vários grupos de pesquisa. Uma importante distinção precisa ser feita entre proteínas relógio e proteínas controladas pelo relógio. A proteína relógio ou qualquer componente do relógio é aquela cuja ausência ou retirada do sistema resultará numa total perda de ritmicidade. Por outro lado, a retirada de componentes regulados pelo relógio não perturbará o mecanismo rítmico, somente a sua própria manifestação.

A expressão da NR tem sido estudada em nível molecular devido à constatação recente de que a mesma tem componentes temporais circadianos em sua regulação.

Oscilações circadianas dos níveis de RNAm de NR têm sido demonstradas em *Nicotiana plumbaginifolia* (Deng *et al.* 1990), *Arabidopsis thaliana* (McClung & Kay 1994), *Gonyaulax polyedra* (Ramalho *et al.* 1995), *Lycopersicon esculentum* (Galangau *et al.* 1988). A tradução do RNAm da NR na enzima NR ativa é necessária para obtenção de retroalimentação negativa no sistema oscilatório (Esquema 5). Tal fato foi observado quando plantas tiveram o meio de cultura enriquecido com tungstênio, o que levou a inativação da NR por substituir o molibdênio no sítio redutor de nitrato da enzima (Deng *et al.* 1990). Nestas plantas alimentadas com tungstênio os níveis de RNAm de NR permaneceram constantes e em altos níveis, não sendo observada nenhuma oscilação como seria esperado. Conclui-se daí, que a atividade catalítica da NR é necessária para a repressão da transcrição do gene da NR.

A redução de nitrato pela NR e NiR leva a produção de amônia que é assimilada em glutamina pela glutamina sintetase. Os níveis de glutamina em *Nicotiana plumbaginifolia* oscilam de maneira inversa aos níveis de RNAm de NR (Deng *et al.* 1991) o que a coloca como possível candidata no processo de retroalimentação negativa sobre a expressão da NR. Entretanto, o exato mecanismo de inibição da glutamina não foi totalmente esclarecido e certamente a glutamina não é necessariamente o efector negativo *per si*, mas possivelmente algum produto derivado ou dependente de glutamina.

Luz e nitrato são fatores essenciais na expressão da NR (Lillo 1994). A luz parece ser um importante efector positivo na ritmicidade da transcrição bem como na regulação da NR. Os ritmos de atividade da NR e de RNAm de NR persistem somente sob condições de luz constante mas não sob escuro constante em várias espécies. Tal fato foi observado em *Hordeum* (Lillo 1984), *Nicotiana* (Deng *et al.* 1990), *Arabidopsis* (McClung & Kay 1994), milho (Lillo & Ruoff 1989).

Esquema 5. Retroalimentação negativa definindo a oscilação circadiana da NR em plantas superiores. O repressor é a glutamina, que é produto de NR ativa. Entretanto, pouco é sabido a respeito do mecanismo de inibição. O Gene Nia é o gene codificador da NR em tabaco. Modificado de Lillo *et al.* (2001).

Experimentos com várias linhagens transgênicas de *Nicotiana plumbaginifolia* têm suportando a teoria de que a NR sustenta por si mesma o mecanismo oscilatório. Mutantes que produzem uma NR defeituosa e sem atividade mantêm os níveis de RNAm de NR constantes. A oscilação é restabelecida quando estes mutantes são cruzados com formas selvagens contendo o gene *Nia* (gene estrutural da NR) intacto. O restabelecimento do ritmo no híbrido é observado porque o “loop” de retroalimentação negativa foi restabelecido pela presença de NR cataliticamente ativa (Vaucheret *et al.* 1992). Em outras linhagens transgênicas de tabaco, as oscilações do RNAm de NR foram abolidas quando o promotor do gene *Nia* foi substituído pelo

promotor constitutivo 35S mostrando que a região promotora do gene *Nia* é alvo de um sinal de retroalimentação negativa (Vicentz *et al.* 1993).

A fosforilação de diversos componentes do relógio parece ter importância em todos os organismos modelo como drosófila, mamíferos e cianobactérias. Como discutido anteriormente, a NR é fosforilada num sítio específico que leva a ligação com proteínas do tipo 14-3-3 e inibição da atividade da NR. Em adição, a fosforilação parece estar relacionada com a degradação e estabilidade de proteínas relógio da NR de *Arabidopsis* e *Neurospora* (Cotelle *et al.* 2000, Liu *et al.* 2000). Maior quantidade de pesquisa deve ser realizada antes de supor-se o papel da fosforilação da NR na manutenção dos ritmos circadianos tenha alguma importância. Entretanto, reconhece-se que os mecanismos de fosforilação são de fundamental importância no controle do metabolismo celular (Lillo *et al.* 2001).

Todos os osciladores biológicos conhecidos possuem “loops” de retroalimentação negativa e positiva como condição necessária, mas não suficiente para que as oscilações ocorram (Lillo *et al.* 2001). Os elementos essenciais requeridos para a sustentação dos ritmos da expressão da NR estão claramente presentes sem que seja postulado um mecanismo regulador central (Esquema 5). A idéia de um controlador mestre em cada organismo é atraente, mas provavelmente uma simplificação extrema de todo o processo. A pressão seletiva causada pela mudança diária de claro:escuro está constantemente presente e pode selecionar componentes regulatórios para criar ritmos circadianos mais de uma vez dentro de um único organismo.

2. OBJETIVOS

O estudo das características bioquímicas gerais da NR e de sua regulação foi concentrado apenas em alguns organismos como *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *Neurospora* e *Chlorella*. Embora, as características bioquímicas da NR estejam bem estabelecidas, muitas dúvidas ainda não foram elucidadas a cerca de sua estrutura e regulação. Apesar da grande importância das macroalgas no processamento e metabolismo do nitrogênio no ambiente marinho poucos estudos têm sido realizados neste campo.

Portanto, no desenvolvimento do projeto visamos de modo geral ao entendimento dos aspectos moleculares e celulares do relógio biológico que controla a expressão da enzima NR em *G. tenuistipitata*, uma alga de importância econômica. Tivemos como objetivos principais:

- ◆ Caracterização bioquímica da NR de *G. tenuistipitata*;
- ◆ Purificação da enzima NR;
- ◆ Estudo da variação circadiana na atividade e expressão da NR;
- ◆ Estudo da qualidade e intensidade de luz sobre a atividade e expressão da NR;
- ◆ Localização intracelular da enzima NR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes: Os reagentes foram adquiridos dos seguintes fornecedores:

Sigma: NaEDTA, NaNO₃, Na₂HPO₄(12H₂O), FeSO₄(7.H₂O), polivinilpirrolidona (PVP), MgSO₄, NADH, sulfanilamida (SULFA), n-naftiletilenodiamina (NED), MnCl₂(4H₂O), Tiamina, biotina, cianocobalina, anfolito Pharmalyte/pH 3-10, acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, persulfato de amônio, MgSO₄, soroalbumina bovina (BSA), PMSF, tampão CAPS, benzamidina, KCl, poli-L-lisina, EDTA, triton X-100, tris-base, dodecil sulfato de sódio, azul de bromofenol, Coomassie Brilliant blue R e G-250, formaldeído, NaCl, nitrato de sódio, nitrito de sódio, ditiotretol, DTT Tween 20, NR de milho, marcadores de massa molecular “high grade” pré-corados, formaldeído para microscopia eletrônica, nitrato de prata, cianeto de sódio, cloreto de mercúrio, cacodilato de sódio, adjuvante de Freund completo e incompleto, glicina.

Sinth: Na₂HPO₄, sulfato de amônio, nitrato de prata, uréia.

Vetec: NaH₂PO₄.

Biorad: BioRad Protein Assay, membrana PVDF, resina Affigel-blue, Mini Protean II, Transfer Blot Cell system.

AmershamPharmacia: hiperfilme, ECL reagent system, resinas Q-sepharose fast flow, Sephacryl S-300 HR, I¹²⁵ proteína A, VDS-Image Master, colunas XK 16/70 e XK 16/30.

Merck: β-mercaptoetanol, formaldeído, glicerol, metanol, ácido acético, glicerol.

Rosco: papel gelatina azul (número 119), papel gelatina vermelho (número 164).

Kodak: revelador, fixador, filme X-Omat, filme Kodak X-Omat para microscopia eletrônica.

Electron Microscopy Sciences: resina LR White “hard grade”, lâminas de aço, redes de níquel (200 mesh), resina/pó formvar 15/95, cápsulas para infiltração da resina tamanho 00 (8 mm ID, polietileno), caixas para estocagem de redes, pinças especiais para microscopia eletrônica (ME), caixa de lâminas de vidro, partículas de ouro coloidal – 20 nm, “anti-mouse” IgG.

Vector laboratories: Fluoresceína “anti-mouse” IgG (H+L) – purificada por afinidade.

Equipamentos para ME: microscópio óptico Leitz (Aristoplan), microscópio eletrônico de transmissão Jeol, micrótomo Jeol, microondas Pelco™3441 – Laboratory Microwave System, Pelco™3420- Microwave Load Cooler, Pelco™3430-microwave Power Controller.

Outros equipamentos: Autoanalyser II- Technicon, ultracentrífuga Hitachi, espectrofotômetro Hitachi, Centrífuga Sorvall, Quamtameter (Biospherical Instruments Inc. QSL 100), Autogeldivider/acrylamide gel fractioner (fracionador de gel, Savant Instruments Inc.).

3.2. Cultivo e coleta de *Gracilaria*: os ápices de *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang *et* Xia, fase tetrasporofítica, utilizados para início de cultivo foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo que mantém um banco de algas. A alga é proveniente de Haikou (China); foi coletada e isolada de contaminantes em 1993 pelo Dr. Eurico Cabral de Oliveira. O cultivo foi estabelecido em meio von Stosch (VS, Edwards 1970) em água do mar estéril com salinidade de 21‰. A água do mar estéril é obtida por filtração em papel de filtro seguido de autoclavagem por 20 min. Os frascos de cultura foram mantidos em incubadoras com fotoperíodo de 12 h claro (luz branca fluorescente, $150 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por 12 h escuro, temperatura em torno de 20°C e, sob aeração constante. A cada 2 semanas o meio foi substituído por um novo.

3.3. Caracterização bioquímica da enzima NR.

3.3.1. Extração de proteína total: Aproximadamente 2 g (peso fresco) de alga foram lavados em água destilada, secos e, imediatamente, macerados com nitrogênio líquido em almofariz e pistilo e, em seguida, suspensos em tampão fosfato de potássio (gelado) 0,2 M, pH 8,0 contendo 1mM de ditioneitol (DTT). A suspensão foi centrifugada a $17.000 \times g$ por 15 min a 4°C (modificado a partir de Chapman & Harrison 1988) e o sobrenadante (extrato bruto) coletado e mantido a 4°C.

Para determinar os efeitos de diferentes componentes no tampão de extração sobre a atividade da NR, extratos foram preparados adicionando-se ao tampão PVP (4 mg/ml) e/ou EDTA (5 Mm). Também foram testados diferentes processos alternativos de

maceração da biomassa. Maceração diretamente em tampão de extração foi testada com Omini-mixer com homogeneizador elétrico e, com agitação em vortex com “glass beads” ou areia estéril.

A atividade enzimática da NR foi testada no macerado suspenso no tampão de extração sem que o extrato celular fosse centrifugado, e comparou-se essa atividade à apresentada por um extrato submetido à centrifugação. Testou-se também sonicação do extrato celular por 5 min antes de submetê-lo à centrifugação.

3.3.2. Conteúdo protéico: a quantidade de proteína dos extratos brutos foi avaliada pelo método de Bradford (1976), utilizando como referência a soroalbumina bovina (BSA).

3.3.3. Ensaio enzimático para NR: ao extrato bruto adicionou-se tampão fosfato 0,2 M, pH 8,0; KNO_3 10 mM; MgSO_4 2 mM; e a mistura foi mantida a 20°C (temperatura de incubação) por cerca de 10 min. A reação foi iniciada com a adição de NADH 0,4 mM (tempo zero). Após o período de incubação a reação foi interrompida com a adição de ZnSO_4 50mM e 0,7 volumes de etanol absoluto (gelado). Às reações controle não foi adicionado o doador de elétrons. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A quantidade de íons nitrito produzida na reação é medida por reação colorimétrica. A cada alíquota da reação adicionou-se 0,75 mM de sulfanilamida (SULFA; 1.0% em HCl 10%) e 7,7 μM de n-1-naftiletlenodiamina (NED; 0,1%). Os

íons nitrito combinam-se com a SULFA e, em seguida, com o NED formando um complexo de coloração rosa, de absorbância máxima em 543 nm (Grasshoff *et al.* 1983). Uma unidade de atividade de enzima (U) corresponde a 1 μmol de produto formado ou de substrato consumido por min numa reação (Vega-Palas *et al.* 1990); portanto, uma unidade de atividade de NR corresponde a 1 μmol de NO_2^- produzido por min a 20°C. Antes de efetuar a leitura em espectrofotômetro, cada amostra foi centrifugada por 5 min a 12.000 rpm em microcentrifuga de bancada para eliminar sedimentos que eventualmente tenham sido produzidos durante o processo.

3.3.4. Determinação de condições ótimas para o ensaio da NR e caracterização bioquímica.

- **potencial redutor utilizado pela NR de *G. tenuistipitata*** : utilizando-se ensaio de atividade de NR descrito no item anterior foi testada a especificidade da NR substituindo-se NADH por NADPH como doador de elétrons na reação.
- **Temperatura ótima de ensaio:** para verificar a temperatura ótima de ensaio da NR, sua atividade foi avaliada sob as seguintes temperaturas de incubação: 4°, 10°, 15°, 20°, 27°, 37° e 45°C. Todos os ensaios foram realizados como descrito no item 3.3.3 alterando-se a temperatura de incubação do ensaio enzimático.
- **pH ótimo de ensaio:** para estimativa do pH ótimo de atividade da NR o ensaio enzimático foi realizado adicionando-se diferentes tampões à mistura de reação (citrato 0,2 M, fosfato 0,2 M, TRIS-HCl 0,2 M e glicina 0,2 M) com pHs

variando de 5,0 a 10,0 (a 20°C). Exceptuando-se o tipo de tampão adicionado a mistura de reação o teste enzimático foi realizado como descrito no item 3.3.3.

- **K_M aparente tendo o NADH como substrato analisado:** para obtenção do K_M aparente para o NADH, a atividade enzimática da NR foi medida variando-se a concentração do potencial redutor de 0 a 0,5 mM. As condições de ensaio foram as descritas como no item 3.3.3, tendo sido modificada somente a concentração de potencial redutor neste caso.
- **K_M aparente tendo o nitrato como substrato analisado:** para obtenção do K_M aparente para o nitrato, a atividade enzimática da NR foi medida variando-se a concentração de nitrato de 0 a 10 mM. As condições de ensaio foram as descritas como no item 3.3.3, tendo sido modificada somente a concentração de nitrato neste caso. A determinação do K_M aparente de nitrato mereceu atenção especial. Pelo fato desta alga armazenar nitrato em grandes quantidades, foi necessário esgotar suas reservas endógenas. A alga foi mantida por dois meses em água do mar com salinidade de 21‰. O K_M foi estimado por regressões não-lineares usando o programa de ajuste de curvas Enzifitter (Leatherbarrow RJ, Elsevier - Biosoft 1988) e o “background” de nitrato, presente nos tecidos da alga, foi estimado usando o método de Leatherbarrow (1990). Alternativamente, o extrato bruto foi submetido à diálise contra tampão fosfato, a fim de esgotar o nitrato.
- **Determinação do ponto isoelétrico da NR:** A focalização isoelétrica da enzima NR foi realizada em géis cilíndricos de poliacrilamida segundo Haglund (1971) realizando pequenas modificações. Utilizamos anfolitos de pH 3-10 e após a pré-

focalização, cerca de 90 µg de proteína total em 10% de glicerol foi aplicada a cada cilindro. Terminada a focalização, os géis foram fracionados em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 8 contendo 1 mM de DTT. As alíquotas coletadas foram mantidas durante a noite a 4°C com a finalidade de eluir a proteína do gel para o tampão. Para cada alíquota realizaram-se a medida de pH e o ensaio enzimático para NR, realizado como descrito no item 3.3.3.

- **Estabilidade da NR:** a estabilidade da NR foi examinada mantendo-se réplicas provenientes da mesma extração a -20°, 4° e 20°C por 19, 43, 67, 91 e 121 h antes de serem ensaiadas para atividade de NR. Testou-se, também, a viabilidade de congelamento da alga e do macerado a -70°C. Todos os ensaios enzimáticos para NR foram realizados como descrito no item 3.3.3.
- **Teste de inibidores da atividade da enzima NR:** cianeto, uréia, Ag⁺ e Hg²⁺ são conhecidos como potentes inibidores da atividade enzimática da NR (Rigano & Aliotta 1974, 1975; Solomonson 1974; Solomonson & Barber 1990). Tais compostos foram adicionados ao extrato bruto e procedeu-se a medida de atividade de NR. As concentrações finais de cada composto adicionado variaram em torno dos valores médios conhecidos e que inibem 50% da atividade da enzima. O cianeto, o nitrato de prata e o cloreto de mercúrio foram adicionados à mistura de reação 10 min antes da adição de potencial redutor (0,4 mM de NADH) que inicia a reação de óxido-redução. A concentração de cianeto variou de 0,01 a 10 µM; a de nitrato de prata de 0,1 a 1 µM, e a de cloreto de mercúrio de 50 a 300 µM. A uréia foi adicionada ao extrato bruto em concentrações que variaram de 0,5 a 3 M sendo incubada durante 1 h, após o que o ensaio

enzimático foi realizado. Todos os ensaios enzimáticos para NR foram realizados como descrito no item 3.3.3.

3.3.5. Atividade da NR em diferentes porções do talo da alga.

Diferentes porções do talo podem apresentar diferentes quantidades de nitrato redutase (Dipierro *et al.* 1980; Hurd *et al.* 1995). Com a finalidade de testar a distribuição da NR em *G. tenuistipitata* estabeleceu-se como região apical os três centímetros de talo a partir da região apical meristemática e o restante como região basal. Ápices de 3 cm e bases foram, então, isolados, macerados em nitrogênio líquido e ensaiados para atividade de NR como descrito no item 3.3.3.

3.3.6. Indução da atividade da NR.

Fragmentos apicais da alga foram mantidos por aproximadamente 30 dias em água do mar pobre em nitrato e, então, transferidos para água do mar acrescida de 500 μM de KNO_3 , meio VS 100% (500 μM de nitrato), ou para água do mar (0,8 μM de nitrato). Após 24 h os ápices foram congelados em nitrogênio líquido para posterior análise da atividade enzimática de NR como descrito no item 3.3.3.

3.3.7. Absorção de nitrato do meio de cultura.

Para verificação da absorção de nitrato do meio, ápices foram mantidos somente em água do mar durante 15 dias para esgotamento das reservas internas de nitrato. Após esse período os fragmentos foram divididos em 24 amostras (150 mg de alga cada) e,

então, adicionou-se 360 μM de KNO_3 a cada uma delas em intervalos de 1 h durante 24 h. Uma hora depois da adição de nitrato, 10 mL de água do mar foram coletados de cada amostra e imediatamente congelados. A análise do conteúdo de nitrato na água do mar foi realizada pelo Instituto Oceanográfico utilizando AutoAnalyser II-Technicon® seguindo o método de Grasshoff *et al.* (1983).

3.3.8. Determinação da existência de oscilação diária na atividade da NR.

Fragmentos apicais (~ 250 mg) da alga mantidos sob fotoperíodo 12 h de claro/12h de escuro (LD 12:12) ou sob condições constantes (claro constante = LL; escuro constante = DD) foram coletados a cada 2 h durante um período de 24 h e, imediatamente, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C . O ensaio de atividade da NR foi realizado como descrito no item 3.3.3. LD-zero corresponde ao momento de acendimento das lâmpadas na câmara de cultivo, ou seja, o início do período de claro num fotoperíodo claro:escuro.

3.3.9. Purificação da NR de *Gracilaria tenuistipitata*.

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados a 4°C. A atividade da NR foi medida durante a processo de purificação como descrito como descrito no item 3.3.3. O esquema 6 mostra resumidamente as etapas de purificação da NR.

Esquema 6. Etapas de purificação da NR de *G. tenuistipitata*.

3.3.9.1. Tampões utilizados.

Tampão A: tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 8,0 contendo β -mercaptoetanol 14 mM e glicerol 2%.

Tampão B: Tampão A acrescido de PMSF 150 μ g/mL e benzamidina 2 mM.

Tampão C: Tampão A acrescido de PMSF 150 μ g/mL, benzamidina 2 mM, e KCl 100 mM.

3.3.9.2. Preparação do extrato destinado a purificação.

Aproximadamente 400g de biomassa de alga (massa fresca) foram macerados com nitrogênio líquido em almofariz e pistilo. A suspensão do pó foi feita em tampão B sendo utilizado o menor volume possível (cerca de 500 mL). A suspensão obtida foi centrifugada a 17.000 x g por 15 min. O sedimento foi descartado e o sobrenadante centrifugado novamente a 105.000 x g por 1 h a em ultracentrífuga Hitachi rotor fixo. O sobrenadante foi então utilizado na purificação da NR.

3.3.9.3. Cromatografia em “Q-Sepharose Fast Flow”.

O sobrenadante proveniente da centrifugação foi submetido a cromatografia de troca iônica em “batch” utilizando-se 30 mL de Q-Sepharose, previamente equilibrada em tampão B. O sobrenadante foi mantido sob agitação em “batch” com a resina por 30 min para promover melhor adsorção das proteínas a resina. Esta suspensão foi então submetida a centrifugações sucessivas (2 min, 1.000 rpm) após as quais retirava-se o sobrenadante. Essas lavagens foram realizadas até que a absorbância a 280 nm das lavagens fosse inferior a 0,05. A resina foi então transferida para uma coluna XK16/30 (Pharmacia) para ser submetida a gradiente salino. As proteínas adsorvidas a resina foram eluídas com gradiente linear de 75 mM a 700 mM de NaCl em tampão B (20x o

volume da coluna). Foram coletadas frações de 7,5 mL num fluxo de cromatografia de 180 mL/h sendo acompanhadas a atividade de NR e a absorbância a 280 nm de cada fração. As frações que continham atividade de NR foram reunidas e sulfato de amônio foi adicionado lentamente sob agitação para saturação de 45% (258 mg/mL). Após incubação sob agitação por 30 min, a mistura foi centrifugada a 16.000xg por 20 min. O precipitado obtido foi suspenso em tampão B e submetido a diálise por 12 h em tampão A.

3.3.9.4. Cromatografia em Sephacryl S-300 HR.

À amostra proveniente da diálise, adicionou-se KCl concentração final de 100 mM, sendo, então, submetida a cromatografia de gel filtração em uma coluna XK 16/70 (65 cm, Pharmacia) de resina Sephacryl S-300 HR previamente equilibrada com tampão C. Foram coletadas frações de 5mL sob fluxo de 40 mL/h sendo acompanhadas a atividade da NR e a absorbância a 280 nm de cada fração. A calibração da coluna foi realizada com as seguintes proteínas: blue dextran (2.000 kDa), ferritina (400 kDa), citocromo c (12,5 kDa) e flavina (478 Da). As frações que continham atividade de NR foram reunidas e submetidas a cromatografia de afinidade em coluna de resina Affigel-blue.

3.3.9.5. Cromatografia em resina Affigel-blue.

As frações que continham atividade de NR correspondente as frações 12 a 15 eluídas da coluna S-300 HR foram aplicadas a uma coluna de Affigel-blue (1,5 x 10 cm) previamente equilibrada com tampão B. A coluna foi então lavada com 200 mL do mesmo tampão sendo acompanhada a absorbância a 280 nm de cada fração. A eluição da NR foi realizada com 100 mL gradiente linear de NaCl (0 a 1M) em tampão B. Foram

coletadas frações de 2 mL sob um fluxo de 30 mL/h sendo acompanhada a atividade de NR e a absorbância a 280 nm de cada fração. As frações 21 a 26 da coluna Affigel-blue com atividade de NR foram dialisadas contra tampão fosfato 10 mM pH 8,0 e, em seguida, liofilizadas. Após serem suspensas em 50 µL de água deionizada, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.

3.3.9.6. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS.

A eletroforese em SDS-PAGE foi realizada segundo método descrito por Laemmli (1970) utilizando-se o sistema para eletroforese em placa Mini-Protean II (BioRad). O gel de empilhamento continha concentração de acrilamida de 4,5%, e o de separação, 10%, sendo o gel de 0,75 mm de espessura.

As amostras acrescidas de tampão de amostra (concentração final de Tris-HCl 50 mM pH 6,8, DTT 25 mM, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v) e 0,08 µg/mL de azul de bromofenol) foram fervidas por 5 min e então aplicadas ao gel. A eletroforese realizou-se em corrente constante de 15 mA para o empilhamento e 25 mA para a separação dos polipeptídeos. A eletroforese foi interrompida quando a linha do corante azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel. Como padrão de massa molecular foi utilizado o marcador da Sigma Co. (fosforilase b – 94 kDa, albumina bovina – 67 kDa, ovoalbumina – 43 kDa, anidrase carbônica – 30 kDa).

Os polipeptídeos no gel foram corados com azul de Coomassie Blue R-250 0,2% em 50 metanol:10 ácido acético:40 água por 30 a 60 min, sendo descorados em 30 metanol:7 ácido acético:63 água; ou coradas com prata (Blum *et al.* 1987).

3.3.10. Preparação de anticorpos policlonais contra NR.

Para geração de anticorpos contra NR de *G. tenuistipitata* utilizamos a solução contendo o polipeptídeo de aproximadamente 100 kDa purificado; e contra NR de milho utilizamos 0,5 mg da enzima comercial. À solução contendo a NR de milho ou de *G. tenuistipitata* foi adicionado tampão fosfato 0,2 M pH8,0 para completar o volume de 1 mL. Adicionou-se, então, 1 mL de adjuvante de Freund completo e a mistura foi sonicada até tornar-se homogênea. A emulsão foi injetada no coelho (injeção subcutânea) acima da junta do fêmur. Após 15 dias foi aplicado outro pulso de proteína emulsificada com adjuvante de Freund incompleto. Uma semana após esse procedimento o sangue dos animais foram recolhidos em tubos siliconizados.

O sangue foi deixado a temperatura ambiente por no mínimo 2 h para que houvesse formação de coágulo. Após este período, as amostras foram estocadas a 4°C durante uma noite. Este procedimento permite a contração do coágulo sangüíneo. Com o auxílio de uma espátula, o soro e o coágulo foram separados e a remoção de possíveis células remanescentes no soro foi feita por centrifugação a 1.000 x g por 30 min. O sedimento foi descartado e o sobrenadante (soro contendo os anticorpos) mantido a -20°C até o uso (Garvey *et al.* 1977).

3.3.11. Teste dos anticorpos policlonais produzidos em coelho após imunização do mesmo com NR comercial ou NR purificada de *G. tenuistipitata*.

3.3.11.1. “Dot Blot”.

Para testar se houve produção de anticorpos após imunização dos coelhos, NR comercial de milho, extrato bruto de proteínas de *G. tenuistipitata* e NR purificada da

alga foram transferidos para membrana de nitrocelulose utilizando-se o equipamento Dot blot Cell (BioRad), no qual a mistura contendo as proteínas é aplicada a pequenos orifícios abaixo do qual encontra-se a membrana de nitrocelulose. O sistema está submetido a vácuo, então, a mistura é sugada e as proteínas ficam retidas por afinidade a membrana.

Após “dot blot”, as membranas foram incubadas em tampão PBS 1x contendo 3 % BSA (3% BSA-PBS) por 60 min, a temperatura ambiente e sob agitação lenta. Após esse período as membranas foram incubadas por 60 min a 37°C sob agitação, com anticorpo policlonal contra a NR de milho (anti-NR milho) ou contra a NR purificada (anti-NR) diluído em 3 % BSA-PBS. As diluições feitas foram 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:2000. Após lavagem com 0,3 % BSA-PBS por 5 vezes a cada 6 min, a membrana foi incubada com 1 μ Ci de proteína A- I^{125} diluída em 3% BSA-PBS durante 1 h a 37°C. Em seguida a membrana foi lavada com várias trocas de PBS1x. Após secagem ao ar, as membranas foram expostas a filmes para raios X (Kodak) em cassete apropriado e mantidos a -70°C. Após o tempo de exposição adequado, o filme foi revelado de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.11.2 “Western blots”.

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada como descrito no item 3.3.9.6, e seguiu-se à imobilização dos polipeptídeos em membrana PVDF como descrito a seguir.

3.3.11.2.1. Transferência de proteínas de géis de poliacrilamida para membrana.

Após eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, os polipeptídeos foram transferidos do gel para membrana PVDF segundo o procedimento descrito por Matsudaira (1987). A transferência foi realizada no aparato Transblot Cell (BioRad) utilizando CAPS (10 mM, pH11, contendo metanol 10%) como tampão de transferência. A membrana de PVDF foi previamente umedecida em metanol e depois equilibrada no tampão de transferência antes que o sistema “sanduíche” fosse montado. A transferência eletroforética foi feita durante 2 h a corrente constante de 250 mA (cerca de 50 V), a 4°C. A eficiência da transferência foi verificada por imersão da membrana em Coomassie Blue R-250 0,1% em metanol 50% (v/v) por 5 min. O excesso de corante foi removido por lavagem com metanol 50%. A membrana PVDF foi então submetida a imunodeteção ou seca ao ar e armazenada a -20° para posterior utilização.

3.3.11.2.2. Imunodeteção utilizando anticorpos policlonais contra NR de milho.

NR comercial de milho e extrato bruto de *G. tenuistipitata* (20 µg) foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE e transferência para membrana PVDF como descrito nos itens 3.3.9.6 e 3.3.11.2.1, respectivamente. Após transferência a membrana foi incubada em tampão PBS 1x contendo 3% BSA (3% BSA-PBS) por 60 min, a temperatura ambiente e sob agitação lenta. Após esse período a membrana foi incubada por 60 min a 37°C sob agitação, com anticorpo policlonal contra a NR de milho diluído 100 vezes em 3% BSA-PBS. Após lavagem com 0,3 % BSA-PBS por 5 vezes a cada 6 min, a membrana foi incubada com 1 µCi de proteína A-I¹²⁵ diluída em 3% BSA-PBS

durante 1 h a 37°C. Em seguida a membrana foi lavada com várias trocas de PBS 1x. Após secagem ao ar, a membrana foi exposta a filme para raios X (Kodak) em cassete apropriado e mantido a -70°C. Após o tempo de exposição adequado, o filme foi revelado de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.12. Teste dos anticorpos monoclonais produzidos contra NR purificada de *Porphyrizans yezoensis*.

Foram testados os anticorpos monoclonais feitos contra NR purificada de *P. yezoensis* cedidos gentilmente pelo Dr. Yoshiko Nakamura (Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan; Nakamura *et al.* 1994). Os testes concentraram-se nos anticorpos que reconheciam regiões do grupo prostético com Mo por corresponder à região mais conservada da proteína.

3.3.12.1. Imunodeteção utilizando anticorpos monoclonais anti-NR de *P. yezoensis*.

Extrato bruto de *G. tenuistipitata* (20 µg por canaleta) foi submetido a eletroforese em SDS-PAGE e transferência para membrana PVDF como descrito nos itens 3.3.9.6 e 3.3.11.2.1, respectivamente. Após a transferência, a membrana foi incubada por uma noite a 4°C em solução de bloqueio (TBS-T: Tris-HCl 10mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado. Em seguida realizaram-se lavagens com trocas de TBS-T, após o que a membrana foi incubada com o anticorpo (diluição 1:3.000 em TBS-T) por 2 h a 4°C. Após incubação no anticorpo primário monoclonal, a membrana foi submetida a lavagens sucessivas com TBS-T, e

em seguida, incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase produzido em rato (diluição de 1:5.000 em TBS-T) a temperatura ambiente durante 1h. Em seguida, a membrana foi lavada várias vezes com TBS-T e incubada por 1 min na solução ECL1-ECL2 do kit na proporção 1:1; e, imediatamente exposta a filme especial para detectar quimioluminescência (Hyperfilm ECL) e revelada a tempos que variaram de 1 a 5 min. A mistura ECL1-ECL2 contém luminol que em condição alcalina é oxidado pela peroxidase conjugada ao anticorpo secundário. Imediatamente após a oxidação, o luminol está num estado excitado o qual então decai ao estado fundamental via emissão de luz que pode ser detectada por curta exposição a filme de auto-radiografia sensível (Hyperfilm ECL). A quimioluminescência é aumentada pela presença de reagentes químicos na mistura de ECL que atuam como amplificadores.

3.3.12.2. Titulação dos anticorpos monoclonais feitos contra NR de *P. yezoensis*.

Extratos brutos preparados como descrito no item 3.3.1, contendo alta atividade de NR foram incubados a 24°C com diferentes concentrações dos anticorpos NR10 e NR20, durante uma hora. Após este período, a atividade de NR remanescente foi estimada como descrito no item 3.3.3 e comparada com a atividade enzimática encontrada no extrato bruto sem adição de anticorpos (controle).

3.3.13. Estudo do efeito de moduladores sobre a NR.

Nos organismos onde a NR foi estudada verificou-se sua modulação por vários fatores externos como a natureza da fonte de nitrogênio e quantidade e qualidade de luminosidade.

3.3.13.1. Efeito da adição de amônio ao meio de cultura sobre a atividade da enzima NR e sobre a quantidade da proteína NR.

A adição de amônio ao meio de cultura leva a inibição da atividade enzimática da NR (Franco *et al.* 1988; Crawford 1995). Ápices foram isolados e mantidos em tubos de ensaio com meio de cultura. A cada tubo foram adicionados 10 mM de amônio; a coleta realizou-se 24 h, 48 h, 72 h e 96 h depois da adição, sendo que ao tubo controle não foi adicionado amônio. Como controles adicionais, tínhamos 2 tubos de ensaio com ápices apenas em água do mar (salinidade 21 ‰, sem amônio e com baixa quantidade de nitrato), a um deles adicionamos 10 mM de sulfato de amônio e ao outro, 10 mM de nitrato de sódio e as amostras foram coletadas após 24 h.

3.3.13.2. Efeito da qualidade de luz sobre a atividade da NR e sobre a quantidade da proteína NR.

De acordo com os dados da literatura (Ninnemann 1995; Aparicio *et al.* 1976), a luz azul e a luz vermelha têm papel fundamental na regulação da atividade da enzima NR, sendo descrito que a primeira teria papel ativador, enquanto que a luz vermelha teria papel inativador. Para testar se qualidade de luz influenciaria na atividade da NR, utilizamos como filtros folhas de papel gelatina azul (marca Rosco número 119) e vermelha (marca Rosco número 164) que foram indicados pelo Prof. Mikya Muramatsu do Departamento de Óptica do Instituto de Física da USP (Campus Capital) por serem de melhor qualidade e garantirem um espectro de transmitância restrito aos comprimentos de onda do azul e vermelho, respectivamente (Figura 2). Ápices isolados, aliquotados em tubos de ensaio com meio de cultura, foram colocados em caixas de acrílico revestidas com o papel gelatina vermelho ou azul, sendo o controle (luz branca) mantido em caixa acrílica sem nenhum revestimento. Com um quantameter (Biospherical Instruments Inc.-

QSL100) medimos as irradiâncias de luz em cada condição: a irradiância da luz branca era de $120 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, de luz azul era de $6,6 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e de luz vermelha de $31 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A cada 3 horas, durante 36 h, uma alíquota (tubo de ensaio contendo 0,2 g de ápices) submetida a cada tipo de luz foi retirada. As alíquotas de luz azul e luz vermelha foram retiradas sob iluminação azul e vermelha, respectivamente, não tendo ocorrido nenhuma influência de outra qualidade de luz no experimento. A atividade enzimática de NR de cada amostra coletada foi medida como descrito no item 3.3.3 e “Western blots” foram realizados, como descrito nos itens 3.3.12.1

3.3.13.3. Efeito da qualidade de luz sobre a atividade da NR e sobre a quantidade da proteína NR quando se tem mesma irradiância para cada tipo de luz.

Montamos uma sala especial onde 7 lâmpadas de 40 W cada foram posicionadas na parte superior de uma estante com divisórias de vidro. Com o auxílio do quantameter, determinamos posições na estante que correspondiam à mesma irradiância de luz quando os filtros fossem ou não utilizados. Tanto a luz branca, quanto àquela obtida com o filtro azul e o vermelho em diferentes prateleiras, tinham a irradiância de $50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Essa irradiância corresponde à metade daquela na qual a alga é cultivada. Os ápices foram aliquoteados em placas de Petri com meio de cultura e permaneceram na prateleira onde a luz branca era de $50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 5 dias para aclimatá-los a menor irradiância de luz. Após esse período, cada placa de Petri foi colocada dentro de um envelope feito com o papel gelatina azul ou vermelho e posicionadas nas prateleiras. As placas que ficaram na luz branca não receberam nenhum invólucro. Os filtros foram

colocados no final do dia, pouco antes das luzes da sala de cultura serem apagadas. As coletas foram realizadas após 2, 4 e 8 h de luz do próximo período de claro (CT02, CT04 e CT08, respectivamente). A atividade enzimática de NR de cada amostra coletada foi medida como descrito no item 3.3.3. “Western blots” foram realizados, como descrito no item 3.3.12.1.

A **B**

Figura 2. Espectro de transmitância do papel gelatina utilizado como filtro de luz. A) papel gelatina azul (Marca Rosco no. 119), **B)** papel gelatina vermelho (Marca Rosco no. 164).

3.3.14. Localização intracelular da NR.

3.3.14.1. Indução da síntese da NR.

Ápices (~3cm) foram isolados para indução da síntese da NR. Sabemos que a região apical apresenta maior atividade da enzima NR e sugerimos que o pico de atividade enzimática pode estar relacionado com a maior quantidade de enzima.

Os ápices foram mantidos em água do mar sem nutrientes por uma semana. Após esse período os ápices foram transferidos para água do mar enriquecida com meio Von Stosch (contendo 10 mM de nitrato) e coletados após 24 h da indução da NR.

3.3.14.2. Fixação das células.

Padronizamos as fixações de modo a serem realizadas após exposição a 6 h de luz, coincidindo com a máxima atividade enzimática da NR. Foram testados três diferentes tipos de fixação: padrão, substituição por congelamento e fixação por microondas; como descrito a seguir:

(i) fixação padrão.

Os ápices foram cortados em fragmentos de aproximadamente 2 mm e, imediatamente, imersos em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 contendo glutaraldeído 0,5% e formaldeído 3%. A fixação foi realizada a 4°C por 2 h. Os fragmentos de alga foram então lavados em tampão fosfato por 3 vezes (10 min cada). Procedeu-se então as etapas de desidratação e infiltração descritas abaixo nos itens 3.3.14.3 e 3.3.14.4.

(ii) substituição por congelamento.

Os ápices foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1 cm e, imediatamente, imersos em propano líquido onde permaneceram de 1 a 2 min. Foram, então, transferidos para acetona congelada em nitrogênio líquido. Nesta etapa realizamos 3 diferentes tratamentos:

(A) acetona 100%;

(B) acetona contendo 0,5% de glutaraldeído;

(C) acetona contendo 0,5% de glutaraldeído e 3% de formaldeído.

Os tubos contendo os fragmentos de algas (tratamentos A, B e C), foram então transferidos para o freezer a -85°C onde permaneceram por 3 dias. Após este período os tubos foram transferidos para freezer -20°C onde permaneceram mais 2 dias; sendo então transferidos para geladeira (4°C) onde permaneceram mais dois dias.

Procedeu-se então a etapa de desidratação (descrita no item 3.3.14.3) e a seguir, a infiltração da resina como descrito no item 3.3.14.4.

(iii) fixação por microondas.

O protocolo realizado foi modificado a partir de Westcot *et al.* (1993) que utilizaram microondas convencional na fixação de folhas de tomateiro. Foram testadas três diferentes condições de tempo de exposição e potência utilizada.

A determinação da posição do tubo contendo o material a ser fixado, bem como do béquer contendo água, foi realizada de acordo com a orientação do fabricante do forno de microondas e nas mesmas posições em que o mesmo teve os níveis de potência padronizados.

O talo da alga foi fragmentado em pedaços de cerca de 3 mm e imediatamente transferidos para tubos de vidro contendo 2 mL de tampão cacodilato 50 mM pH 7,3 acrescido de 0,2% glutaraldeído e de 4% p-formaldeído.

Os tempos de exposição e potência variaram da seguinte maneira:

- (A) 10 s a potência de 370 W.
- (B) 15 s a potência de 370 W.
- (C) 15 s a potência máxima (750 W).

O forno de microondas foi ajustado para não ultrapassar o limite de 55°C e a temperatura dentro do frasco contendo a alga foi monitorada por um sensor durante todo o tempo de exposição a microondas.

Sob as condições descritas em A e B, a temperatura não excedeu o limite estabelecido como máximo, porém na condição C, o tampão entrou em ebulição e ocorreu mudança de cor nos fragmentos de alga por decomposição térmica dos pigmentos.

Imediatamente após a exposição a microondas, os fragmentos foram submetidos a 3 lavagens subsequentes (15 min cada) em tampão cacodilato 50 mM pH 7,3.

Procedeu-se então as etapas de desidratação e infiltração em resina a serem descritas.

3.3.14.3. Desidratação do ápice fixado.

O ápice fixado foi então submetido a seguintes etapas de desidratação:

1. água destilada e deionizada, por 10 min em gelo;
2. Etanol 12,5%, por 10 min em gelo;
3. Etanol 25%, por 10 min em gelo;
4. Etanol 50%, por 10 min em gelo;

5. Etanol 75%, durante a noite e mantido a 4°C;
6. Etanol 95%, por 10 min em gelo (duas vezes);
7. Etanol absoluto, por 10 min em gelo (duas vezes).

3.3.14.4. Infiltração da resina no ápice

Após desidratação o ápice foi submetido à infiltração da resina LR White hard grade como descrito abaixo:

Passo 1. 25% resina LR White em etanol absoluto, por 2 h em gelo;

Passo 2. 50% resina LR White em etanol absoluto, por 4-6 h em gelo;

Passo 3. 100% resina LR White, durante 1 noite e mantido a 4°C;

Passo 4. 100% resina LR White, durante 1 dia e mantido a 4°C;

Passo 5. Colocar o fragmento de alga no fundo da cápsula e preencher esta com 100 % resina com cuidado para que a alga fique no fundo do tubo. Colocar a 55°C para que a polimerização da resina ocorra (1 a 2 dias).

3.3.14.5. Microscopia óptica.

Após cada etapa, descritas nos itens anteriores, cortes finos foram realizados a mão livre, ou em micrótomo (após a etapa de infiltração da resina), a fim de checar a integridade da estrutura intracelular sob microscopia óptica.

3.3.14.6. Anticorpos a serem utilizados.

Foram utilizados os anticorpos monoclonais NR10 e NR20 contra NR de *P. yezoensis*. Estes reconhecem especificamente o domínio de molibdênio da NR que corresponde a região mais conservada identificada nas seqüências de aminoácidos das NRs até então identificadas (Solomonson *et al.* 1990).

3.3.14.7. Técnica de Imunofluorescência.

3.3.14.7.1. Preparação das lâminas de vidro.

As lâminas de vidro foram recobertas com uma fina camada de solução de poli-L-lisina (diluição 1:10) para garantir a aderência dos cortes à lâmina.

Cada lâmina foi limpa previamente com etanol absoluto e depois de secas, recebeu aproximadamente 20 μ L da solução de poli-lisina que foi espalhada com uma ponteira plástica. As lâminas foram então mantidas a 60°C por 1 h.

3.3.14.7.2. Montagem das lâminas com os cortes.

O material foi seccionado em micrótomo e cortes de aproximadamente 45 μ m foram obtidos. A cada lâmina de vidro (recoberta com poli-lisina) foram transferidos cerca de 5 cortes. As lâminas foram então transferidas para uma chapa levemente aquecida (~35°C) onde permaneceram até estarem totalmente secas.

3.3.14.7.3. Protocolo de imunofluorescência.

O tratamento das lâminas contendo os cortes obedeceu a seguinte seqüência:

1. as lâminas foram imersas em água deionizada onde permaneceram por 10 min (temperatura ambiente).
2. as lâminas foram transferidas para tampão TBS-T contendo 5% de leite desnatado (solução de bloqueio) onde permaneceram 2 h (temperatura ambiente).
3. lavagem das lâminas por 2-5 min em TBS-T e remoção do excesso de tampão utilizando papel absorvente.

4. sobre os cortes adicionou-se o anticorpo primário anti-NR diluído 10 x em TBS-T. Incubação durante a noite a 4°C em câmara umedecida.
5. lavagem das lâminas por 10 min em TBS-T (3 vezes) e remoção do excesso de tampão utilizando papel absorvente.
6. sobre os cortes adicionou-se o anticorpo secundário “anti-mouse” conjugado a fluoresceína diluído 50 x em TBS-T. Incubação a temperatura ambiente por 2h e em câmara umedecida.
7. lavagem das lâminas por 10 min em TBS-T (3 vezes), seguida de lavagem de 10 min em água deionizada.
8. Remoção do excesso de água e observação em microscópio óptico sob iluminação em UV utilizando-se filtro H3 Leica (código 513807) com excitação na faixa do azul (420-490 nm). Os controles não receberam anticorpo primário.

3.3.14.8. Técnica de imunomarcacão utilizando partículas de ouro como marcador.

3.3.14.8.1. Preparação das telas de níquel.

As telas de níquel foram recobertas com uma fina camada plástica de resina formvar 2% em clorofórmio.

3.3.14.8.2. Cortes ultrafinos.

Os cortes ultrafinos (0,45 μm) foram realizados em micrótomo utilizando-se lâmina de diamante. Cada tela recebeu de 4 a 6 cortes.

3.3.14.8.3. Protocolo de imunomarcação utilizando partículas de ouro como marcador.

O tratamento das telas contendo os cortes obedeceu a seguinte sequência:

9. as telas foram imersas em água deionizada onde permaneceram por 30 min (temperatura ambiente).
10. as telas foram transferidas para tampão TBS-T contendo 5% de leite desnatado (solução de bloqueio) onde permaneceram 2h (temperatura ambiente).
11. lavagem das telas em TBS-T e remoção do excesso de tampão utilizando-se papel de filtro.
12. as telas foram colocadas sobre uma gota do anticorpo primário anti-NR diluído 10 x em TBS-T. Incubação durante a noite a 4°C em câmara umedecida.
13. Remoção do excesso de solução com anticorpo primário utilizando papel de filtro e transferir as telas para tampão TBS-T. Deixá-las no tampão por aproximadamente 1 h.
14. as telas foram colocadas sobre uma gota do anticorpo secundário “anti-mouse” diluído 50 x em TBS-T. Incubação de 2 h a temperatura ambiente em câmara umedecida.
15. Remoção do excesso de solução com anticorpo secundário utilizando papel de filtro e transferência das telas para tampão TBS-T. Deixá-las no tampão por aproximadamente 1 h.
16. Realização de 3 lavagens sucessivas em TBS-T. Cada lavagem consiste de 25 imersões em tampão.
17. Transferência das telas para água deionizada (5-10 min).
18. Secagem em papel de filtro e armazenamento em caixas apropriadas com a devida indicação.

19. Observação no microscópio eletrônico de transmissão. Os controles não receberam o anticorpo primário.

3.3.14.9. Recuperação do antígeno.

Vários protocolos de recuperação de epítopos foram testados na tentativa de aumentar a resposta imune, tendo sido mais eficiente a recuperação por aquecimento em tampão (Harlow & Lane 1999).

O teste de recuperação de antígenos por aquecimento foi realizado utilizando-se dois diferentes tampões (tampão citrato 10 mM pH 6,0 ou EDTA 1 mM pH 8,0) e três diferentes temperaturas (55°C, 65°C ou 95°C), como descrito por Brorson (1999). As telas contendo os cortes receberam o seguinte tratamento, antes de serem submetidas a imunomarcação:

- (i) incubação por 10 min a temperatura ambiente em tampão;
- (ii) incubação de 15 min a 55°C, 65°C ou 95°C;
- (iii) Deixar a temperatura baixar à ambiente naturalmente;
- (iv) Realização de 2 lavagens (10min) em TBS-T;
- (v) Proceder ao protocolo de imunomarcação.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização bioquímica da enzima NR.

O extrato de proteína total de *G. tenuistipitata* foi obtido por diferentes métodos de extração sendo que a maceração mais efetiva foi obtida utilizando-se nitrogênio líquido em almofariz e pistilo, tratamento este que transformou a biomassa num pó fino que foi, em seguida, suspenso em tampão de extração. As demais metodologias de extração feitas diretamente no tampão de extração não foram eficientes (Tabela 2); observando-se a presença de muitos fragmentos de tecido com alguns milímetros de comprimento. Tendo sido a maceração com nitrogênio líquido a mais efetiva este procedimento foi utilizado em todos os demais testes.

A centrifugação do extrato celular suspenso em tampão de extração representou um aumento de cerca de 30% na medida de atividade da NR em relação ao extrato não centrifugado (Tabela 2). A sonicação do extrato celular antes da centrifugação representou um aumento de cerca de 10% na atividade da enzima em relação à fração não sonicada (Tabela 2).

A adição de PVP e/ou EDTA ao tampão de extração não mostrou diferença significativa na atividade da NR em relação à atividade apresentada pelo controle no qual o tampão de extração era composto somente de tampão fosfato (0,2 M, pH 8,0; Tabela 2).

O teste de especificidade da enzima NR para fonte doadora de elétrons revelou que ela é específica para NADH sendo que nenhuma atividade foi detectada quando NADPH foi adicionado à mistura de reação (Tabela 2).

Embora o talo fresco da alga ou o pó macerado possa ser armazenado a -70°C por meses sem perda da atividade da NR, o extrato celular em tampão mantido a mesma

temperatura mantém apenas 10% de sua atividade após 24 h (Tabela 2). Porém, o mesmo extrato celular é relativamente estável por vários dias quando mantido a 4°C. Após 3 dias a esta temperatura o extrato mantém cerca de 80% da atividade inicial. Os extratos mantidos a 20°C apresentaram após 24 h apenas 5% da atividade inicial, enquanto aqueles congelados a -20°C apresentaram, após esse mesmo período, metade da atividade inicial (Figura 3).

Os experimentos realizados para determinação da temperatura e pH ótimos de ensaio mostraram que a NR é mais ativa a 20°C e em pH 8,0 (Figura 4), sendo que neste pH o tampão mais eficiente é o fosfato de sódio 0,2 M. De posse destes dados os demais experimentos foram realizados em tampão fosfato pH 8,0 e as incubações passaram a ser feitas a 20°C.

O valor do K_M aparente obtido utilizando-se NADH como substrato foi de 95 μM , e observamos que concentrações de NADH acima de 0,4 mM inibiram a atividade da NR. Utilizando-se nitrato como substrato obteve-se K_M aparente de 197 μM . Utilizando-se o método de Leatherbarrow (1990) observou-se que após dois meses em cultura sem fonte de nitrogênio a reserva interna de nitrato nos tecidos de *G. tenuistipitata* é cerca de 60 μM . Os valores encontrados para K_M aparente de NADH e nitrato encontram-se próximos dos descritos na literatura (Tabela 3).

Tabela 2. Porcentagem de atividade específica de NR para diferentes condições de extração e ensaio enzimático em relação ao controle (macerado em nitrogênio líquido, centrifugado, e ensaiado, sem adição de PVP ou EDTA, utilizando NADH como fonte doadora de elétrons). Ensaios enzimáticos realizados a 20°C e pH 8,0. Cada ponto correspondendo à média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

	% de atividade específica total (contra o controle)
Método de rompimento do material	
Maceração em nitrogênio líquido	100 $\pm$ 2
Maceração em tampão	14 $\pm$ 3
Sonicação (5 min) após maceração em nitrogênio líquido	110 $\pm$ 10
Extrato Bruto	
Não centrifugado	71 $\pm$ 3
Armazenado a -70°C	8 $\pm$ 3
Sem adição de PVP e EDTA	100 $\pm$ 2
Com adição de PVP (4mg/mL)	113 $\pm$ 14
Com adição de EDTA (5 mM)	109 $\pm$ 12
Com adição de PVP (4mg/mL) + EDTA(5 mM)	97 $\pm$ 14
Ensaio Enzimático	
NADH	100 $\pm$ 1
NADPH	0

Figura 3. *Estabilidade térmica da atividade de NR em extratos de G. tenuistipitata.* O extrato bruto protéico foi mantido a diferentes temperaturas e após período determinado, ensaiamos a atividade de NR como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos. Cada ponto corresponde à média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

Figura 4. *Efeito da temperatura e do pH ótimos sobre a atividade específica da NR de G. tenuistipitata.* Os ensaios de atividade de NR foram realizados como descritos no item 3.3.3 variando-se a temperatura de ensaio da NR (A), e variando-se o pH do tampão de ensaio a 20°C (B). Cada ponto corresponde à média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

Tabela 3. Comparação dos diferentes valores de K_M para NADH e nitrato obtidos para diferentes algas identificando seu habitat.

Macroalga	Material	K_M NADH (μ M)	K_M NO_3^- (μ M)	Habitat	Referência
Chlorophyta					
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	EB *	50	250	Entre-marés	Thomas & Harrison 1988
Rhodophyta					
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	EB	5	30	Entre-marés	Granbom <i>et al.</i> 2001
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	EB	95	197	infralitoral	Esta tese
<i>Porphyra perforata</i>	EB	32	30	Entre-marés	Thomas & Harrison 1985
<i>Porphyra yezoensis</i>	purificada	50	120	Entre-marés	Araki <i>et al.</i> 1979
Phaeophyta					
<i>Fucus gardneri</i>	EB	180	990	Entre-marés	Hurd <i>et al.</i> 1995
Bacillariophyta					
<i>Skeletonema costatum</i>	purificada	3,6	295	Plâncton	Gao <i>et al.</i> 1993
<i>S. costatum</i>	EB	48	146	Plâncton	Berges & Harrison 1995
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	EB	17	47	Plâncton	Berges & Harrison 1995
Dinoflagelados					
<i>Amphidinium carterae</i>	EB	150	75	Plâncton	Berges & Harrison 1995
<i>Gonyaulax polyedra</i>	purificada	80	250	Plâncton	Ramalho <i>et al.</i> 1995

*EB= extrato bruto

A atividade específica da NR encontrada no extrato bruto preparado de bases foi cerca de 46% menor que a encontrada no extrato bruto de ápices (Figura 5); mostrando claramente que a NR ativa está presente em maior quantidade na região apical.

Figura 5. *Atividade específica de NR em diferentes porções do talo de G. tenuistipitata.* Estabeleceu-se como região apical os três centímetros de talo a partir da região meristemática e o restante como região basal. Ápices de 3 cm e bases foram, então, isolados e ensaiados para atividade de NR como descrito no item 3.3.3. Cada ponto corresponde à média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

Os resultados da focalização isoeletrica revelaram que a NR é uma proteína básica apresentando pI 8,66 (Figura 6).

Figura 6. Determinação do ponto isoeletrico da NR de *G. tenuistipitata*. A focalização isoeletrica da enzima NR foi realizada em géis cilíndricos de poliacrilamida segundo Haglund (1971). Foram utilizados anfolitos de pH 3-10, e a cada gel foram aplicados 90 µg de proteína total em glicerol 10%. Após focalização os géis foram fracionados em tampão fosfato 0,2 M contendo DTT 1 mM. Em cada alíquota mediu-se o pH e o ensaio enzimático para NR foi realizado como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos.

A NR de diversos organismos tem sua atividade catalítica inibida por cianeto, uréia, prata e chumbo, inibidores clássicos da atividade desta enzima. Na Tabela 4 pode-se observar a inibição da atividade da NR de *G. tenuistipitata* utilizando tais inibidores.

Tabela 4. Inibição da atividade da NR de *G. tenuistipitata*. Diferentes inibidores da atividade enzimática de NR foram adicionados ao tampão de ensaio e as atividades medidas conforme descrito no item Material e Métodos. Cada ponto corresponde a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

Tratamento	Atividade específica NR remanescente (%)
Nenhum (controle)	$100 \pm 4,7$
Adição de NaCN (1 μ M)	$61,2 \pm 3,5$
Adição de uréia (1 M)	$48,5 \pm 2,2$
Adição de HgCl ₂ (3 μ M)	$67,9 \pm 3,5$
Adição de AgNO ₃ (1 μ M)	$58,8 \pm 10,2$

4.2. Indução da atividade da NR.

Quando fragmentos de alga foram mantidos por longos períodos (2 meses) em água do mar pobre em nitrato um aumento na atividade da NR foi observado após adicionar-se água do mar fresca, nitrato ou meio VS a cultura (Figura 7). Estas atividades, entretanto, eram menores que aquelas observadas em culturas crescidas sob condições nutricionais ótimas.

Figura 7. Atividade de NR em fragmentos apicais submetidos a limitação de nutrientes e posterior adição de nitrato. A atividade de NR foi medida em fragmentos apicais mantidos sob condições de limitação de nutrientes e 24h após substituição da água do mar pobre em nitrato por água do mar não enriquecida ($0,78 \mu\text{M}$ de NO_3^-), por nitrato ($500 \mu\text{M}$), ou por meio VS ($500 \mu\text{M}$ de NO_3^-). Controles (ou seja, ápices mantidos sob condições de limitação de nutrientes e sem nitrato adicionado ao meio de reação da NR) mostram uma atividade basal de $0,94 \text{ U}$. Todos os ensaios foram realizados como descrito em Material e Métodos utilizando 250 mg de alga. Cada ponto corresponde a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.3. Absorção de nitrato do meio.

A absorção de nitrato do meio mostrou estar ocorrendo principalmente durante o período de escuro de um regime LD (Figura 8). Como mostrado pela quase completa recuperação do nitrato adicionado ao meio durante este período, pouco ou nenhum nitrato foi absorvido durante o dia. Estes resultados evidenciam uma atividade noturna dos transportadores de nitrato localizados na membrana celular. Pode-se observar também que a partir do momento em que a luz é apagada a ativação do transporte é imediata permanecendo com níveis 5 vezes maiores que durante o dia por toda a fase noturna.

Figura 8. Oscilação diária na absorção de nitrato do meio de cultura por fragmentos apicais sob regime LD. Culturas de alga foram mantidas em água do mar pobre em nitrato por 10 dias. Uma hora após a adição de nitrato (concentração final 360 μM , mostrada por -----), amostras da água (10 mL) foram coletadas, e a quantidade de nitrato remanescente na água do mar foi medida como descrito no item 3.3.7 de Material e Métodos.

4.4. Determinação da existência de oscilação diária na atividade da NR.

Nos fragmentos apicais de alga cultivados sob regime claro:escuro (LD, 12:12) a atividade da NR exibiu um ritmo diurno (Figura 9), sendo que o pico de atividade ocorreu por volta da 6-8 h de luz e é cerca de 30 vezes maior que a atividade durante o período noturno.

Figura 9. Oscilação diária da NR em fragmentos apicais de *G. tenuistipitata*. Culturas de *G. tenuistipitata* foram mantidas em regime LD e ápices coletados a cada 2 h. Os ensaios de atividade de NR foram realizados como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos. Cada ponto corresponde a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

Sob condições de regime de claro constante (LL), a atividade da NR foi cerca de duas vezes maior que atividade observada durante condições de regime de luz LD (Figura 10). Os experimentos sob regime LL foram realizados por até 10 dias e mostraram que a ritmicidade de atividade da NR pode ser detectada depois desse período de exposição a claro constante. Em regime de escuro contínuo (DD) a atividade de NR encontrada foi baixa, representando cerca de 15% da atividade encontrada nas amostras submetidas a regime de claro constante, e nenhum ritmo foi verificado (Figura 10).

Figura 10. Oscilação circadiana da atividade da NR em fragmentos apicais de *G. tenuistipitata*. Ápices de *G. tenuistipitata* mantidos em regime LL (---■---) ou regime DD (---●---) foram coletados a cada 2 h. Os ensaios de atividade de NR realizaram-se como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos. As setas mostram o pico de atividade da NR. Cada ponto corresponde a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.5. Purificação da enzima NR.

Partindo-se de uma biomassa de 400 g iniciou-se a purificação da NR sendo finalizada após 4 dias. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi submetido a cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose FF e a atividade de NR foi eluída desta resina como um pico de atividade em gradiente salino linear de 75 a 700 mM em tampão de extração (frações 21 a 52) como pode ser visto na Figura 11.

Figura 11. Cromatografia de troca-iônica em resina Q-Sepharose FF. O extrato bruto de *G. tenuistipitata* foi aplicado a resina de troca iônica empacotada em coluna XK16/30 (Pharmacia) e a eluição das proteínas adsorvidas foi realizada com aplicação de gradiente salino linear (NaCl 75 mM a 700 mM no tampão de extração), sob fluxo de 180 mL/h. A eluição das proteínas foi monitorada a 280 nm (---♦---), e a atividade de NR a 543 nm (---■---), depois de ensaiar cada uma das frações para a atividade de NR como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos.

As frações com atividade de NR eluídas da Q-Sepharose foram reunidas, precipitadas com sulfato de amônio a concentração final de 45%, dialisadas e submetidas a cromatografia em coluna de gel filtração S-300 HR. Nesta cromatografia, mostrada na figura 12, observamos a eluição de um único pico de atividade de NR, que segundo a curva de calibração da coluna corresponde a região de massa molecular aproximada de 420 kDa.

Figura 12. Cromatografia de gel filtração em resina Sephacryl S-300. As frações eluídas da Q-Sepharose contendo atividade de NR foram reunidas e sulfato de amônio adicionado lentamente até saturação final de 45% (a 4°C). As proteínas precipitadas foram suspensas em tampão de extração e dialisadas, antes de submetidas a gel filtração em resina Sephacryl S-300 empacotada em coluna XK16/70 (65 cm). A cromatografia foi realizada sob um fluxo de 40 mL/h, e o perfil protéico monitorado a 280 nm (—♦—). A atividade de NR foi ensaiada para cada fração (absorbância a 543 nm, —■—) como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos. O pico de atividade de NR mostrou que a holoenzima tem aproximadamente 420 kDa. As setas mostram os padrões utilizados na calibração da coluna (flavina mononucleotídeo, 478 Da; ferritina, 430 kDa; citocromo c, 12,3 kDa; e, blue dextran, 2.000 kDa).

Na Figura 13 temos o SDS-PAGE das etapas de purificação que foi corado por prata. Como pode ser observado no gel, a partir da etapa 4, diálise após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, na área onde referente a NR (~110 kDa) nenhuma banda é visível. Porém a atividade específica continua bastante elevada.

Figura 13. SDS-PAGE das etapas de purificação da NR de *G. tenuistipitata*.

Cerca de 5 μg de proteína total foram aplicadas a cada canaleta, submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 10% e coradas com prata como descrito no item Material e Métodos. Nas canaletas foram aplicados respectivamente: 1) extrato bruto; 2) extrato bruto submetido a ultracentrifugação, 3) “pool” das frações eluídas a coluna Q-Sepharose com atividade de NR; 4) precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dialisado; 5) “pool” das frações eluídas da coluna Sephacryl S-300 com atividade de NR. A posição relativa dos padrões de massa molecular está indicada pelas setas a esquerda.

As frações com atividade de NR eluídas da coluna S-300 HR (11 a 20) foram reunidas e submetidas a cromatografia de afinidade em resina Affigel-blue e a atividade de NR, eluída com gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M (Figura 14).

Figura 14. Cromatografia de afinidade em resina Affigel-blue. As frações eluídas da Sephacryl S-300 contendo atividade de NR foram reunidas e aplicadas numa coluna de afinidade Affigel-Blue 1,5 x 10 cm (Bio Rad), previamente equilibrada com tampão de extração, e lavada exaustivamente com o mesmo tampão. As lavagens foram descartadas e a NR eluída com gradiente salino linear (NaCl, 0 a 1 M no tampão de extração) sob fluxo de 30 mL/h. A eluição da proteína foi monitorada a 280 nm (--♦--), e a atividade de NR a 543 nm (--■--), depois de ensaiar cada uma das frações para atividade de NR como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos.

As frações de 21 a 26 eluídas da coluna Affigel-blue foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 10% e coloração por prata e revelaram um polipeptídeo majoritário de aproximadamente 110 kDa (Figura 15).

Figura 15. SDS-PAGE das frações com atividade de NR eluídas da coluna Affigel-blue corado por prata. As frações contendo atividade de NR eluídas da resina Affigel-blue foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) contendo SDS e os polipeptídeos foram corados com prata de acordo com Blum *et al.* (1987). A posição dos marcadores de peso molecular (pré-corados Sigma High) está indicada, e o polipeptídeo purificado de aproximadamente 110 kDa está indicado pela seta a direita.

Na Tabela 5 apresentamos os resultados da purificação da NR de *G. tenuistipitata*. Interessante que após etapa de troca iônica observamos uma recuperação de 436,89% com aumento na atividade total de NR. Isto provavelmente aconteceu por termos separado algum tipo de inibidor da NR durante a eluição por gradiente salino. Durante o processo de purificação foi obtida enzima cerca de 500x mais pura e com rendimento de 85%. A proteína obtida após a purificação tem um grau de pureza e homogeneidade acima de 95% como confirmado na Figura 15.

Tabela 5. Purificação da NR de *Gracilaria tenuistipitata*.

Passo	Volume (mL)	Proteína (mg)	Atividade total (U)*	Atividade específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Sobrenadante	600	547	3,74	0,0068	1	100
17.000 x g						
Sobrenadante	600	537	2,92	0,0054	1	78,07
105.000 x g						
Q-Sepharose	240	67,3	16,34	0,2429	36	436,89
Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄	5	43,8	0,27	0,0069	1	7,22
S-300 HR	50	17,5	5,94	0,339	49,85	158,88
Affigel-Blue	12	0,095	3,21	3,37	495,58	85,52

* 1U= μ mol de nitrito reduzido por minuto a 20°C.

4.6. Teste dos anticorpos policlonais produzidos em coelho após imunização do mesmo com NR comercial de milho ou NR purificada de *G. tenuistipitata*.

4.6.1. “Dot Blot”.

Após realizar a imunodeteção em “dot blot” com o soro imune dos coelhos verificamos na autorradiografia que o soro do coelho imunizado com a injeção de NR comercial de milho deu resultado positivo e intenso nos “dots” em que aplicamos a NR de milho, inclusive quando o soro foi diluído 2.000 vezes (Figura 16A). Na mesma autorradiografia podemos observar que nenhum sinal foi observado quando soro imune obtido contra a NR purificada de *G. tenuistipitata* foi utilizado no procedimento de imunodeteção em membranas contendo extrato bruto protéico da alga (Figura 16B). A incubação de membranas com soro pré-imune não acarretou marcação alguma, garantindo que os coelhos não possuíam anticorpos que reconhecessem as enzimas injetadas.

Figura 16. Imunodeteção em “dot blot” usando soro imune produzido em coelho contra NR de milho comercial e de *G. tenuistipitata*. Extrato bruto protéico de *G. tenuistipitata* e NR comercial de milho foram imobilizados em membrana de nitrocelulose utilizando aparato da Dot Blot (Biorad). As tiras de membrana contendo NR de milho foram incubadas com diferentes diluições (indicadas a esquerda) do soro imune produzido contra NR de milho (A), e tiras de membrana contendo NR purificada de *G. tenuistipitata* (B), contra o soro imune produzido contra NR purificada de *G. tenuistipitata*. As membranas também foram incubadas com soro pré-imune não revelando nenhum sinal. A imunodeteção foi realizada com ^{125}I -proteína A como descrito no item Material e Métodos.

4.6.2. “Western blot”.

NR comercial de milho e extrato bruto de *G. tenuistipitata* foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE 10 % seguido de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e posterior imunodeteção usando o soro imune obtido em coelho contra NR de milho. Na Figura 17 observamos em autorradiografia que o anticorpo policlonal reconhece uma única banda de aproximadamente 110 kDa na canaleta 1 onde NR milho foi aplicada; e não apresenta reação cruzada com nenhum polipeptídeo do extrato bruto de *G. tenuistipitata* (canaleta 2).

Figura 17. Western Blot utilizando anticorpo policlonal feito contra NR de milho. NR de milho purificada (canaleta 1) e extrato bruto protéico de *G. tenuistipitata* (20 µg, canaleta 2) foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana de nitrocelulose, em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo policlonal feito contra NR de milho comercial (dil. 1:100), revelando após procedimento de detecção radioativa com proteína A – I¹²⁵, uma única banda de reconhecimento com 110 kDa na canaleta 1 onde estava presente a NR de milho comercial. A posição relativa dos padrões de massa molecular está indicada pelas setas a esquerda.

4.7. Teste dos anticorpos monoclonais produzidos contra NR de *P. yezoensis*.

4.7.1. “Western blot”.

Todos os anticorpos monoclonais feitos contra NR de *P. yezoensis* foram testados sendo que 2 deles, NR10 e NR20, reconhecem uma banda única de aproximadamente 110 kDa em extrato bruto de *G. tenuistipitata*, submetido a eletroforese sob condições desnaturantes e posterior transferência para membrana PVDF, sendo o NR10 mais eficiente. A eficiência foi testada realizando-se titulação dos anticorpos NR10 e NR20 (Figura 18).

O anticorpo monoclonal NR 10 feito contra NR de *P. yezoensis* que reconhece um polipeptídeo de 110 kDa em extrato bruto de *G. tenuistipitata* também reconhece a proteína obtida na última etapa de purificação da NR, confirmando assim que a enzima purificada foi a nitrato redutase (Figura 19).

Este anticorpo foi utilizado para verificar se a oscilação diária na atividade da NR apresentada na Figura 9 estava relacionada a variação dos níveis protéicos da NR. Na Figura 20A temos o Western blot correspondente as frações coletadas durante 24h de fragmentos apicais da alga cultivados sob regime claro:escuro. Em B temos o gráfico mostrando a oscilação da atividade de NR nestas mesmas amostras (corresponde a Fig. 9). Podemos observar claramente que à oscilação da atividade da NR corresponde uma oscilação nos níveis da proteína NR, tendo níveis mais elevados durante o período do dia e níveis menos durante o período noturno.

Figura 18. Titulação dos anticorpos monoclonais NR10 e NR20. Extrato bruto protéico de *G. tenuistipitata* foi incubado durante uma hora com diferentes quantidades de anticorpo monoclonal NR10 ou NR20, e em seguida, foi feito o ensaio de atividade como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos. A atividade remanescente é calculada em relação ao ensaio da atividade inicial da NR, ao qual não foi adicionado anticorpo.

Figura 19. Western Blot utilizando anticorpo monoclonal feito contra NR de *P. yezoensis*. Extrato bruto protéico (20 µg, canaleta 1) e NR purificada (canaleta 2) ambos de *G. tenuistipitata* foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana PVDF e, em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal NR10 feito contra NR de *P. yezoensis*, revelando após procedimento de detecção a frio, uma única banda de reconhecimento com 110 kDa. A posição relativa dos padrões de massa molecular está indicada pelas setas a esquerda.

Figura 20. Oscilação diária da NR em fragmentos apicais de *G. tenuistipitata*. Culturas de *G. tenuistipitata* foram mantidas em regime LD e ápices coletados a cada 2 h. O western blot e os ensaios de atividade de NR foram realizados como descrito nos itens 3.3.12.1 e 3.3.3 de Material e Métodos, respectivamente. A) western blot, B) atividade de NR. Cada ponto corresponde a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.8. Estudo do efeito de moduladores sobre a NR.

4.8.1. Efeito da adição de amônio ao meio de cultura sobre a atividade da enzima NR e sobre a quantidade da proteína NR.

Na Figura 21 observamos o comportamento da atividade da enzima NR após adição de 10 mM de amônio ao meio de cultura. Imediatamente após a adição de amônio (dia 1) observamos uma ativação de 100% na atividade da NR. Para nos certificarmos se o aumento da atividade observado dependia da adição de amônio, foram realizados controles adicionais. Nestes controles, adicionamos nitrato de sódio 10mM ou sulfato de amônio 10 mM a ápices mantidos em água do mar não enriquecida. Podemos observar no dia 1 que ambos os tratamentos levaram a ativação de 100% da atividade da NR evidenciando que a adição de uma fonte de nitrogênio seria responsável pela ativação da NR e não a ação de amônio “per si”. Após 24 h da adição de amônio, restam 20% de atividade de NR, e depois de 48h, 30%. Entretanto a partir do terceiro dia após adição amônio a inibição atividade da NR é total.

A Figura 22 apresenta os resultados de Western Blot do experimento com adição de amônio. Em 22A temos os controles adicionais no dia zero, neste caso observa-se diferença entre a quantidade de proteína NR (NRP) nas duas condições. Os controles do experimento aos quais nenhuma adição foi realizada estão mostrados na Figura 22B. Podemos verificar que não ocorre grande variação de NRP entre os diferentes dias de tratamento. Na Figura 22C, observamos pela marcação da NRP após adição de amônio ao meio de cultura que ocorre diminuição da quantidade de NRP após adição de amônio e, se compararmos com a Figura 21, temos que este decréscimo está relacionado a perda de atividade da NR.

Figura 21. Efeito da adição de amônio ao meio de cultura sobre a atividade da NR. O dia 1 corresponde ao momento da adição de 10 mM de sulfato de amônio (CT06) ao meio de cultura contendo ápices de *G. tenuistipitata*. Coletas foram realizadas imediatamente após adição de amônio e posteriormente depois de 24, 48, 72 e 96 h da adição. Controles adicionais foram feitos para o dia 1 e neles os ápices foram mantidos em água do mar e no CT06 adicionou-se 10 mM de nitrato de sódio ou 10 mM de sulfato de amônio, sendo realizada a coleta do material imediatamente após a adição. A atividade enzimática de NR foi estimada como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos. Cada ponto corresponde a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

Figura 22. Efeito da adição de amônio ao meio de cultura sobre o conteúdo da proteína NR (NRP). O extrato bruto protéico de *G. tenuistipitata* (20 µg por cananleta) foi submetido a eletroforese em SDS-PAGE 10% e transferência dos polipeptídeos para membrana PVDF e, então submetidos a imunodeteção usando anticorpos monoclonais NR10 como descrito no item Material e Métodos. A densitometria das bandas foi realizada em aparelho VDS-Image Master (Pharmacia). **A)** controles adicionais: nitrato de sódio ou sulfato de amônio foi adicionado no dia 1 a água do mar contendo ápices isolados, sendo os ápices imediatamente coletados após a adição. **B)** controles sem adição de amônio: ápices foram mantidos em meio de cultura e coletas realizaram-se nos dias 1, 2, 3, 4 e 5. **C)** adição de sulfato de amônio: 10 mM de sulfato de amônio foi adicionado ao meio de cultura contendo ápices e as coletas realizaram-se nos dias 1, 2, 3, 4 e 5 após a adição de amônio.

4.8.2. Efeito da qualidade de luz sobre a atividade da enzima NR e sobre a quantidade da proteína NR.

4.8.2.1. Iluminando-se a alga com luzes de diferentes comprimentos de onda e diferentes irradiâncias.

Na Figura 23 podemos observar que há variação no ritmo de atividade descrito para atividade de NR em 24 h (fotoperíodo 12hclaro:12h escuro) quando a alga é iluminada com luzes de diferentes comprimentos de onda: luz branca ($120\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), luz azul ($6,6\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ou luz vermelha ($31\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Na luz branca, o ritmo circadiano de atividade da NR é bem evidente e mostra o grande controle pela luz. As algas iluminadas com luz vermelha continuam apresentando atividade de NR durante o período de claro, embora os níveis de atividades sejam bem menores do que os encontrados sob luz branca. A luz azul, ao contrário do que se esperava, inibe fortemente a atividade da NR que passa a ter comportamento de algas submetidas a escuro constante.

A Figura 24 mostra a imunomarcagem da NR, utilizando anticorpo monoclonal NR10, para luz branca, vermelha e azul durante as 24 h de experimento. Quando os ápices estão submetidos a iluminação por luz branca o conteúdo de NRP é alto do CT0 ao CT6, após o qual começará a queda a níveis baixos que refletem o período noturno (Figura 24A). Quando sob luz vermelha (Figura 24B), vemos que a NRP está presente em todos os CTs e perde-se a característica de oscilação circadiana do nível protéico. Entretanto, sob iluminação com luz azul, embora um pouco alterada, ainda existe variação circadiana (Figura 24C).

Figura 23. Efeito da qualidade de luz sobre a atividade da NR de *G. tenuistipitata*. Ápices isolados e aliquotados em tubos de ensaio foram colocados em caixas de acrílico revestidas com papel gelatina azul ou vermelho, e o controle (luz branca) em caixas sem revestimento. A intensidade de luz em cada condição foi medida: luz branca - $120 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, luz azul - $6,6 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, luz vermelha - $31 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Todas as coletas foram realizadas a cada 3 h após o início do período de claro. Atividade enzimática para NR foi realizada como descrito no item 3.3.3 de Material e Métodos.

Figura 24. Efeito da qualidade da luz sobre os níveis de NRP de *G. tenuistipitata*.

Ápices isolados foram colocadas em caixas de acrílico sem revestimento (luz branca, $120 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e com revestimento (luz azul, $6,6 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; luz vermelha, $31 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). As coletas foram realizadas a cada 3 h após o início do período de claro. A extração de proteína total foi realizada como descrito no item 3.3.2 de Material e Métodos e a cada canaleta do gel foram aplicados $20 \mu\text{g}$ de proteína. Após eletroforese em SDS-PAGE, e posterior transferência dos polipeptídeos para membrana PVDF a imunodeteção foi realizada com anticorpos monoclonais NR10 e procedeu-se a densitometria das bandas em aparelho VDS-Image Master (Pharmacia).

A) luz branca; B) luz vermelha, C) luz azul.

4.8.2.2. Iluminando-se a alga com mesma irradiância para cada tipo de luz.

Após padronizar as condições nas quais utilizando filtros azul ou vermelho tivéssemos a mesma irradiância incidindo sobre o frasco contendo os ápices, estes foram coletados em diferentes CTs com o intuito de observar a influência da qualidade de luz, agora com mesma irradiância, sobre a atividade da NR e sobre os níveis protéicos desta enzima (NRP). Na Figura 25 temos os dados da coleta realizada no CT02, ou seja, duas horas após a luz ter acendido. Em 25A podemos observar que a atividade de NR sob iluminação com luz azul sofre inibição de cerca de 85% em relação a atividade controle (= sob luz branca), enquanto que a atividade da NR sob iluminação com luz vermelha não sofre alteração significativa em relação ao controle. Na Figura 25B, onde temos imunomarcção com anticorpo NR10 e densitometria das bandas marcadas, vemos que as algas sob luz branca apresentam três vezes menos proteína em relação aquelas mantidas em luz azul ou vermelha, entretanto a atividade sob luz vermelha, como vimos na Figura 25A, é bem menor que na condição luz branca que tem bem menos NRP.

Na figura 26 temos os dados da coleta realizada no CT04. Neste ponto observamos na Figura 26A que houve inibição da atividade da NR em ambos os tratamentos (com luz azul e vermelha) em relação ao controle. Observando a Figura 26B, vemos que não existe variação significativa na quantidade de proteína entre os diferentes tratamentos que justificasse a inibição da atividade em luz azul e luz vermelha.

Passadas 8 h do acendimento das lâmpadas da câmara de cultivo, observa-se na Figura 27A que ocorre ativação da NR em condições de iluminação sob luz vermelha ou azul, sendo que a vermelha ativa cerca de 40% em relação a luz branca, e a luz azul, atinge níveis de atividade de NR próximos ao do controle, não caracterizando uma ativação da NR. Na Figura 27B observamos que no CT 08 existe mais NRP quando da

iluminação com luz vermelha e menos NRP, quando da iluminação com luz azul, quando comparadas ao controle mantido sob iluminação com luz branca.

A

B

Figura 25. Efeito da qualidade de luz no CT02 sobre a atividade e quantidade da enzima NR quando se tem a mesma irradiância para luz branca, azul e vermelha. Ápices isolados foram aclimatados a irradiância de $50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. durante 5 dias sob luz branca. Após esse período foram transferidos para o compartimento contendo filtro azul ou vermelho, mantendo-se a irradiância em $50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A coleta foi realizada no CT 02, ou seja, após duas horas de iluminação. A) efeito da qualidade de luz sobre a atividade de NR. B) imunodeteção utilizando anticorpos monoclonais NR10 e densitometria das bandas. Procedimentos realizados como descrito no item Material e Métodos. Cada ponto corresponde a $\pm$ média DP de 3 experimentos independentes.

Figura 26. Efeito da qualidade de luz no CT04 sobre a atividade e quantidade da enzima NR quando se tem a mesma irradiância para luz branca, azul e vermelha. Ápices isolados foram aclimatados a irradiância de $50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 5 dias sob luz branca. Após esse período foram transferidos para o compartimento contendo filtro azul ou vermelho, mantendo-se a irradiância em $50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A coleta foi realizada no CT 04, ou seja, após quatro horas de iluminação. A) efeito da qualidade de luz sobre a atividade de NR. B) imunodeteção utilizando anticorpos monoclonais NR10 e densitometria das bandas. Procedimentos realizados como descrito no item Material e Métodos. Cada ponto corresponde a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

Figura 27. Efeito da qualidade de luz no CT08 sobre a atividade e quantidade da enzima NR quando se tem a mesma irradiância para luz branca, azul e vermelha. Ápices isolados foram aclimatados a irradiância de $50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 5 dias sob luz branca. Após esse período foram transferidos para o compartimento contendo filtro azul ou vermelho, mantendo-se a irradiância em $50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A coleta foi realizada no CT 08, ou seja, após oito horas de iluminação. **A)** efeito da qualidade de luz sobre a atividade de NR. **B)** imunodeteção utilizando anticorpos monoclonais NR10 e densitometria das bandas. Procedimentos realizados como descrito no item Material e Métodos. Cada ponto corresponde a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.9. Localização intracelular da NR.

4.9.1. Fixação das células.

(i) fixação padrão.

Como podemos observar na figura 28 as células são facilmente identificadas no corte transversal do talo quando os cortes semi-finos foram corados com azul de metileno. Podemos identificar claramente a região correspondente à parede celular e também a linha que define o perímetro ocupado pelo citoplasma. Observando sua forma podemos ver que houve uma pequena retração da região citoplasmática caracterizada pela irregularidade desta linha. Isto significa que os processos de fixação, de desidratação e de infiltração da resina alteraram a anatomia normal do citoplasma indicando que as condições intracelulares sofreram modificações.

Figura 28. *Microscopia óptica de corte do talo de G. tenuistipitata após fixação padrão.* O talo da alga foi submetido à fixação padrão como descrito no item 3.3.14.2. Após desidratação e infiltração de resina, cortes (45 µm) transversais do talo foram corados com azul de metileno (aumento de 20x). Seta indica parede celulósica e ponta de seta, perímetro do citoplasma.

(ii) substituição por congelamento.

Nas Figuras 29, 30 e 31 temos a microscopia óptica dos cortes transversais do talo da alga que foram submetidos à substituição por congelamento utilizando 3 diferentes soluções fixadoras. Na figura 29 a fixação foi realizada em acetona pura, e vemos que ocorreu encolhimento da região ocupada pelo citoplasma. Nas figuras 30 e 31 podemos verificar que a integridade da forma original da região citoplasmática foi mantida na maioria das células.

Figura 29. Microscopia óptica de corte do talo de *G. tenuistipitata* após substituição por congelamento em acetona. O talo da alga foi submetido à fixação por substituição por congelamento em acetona como descrito no item 3.3.14.2. Após desidratação e infiltração de resina, cortes (45 μ m) transversais do talo corado com azul de metileno (aumento de 40x). Seta indica parede celulósica e ponta de seta, perímetro do citoplasma.

Figura 30. Microscopia óptica de corte do talo de *G. tenuistipitata* após substituição por congelamento em acetona + glutaraldeído. O talo da alga foi submetido à fixação por substituição por congelamento em acetona contendo 0,5% de glutaraldeído, como descrito no item 3.3.14.2. Após desidratação e infiltração de resina, cortes (45 μ m) transversais do talo corado com azul de metileno (aumento de 40x). Seta indica parede celulósica e ponta de seta, perímetro do citoplasma.

Figura 31. Microscopia óptica de corte do talo de *G. tenuistipitata* após substituição por congelamento em acetona + glutaraldeído + formaldeído. O talo da alga foi submetido à fixação por substituição por congelamento em acetona contendo 0,5% de glutaraldeído e 3% de formaldeído, como descrito no item 3.3.14.2. Após desidratação e infiltração de resina, cortes (45 μ m) transversais do talo corado com azul de metileno (aumento de 40x). Seta indica parede celulósica e ponta de seta, perímetro do citoplasma.

(iii) fixação por microondas.

Nas figuras 32, 33 e 34 temos a microscopia óptica dos cortes transversais dos fragmentos apicais que foram submetidos a fixação por microondas utilizando diferentes tempos de tratamento e variação na potência do forno de microondas. Na Figura 32 temos o tratamento mais ameno (10s a potência de 420 W); podemos verificar que a integridade da região correspondente ao citoplasma foi mantida e está melhor do que aquela obtida quando fizemos substituição por congelamento utilizando acetona e glutaraldeído (Figura 30). Na figura 33 podemos observar que a diferença de apenas 5 s a mais no tempo de exposição a microondas levou ao encolhimento da região citoplasmática. Já na Figura 34 podemos observar que quando o tratamento foi mais radical (15s a potência máxima) a região citoplasmática sofreu grande encolhimento, tendo sido totalmente alterada.

Figura 32. *Microscopia óptica de corte do talo de G. tenuistipitata após fixação por microondas.* O talo da alga foi submetido a fixação por microondas durante 10s potência de 370 W em tampão cacodilato, pH 7,3, como descrito no item 3.3.14.2. Após desidratação e infiltração de resina, cortes (45 μ m) transversais do talo corado com azul de metileno (aumento de 40x). Seta indica parede celulósica e ponta de seta, perímetro do citoplasma.

Figura 33. Microscopia óptica de corte do talo de *G. tenuistipitata* após fixação por microondas. O talo da alga foi submetido a fixação por microondas durante 15s potência de 370 W em tampão cacodilato, pH 7,3, como descrito no item 3.3.14.2. Após desidratação e infiltração de resina, Cortes (45 μ m) transversais do talo corado com azul de metileno (aumento de 40x). Seta indica parede celulósica e ponta de seta, perímetro do citoplasma.

Figura 34. *Microscopia óptica de corte do talo de G. tenuistipitata após fixação por microondas.* O talo da alga foi submetido a fixação por microondas durante 15s potência de 750 W em tampão cacodilato, pH 7,3, como descrito no item 3.3.14.2. Após desidratação e infiltração de resina, cortes (45 μ m) transversais do talo corado com azul de metileno (aumento de 40x). Seta indica parede celulósica e ponta de seta, perímetro do citoplasma.

4.9.2. Técnica de Imunofluorescência.

A técnica de imunofluorescência foi utilizada como primeira estratégia na verificação de reconhecimento do anticorpo pelo antígeno (NR).

Na Figura 35A apresentamos o controle (sem anticorpo primário) e vemos que não há fluorescência. Nas figuras 35B e 35C os anticorpos NR10 e NR20, respectivamente, estão presentes na reação e podemos observar claramente a fluorescência na mesma região periférica da célula.

Figura 35. *Microscopia óptica de corte do talo de G. tenuistipitata submetidos à técnica de imunofluorescência.* Cortes (45 μm) transversais do talo fixados por microondas (10s, 370 w) e submetidos a imunomarcação por fluorescência. A) controle (sem anticorpo primário); B) NR10; C) NR20; aumento de 40x.

4.9.3. Técnica de Imunomarcacão utilizando partículas de ouro como marcador.

Na Figura 36 observamos, por microscopia eletrônica de transmissão, secções ultrafinas do talo de *G. tenuistipitata* (fixado por microondas 10 s, 370 W) que foram submetidas à coloração por acetato de uracila e chumbo. Na Figura 36A temos o aspecto geral da disposição das células e de suas estruturas intracelulares. Podemos verificar que a região central da célula, ocupada pelo grande vacúolo encontra-se vazia, e na região que circunda o limite do citoplasma identificamos os cloroplastos e grãos de amido. Em 36B vemos com maior detalhe os cloroplastos e os grânulos. Em 36C temos um maior aumento de um cloroplasto onde podemos verificar detalhes internos.

Figura 36. Microscopia eletrônica de corte do talo de *G. tenuistipitata*. Cortes transversais finos (0,45 μm) do talo da alga fixado por microondas (10 s, 370 W) e corados com acetato de uracila e chumbo. A) aumento de 4.000x; B) aumento de 8.000x; C) aumento de 25.000x. Legenda: Cp: cloroplasto; g: grânulos de amido.

Na Figura 37 temos os resultados obtidos com a técnica de imunomarcação por ouro utilizando os anticorpos primários anti-NR. Em 37A temos o controle ao qual não foi adicionado anticorpo primário. Podemos observar que não houve reconhecimento inespecífico de nenhuma proteína. Em 37B e 37C temos respectivamente as redes incubadas com anti- NR10 e NR 20. Observamos que a marcação ocorre somente na região interna do cloroplasto embora seja de pouca intensidade. Em 37D temos a imunomarcação utilizando como anticorpo primário uma combinação dos anticorpos NR10 e NR20. Vemos claramente que a quantidade de partículas de ouro praticamente dobrou.

Figura 37. Microscopia eletrônica de corte do talo de *G. tenuistipitata*. Cortes transversais finos (0,45 μm) do talo da alga fixado por microondas e submetidos à técnica de “immunogold”. (aumento de 25.000x). A) controle B) NR10; C) NR20; D) NR10 + NR20.

Legenda: Cp: cloroplasto; g: grânulos de amido.

4.9.4. Recuperação do antígeno.

Na Figura 38 temos as telas de níquel controle (contendo os cortes ultrafinos) que não sofreram aquecimento só tendo sido mantidas em tampão EDTA. Em 38A temos aquela em que não foi adicionado anticorpo primário e, em B, àquela que recebeu o anticorpo primário (mistura de NR10 e NR20). Podemos observar que o nível de reconhecimento da NR foi baixo.

Figura 38. Imunomarcção utilizando partículas de ouro – Controle do experimento de Recuperação de antígeno. Cortes ultrafinos (0,45µm) do talo de *G. tenuistipitata* fixado por microondas (10s potência de 370 W) e infiltrado em resina LR White foram mantidos por 15 min em tampão EDTA 1mM, pH 8, a temperatura ambiente. Após este tratamento as telas contendo os cortes ultrafinos foram submetidas à técnica de imunomarcção (descrita no item 3.3.14.8) e observação em microscópio eletrônico de transmissão (aumento de 25.000x). A) controle, sem anticorpo primário; B) NR10 + NR20. Legenda: Cp: cloroplasto; g: grânulos de amido.

Na Figura 39 temos as telas contendo os cortes que foram submetidas a aquecimento em banho por 15min a 55°C em tampão EDTA. Na Figura 39A temos o controle ao qual não foi adicionada a mistura de anticorpos primários, em B temos aquela que recebeu a mistura de anticorpos primários. O nível de marcação após o tratamento é claramente maior do que o obtido nas telas contendo cortes que não foram submetidas a aquecimento. Cerca de 70% das partículas de ouro encontram-se dentro dos cloroplastos.

Figura 39. Imunomarcção utilizando partículas de ouro - Recuperação de antígeno. Cortes ultrafinos (0,45µm) do talo de *G. tenuistipitata* fixado por microondas (10s potência de 370 W) e infiltrado em resina LR White foram submetidos à técnica de recuperação de antígeno que consistiu em aquecimento por 15 min a 55°C em tampão EDTA 1mM, pH 8. Após este tratamento as telas contendo os cortes ultrafinos foram submetidas à técnica de imunomarcção (descrita no item 3.3.14.8) e observação em microscópio eletrônico de transmissão(aumento de 25.000x). A) controle, sem anticorpo primário; B) NR10 + NR20. Legenda: Cp: cloroplasto.

Na Figura 40 temos as telas contendo os cortes que foram submetidas ao aquecimento em banho por 15min a 65°C em tampão EDTA. Na figura 40A temos o controle ao qual não foi adicionada a mistura de anticorpos primários e na figura 40B temos aquela que recebeu a mistura de anticorpos primários. O nível de marcação após o tratamento é praticamente o mesmo obtido nas telas contendo os cortes que não foram submetidas a aquecimento (Figura 38).

Figura 40. Imunomarcção utilizando partículas de ouro - Recuperação de antígeno. Cortes ultrafinos (0,45µm) do talo de *G. tenuistipitata* fixado por microondas (10s potência de 370 W) e infiltrado em resina LR White foram submetidos à técnica de recuperação de antígeno que consistiu em aquecimento por 15 min a 65°C em tampão EDTA 1mM, pH 8. Após este tratamento as telas contendo os cortes ultrafinos foram submetidas à técnica de imunomarcção (descrita no item 3.3.14.8) e observação em microscópio eletrônico de transmissão(aumento de 25.000x). A) controle, sem anticorpo primário; B) NR10 + NR20. Legenda: Cp: cloroplasto.

Podemos observar na Figura 41 que o aquecimento a 95°C como descrito por Brorson (1999) não foi eficaz promovendo o aparecimento de buracos nas secções sobre a tela contendo os cortes.

Figura 41. Imunomarcção utilizando partículas de ouro - Recuperação de antígeno. Cortes ultrafinos (0,45µm) do talo de *G. tenuistipitata* fixado por microondas (10s potência de 370 W) e infiltrado em resina LR White foram submetidos à técnica de recuperação de antígeno que consistiu em aquecimento por 15 min a 95°C em tampão EDTA 1mM, pH 8. Após este tratamento as telas contendo os cortes ultrafinos foram submetidas à técnica de imunomarcção (descrita no item 3.3.14.8) e observação em microscópio eletrônico de transmissão(aumento de 25.000x).

5. DISCUSSÃO

As macroalgas desempenham papel essencial na produção primária e ciclagem de nutrientes inorgânicos nos ecossistemas estuarinos e marinhos (Hanisak 1983). Apesar de sua importância no processamento e metabolismo do nitrogênio muito pouco é sabido a esse respeito em macroalgas. A enzima NR, passo limitante no processo que inclui tomada de nitrogênio do meio e sua subsequente redução a amônio (Solomonson & Barber 1990), embora tenha sido investigada em detalhes em alguns organismos teve pouca abordagem em Rhodophyta (Dipierro *et al.* 1977, 1980; Araki *et al.* 1979; Thomas & Harrison 1985; Arzeni *et al.* 1991; Nakamura & Ikawa 1993; Hernandez *et al.* 1993; Hurd *et al.* 1995).

Hurd *et al.* (1995) determinaram que o primeiro obstáculo a ser enfrentado para realização de ensaios enzimáticos para NR seria a determinação do método de homogeneização adequado, bem como da preservação e estabilização da atividade da enzima durante a extração. O talo de *G. tenuistipitata* foi macerado em nitrogênio líquido uma vez que a maceração mecânica diretamente em tampão mostrou-se ineficaz pelo fato da alga apresentar parede celular altamente resistente. A utilização de nitrogênio líquido além de eficaz foi rápida e simples, reduzindo o talo a um pó fino. Além disso, a baixa temperatura diminui o risco de inativação da NR por proteases (Hurd *et al.* 1995). A sonicação do extrato celular antes de submetê-lo à centrifugação não implementou a atividade encontrada para NR de modo significativo, porém este procedimento poderia ser importante para outras algas.

PVP é um composto utilizado para inativação de compostos fenólicos que podem bloquear a atividade enzimática (Haxen & Lewis 1981). A adição de PVP ao ensaio enzimático não aumentou significativamente a atividade da NR. Hurd *et al.* (1995)

observaram um significativo decréscimo na atividade de NR de *Fucus gardneri* com o acréscimo de PVP enquanto Thomas & Harrison (1988) relataram nesta mesma alga que o PVP era necessário para que a atividade da NR fosse observada. Hurd *et al.* (1995) interpretaram esse comportamento distinto devido às diferentes maneiras de maceração do material; esta o fez em nitrogênio líquido e aquele, maceração mecânica diretamente em tampão de extração. Supôs-se que a homogeneização em nitrogênio líquido auxiliasse na prevenção da oxidação dos compostos fenólicos, minimizando a interferência no ensaio enzimático. O pouco efeito do PVP sobre a atividade da NR no extrato bruto de *G. tenuistipitata* poderia, então, ser devido ao fato da maceração ter sido realizada em nitrogênio líquido, ou simplesmente pelo fato da alga conter pouca quantidade de compostos fenólicos em relação a *F. gardenari*.

A enzima NR de *G. tenuistipitata* apresenta atividade numa larga faixa de temperatura que vai de 10° a 30°C. A temperatura ótima estimada foi de 20°C, embora a 30°C apenas tenha sido verificada uma redução de 17% na atividade. Em condições ótimas de cultivo, a maior taxa de crescimento encontrada para esta espécie varia de 25° a 27°C (Macchiavello 1994), um valor maior que a temperatura ótima de ensaio da NR. Estes dados diferem daqueles descritos por Hurd *et al.* (1995), nos quais muitos pesquisadores verificaram que para obtenção de incremento na atividade da NR é necessário que a temperatura de ensaio seja maior que aquela em que as algas foram coletadas em campo. Talvez esta diferença esteja relacionada ao fato de *G. tenuistipitata* exibir uma grande tolerância a mudanças de temperatura (Haglund & Pedersén 1992).

Como outras Nrs, a NR de *G. tenuistipitata* apresenta maior atividade em pH ligeiramente alcalino, apresentando atividade máxima em pH 8,0. Entretanto, esta NR comporta-se de maneira diferente das NRs de plantas superiores frente a mudanças de pH. Um aumento de 0,5 unidade de pH diminui a atividade da NR de *G. tenuistipitata*

em 40%, enquanto a mesma variação de pH em plantas superiores leva a perda da atividade da NR (Lillo 1994). Altos valores de pH entre 9 e 9,5, têm sido descritos durante o cultivo *Gracilaria tikvahiae* em tanques ocasionando apenas diminuição da taxa de crescimento. Entretanto, *G. tenuistipitata* apresenta a habilidade de altas taxas de crescimento a pHs altos, tanto em cultivo de laboratório (Haglund & Pedersén 1993) como em tanques de cultivo (Haglund & Pedersén 1992). Segundo Haglund & Pedersén (1992), *G. tenuistipitata* pode elevar o pH do meio de cultivo a 10 e crescer a altas taxas mesmo sob tais condições. A maior estabilidade da atividade de NR frente a mudanças de pH estaria relacionada à manutenção da alta taxa de crescimento desta alga em meios de cultura com pH elevado.

A NR de *G. tenuistipitata* utiliza como única fonte doadora de elétrons o NADH, pertencendo então ao grupo de NRs específicas para NADH. Muitas algas apresentam ao menos alguma atividade de redução de nitrato utilizando NADPH como fonte de potencial redutor (Berges & Harrison 1995), entretanto nenhuma atividade foi detectada quando se utilizou NADPH nos ensaios enzimáticos de *G. tenuistipitata*. *Porphyra yezoensis*, uma outra alga vermelha, também apresenta especificidade completa para NADH (Nakamura & Ikawa 1993).

O K_M aparente encontrado utilizando-se NADH como substrato foi de 95 μM , valor este muito maior que o da maioria das plantas superiores (10-20 μM ; Wray e Fido 1990) e de outras algas (*Porphyra perforata*, 32 μM , Thomas & Harrison 1988; *Thalassiosira pseudonana*, 17 μM , Berges & Harrison 1995; *Skeletonema costatum*, 48 μM , Berges & Harrison 1995). O K_M aparente encontrado para o nitrato foi de 197 μM , valor próximo ao descrito para outras algas por exemplo (*P. yezoensis* 120 μM , Araki *et al.* 1979; *Skeletonema costatum*, 146 μM , Berges & Harrison 1995). Se analisarmos os valores de K_M para o nitrato em relação ao habitat das algas teremos que aquelas que

estão localizadas na região entre-marés tem esse valor de K_M em sua maioria mais alto que as algas do infralitoral. Isso porque na região entre marés ocorre o fenômeno de ressurgência havendo maior disponibilidade de nitrato no meio. Já as algas da infralitoral sofrem exposição ao dessecação, alta salinidade e baixa disponibilidade de nitrato durante a maré baixa quando ficam isoladas em poças de maré, justificando menores valores de K_M para o nitrato. O plâncton em sua maioria utiliza amônia como segunda fonte de nitrogênio não necessitando ter afinidade por nitrato.

A atividade da NR pode ser modulada por vários efetores potenciais que em alguns casos podem acarretar em inativação reversível da enzima (Solomonson & Barber 1990). O cianeto é descrito como um poderoso inibidor da NR principalmente quando a enzima encontra-se reduzida (Rigano & Aliotta 1975; Solomonson & Barber 1990). O fato das atividades parciais da NR dependentes de NADH estarem ativas durante a inativação da enzima com cianeto evidencia que o cianeto deva formar um complexo com a forma reduzida do Mo, prevenindo a “renovação” da enzima e redução do nitrato neste sítio. (Solomonson 1974). Observamos que a NR de *G. tenuistipitata* não foge a padrão de inibição; 1,5 μM de cianeto no tampão de reação inibiu cerca de 50% da atividade total.

A adição de Ag^+ ou Hg^{2+} ao extrato bruto promovem apreciável redução da atividade da enzima, principalmente no que diz respeito às atividades parciais diaforases (Rigano & Aliotta 1974/1975; Solomonson 1974; Solomonson & Barber 1990). Medimos somente a atividade redutora de nitrato tendo NADH como potencial redutor, e observamos que tanto a prata (1 mM) como o mercúrio (3 mM) promove inibição da atividade em 30 e 40%, respectivamente. Supõe-se que íons Ag^+ e Hg^{2+} associam-se aos grupamentos sulfidril do nucleotídeo piridina envolvidos na manutenção da estrutura da parte mais estável da NR (Rigano & Aliotta 1974) envolvida nas atividades diaforase.

As porções apicais de *G. tenuistipitata* apresentaram maior atividade do que as regiões basais. Dipierro *et al.* (1980), trabalhando com a alga vermelha *Schottera nicaensis*, encontraram altas atividades nas porções mais jovens; o mesmo foi descrito para *Fucus gardneri* (Hurd *et al.* 1995). Essa diferença de atividade entre as diferentes regiões do talo pode se devido a altas taxas metabólicas na porção meristemática apical que está crescendo mais ativamente que as regiões basais.

Entre os diversos fatores envolvidos na regulação da atividade da NR, o nitrato é considerado um dos mais importantes. Uma das respostas universais em fungos e plantas a exposição a nitrato é a indução da atividade da NR (Crawford 1995). Constatamos que na linhagem de *G. tenuistipitata* cultivada em nosso laboratório a indução da atividade da NR não era observada quando da adição de nitrato ao meio 24 h antes da coleta da biomassa, provavelmente devido ao fato de trocarmos o meio de cultura semanalmente e por isso garantir alto suprimento de nitrato para as algas. Entretanto, quando a alga foi mantida por longos períodos em meio pobre em nutrientes (água do mar pobre em nitrato), observou-se que a atividade da NR havia sido reduzida a uma taxa basal e um aumento dessa atividade foi verificado mesmo quando pequenas quantidades de nitrato foram adicionadas.

O nitrato é absorvido em plantas superiores via transporte através da membrana plasmática (Mätschke *et al.* 1997). Na planta *Lemna giba* a absorção ocorre via uma proteína carregadora desconhecida e demonstrou-se ocorrer um co-transporte de prótons durante o processo (Ullrich & Novacky 1981). A energia utilizada neste evento seria produzida na fotossíntese ou respiração aeróbica. Nossos resultados indicam que a tomada de nitrato do meio ocorre principalmente durante a noite, embora a atividade da NR seja maior durante o dia, indicando que a tomada de nitrato e o processo de redução do mesmo sejam processos independentes. Tais resultados evidenciariam a ativação das

permeases responsáveis pela translocação de nitrato para dentro da célula no período noturno. Todavia tais proteínas transportadoras ainda não foram isoladas e identificadas. Em *Chlorella*, acredita-se que uma NR ligada à membrana plasmática esteja envolvida no processo (Stöhr *et al.* 1995).

Isoformas constitutiva e induzida de NR têm sido encontradas em plantas superiores. A NR induzida é regulada por fatores ambientais (por exemplo, nitrato, luz) enquanto a NR constitutiva mantém-se numa taxa basal (Lillo 1994). Quando mantivemos fragmentos de alga em escuro contínuo, observamos uma atividade basal de NR, independente de luz e sem ritmicidade endógena. Esse mesmo comportamento sob condições de escuro constante foi observado em tabaco, cevada, milho e *Arabidopsis* (Deng *et al.* 1990; Somers *et al.* 1983; Remler & Campbell 1985; McClung & Kay 1994). Em fragmentos de alga mantidos por longos períodos em meio pobre em nutrientes uma atividade de NR basal também foi encontrada quando se adicionou nitrato a mistura de reação, indicando que ao menos um nível basal dessa enzima ativa está presente mesmo quando o nitrato não está disponível no meio de cultura.

Outros importantes fatores envolvidos na regulação da NR são a luz e o relógio biológico (Lillo 1994). Warburg (1920, in Solomonson *et al.* 1990) mostrou que a luz estimula a redução de nitrato na alga verde *Chlorella*. A generalidade desta observação tem sido demonstrada em plantas superiores e inferiores e em algas (plantas superiores, Lillo 1994; *Arabidopsis*, Pilgrim *et al.* 1993; *Ulva fenestrata*, Gao *et al.* 1992; *Nicotiana*, Deng *et al.* 1990). A atividade da NR de *G. tenuistipitata* foi claramente aumentada pela luz. Quando a alga foi mantida sob claro constante obtivemos uma atividade muito maior que aquela encontrada em algas crescidas em regime claro:escuro. Quando as mantivemos em escuro contínuo somente uma atividade basal de NR foi observada. Resultados semelhantes foram encontrados por Gao *et al.* (1992) para a alga verde *U.*

fenestrata, Rossa *et al.* (2001) para *Gracilariopsis tenuifrons*, e Granbom *et al.* (2001) para *Kappaphycus alvarezii*.

Em vários organismos a NR mostra variações circadianas na atividade, com taxas máximas de atividade ocorrendo durante o período de claro e mínimas, ocorrendo no período de escuro (Gao *et al.* 1992; Ramalho *et al.* 1995). Em extratos de *G. tenuistipitata* crescidos sob regime LD, o pico de atividade da NR ocorreu na metade do período de claro. Este ritmo manteve-se em regime de claro constante indicando regulação pelo relógio biológico. Resultados similares foram obtidos anteriormente para NR de *G. polyedra* (Ramalho *et al.* 1995). Em regime de luz LD, o pico de atividade da NR de *G. polyedra* ocorreu após 6 h de luz e começou a diminuir antes que o período de escuro começasse, permanecendo em nível baixo durante o escuro. A maioria das espécies fotossintéticas tem um pico diurno de atividade de NR que ocorre entre a sexta e oitava hora após o início do período de claro (Gao *et al.* 1992; Deng *et al.* 1990; Granbom *et al.* 2001).

Não encontramos descrito na literatura qualquer valor de ponto isoelétrico para a enzima NR. Sendo assim, não temos termo de comparação para o valor encontrado, acreditando que essa seja a primeira determinação a ser realizada. Entretanto, a utilização de resina de troca-iônica aniônica por outros pesquisadores na purificação da NR de outros organismos indica que as demais NR devem ter um pI alto revelando sua alta basicidade. Cromatografia de troca iônica em resina DEAE Celulose já havia sido usada com sucesso na purificação da enzima NR de vários organismos (*E. coli*, MacGregor *et al.* 1974; *C. vulgaris*, Solomonson *et al.* 1975; *P. yezoensis*, Nakamura & Ikawa 1993; *G. polyedra*, Ramalho *et al.* 1995). Escolhemos a resina Q-Sepharose, fortemente aniônica, na purificação da NR de *G. tenuistipitata*. Esta resina mostrou-se muito adequada na adsorção e manutenção da atividade de NR e obtivemos boa

recuperação da enzima e purificação de aproximadamente 36 vezes. Ainda nesta etapa de purificação podemos observar na Tabela 4 que houve um aumento de 45 vezes na atividade específica da NR indicando que nesta etapa tenha sido separado um inibidor presente no extrato bruto.

A concentração das frações com atividade de NR provenientes da Q-sepharose por precipitação com sulfato de amônio e subsequente diálise embora não pareça ter sido eficiente por revelar uma grande diminuição na atividade da NR após esse tratamento, revelou-se de extrema importância no processo geral de purificação e foi utilizado em outras purificações de outras NR (Solomonson *et al.* 1975; Campbell & Wray 1983; Nakamura & Ikawa 1993). Após aplicação do dialisado em coluna Sephacryl S-300, a atividade de NR no eluído mostra que a enzima além de ter sido purificada foi reativada nesta etapa.

A cromatografia de gel filtração em Sephacryl S-300 revelou que a holoenzima NR de *G. tenuistipitata* tem massa molecular de aproximadamente 420 kDa. Existe grande variação no tamanho da holoenzima NR tendo sido descritas proteínas desde 200 kDa, para a NR de espinafre (Hewitt 1975) e *Chlorella* (Solomonson *et al.* 1975) até 500 kDa para a enzima da alga verde *A. braunii* (De la Rosa *et al.* 1981).

Pelos dados verificamos que a resina Blue Sepharose liga NR tanto de plantas superiores como de algas (Campbell & Smarrelli 1978; Redinbaugh & Campbell 1983; Campbell & Wray 1983; De La Rosa *et al.* 1980; Nakamura & Ikawa 1993). Utilizando o mesmo princípio de afinidade, empregamos a resina Affigel-blue na purificação da NR de *G. tenuistipitata*. As frações com atividade de NR provenientes da coluna Sephacryl S-300 foram submetidas a essa coluna e dela obtivemos, após eluição com gradiente salino de 0 a 1 M, um pico de atividade (Figura 14). As frações provenientes da resina Affigel-blue que apresentaram atividade de NR foram submetidas a SDS-

PAGE 10% no qual as proteínas foram coradas por prata e revelaram um peptídeo majoritário de aproximadamente 110 kDa (Figura 15). A mesma variação de massa molecular da holoenzima é encontrada para tamanho e número de subunidades sendo descritos subunidades da enzima de aproximadamente 100 kDa (*C. vulgaris*, Solomonson *et al.* 1975; cevada (*Hordeum*), Campbell & Wray 1983; *N. crassa*, Horner 1983; *P. yezoensis* Nakamura & Ikawa 1993), 52 kDa (*G. polyedra*, Ramalho *et al.* 1995) e 58 kDa (*A. braunii*, De La Rosa *et al.* 1980). Com nossos resultados de filtração em gel e SDS-PAGE da proteína purificada, podemos sugerir que a NR de *G. tenuistipitata* seja composta de 4 subunidades de aproximadamente 110 kDa cada.

O teste dos soros imunes produzidos após imunização de coelhos com a injeção de NR comercial de milho mostrou que o soro imune produzido contra NR de milho continha anticorpos que reconheciam fortemente uma única banda de cerca de 100 kDa quando a imunodeteção foi realizada, após transferência para membrana PVDF da proteína de milho pura submetida a SDS-PAGE. Este valor corresponde ao tamanho da subunidade da NR de milho descrita por Hyde *et al.* (1989). A reatividade cruzada entre o anticorpo produzido contra NR de milho e o extrato bruto protéico de *G. tenuistipitata* foi testada e não ocorreu cruzamento. A extensão de reatividade cruzada é aparentemente dependente das distâncias filogenéticas entre os organismos, mas pode ocorrer cruzamento entre espécies distintas, devido à alta conservação de três domínios – FAD, Mo-pterina, Heme - em todas as NRs caracterizadas até o momento (Solomonson & Barber 1990). Nakamura *et al.* (1994) produziram um conjunto de 22 anticorpos monoclonais contra NR purificada de *P. yezoensis* e testaram a reatividade cruzada destes anticorpos com extrato bruto protéico de várias Spermatophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Chromophyta e Chlorophyta. Obtiveram reatividade cruzada principalmente com os anticorpos específicos para o domínio de ligação do Mo. Quanto

menor a distância evolutiva, maior foi o número de anticorpos que tiveram reação cruzada. Com o aumento da distância evolutiva, os anticorpos contra o sítio de Mo foram geralmente os que reagiram cruzado. Dos três domínios conservados, o domínio Mo-pterina é o que tem maior grau de conservação (Nakamura *et al.* 1994). Após adequação dos protocolos de imunodeteção conseguimos reatividade cruzada de dois anticorpos monoclonais, NR10 e NR20, com reconhecimento de uma única banda em extrato bruto de *G. tenuistipitata*. O polipeptídeo identificado por estes anticorpos apresenta massa molecular em torno de 110 kDa. Uma vez que Nakamura *et al.* (1994) já havia descrito que estes dois anticorpos, específicos para o domínio de ligação do Mo, reagiam cruzado e imunodetectavam uma banda massa molecular cerca de 100 kDa em outras dez espécies de alga vermelha, era de se esperar, pela proximidade filogenética que fosse reconhecido em *Gracilaria*, também uma alga vermelha, um polipeptídeo de peso similar. Os mesmos anticorpos reconheceram a enzima NR purificada de *G. tenuistipitata*, revelando que provavelmente a holoenzima de peso estimado em cerca de 420 kDa seja um homotetrâmero.

A inibição da atividade da NR por amônia tem sido corroborada há anos sendo considerada uma resposta universal em plantas, algas e fungos (Rigano *et al.* 1974; Redinbaugh & Campbell 1991; Solomonson & Barber 1990; Crawford 1995). A adição de amônio ao meio de cultura de levou a uma inibição da atividade da enzima NR, porém ela não foi imediata. Após 48 h da adição da amônia restava ainda cerca de 20 % de atividade de NR, sendo totalmente inibida após 72 h.

A inibição da atividade da NR após a adição de amônio ao meio de cultura é acompanhada pela diminuição na quantidade de proteína (NRP) após o quarto dia da adição, como pode ser visto na Figura 22 onde apresentamos o Western blot do experimento. O amônio estaria então num primeiro momento atuando sobre os

mecanismos de regulação da atividade de NR, e num segundo momento sua presença poderia ocasionar a inibição da transcrição ou tradução. A queda do nível de NRP estaria ligada ao seu “turnover” e a não reposição da mesma em condições de manutenção de amônio no meio. Esta seria estratégia para economia celular, pois uma vez que dispõe de amônio, a célula vai utilizá-lo em detrimento de outra fonte de nitrogênio que requeira gasto de energia excedente. Entretanto, tais hipóteses só poderiam ser confirmadas por experimentos de “Northern blot” nos quais os RNAs mensageiros de NR seriam quantificados sob as condições de adição de amônio, bem como de adição de inibidores de transcrição e tradução.

Os experimentos realizados submetendo as algas a diferentes qualidades de luz, com irradiâncias diferentes, revelaram que em luz branca o ritmo circadiano de atividade da NR em fotoperíodo claro:escuro (12h:12h) era acompanhado pela maior quantidade de NRP durante o dia e menor quantidade durante a noite (Figuras 20 e 24A). Em luz vermelha, a observação de desaparecimento do ritmo circadiano de atividade da NR, bem como seu decréscimo em relação ao controle foi acompanhado pela manutenção de quantidades praticamente constantes da proteína NRP durante o período de 24 h. Isto quer dizer que além de exercer influência sobre a regulação da atividade de NR a luz vermelha influencia os mecanismos de manutenção da quantidade de proteína NRP diária na célula. Para os ápices submetidos na luz azul, o ritmo circadiano foi abolido completamente de atividade da NR e houve grande inibição da atividade (em média 20x menos). O perfil apresentado para atividade de NR sob luz azul é bastante semelhante ao encontrado para as algas mantidas em escuro constante, enquanto o perfil protéico é similar àquele encontrado sob iluminação com luz branca (Figuras 23 e 24C), tal observação poderia ser devido à redução da intensidade da luz em cerca de 20 vezes quando da adição do filtro azul. Entretanto, este resultado é contrário ao descrito por

Aparicio *et al* (1976) em *Chlorella fusca*. Nesta alga, eles observaram fotorreativação da atividade de NR *in vivo* e *in vitro* utilizando luz azul de intensidade 12 vezes menor que a luz branca empregada como controle para o experimento. Todos os dados de literatura tratam a luz azul como ativadora a NR e a luz vermelha como inibidora, mas nenhum destes relatos refere-se a algas vermelhas.

Quando as algas foram expostas a diferentes qualidades de luz mas com mesma irradiância pudemos observar que as algas mantidas sob luz azul, embora não apresentassem o comportamento de ativação da atividade de NR em relação à luz branca, exibiram padrão de atividade de NR semelhante ao de algas do período do dia, evidenciando que no experimento com luzes de diferentes irradiâncias a iluminação com luz azul seria tão baixa que simulava o escuro, ou então, que os mecanismos de regulação por luz azul nesta alga diferem daquele apresentado por Aparício *et al.* (1976) para *Chlorella*. Após a segunda hora de iluminação (Figura 25A) observamos uma inibição de 80% da atividade de NR pela luz azul, enquanto sob luz vermelha a atividade de NR permaneceu bem próxima do controle (luz branca). Entretanto, quando observamos a quantidade de NRP (Figura 25B) em luz azul e vermelha temos 3 vezes mais proteína que no controle. Sendo assim, a NR ativa e responsável pela atividade de NR medida varia de acordo com o tratamento de luz recebido. Este dado vem confirmar a participação de eventos de controle pós-traducionais controlados por luz na regulação da atividade da enzima NR.

No CT 04 observamos que a atividade da NR sob luz azul continua inibida em torno de 80% e que sob luz vermelha observa-se agora inativação de 90% da atividade de NR (Figura 26A). A inibição da atividade da enzima por luz vermelha no CT04 é maior do que a observada por luz azul, sendo que neste ponto do dia, os níveis protéicos para ambas as qualidades de luz, inclusive a branca, é praticamente o mesmo (Figura

26B). Novamente observamos que o estado de ativação da enzima depende de modificações pós-tradução controlado por luz, pois na mesmas quantidades de proteínas verifica-se diferente atividade enzimática de NR sob diferentes qualidades de luz. Após 8 horas de luz observamos uma diminuição da inativação por luz azul, mas a atividade da NR continua 20% menor que o valor encontrado para o controle (Figura 27A). Surpreendentemente, a luz vermelha neste CT levou a ativação de 40% da atividade de NR. A quantidade de proteína estimada por imunodeteção foi proporcional a atividade de NR encontrada (Figura 27B).

O estabelecimento da localização intracelular da enzima NR na macroalga *G. tenuistipitata* foi realizado com sucesso utilizando-se ambas as técnicas de imunofluorescência e imunomarcação usando partículas de ouro.

A etapa mais crítica do processo foi à fixação do tecido onde se revelou depois de muitas tentativas que a fixação por microondas em tampão cacodilato era a mais eficiente. Muitos pesquisadores têm utilizado fornos de microondas para acelerar o processo de fixação bem como para obtenção de melhores condições de fixação (Westcot 1993). Atualmente fornos de microondas estão sendo fabricados com direcionamento a pesquisa em laboratório o que permite um maior controle da potência empregada bem como da temperatura a que o espécime é submetido. Vimos que variações de segundos no tempo de exposição a microondas, bem como da potência empregada, são fatores de extrema importância e que podem levar a resultados completamente diversos. A fixação utilizando microondas é realizada em segundos enquanto a substituição por congelamento, que também foi testada na execução deste trabalho, leva cerca de uma semana para ser completada. A economia de tempo e o aumento na qualidade dos resultados são fatores importantes que nos levaram a tentar a nova técnica (Westcot 1993).

A fixação por substituição por congelamento em acetona contendo glutaraldeído e formaldeído garantiu boa preservação da ultraestrutura da célula, tendo sido a fixação por microondas ligeiramente superior neste aspecto. A maioria das células não apresentou encolhimento de região citoplasmática, evidenciando a eficiência do processo de fixação dos tecidos.

A observação dos cortes ultrafinos do talo da alga submetido na microscopia eletrônica de transmissão permitiu observar a ausência de tilacóides empilhados nos cloroplastos (Figura 36). Esse tipo de organização dos cloroplastos é exclusivo do grupo de algas vermelhas sendo utilizado na taxonomia do grupo. O tilacóide geralmente é único e não ocorre empilhamento, só dobramento em alguns gêneros.

A técnica de imunofluorescência utilizando-se anticorpos monoclonais contra NR revelou nas seções obtidas de alga submetida na fixação por microondas (105, 370 W) que a enzima encontra-se localizada na região citoplasmática, identificando-se a fluorescência na região ocupada pelos cloroplastos que foi evidenciada após as primeiras micrografias eletrônicas. Os cloroplastos ocupam a região periférica da célula estando limitados ao perímetro externo do citoplasma por causa do grande vacúolo que ocupa a região central da célula.

Com a técnica de imunolocalização utilizando-se partículas de ouro como sinal tivemos reconhecimento específico da enzima NR dentro dos cloroplastos. Embora o nível de marcação obtido tenha sido baixo ele foi observado em todas as repetições do experimento e corroborou os resultados encontrados quando foi empregada a técnica de imunofluorescência. A baixa taxa de partículas de ouro nos cortes tratados com anticorpos anti-NR deve ter ocorrido pelo fato da NR não ser uma enzima abundante, ou não estarem os epitopos localizados na superfície do corte e expostos dificultando assim o acesso dos anticorpos a eles. Outra possibilidade seria a modificação destes epitopos,

durante o processo de fixação e infiltração da resina, o que acarretaria em não reconhecimento. Uma das tentativas de potencialização do sinal obtido foi à combinação de dois anticorpos monoclonais feitos contra o domínio de molibdênio da NR de *P. yezoensis* e que reconheciam epitopos diferentes na mesma região da enzima. Com isto conseguimos duplicar a imunomarcação que todavia continuava baixa, mas evidenciando a presença da enzima na região do cloroplasto, uma vez que não houve reconhecimento não-específico nas seções controle (sem adição de anticorpo primário).

O baixo reconhecimento do anticorpo primário pelo epitopo pode ter ocorrido devido à modificação que podem ter ocorrido durante o processamento do tecido (fixação, infiltração) ocasionando bloqueio deste sítio de reconhecimento. Algumas metodologias chamadas genericamente de recuperação de antígeno foram desenvolvidas na tentativa de solucionar esse problema. As mais comuns são o aquecimento em tampão (geralmente citrato e fosfato) e remoção da resina (Harlow & Lane 1999). Esta última pode ser feita utilizando resina epóxi para infiltração. Ela é removida totalmente por imersão em etóxido de sódio.

As tentativas de recuperação do antígeno foram realizadas na tentativa de obtenção de maior marcação. Somente uma das condições (aquecimento em banho por 15 min a 55°C em tampão EDTA) revelou-se eficiente. As demais testadas, ou reduziram o nível de marcação ou aumentaram a marcação não-específica. A tentativa de recuperação do antígeno é empregada amplamente uma vez que os processos de fixação e de infiltração da resina no tecido promovem modificações que podem levar ao mascaramento da proteína em estudo (Harlow & Lane 1999).

A localização intracelular da enzima NR tem sido alvo de grande especulação uma vez que existem dados controversos na literatura. Uns descrevem sua presença no citoplasma (espinafre e tabaco, Dalling *et al.* 1972; folha de ervilha, Wallgrove *et al.*

1979; cotilédone de soja, Vaughan *et al.* 1984; *Chlamydomonas*, Fisher *et al.* 1988), outros nos cloroplastos (espinafre, Kamachi *et al.* 1987; *Monoraphidium braunii*, Lopez-Ruiz *et al.* 1985; *G. polyedra*, Fritz *et al.* 1996), e outros ainda em membranas (*Neurospora*, Roldán *et al.* 1982; raízes de semente de cevada, Ward *et al.* 1988). Tem-se atribuído as NRs de membrana diferentes papéis além daqueles de redução de nitrato. Em *Neurospora*, Roldán *et al.* (1982), descreveram evidências de que ao menos parte da NR, possivelmente em certos estágios fisiológicos, estavam associadas à região da membrana plasmática. Relatos anteriores da associação da NR com a membrana de plantas superiores foram confirmados quando uma forma de NR ligada à membrana plasmática foi isolada quando a extração de proteínas foi realizada utilizando-se Triton X-114, conhecidamente empregado no isolamento de enzimas hidrofóbicas (cevada, Ward *et al.* 1988; *Chlorella sorokiniana*, Tischner *et al.* 1989; *C. saccharophyla*, Stöhr *et al.* 1995; raiz de cevada, Meyerhoff *et al.* 1994). Entretanto, a hipótese de uma NR ligada à membrana em plantas superiores ainda é controversa na literatura. Sua relevância biológica seria muito importante, pois tais NR associadas à membrana agiriam como proteína transportadora de nitrato e participaria de atividades de óxido-redução nas plantas, além da possibilidade de atuação como fotorreceptor (Ninnemann 1995).

Acredita-se que a existência de diferentes isoformas da enzima esteja relacionada a diferente localização na célula sendo esta a causa dos resultados controversos. Porém os últimos trabalhos utilizando técnicas mais refinadas de imunolocalização têm apontado para sua presença nos cloroplastos (Fritz *et al.* 1996). As localizações em outras regiões da célula em alguns casos não passariam de artefatos das técnicas utilizadas ou simplesmente de isoformas reconhecidas pelo mesmo anticorpo. No presente trabalho utilizamos as técnicas mais avançadas utilizadas na

imunolocalização intracelular de proteínas e como foi descrito a enzima NR, reconhecida pelos anticorpos monoclonais utilizados, encontra-se nos cloroplastos da alga vermelha *G. tenuistipitata*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi realizado o isolamento e caracterização bioquímica de uma proteína cuja expressão é regulada pelo relógio biológico. A NR é a primeira enzima envolvida no processo de assimilação de nitrogênio e provavelmente represente o passo regulatório da via. A regulação desta enzima é complexa e tem sido foco de intensa pesquisa pelo potencial de melhoramento em eficiência do processo e aumento da produtividade através da intervenção no processo que limita o crescimento e produção de agarocolóides. O trabalho desenvolvido permite concluir:

- A NR é uma enzima que tolera uma ampla faixa de temperatura e pH, com valores ótimos em 20°C e 8,0, respectivamente. Ela é específica para o NADH sendo que nenhuma atividade foi detectada utilizando-se NADPH como fonte doadora de elétrons. Os valores de K_M aparente para o NADH e nitrato foram respectivamente 95 μM e 197 μM ;
- A NR apresenta oscilação rítmica de atividade tanto em regime de claro:escuro quanto em regime de claro constante, com pico de atividade no meio do período diurno. A manutenção da oscilação da atividade sob condições de livre-curso (luz constante) indica que a NR está sob controle do relógio biológico.
- Quando as algas foram mantidas sob condições de escuro constante observou-se um nível basal de atividade de NR e nenhum ritmo foi detectado. Tal fato mostrou que a luz é um fator importante na ativação da enzima;
- Os experimentos de “western blot” utilizando-se anticorpos monoclonais contra NR mostraram que a oscilação da NR corresponde uma variação nos níveis protéicos da enzima;

- A tomada de nitrato do meio de cultura ocorre durante o período noturno indicando que a absorção e redução do nitrato sejam processos independentes;
- Uma das respostas universais em fungos e plantas é a indução da atividade da NR por nitrato e sua inibição por amônia. Na macroalga *G. tenuistipitata* observamos a mesma resposta;
- A enzima nativa possui massa molecular de 420 kDa, revelando em SDS-PAGE um polipeptídeo majoritário de aproximadamente 110 kDa. A NR seria, então, um homotetrâmero;
- A regulação por qualidade de luz aparentemente está agindo de maneira inversa àquela observada para outras algas e plantas superiores. Não observamos nesta alga o padrão de ativação por luz azul e inativação por luz vermelha. Ao contrário, a luz azul parece não exercer grande influencia sobre a atividade da NR quando comparada ao controle mantido sob iluminação com luz branca. A luz vermelha, por sua vez, parece estar agindo de maneira a ativar a NR quando a alga é mantida sob esta condição luminosa em relação à luz branca. Tal fato poderia ser explicado pela diferente composição de fotorreceptores nas macroalgas vermelhas, mas tal fato merece maior atenção e detalhamento no delineamento de novos experimentos que corroborem tal hipótese;
- A NR de *G. tenuistipitata* está localizada no interior dos cloroplastos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams MW & Mortenson LE (1985) Mo Reductases: Nitrate Reductase and Formate Dehydrogenase. *In Molybdenum Enzymes*, Spiro T. G. [Ed.], Princeton University, John Wiley & Sons, New York, pp 519-93
- Aparicio PJ, Roldán JM & Calero F (1976) Blue light photoreactivation of nitrate reductase from green algae and higher plants. *Biochem Biophys Res Comm* 70(4):1071-1077
- Araki S, Ikawa T, Oohusa T & Nisizawa K (1979) Some enzymatic properties of nitrate reductase from Porphyra yezoensis Ueda f. nawarensis Miura. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45: 919-24
- Aronson BD, Jonhson KA, Loros JJ & Dunlap JC (1994) Negative feedback defining a circadian clock autoregulation of the clock gene frequency. *Science* 263:1578-1584
- Arzeni P, Felicini GP, Perron C & Cecere E (1991) In vivo nitrate-reducing activity in some mediterranean seaweed. *Int. J. Mar. Biol. and Oceanog* XVIII, 1 Suppl.:529-35
- Aschoff J (1981) Biological rhythms. *In* King FA, ed. Handbook of behavioral neurobiology Biol Rhythm, New York, Plenum Press. Vol. 4
- Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. biochem.* 72:248-54
- Bachmann M, McMichael RW, Huber JL, Kaiser WM & Huber SC (1995) Partial purification and characterization of a calcium-dependent protein kinase and an inhibitor protein required for inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Planta Physiol* 108:1083-1091

- Bachmann M, Huber JL, Liao P-C, Gage DA & Huber SC (1996a) The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (Spinacia oleracea) leaves in a 14-3-3 protein. *FEBS letters* 387:127-131
- Bachmann M, Huber JL, Athwal GS, Wu K, Ferl R & Huber SC (1996b) 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS letters* 398:26-30
- Beevers L & Hageman RH (1969) Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20:495-519
- Berges JA & Harrison PJ (1995) Nitrate activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: A revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 40(1):82-93
- Berges JA (1997) Minireview: Algal nitrate reductases. *Eur J Phycol* 32:3-8
- Bird CJ & Rice EL (1990) Recent approaches to the taxonomy of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) and the Gracilaria verrucosa problem. *Hydrobiologia.* 204/205:111-118
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver stain of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99
- Brorson S-H (1999) Comparison of the immunolabeling of heated and deplasticized epoxy sections on the electron microscopical level. *Micron* 30:319-324
- Bunning E (1935) Zur kenntnis der erblichen Tagesperiodiität bei den Premablättern von *Phaseolus multiflorus*. *Jahrh Wiss Bot.* 81:411-418

- Caboche M & Rouzé P (1990) Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet.* 6:187-92
- Campbell JM & Wray JL (1983) Purification of barley nitrate reductase and demonstration of nicked subunits. *Phytochemistry* 22:2375-82
- Campbell WH & Smarrelli J (1978) Purification and kinetics of higher plant NADH:Nitrate reductase. *Plant Physiol* 61:611-6
- Cannons AC, Iida N & Solomonson LP (1991) Expression of a cDNA clone encoding the heme-binding domain of Chlorella nitrate reductase. *Biochem. J.* 278:203-209
- Chapman DJ & Harrison PJ (1988) Nitrogen metabolism and measurement of nitrate reductase activity, *In* Lobban CS, Chapman DJ. & Kremer B (eds.) *Experimental Phycology. A Laboratory Manual* Cambridge Univ. Press pp.196-202
- Cheng C, Dewdney J, Nam H, den Boer BGW & Goodman H (1988) A new locus (NIA1) in Arabidopsis thaliana encoding nitrate reductase. *EMBO J.* 7(11):3309-3314
- Chiang YM & Lin JL (1989) Nitrate uptake by nitrogen-starved plants of the red alga Gracilaria tenuistipitata var. liui. *Jpn, J. Phycol.* 37:187-93
- Chory J (1993) Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated developmental in plants. *Trends genet* 9:167-172
- Cotelle V, Meek SEM, Provan F, Milne FC, Morrice N & MacKintosh C (2000) 14-3-35 regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar starved Arabidopsis cells *EMBO J* 19:14652-14657

- Crawford NM & Campbell WH (1990) Fertile fields. *The Plant Cell* 2: 829-35
- Crawford NM (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* 7:859-868
- Crichtley AT (1993) Gracilaria (Rhodophyta, Gracilariales): an economically important agarophyte. *In* Seaweed cultivation and marine ranching. Ohno M & Crichtley AT (eds.) JICA, Yolosuka, Japan pp. 89-112
- Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, Weitz CJ & Kay SA (1999) Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285(5247):553
- Dalling MJ, Tolbert NE & Hageman RH (1972) Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. I. Spinach and tobacco leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 283:505-512
- De la Rosa MA, Diez MA, Vega JM & Losada M (1980) Purification and properties of assimilatory nitrate reductase from Ankistrodesmus braunii. *Eur. J. Biochem.* 106:249-256
- De la Rosa MA, Vega JM & Zumft WG (1981) Composition and structure of assimilatory nitrate reductase from Ankistrodesmus braunii. *J. Biol. Chem.* 256:5814-19
- Deng M, Moureaux T, Leydecker M & 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, Moureaux T, Cherel I, Boutin J-P & Caboche M (1991) *Plant Physiol Biochem* 29:239-247

- Dipierro S, Perrone C & Felicini GP (1977) *In vivo* nitrate reductase assay in Pteroglossum nicaense (Duby) Schotter (Rhodophyta, Phyllophoraceae). *Phycologia* 16(2):179-182
- Dipierro S, Perrone C & Felicini GP (1980) Changes in the nitrate-reducing activity of Schottera nicaensis Guiry *et* Hollenberg (Rhodophyta, Phyllophoraceae) during ontogenesis. *Phycologia* 19(3):232-234
- Edmunds LN (1988) *Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks*. Springer-Verlag, Berlin/New York pp 497
- Edwards P (1970) Illustrated guide to the sea weeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contr. Mar. Sc., Austin 15:1-228
- Evans HJ & Nason A (1953) Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.* 28:233-254
- Franco AR, Cárdenas J & Fernández E (1988) Regulation by ammonium of nitrate and nitrite assimilation in Chlamydomonas reinhardtii. *Bioch. Biophys. Acta* 951:98-103
- Feldman JJ (1983) Genetics of circadian clocks *Bioscience* 33:426-431
- Fischer P & Klein U (1988) Localization of nitrogen assimilating enzymes in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii *Plant Physiol.* 88:947-952
- Fritz L, Stringher CG & Colepicolo P (1996) Immunolocalization of nitrate reductase in the marine dinoflagellate Gonyaulax polyedra (Pyrrophyta) *J. Phycol* 32:632-637
- Galangau F, Daniel-Vedele F, Moureaux T, Dorbe M, Leydecker M & Caboche M (1988) Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol.* 87:3190-94

- Gao Y, Smith GJ & Alberte RS (1992) Light regulation of nitrate reductase in Ulva fenestrata (Chlorophyceae) I. Influence of light regimes on nitrate reductase activity. *Mar. Biol.* 112:691-96
- Gao Y, Smith GJ & Alberte RS (1993) Nitrate reductase from the marine diatom Skeletonema costatum. *Plant Physiol* 103:1437-1445
- Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown AM, Myers MP, Sehgal A, Young MW & Weitz CJ (1995) Isolation of *timeless* by PER protein interaction: defective interaction between *timeless* protein and long-period mutant *per^L*. *Science*. 270:811-815
- Garvey (1977) *Methods in Immunology*.
- Granbom M, Chow F, Lopes PF, Oliveira MC, Colepicolo P, de Paula EJ & Pédersen M (2001) Biochemical characterization and circadian oscillation of nitrate reductase in the red macroalga Kappaphycus alvarezii. Submetido.
- Grasshoff K, Enhardt M & Kemeling K (1983) Determination of nitrite. *In*: Methods of Sea Water Analysis. Verlag Chemie, Weinheim pp. 139-150
- Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL (1993) The phycobilisome, a light harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Reviews*. 57(3):725-749
- Haglund H (1971) Isoelectric focusing in pH gradients – a technique for fractionation and characterization of ampholytes. *Methods biochem Anal* 19:1-104
- Haglund K & Pédersen M (1992) Growth of the red alga Gracilaria tenuistipitata at high pH. Influence of some environmental factors and correlation to an increased carbonic-anhydrase activity. *Botanica Marina* 35:579-87

- Haglund K & Pédersen M (1993) Outdoor pond cultivation of the subtropical marine red alga Gracilaria tenuistipitata in brackish water in Sweden Growth, nutrient uptake, co-cultivation with rainbow trout and epiphyte control *J. Applied Phycology* 5:271-284
- Halberg F (1959). Lighting regimen and experimental method: light-synchronized periodicity analysis. In: *Digest of Technical papers*. 12th Ann. Conference on Electrical Techniques in Medicine and Biology pp 78-79
- Hanisak MD (1983) The nitrogen relationships of marine macroalga. In Carpenter EJ & Capone DG (eds) Nitrogen in the marine environment. Academic Press, New York, pp:699-730
- Harlow E & Lane D (1999) Using antibodies: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, New York*, 1999 first edition pag 215
- Hastings JW, Rusak B & Boulos Z (1991) Circadian rhythms: the physiology of biological timing. In: Prosser LD, ed. Offprint from neural and integrative animal physiology. Wiley-Liss. pp 435-456
- Haxen PG & Lewis OAM (1981) Nitrate assimilation in the marine kelp, Macrocystis augustifolia (Phaeophyceae) *Bot. Mar* 24:631-5
- Hernández I, Corzo A, Gordillo FJ, Robles MD, Saez E, Fernández JA & Niell FX (1993) Seasonal cycle of the gametophytic form of Porphyra umbilicalis: nitrogen and carbon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 99:310-11
- Hewitt EJ (1975) Assimilatory nitrate-nitrite reduction, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26:73-100
- Horner RD (1983) Purification and comparison on nit-1 wild type NADPH:nitrate reductases of Neurospora crassa. *Biochim. Biophys. Acta* 744:7-15

- Huber JL, Huber SC, Campbell WH & Redinbaugh MG (1992) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arc. Bioch Bioph* 296:58-65
- Hunter-Ensor M Ousleuy A & Sehgal A (1996) Regulation of the Drosophila protein Timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* 84:677-685
- Hurd CL, Berges JA, Osborne J & Harrison PJ (1995) An in vitro nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for Fucus gardnari (Phaeophyta). *J. Phycol.* 31:835-843
- Hyde GE, Wilberding JA, Meyer AL, Campbell ER & Campbell WH (1989) Monoclonal antibody-based immunoaffinity chromatography for purifying corn and squash NADH: nitrate reductases. Evidence for an interchain disulfide bond in NR. 13(2):233-246
- Jackson FR (1983) The isolation of biological rhythm mutations on the autosomes of Drosophila melanogaster. *J. Neurosc.* 1:3-15
- Johnson CH & Golden SS (1999) Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanism. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:389-409
- Johnson CH & Hastings JW (1986) The elusive mechanism of the circadian clock *American Scientist* 74:29-36
- Kaiser WM & Spill D (1991) Rapid modulation of spinach nitrate reductase by photosynthesis II In vitro modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol.* 96:368-75
- Kalmus H (1934) Über das Zeitgedächtnis der Bienen. *Z Vgl Physiol.* 20:405-19

- Kamachi K, Amemiya Y, Ogura N & Nakagawa H (1987) Immuno-gold localization of nitrate reductase in spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 28:333-338
- Kastle JH & 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
- Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh A., Wsley CS & Young MW (1998) The *Drosophila clock* gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I ϵ . *Cell.* 94:97-107
- Kondo T & Ishiura M (2000) The circadian clock of cyanobacteria. *BioEssays* 22:10-15
- Konopka RJ & Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophyla melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2112-2116
- Konopka RJ (1987) Genetics of biological rhythms in *Drosophila*. *Annu Rev Genet.* 21:227-236
- Kuo Y, Kleinhofs A & Warner MT (1980) Purification and partial characterization of nitrate reductase from barley leaves *Plant Sci. Lett.* 17:371-81
- Kyriacou C & Hall J, (1980) Circadian rhythm mutations affect high frequency rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6929-6733
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature (London)* 226:680-85
- Lakin-Thomas PL, Cotè GG, Brody S (1990) Circadian rhythms in *Neurospora crassa* - Biochemistry and genetics. *CRC Crit Rev Microbiol.* 17:365

- Leatherbarrow RJ (1990) Use of nonlinear regression to analyze enzyme kinetic data: application to situations of substrate contamination and background subtraction. *Anal. Biochem.* 184:274-78
- Lewy AL, Sack RL, Miller S, Hoban TM (1987) Antidepressant and circadian phase-shifting effects of light. *Science* 235:352-35
- Lillo C (1984) Circadian rhythms of nitrate reductase in barley leaves. *Physiologia Plantarum* 61:219-223
- Lillo C (1994) Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiologia Plantarum* 90:616-20
- Lillo C & Ruoff P (1989) An unusually rapid light-induced nitrate reductase mRNA pulse and circadian oscillations. *Naturwissenschaften* 76:526-528
- Lillo C, Meyer C & Ruoff P (2001) The nitrate reductase circadian system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. *Plant Physiol* 125:1554-1557
- Liu Y, Loros J & Dunlap JC (2000) Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock *Proc Natl Acad Sci USA* 97:234-239
- Lobban CS & Harrison PJ (1994) *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge pp 366
- Lopez-Ruiz A, Roldan JM, Verbelen JP & Diez J (1985) Nitrate reductase from Monoraphidium braunii *Plant Physiol.* 78:614-618
- Macchiavello J (1994) *Tolerância fisiológica e características do ágar de cinco espécies de Gracilaria (Rhodophyta, Gracilariales)*. Tese de Doutorado, IBUSP.pp 96

- MacGregor CH, Schnaitman CA, Normansell DE & Hodgins MG (1974) Purification and properties of nitrate reductase from Escherichia coli K12 *J. Biol. Chem.* 249:5321-5327
- MacKintosh C (1992) Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation *Bioch Bioph. Acta* 1137:121-126
- MacKintosh C, Douglas P & Lillo C (1995) Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (Spinaceae oleracea) leaves. *Plant Physiol* 107:451-457
- McClung CR, & Kay SA (1994) In CR somerville, E Meyerowitz, eds, *Arabidopsis thaliana*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 615-637
- Mätschke M, Riedel J & Tischner R (1997) Evidence for Signal Transduction in the Stimulation of Nitrate Uptake by Blue Light in Chlorella saccharophila. *Photochemistry and Photobiology* 66(1):128-132
- Matsudaira P (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes *J. Biol. Chem* 262:10035-10038
- Mergenhagen D (1984) Circadian clock: Genetic characterization of a short-period mutant of Chlamydomonas reinhardtii. *Eur J Cell Bio* 33:13-18
- Meyerhoff PA, Fox TC, Travis RL & Huffaker RC (1994) Characterization of the association of nitrate reductase with barley (Hordeum vulgare L.) root membranes. *Plant Physiol.* 104:925-936
- Miyazaki J, Juricek M, Angelis K, Schorr KM, Kleinhofs A & Warner RL (1991) Characterization and sequence of a novel nitrate reductase from barley. *Mol. Gen. Genet.* 228:329-34

- Moorhead G, Douglas P, Morrice N, Scarabel M, Aitken A & MacKintosh C (1996) Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr Biol* 6:1104-1113
- Murray SN & Dixon PS (1992) The Rhodophyta: some aspects of their biology. III In *Oceanogr Mar Biol. Annu. Rev.* edited by Barnes M, Ansell AD & Gibson RN, UCL Press. 30:1-148
- Nakamura Y & Ikawa T (1993) Purification and properties of NADH:nitrate reductase from red alga Porphyra yezoensis. *Plant Cell Physiol.* 34(8):1239-49
- Nakamura Y, Saji H & Kondo N (1994) Preparation of monoclonal antibodies against NADH: Nitrate reductase from the red alga Porphyra yezoensis *Plant Cell Physiol.* 35(8): 1185-1198
- Nason A (1962) Symposium on metabolism of inorganic compounds II. Enzymatic pathways of nitrate, nitrite and hydroxylamine metabolism *Bact. Rev.* 26:16-41
- Nason A (1963) Nitrate reductases, *In* The Enzymes (Boyer, Lardy, Myrbach, eds.) Academic Press, NY pp: 587-607
- Ninnemann H (1995) Some aspects of blue light research during the last decade. *Photochem. Photob.* 61(1):22-31
- Oliveira EC & Alveal K (1990) The mariculture of Gracilaria (Rhodophyta) for the production of agar. *In* Akatsuka, I [Ed] *Introduction to Applied Phycology* SPB Academic Publishing bv, The Hague, pp: 553-64
- Pan S-S & Nason A (1978) Purification and characterization of homogeneous assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase from Neurospora crassa. *Biochim. Acta* 523:297-313

- Pilgrim ML, Caspar T, Quail PH & MacClung CR (1993) Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in Arabidopsis *Plant Mol Biol* 23:349-364
- Piotrowski M & Oecking C (1998) Five new 14-3-3 isoforms from Nicotiana tabacum L.: implications for the phylogeny of plant 14-3-3 proteins. *Planta* 204:127-130
- Pittendrigh CS (1967) Circadian systems I the driving oscillator and its assay in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:1762-1767
- Price JL, Blau J A Rothenfluh A, Adodeely M, Kloss B & Young MW (1998) Double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*. 94:83-95
- Price JL, Dembinska ME, Young MW & Rosbash M (1995) Suppression of PERIOD protein abundance and circadian cycling by the Drosophila clock mutation timeless. *EMBO J*. 14:4044-4049
- Pueschel CM (1990) Cell structure In *Biology of the Red Algae*, edited by Cole KM & Sheath RG, Cambridge University Press, Cambridge, pp 7-41
- Ralph MR, Menaker M (1988) A mutation of the circadian system in golden hamster. *Science* 241:1225-1227
- Ramalho CB, Hastings JW & Colepicolo P (1995) Circadian oscillation of nitrate reductase activity in Gonyaulax polyedra is due to changes in cellular protein levels *Plant Physiol*. 107:225-231
- Redinbaugh MG & Campbell WH (1983) Purification of squash NADH:nitrate reductase by zinc chelate affinity chromatography. *Plant physiol* 71:205-7
- Redinbaugh MG & Campbell WH (1991) Higher plant responses to environmental nitrate *Physiol Plant* 82:640-50

- Remmler JL & Campbell WH (1985) Regulation of corn leaf nitrate reductase: synthesis and turnover of the enzyme's activity and protein. *Plant Physiol* 80:442-47
- Rensing L, Bruniken W & Hardeland R (1968) On the genetics of a circadian rhythm in *Drosophila*. *Experientia* 24:509-510
- Reppert SM & Sauman J (1995) Period and timeless tango: a dance of two clock genes. *Neuron* 15(5):983-986
- Rigano C, Aliotta G & Violante U (1974) Reversible inactivation by ammonia of assimilatory nitrate reductase in Cyanidium caldarium. *Arch. Microbiol.* 99(1):81-90
- Rigano C, Aliotta G & Violante U (1975) Electron donors and inhibitors of nitrate reductase from Cyanidium caldarium. *Biochim Biophys Acta* 384(1):37-45
- Roldan JM, Verbelen JP, Butler WL & Tokuyasu KT (1982) Intracellular localization of nitrate reductase in Neurospora crassa. *Plant Physiol.* 70:872-874
- Rossa MM, Oliveira MC, Okamoto OK, Lopes PF & Colepicolo P (2001) Light effect on superoxide dismutase (SOD) in the red alga Gracilariopsis tenuifrons (Gracilariales, Rhodophyta). No prelo
- Rouzé P & Caboche M (1992) Nitrate reduction in higher plants: molecular approaches to function and regulation. In *Inducible Plant Proteins* Edited by Wray JL pp 45-47 Cambridge University Press, Cambridge
- Rutila JE, Zeng H, Le M, Curtin KD & Hall JC (1996) The *tim*^{SL} mutant of the Drosophila rhythm gene timeless manifests allele-specific interactions with period gene mutants. *Neuron* 17:921-929

- Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D, Whitley A, Frucht EM, Vitaterna MH, Shimomura K, King DP, Young MW, Weitz CJ & Takahashi JS (1998) Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron*. 21:1101-1113
- Santelices B & Doty MS (1989) A review of Gracilaria farming. *Aquaculture* 78:95-133
- Sehgal A, Price JL, Man B & Young MW (1994) Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the Drosophila mutant timeless. *Science*. 263:1603-1606
- Sehgal A, Rothenfluh-Hilfiker A, Hunter-Ensor M, Chen Y, Myers MP & Young MW (1995) Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science* 270:808-810
- Solomonson LP (1974) Regulation of nitrate reductase activity by NADH and cyanide *Biochim.Biophys.Acta* 334:297-308
- Solomonson LP, Lorimer GH, Hall RL, Borchers R & Bailey JL (1975) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-nitrate reductase of Chlorella vulgaris. *J. Biol.Chem.*250:4120-4127
- Solomonson LP, Barber MJ & Robbins AP (1986) Functional domains of assimilatory NADH:nitrate reductase from Chlorella. *J Biol.Chem.*261:11290-11294
- Solomonson LP & Barber MJ (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Ann. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:225-253
- Somers DA, Kuo TM, Kleinhofs A, Warner RL & Oaks A (1983) Synthesis and degradation of barley nitrate reductase *Plant Physiol* 72:949-952

- Stöhr C, Glogaw U, Mätschke M & Tischner R (1995) Evidence for the involument of plasma-membrane-bound nitrate reductase in signal transduction during blue light stimulation of nitrate uptake in Chlorella saccharophila. *Planta* 197:613-618
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchencko O, Bailey J, Eichele G & Lee CC (1997) RIGUI a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene. *Cell*. 90:1003-1011
- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M & Sakaki Y (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature*.389:512-516
- Thomas TE & Harrison PJ (1985) Effect of nitrogen supply on nitrogen uptake, accumulation and assimilation in Porphyra perforata (Rhodophyta). *Mar. Biol.(Berl.)* 85:269-78
- Thomas TE & Harrison PJ (1988) A comparison of in vitro and in vivo nitrate reductase assays in three intertidal seaweeds. *Bot. Mar.*31:101-7
- Tischner R, Ward MR & Huffaker RC (1989) Evidence for plasma-membrane-bound nitrate reductase involved in nitrate uptake of Chlorella sorokianiana. *Planta* 178:19-24
- Ullrich WR & Novacky A (1981) Nitrate-dependent membrane potencial changes and their induction in Lemna gibba. *Plant. Sci. Lett* 22:211-217
- Vaucheret H, Marion-Poll A, Meyer C, Faure J-D, Marin E & Caboche M (1992) Interest in and limits to the utilization of reporter genes for the analysis of transcriptional regulation of nitrate reductase. *Mol Gen Genet* 235:259-268
- Vaughn KC, Duke SO & Funkhouser EA (1984) Immunochemical characterization and localization of nitrate reductase in norflurazon-treated soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 62:481-484

- Vega-Palas MA, Madueño F, Herrero A & Flores E (1990) Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7942. *J. Bact.* 172(2):643-647
- Vincentz M, Moureaux T, Leydecker M-T, Vaucheret H & Caboche M (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in Nicotiana plumbaginifolia leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J* 3:315-324
- Vitaterna MH, King DP, Chang A-M, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove W f, Pinto LH, Turek FW & Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, clock, essential for circadian behavior. *Science*. 264:719-725
- Wallsgrave RM, Lea PJ & Huffaker RC (1979) Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf Cell. *Plant Physiol.* 63:232-236
- Ward MR, Tischner R & Huffaker RC (1988) Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedlings. *Plant Physiol.* 88:1141-1145
- Westcot DM, Ullman DE, Sherwood JL, Cantone FA & German TL (1993) Rapid fixation and embedding method for immunocytochemical studies of tomato spotted wilt Tospovirus (TSWV) in plant and insect tissues. *Microsc Res Tech* 24:514-520
- Wehr TA, Wirtz-justice A, Goodwin FK, Duncon W & Gillin JC (1979) Phase advance of the circadian sleep wake cycle as an antidepressant. *Science* 206:710-713
- Wray JL & Fido RJ (1990) Nitrate reductase and nitrite reductase *In* Lea, P. J. [Ed.] *Enzymes of Primary Metabolism* Academic Press, London, pp 241-56

Wu K, Rooney MF & Ferl RJ (1997) The Arabidopsis 14-3-3 multigene family. *Plant Physiol* 114:1421-1431

Young MW (2000) Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells. *TIBS* 25:601-606

Zeng H, Qian Z, Myers MP & Rosbash M (1996) A light-entrainment mechanism for the Drosophila circadian clock. *Nature* 380:129-135

Zylka MJ, Shearman LP, Levine JD, Jin XW, Weaver DR & Reppert SM (1998) Molecular analysis of mammalian Timeless. *Neuron* 21:1115-1122