

**ROBERTO NERI DA SILVA**

**PAPEL DOS TRANSPORTADORES DE ADENILATOS NAS RESPOSTAS  
A ESTRESSES EM *Arabidopsis thaliana***

Dissertação apresentada a  
Universidade Federal de Viçosa  
como parte dos requisitos do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção  
do Título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA – MG – BRASIL**

**ABRIL 2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586p  
2016  
Silva, Roberto Neri, 1990-  
Papel dos transportadores de adenilatos nas  
respostas a estresses em *Arabidopsis thaliana* / Roberto  
Neri Silva. - Viçosa, MG, 2016.  
x, 48f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Adriano Nunes Nesi.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Arabidopsis thaliana* - Estresse abiótico.  
2. Metabolismo vegetal. 3. Bioquímica . I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal.  
Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.  
II. Título.

CDD 22. ed.

**ROBERTO NERI DA SILVA**

**PAPEL DOS TRANSPORTADORES DE ADENILATOS NAS RESPOSTAS  
A ESTRESSES EM *Arabidopsis thaliana***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa  
como parte dos requisitos do  
Programa de Pós- Graduação em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção  
do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 08 de Abril de 2016.

---

Wagner L. Araújo

---

João Henrique F. Cavalcanti

---

Adriano Nunes Nesi  
(Orientador)

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, Benedita Aparecida Guariglia da Silva e a meu falecido Pai José Neri da Silva que sempre me estimularam a dar esse grande passo. Estas duas pessoas com muita sabedoria e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigado por serem meus pais.

## **AGRADECIMENTOS**

Meu maior agradecimento é dirigido a Deus por nos momentos difíceis, dar-me força interior para superar as dificuldades, mostrando os caminhos nas horas incertas e em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais Benedita Aparecida Guariglia da Silva e José Neri da Silva por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

Ao meu irmão Rodrigo pelo apoio e exemplo de caráter que sempre me inspiraram a ser uma pessoa melhor.

A minha companheira Danielle pelo apoio incondicional, paciência e incentivo neste trabalho e na vida, principalmente nos momentos difíceis.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal por proporcionar os meios para a realização do Curso de Mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Professor Adriano Nunes Nesi pela inestimável orientação, oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional, amizade, paciência, incentivo e pela confiança em mim depositada.

Aos amigos: Dalton Júnior, Jorge Pérez, Franklin Magnum, Martielly Santana, David Medeiros, Rebeca Omena, Renan Rocha, Paula Pereira, Auxiliadora Martins, Leandro Elias, Acácio Salvador, Thiago Napoleão, Marcelo Vaz, Eduardo Paca e João Henrique pelas trocas de conhecimento, amizade, pelo bom convívio e momentos de descontração. Juntos contribuíram de diferentes formas para a realização deste trabalho. A vocês, um muito obrigado.

Aos Professores Fábio Murilo da Matta e Wagner L. Araújo pela atenção e apoio nas horas difíceis.

Aos demais colegas da Unidade de Crescimento de Plantas.

Aos demais professores do curso, funcionários e colegas que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I.....	3
<b>IMPORTÂNCIA DOS TRANSPORTADORES DE ADENILATOS NO METABOLISMO ENERGÉTICO EM <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	3
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	4
<b>2 Transportadores de adenilatos caracterizados em plantas e outros organismos</b> .....	7
<b>3 Caracterização da expressão gênica dos transportadores de adenilatos sob condições de estresse</b> .....	9
<b>4 Análise de co-expressão <i>in silico</i> de transportadores de adenilatos</b> .....	12
<b>5 Conclusões e perspectivas futuras</b> .....	16
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	17
CAPÍTULO II.....	21
<b>CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO TRANSPORTADOR DE NUCLEOTÍDEO DE ADENINA (ADNT1) EM PLANTAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	21
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>2.1 Material Vegetal e condições de cultivo</b> .....	26
<b>2.2 Testes de germinação</b> .....	26
<b>2.3 Crescimento Radicular</b> .....	27
<b>2.4 Experimento de hipóxia</b> .....	27
<b>2.4.1 Determinação de Fluorescência da clorofila <math>\alpha</math></b> .....	27
<b>2.4.2 Análises bioquímicas</b> .....	28
<b>2.4.2.1 Processamento das amostras e extração de metabólitos</b> .....	28
<b>2.4.2.2 Determinação de pigmentos em tecidos foliares</b> .....	28
<b>2.4.2.3 Determinação de açúcares</b> .....	28
<b>2.4.2.4 Determinação de proteínas</b> .....	28
<b>2.4.2.5 Determinação de amido</b> .....	29
<b>2.4.2.6 Determinação de aminoácidos</b> .....	29
<b>2.5 Análise estatística</b> .....	29
<b>3 RESULTADOS</b> .....	30

<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAC1</b>	<i>Adenine nucleotide translocator 1</i>
<b>AAC2</b>	<i>Adenine nucleotide translocator 2</i>
<b>AAC3</b>	<i>Adenine nucleotide translocator 3</i>
<b>adnt1</b>	<i>Adenine nucleotide transporter 1 mutant</i>
<b>ADNT1</b>	<i>Adenine nucleotide transporter 1</i>
<b>ADP</b>	<i>Adenosine diphosphate</i>
<b>AMP</b>	<i>Adenosine monophosphate</i>
<b>AS</b>	<i>Anti Sense</i>
<b>ATBT1</b>	<i>Arabidopsis thaliana brittle 1</i>
<b>ATMGT7</b>	<i>Arabidopsis thaliana magnesium transporter 7</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<b>ATPNC1</b>	<i>Peroxisomal adenine nucleotide carrier 1</i>
<b>ATPNC2</b>	<i>Peroxisomal adenine nucleotide carrier 2</i>
<b>BAR</b>	<i>Bio-Analytic Resource for Plant Biology</i>
<b>BOD</b>	<i>Biological Oxygen Demand</i>
<b>Col-0</b>	<i>Columbia 0</i>
<b>ER-ANT1</b>	<i>Endoplasmic reticulum-adenine nucleotide transporter 1</i>
<b>ERO</b>	<i>Espécie Reativa de Oxigênio</i>
<b>GUS</b>	<i><math>\beta</math>-Glucuronidase</i>
<b>L10</b>	<i>Line 10</i>
<b>L22</b>	<i>Line 22</i>
<b>mAK</b>	<i>Mitochondrial Adenylate Kinase</i>
<b>MCF</b>	<i>Mitochondrial carrier family</i>
<b>MEV</b>	<i>Multiple Experimental Viewer</i>
<b>MF</b>	<i>Massa Fresca</i>
<b>Mg</b>	<i>Magnésio</i>
<b>NAD</b>	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>

<b>NADP</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
<b>NTT1</b>	<i>Nucleotide Transporter 1</i>
<b>NTT1</b>	<i>Nucleotide transporter 1</i>
<b>NTT2</b>	<i>Nucleotide Transporter 2</i>
<b>NTT2</b>	<i>Nucleotide transporter 2</i>
<b>Pi</b>	<i>Phosphate inorganic</i>
<b>PM-ANT1</b>	<i>Plasmatic membrane-adenine nucleotide transporter 1</i>
<b>PRIMe</b>	<i>Platform for Riken Metabolomics</i>
<b>PSII</b>	<i>Photosystem II</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleotide Acid</i>
<b>TAAC</b>	<i>Thylakoid ATP/ADP carrier</i>
<b>TCA</b>	<i>Tricarboxilic Cicle Acid</i>
<b>T-DNA</b>	<i>Transference Desoxiribonucleotide Acid</i>
<b>UR</b>	Umidade Relativa
<b>UV-B</b>	<i>Ultravioleta - B</i>
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>

## RESUMO

SILVA, Roberto Neri, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2016.  
**Papel dos transportadores de adenilatos nas respostas a estresses em *Arabidopsis thaliana*.** Orientador: Adriano Nunes Nesi

Neste trabalho é abordado a importância dos transportadores de adenilatos no metabolismo vegetal sob condições de estresse por meio de análises de expressão *in silico* e em plantas deficientes no transportador ADNT1 sob condições de hipóxia. A análise de expressão gênica *in silico* revelou aumento na expressão de dois transportadores principalmente, AAC3 que transporta ATP mitocondrial em troca de ADP citosólico na membrana interna da mitocôndria e ATPNC2 que transporta ATP citosólico em troca de ADP peroxissomal em diferentes situações de estresse (osmótico, UV-B, calor, salinidade, injúria, seca e frio), sendo os únicos transportadores a apresentarem aumento na expressão tanto na parte aérea quanto em raiz. A análise de coexpressão revelou que em condições de estresse o transportador AAC3 é coexpresso com diversos genes envolvidos com a degradação de proteínas e genes de respostas a estresse. Outros dois transportadores que foram coexpressos com um número considerável de genes sob condições de estresse, foram o transportador ATBT1 e o transportador ATPNC1, ambos foram coexpressos com 118 genes cada ( $r = 0.65$ ). Nota-se que o transportador ATBT1 foi coexpresso principalmente com genes envolvidos com a síntese de proteína e genes envolvidos com a regulação transcricional, processamento e degradação de RNA. Do mesmo modo, o transportador ATPNC1, foi co-expresso com genes envolvidos em diferentes processos metabólicos, com destaque para degradação de proteínas e metabolismo de aminoácidos, que podem ser utilizados como substratos alternativos para produção de ATP. Quanto ao ADNT1 observou-se que as plantas deficientes no transportador apresentaram um menor teor de amido ao final do estresse por hipóxia, indicando que o transportador ADNT1 é importante no metabolismo do carbono. Adicionalmente foi observado a importância do transportador ADNT1 em tecidos heterotróficos, verificou-se que este tem participação direta na germinação e crescimento radicular.

## ABSTRACT

SILVA, Roberto Neri, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April de 2016.  
**Adenylates role of transporters in response to stress in *Arabidopsis thaliana*.** Adviser: Adriano Nunes Nesi

This paper discussed the importance of adenylates transporters in plant metabolism under stress conditions through in silico expression analysis and deficient plants in ADNT1 carrier under hypoxic conditions. Gene expression in silico analysis revealed increased expression of two conveyors mainly AAC3 carrying mitochondrial ATP exchange ADP cytosolic the inner membrane of mitochondria and ATPNC2 carrying ATP cytosolic in exchange for ADP peroxisomal in different stress situations (osmotic, UV-B, heat, salinity, injury, drought and cold), and the only carriers to submit increased expression both in the shoot and in the root. The coexpression analysis revealed that under stress conditions the AAC3 carrier is coexpressed with several genes involved in the degradation of proteins and gene responses to stress. Two other carriers that were co-expressed with a considerable number of genes under stress conditions, were the carrier ATBT1 and ATPNC1 carrier, both were co-expressed 118 genes each ( $r = 0.65$ ). Note that if the carrier was coexpressed ATBT1 mainly genes involved in protein synthesis and genes involved in transcriptional regulation, RNA processing and degradation. Similarly, the carrier ATPNC1, was co-expressed with genes involved in various metabolic processes, particularly protein degradation and metabolism of amino acids which can be used as alternative substrates for ATP production. As to ADNT1 it was observed that the plants deficient in the carrier had a lower starch content at the end of the hypoxic stress, indicating that the ADNT1 carrier is important in carbon metabolism. In addition it was observed the importance of ADNT1 carrier in heterotrophic tissues, it has been found that this has a direct interest in germination and root growth.

## INTRODUÇÃO GERAL

O ATP é a principal molécula energética utilizada no metabolismo de todos os organismos vivos existentes. A quebra da ligação do grupo fosfato libera cerca de 14 kJ/mol de energia, energia esta que promove as inúmeras reações enzimáticas que ocorrem na célula (Junge and Nelson, 2015). As células produzem uma enorme quantidade deste ATP diariamente, somente para sustentar seu metabolismo. Assim, são necessárias aproximadamente 1000 moléculas de ATP para realizar a importação de somente uma proteína através da membrana plasmática (Alder and Theg, 2003). Em determinadas situações, o status energético da célula vegetal pode ser afetado, como ocorre quando a planta é submetida a alguma condição adversa, que limita a produção de ATP pela mitocôndria (Gupta and Igamberdiev, 2016). Um produto comum do metabolismo vegetal sob condições de estresse é a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas com alto poder oxidante que podem danificar vários componentes das células e dos tecidos vegetais, normalmente essas moléculas são destruídas por um complexo de enzimas antioxidantes existentes no peroxissomo (Corpas et al., 2009). Sob este aspecto, os transportadores de adenilatos se tornam ainda mais imprescindíveis, já que é necessário que o ATP seja transportado das organelas onde ele é produzido, mitocôndrias e cloroplastos, para o citosol e as demais organelas para suprir a demanda energética existentes em situações de estresse (Zabalza et al., 2009; Gupta and Igamberdiev, 2016).

Os adenilatos (ATP,ADP e AMP) são moléculas vitais no metabolismo vegetal, estando presentes em incontáveis processos na célula, tendo como função primária o transporte de energia (Geigenberger et al., 2010). Adicionalmente a essa função, os adenilatos atuam também como, constituintes dos ácidos nucleicos, co-fatores de enzimas, precursores biossintéticos e moléculas sinalizadoras (Haferkamp et al., 2011). O ATP extracelular é considerado uma molécula sinalizadora de danos causados a membrana, sendo bem estudada tanto em animais quanto em plantas (Tanaka et al., 2014). Além disso, vários trabalhos mostram a importância da razão ATP/ADP atuando como parâmetro chave na regulação do metabolismo e respiração (Arnold and Kadenbach, 1999; Geigenberger et

al., 2010; Gout et al., 2014). Adicionalmente acredita-se que a carga energética dos adenilatos (ATP+ADP+AMP) e os níveis de ATP e ADP citosólicos também possam atuar como parâmetros regulatórios no metabolismo vegetal (Atkinson, 1968; Pradet and Raymond, 1983; Arnold and Kadenbach, 1997). Inúmeras condições podem alterar os níveis de adenilatos na célula vegetal, entre elas podemos citar a baixa disponibilidade de oxigênio, sob tal condição a produção de ATP é gravemente afetada o que gera o aumento nos níveis de ADP e AMP, já que o oxigênio funciona como acceptor na cadeia transportadora de elétrons (Bologa et al., 2003). Devido a isso, a célula passa a obter o ATP da glicólise, logo aumenta-se a quebra das reservas da planta, já que a glicólise realiza uma oxidação incompleta da molécula de glicose (Zabalza et al., 2009). Para isso ocorre uma mobilização de carbono através da sacarose, oriunda das reservas de amido dos tecidos autotróficos até os tecidos heterotróficos (Mustroph et al., 2014). Em condições de estresse prolongado substratos alternativos são usados para a produção de ATP, por meio da degradação de proteínas e metabolismo de aminoácidos (Bologa et al., 2003; Araújo et al., 2010).

Neste trabalho abordou-se à importância dos transportadores de adenilatos sob condições de estresse. Por meio de análises de expressão *in silico*, as alterações do metabolismo energético da planta e a relevância dos transportadores de adenilatos em diferentes vias metabólicas são discutidas. Adicionalmente, o papel fisiológico do transportador de adenilatos mitocondrial ADNT1 no metabolismo primário sob condições de hipóxia foi investigado.

**CAPÍTULO I**  
**IMPORTÂNCIA DOS TRANSPORTADORES DE ADENILATOS NO**  
**METABOLISMO ENERGÉTICO EM *Arabidopsis thaliana***

## 1 INTRODUÇÃO

Em uma célula ocorre a síntese, armazenamento e distribuição de energia e metabólitos entre as diferentes organelas. Isso ocorre graças a moléculas carreadoras de energia como os adenilatos (ATP, ADP e AMP). Estas moléculas, através da quebra da ligação do grupo fosfato, liberam energia para as reações endergônicas e exergônicas, desempenhando assim um papel essencial na célula vegetal (Geigenberger et al., 2010). Outros nucleotídeos de vital importância na célula são os nucleotídeos de nicotinamida ( $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ ) e suas formas reduzidas (NADH e NADPH). Esses nucleotídeos carregam elétrons do Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e Ciclo de Calvin-Benson (Fernie et al., 2004). Os nucleotídeos de maneira geral estão conectados em todos os processos metabólicos da planta, participando de inúmeros processos vitais como fotossíntese e respiração, atuando como, carreadores de energia através de toda a célula. Em adição, são constituintes dos ácidos nucleicos e atuam como cofatores de inúmeras enzimas (Haferkamp et al., 2011).

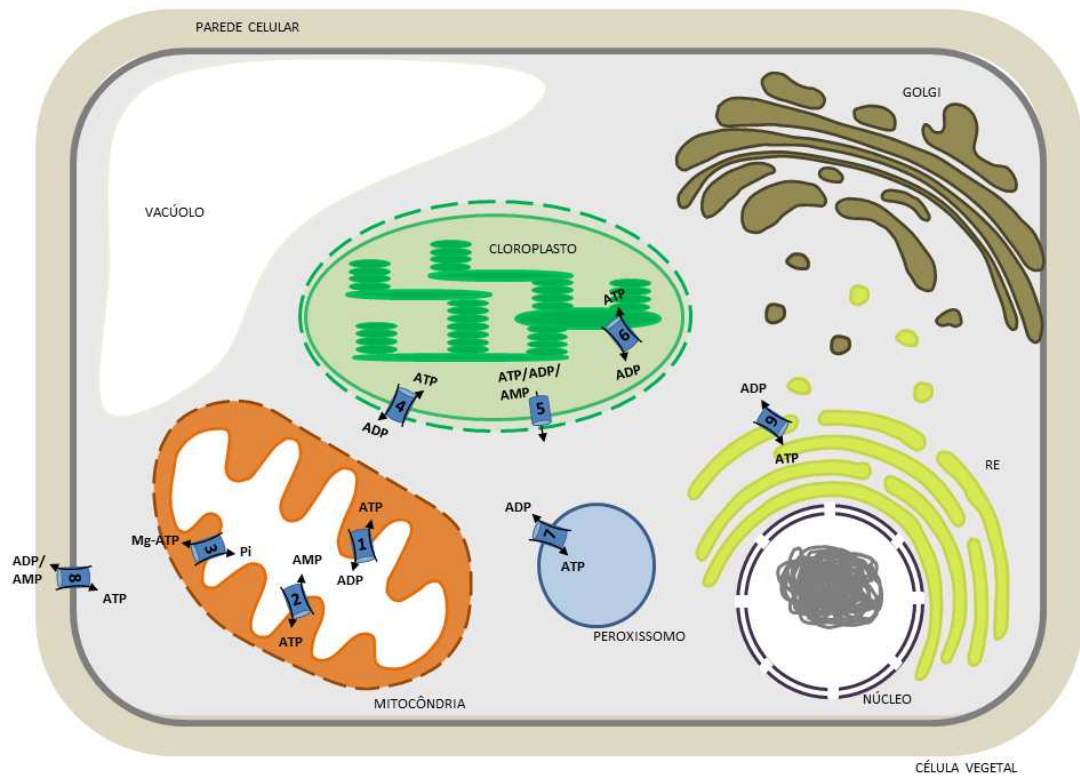
Apesar de serem produzidos principalmente nas mitocôndrias e cloroplastos, ATP, ADP e AMP são encontrados em toda célula vegetal (Junge and Nelson, 2015). ATPs são produzidos principalmente nas cadeias de transporte de elétrons existentes na mitocôndria e cloroplasto pela ligação do  $\text{ADP} + \text{P}_i$  catalisada pela enzima ATP sintase (Fernie et al., 2004). O ATP também é produzido no citosol durante a glicólise, mas a produção é inferior a que ocorre na mitocôndria e no cloroplasto (Zabalza et al., 2009). Cabe ressaltar que essas organelas são altamente reguladas para gerar ATP a níveis adequados para atender a demanda de energia de vários processos anabólicos (Khlyntseva et al., 2009). Dada a distribuição em toda a célula, a existência de transportadores é indispensável para carrear ATP das organelas envolvidas na geração de energia (mitocôndria e cloroplastos) até os locais de consumo, como no citosol (Geigenberger et al., 2010). A membrana interna da mitocôndria é impermeável à maioria das moléculas, permitindo apenas a passagem livre de gases tais como o oxigênio e o dióxido de carbono (Haferkamp et al., 2011). Os transportadores existentes

na membrana interna da mitocôndria pertencem a uma família de carreadores mitocondriais (Mitochondrial Carrier Family; MCF) (Palmieri, 2004; Traba et al., 2009). Entre os membros dessa família estão os transportadores de nucleotídeos de adenina, que transportam ATP para fora da mitocôndria e do cloroplasto em troca de ADP e para a matriz mitocondrial e o estroma cloroplastídico (Palmieri et al., 2011).

Na última década numerosos trabalhos envolvendo a identificação e caracterização de transportadores. Foram realizadas graças ao advento e a exploração das tecnologias em biologia molecular e a disponibilidade de coleções de mutantes de *Arabidopsis*. Isto possibilitou aumentar nossa compreensão destas proteínas em plantas (Picault et al., 2004; Trentmann et al., 2007). A maioria dos transportadores de adenilatos descritos carregam ATP em troca de ADP. Entretanto, a identificação e caracterização de uma proteína em *Arabidopsis*, até então com função desconhecida, se revelou em um transportador mitocondrial de adenilatos denominada ADNT1, que possui a função de transportar ATP para o espaço intermembrana em troca de AMP para a matriz mitocondrial (Palmieri et al., 2008)

Grande parte destes trabalhos foram feitos sob condições ótimas de crescimento, onde os transportadores apresentaram importância nos diferentes processos da planta, tais como, crescimento (ATBT1, ADNT1, ER-ANT1), desenvolvimento da plântula (ATPNC1), desenvolvimento do embrião (NTT1), florescimento (ER-ANT1), produção de sementes (ER-ANT1), entre outros (Figura 1) (Reiser et al., 2004; Arai et al., 2008; Kirchberger et al., 2008; Leroch et al., 2008; Palmieri et al., 2008). Pouco se sabe no entanto sobre o papel desses transportadores no metabolismo vegetal sob condições de estresse.

Neste capítulo objetivou-se descrever o conhecimento atual sobre o papel dos transportadores de adenilatos nas respostas da planta à condições de estresse. Abordou-se também a resposta das isoformas destes transportadores, discutindo sobre a resposta do transportador e quais genes são co-expressos com ele, e em quais processos esses genes estariam envolvidos.



**Figura 1** - Transportadores de nucleotídeos de adenina descritos e caracterizados em células vegetais. O transportador de ATP/ADP ACC1 (1), o transportador de ATP/AMP ADNT1 (2) e o transportador de ATP-Mg/Pi ATMGT7 (3) estão localizados na membrana interna da mitocôndria e representam membros típicos da família de transportadores mitocondriais (MCF). O exportador de ATP/ADP/AMP ATBT1 (4) e o transportador de ATP/ADP NTT1 (6) se encontram na membrana interna do envelope plastidial e o transportador ATP/ADP TAAC se localiza na membrana do tilacóide (6). Estes transportadores estão localizados nas duas organelas fonte de ATP existentes na célula vegetal. Os demais transportadores se encontram no peroxissomo, retículo endoplasmático e membrana plasmática, denominados ATPNC1 (7), ER-ANT1 (9) e PM-ANT (8) respectivamente. Esses transportadores realizam o antiporte de ATP/ADP, com exceção do PM-ANT que também transporta AMP em troca de ATP.

## **2 Transportadores de adenilatos caracterizados em plantas e outros organismos**

Os transportadores de adenilatos desempenham um papel fundamental em vários organismos além de plantas, incluindo bactérias, leveduras e mamíferos (Palmieri et al., 2011). Grande parte dos transportadores que ocorrem em leveduras possuem ortólogos em plantas e mamíferos (Haferkamp et al., 2002). Alguns desses transportadores como o AAC1 apresentam alto grau de relação entre os organismos (Haferkamp et al., 2002). Este fato sugere que transportadores funcionalmente diferentes provavelmente evoluíram por vários eventos como duplicação de genes, alterações de sequência de nucleotídeos da proteína antes da separação dos três reinos eucarióticos (Palmieri et al., 2011; Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012). Entretanto, quando se realiza uma análise filogenética, incluindo as outras isoformas da família AAC (AAC2 e AAC3), ocorre uma clara separação dos organismos em diferentes clados (Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012), indicando que, provavelmente, as isoformas dos transportadores evoluíram após a separação dos três reinos eucarióticos. Dos transportadores que ocorrem em plantas, leveduras e mamíferos podemos citar o AAC e o Mg-ATP atuando em conjunto nos diferentes organismos (Fiermonte et al., 2004; Traba et al., 2009). Em contrapartida aos transportadores que são comuns entre os organismos devido a ao ancestral eucariótico em comum, também existem os que são exclusivos devido a separação dos reinos ao longo da evolução, o que resultou nas diferenças no metabolismo de fungos, plantas e animais. Como exemplo o transportador Brittle1 que só existe em plantas (Haferkamp et al., 2011).

**Tabela 1.** Transportadores de nucleotídeos de adenina já descritos em plantas, e suas isoformas.

Transportador	Locus	Localização	Substrato e afinidade	Modo de transporte	Referência
AAC1	AT3G08580				
AAC2	AT5G13490	Membrana Interna da Mitocôndria	ATP ~ ADP	Antiporte	(Klingenberg, 2008)
AAC3	AT4G28390				
ADNT1	AT4G01100	Membrana Interna da Mitocôndria	ATP > AMP > ADP	Antiporte	(Palmieri et al., 2008)
ATMGT7	AT5G09690	Membrana Interna da Mitocôndria	Mg-ATP ~ Pi	Potencialmente Antiporte	(Gebert et al., 2009)
ATBT1	AT4G32400	Membrana Interna do Envelope Plastidial	ATP/ADP/AMP	Unidirecional	(Kirchberger et al., 2008)
TAAC	AT5G01500	Membrana do Tilacóide	ATP ~ ADP	Antiporte	(Thuswaldner et al., 2007)
NTT1	AT1G80300				
NTT2	AT1G15500	Membrana Interna do Envelope Plastidial	ATP ~ ADP	Antiporte	(Reiser et al., 2004)
ATPNC1	AT3G05290				
ATPNC2	AT5G27520	Membrana do Peroxissomo	ATP ~ ADP	Potencialmente Antiporte	(Arai et al., 2008)
ER-ANT1	AT5G17400	Membrana do Retículo Endoplasmático	ATP ~ ADP	Antiporte	(Leroch et al., 2008)
PM-ANT1	AT5G56450	Membrana Plasmática	ATP > ADP > AMP	Antiporte	(Rieder and Neuhaus, 2011)

### 3 Caracterização da expressão gênica dos transportadores de adenilatos sob condições de estresse

Quando a planta é submetida a uma condição de estresse, as demandas energéticas mudam. Ocorre um aumento da atividade de processos relacionados com defesa, como o metabolismo antioxidativo e degradação de proteínas, e a redução da atividade de processos vitais, como a fotossíntese e a respiração (Geigenberger, 2003; Pucciariello et al., 2014). Nesta condição o balanço energético da célula muda, e alguns transportadores podem ter aumento na expressão, enquanto outros podem ter sua expressão reduzida, devido a maior participação de algumas organelas nas respostas da planta a estresse.

Neste contexto para se avaliar a importância dos transportadores de adenilatos em condições de estresse, foi feita uma análise *in silico* dos dados de transcriptoma existentes na plataforma online BAR (<http://bar.utoronto.ca/>) (Figura 2). Analisou-se a expressão desses transportadores em diferentes tecidos e órgãos de plantas sob diferentes condições de estresse. Observa-se que existem diferenças na expressão dos transportadores nos diferentes tecidos e nas diferentes condições de estresse (Figura 2). Os transportadores *AAC2*, *AAC3* e *ATPNC2* (Tabela 1), apresentaram maior expressão na parte aérea. Entre estes, o transportador *AAC2* apresentou alta expressão na parte aérea de plantas cultivadas em condições de estresse osmótico, salinidade, radiação UV-B e em plantas com ferimentos mecânicos. O transportador *AAC3* também apresentou maior expressão em resposta ao estresse osmótico, UV-B e por calor. Os dois transportadores *AAC2* e *AAC3* apresentaram resposta similar as condições de estresse, estando juntos em um dos cladogramas da árvore (Figura 2 A). Ao contrário do apresentado por *AAC2* e *AAC3*, o transportador *AAC1* se mostrou estável na maioria das condições de estresse, com exceção de alguns pontos de redução na expressão no estresse osmótico, por salinidade e calor. Estes resultados sugerem que em condições de estresse esses transportadores de adenilatos assumam o papel da exportação de ATP da matriz mitocondrial para o citosol, fornecendo energia para os diversos mecanismos de resposta da célula ao estresse submetido (Baena-

González et al., 2007). O transportador *ATPNC2* também apresentou elevada expressão em resposta ao estresse osmótico, por salinidade, injúria, seca e frio. Isto pode ser atribuído a sua localização no peroxissomo, organela responsável pela eliminação de espécie reativas de oxigênio (ERO), resposta comum em diferentes tipos de estresse (Corpas et al., 2009).

Contrariamente ao apresentado pelos transportadores citados acima, o transportador *ATMGT7* (Tabela 1) apresentou baixa expressão no estresse por frio e calor, assim como o transportador *ER-ANT1* que teve baixa expressão ao final do estresse por frio, e o transportador *TAAC* teve sua expressão reduzida no estresse por calor. Os demais transportadores *ADNT1*, *ATPNC1*, *NTT1*, *NTT2* e *PM-ANT* (Tabela 1) se mostraram relativamente estáveis. Todavia no tecido de raiz a maioria dos transportadores apresentaram expressão reduzida, comportamento diferente quando comparado com a expressão ocorrida na parte aérea, o que pode ser visualizado na Figura 2. O transportador *ATBT1* teve sua expressão reduzida no estresse por frio, similarmemente os transportadores *ATMGT7*, *ADNT1* e *NTT1* apresentaram respostas muito similares, tendo sua expressão reduzida no estresse por frio, osmótico e salinidade, formando um dos cladros da árvore (Figura 2 B). Ao contrário do ocorrido na parte aérea, o transportador *AAC2* teve sua expressão reduzida nas condições de estresse em raiz, com destaque no estresse por frio e osmótico. Enquanto que o transportador *ATPNC2* apresentou aumento na expressão, assim como ocorreu na parte aérea, sendo que em raiz, o aumento na expressão foi observada no estresse osmótico e no estresse por salinidade (Figura 2 B), enquanto que o transportador *AAC3* apresentou aumento na expressão em condições de estresse osmótico e por calor. Interessantemente os transportadores *ATPNC2* e *AAC3* apresentaram resultado similar em ambos os tecidos, sendo os únicos transportadores que exibiram aumento na expressão em parte aérea e raiz sob condições de estresse. Este resultado sugere que os dois transportadores e suas respectivas organelas desempenham um importante papel nas respostas da planta em condições de estresse.



O mapa de cores *com os dados* de expressão dos genes dos transportadores correspondem a dados recuperados do recurso Bioarray para Biologia Vegetal (BAR, [http://bar.utoronto.ca/affydb/cgi-bin/affy\\_db\\_exprss\\_browser\\_in.cgi](http://bar.utoronto.ca/affydb/cgi-bin/affy_db_exprss_browser_in.cgi), acessado pela última vez 02 de fevereiro de 2016), utilizando a ferramenta e-Northerns w. Plataforma de expressão Browser. A construção da figura, a normalização dos dados por logaritmo na base 2 e a construção da árvore foi realizada com o software MultiExperiment Viewer (MeV) (Saeed et al., 2003); assim como descrito por (Cavalcanti et al., 2014).

#### **4 Análise de co-expressão *in silico* de transportadores de adenilatos**

Análises de co-expressão podem ser utilizadas como um primeiro passo para fornecer uma caracterização putativa a genes cujas funções são desconhecidas. Essas análises podem identificar genes que tenham padrões de expressão semelhantes e assim associá-los a funções biológicas conhecidas (Cavalcanti et al., 2014). Adicionalmente, têm sido utilizadas com o intuito de verificar mudanças na expressão em uma via ou em grupo de genes previamente conhecidos. Desse modo, construções de redes integradas incorporando dados de expressão gênica vêm sendo realizadas em plantas na tentativa de identificar conexões entre genes e assim fornecer informações sobre como cada gene está conectado a outros e qual seu possível envolvimento nos diferentes processos metabólicos (Schmid et al., 2005; Nunes-Nesi et al., 2014)

Neste contexto, foi realizado nesse estudo análise de correlação de expressão gênica para buscar genes candidatos que podem ser co-expressos com os transportadores de adenilatos em plantas. Assim, pretendeu-se com essa análise identificar quais os genes altamente correlacionados com os genes de interesse, agrupando-os segundo sua função biológica a fim de entender as mudanças nessa interação gênica em respostas a estresses. Para tanto, os 13 genes que comprovadamente codificam proteínas de membrana transportadoras de adenilatos foram pré-selecionados (Tabela 1).

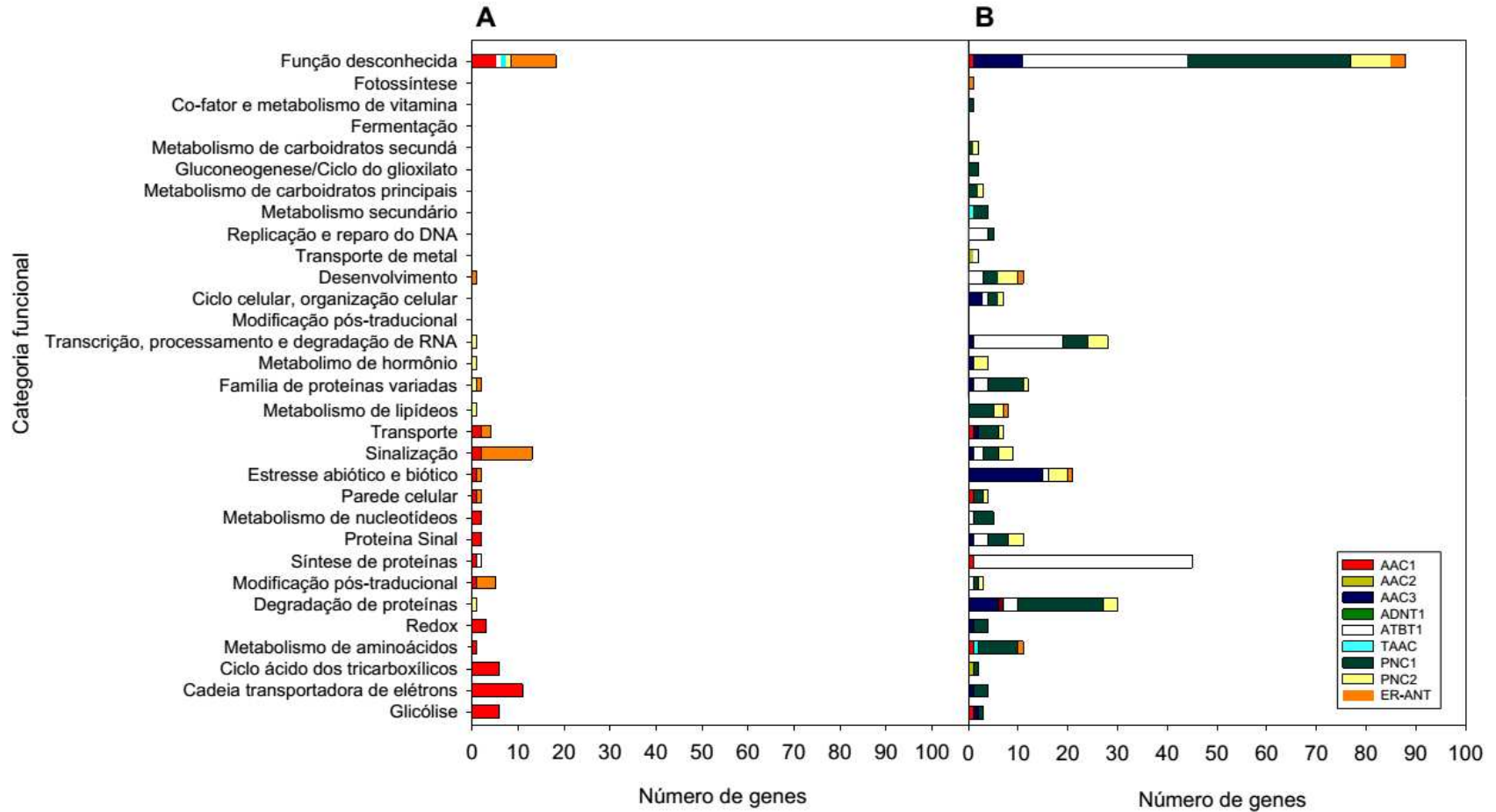
Essa análise revelou que, sob condições normais, o número de genes co-expressos com o *AAC1* e com o *ER-ANT1* foi consideravelmente maior

(44 e 31 genes, respectivamente) que o número de genes co-expressos sob condições de estresse (Figura 3A e 3B). Os 44 genes candidatos encontrados para o *AAC1* foram agrupados, principalmente, nas seguintes categorias: cadeia transportadora de elétrons (11 genes), glicólise (seis genes) e ciclo *TCA* (seis genes). Esse resultado indica que, sob condições normais, há uma forte correlação do gene *AAC1* com genes envolvidos na respiração mitocondrial, principalmente com os genes relacionados à cadeia transportadora de elétrons. Esse resultado encontra-se em consonância com trabalhos anteriores que relatam que o ATP gerado na matriz mitocondrial via fosforilação oxidativa é transportado pelo *AAC1* em troca de ADP citosólico (Fornie et al., 2004; Klingenberg, 2008) Tono *et al.*, 2014). Além disso, dos seis genes co-expressos em situações de estresse, três deles também co-expressam com o *AAC1* sob condições normais. Entretanto, apenas um deles está relacionado a uma das etapas da respiração, a glicólise. Os genes altamente co-expressos com o *ER-ANT1*, sob condições normais, foram classificados principalmente em vias de sinalização de processos requeridos para o desenvolvimento da antera e na sinalização de proteínas-G (11 genes).

De maneira interessante, uma das isoformas da família AAC, conhecida como *AAC3*, apresentou um número considerável de genes candidatos (43 genes) sob condições de estresse, sendo 11 deles envolvidos em respostas a estresse e sete com a degradação de proteínas. Em contrapartida, o *AAC2*, outra isoforma da família AAC, apresentou apenas dois genes candidatos nessas mesmas condições. Verificou-se que ambas as isoformas não apresentaram genes co-expressos sob condições normais, nem genes candidatos em comum. Desse modo, tais resultados sugerem que a expressão da isoforma *AAC3*, sob condições de estresse parece estar fortemente correlacionada a genes envolvidos em vias metabólicas que possuem enzimas dependentes de ATP, como vias de degradação de proteínas. Ressalte-se também que durante situações de estresse pode ocorrer a mobilização de substratos alternativos, como proteínas, para a manutenção da síntese de ATP (Araújo et al., 2010).

Outros dois transportadores que demonstraram considerável importância sob condições de estresse, foram o transportador *ATBT1* e o

transportador *ATPNC1*, ambos foram co-expressos com 118 genes cada. Nota-se que o transportador *ATBT1* foi co-expresso principalmente com genes envolvidos com a síntese de proteína (44 genes) e genes envolvidos com a regulação transcricional, processamento e degradação de RNA (18 genes). Do mesmo modo, o transportador *ATPNC1*, também foi co-expresso com genes envolvidos em diferentes processos metabólicos, com destaque para degradação de proteínas (17 genes) e metabolismo de aminoácidos (oito genes). É esperado que o transportador *ATPNC1* seja co-expresso com genes relacionados a degradação de proteínas, visto que essa é uma atividade comum do peroxissomo, principalmente em situações de estresse (Corpas et al., 2009). Importante mencionar que ambos transportadores foram co-expressos com 33 genes cujas funções ainda não são conhecidas. Conclui-se, portanto, que aproximadamente 30% dos genes co-expressos com *ATBT1* e *ATPNC1* sob condições de estresse, ainda não foram identificados. Isso revela a importância de se caracterizar a função destes genes, a fim de determinar qual seria a relação dos mesmos com as respostas da planta sob condições de estresse.



**Figura 3:** Função biológica dos genes candidatos co-expressos com os genes relacionados ao transporte de adenilatos em *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Categorias funcionais dos genes candidatos sob condições normais **(B)** Categorias funcionais

dos genes candidatos sob condições de estresse. Treze genes que codificam transportadores de adenilatos, cujas funções são conhecidas, foram pré-selecionados para a análise. Inicialmente, foi realizada uma busca por genes candidatos em dois diferentes conjuntos de dados de transcriptoma (“all data sets” e “stress treatments”) utilizando o método "union of sets" através da plataforma PRIME co-expression website ([http://prime.psc.riken.jp/?action=coexpression\\_index](http://prime.psc.riken.jp/?action=coexpression_index)). Correlações positivas ( $r > 0.65$ ) foram utilizadas para localizar os genes candidatos. Posteriormente, esses genes encontrados foram listados e submetidos a análise de categorização funcional através da plataforma MAPMAN utilizando a ferramenta Mercator (<http://www.plabipd.de/portal/web/guest/mercator-sequence-annotation>).

## **5 Conclusões e perspectivas futuras**

De maneira geral, os resultados obtidos com as análises de coexpressão e de expressão gênica dos transportadores de adenilatos indicam que essas abordagens combinadas podem auxiliar na identificação de genes envolvidos em processos metabólicos relevantes. De maneira interessante, os transportadores AAC2 e AAC3, se mostraram importantes nas duas análises realizadas, pois ambos apresentaram aumento em sua expressão em diferentes condições de estresse. Em contrapartida, o transportador AAC1 teve sua expressão e coexpressão com outros genes reduzida sob condições de estresse. Isso indica, que possivelmente na tentativa de compensar essa redução na expressão da isoforma AAC1, nestas condições, as demais isoformas da família AAC desempenham um papel crucial para a manutenção da respiração e conseqüentemente para a provisão de energia. Tendo isso em mente, esta análise sugere que uma validação experimental é necessária para elucidar o envolvimento direto dos genes candidatos. Assim, trabalhos futuros devem ainda ser realizados para melhor compreender as alterações no metabolismo que ocorrem em condições de estresse, particularmente a nível mitocondrial.

## 6 REFERÊNCIAS

- Alder NN, Theg SM** (2003) Energy use by biological protein transport pathways. *Trends Biochem Sci* **28**: 442–51
- Arai Y, Hayashi M, Nishimura M** (2008) Proteomic identification and characterization of a novel peroxisomal adenine nucleotide transporter supplying ATP for fatty acid beta-oxidation in soybean and Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 3227–40
- Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, et al** (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *Plant Cell* **22**: 1549–63
- Arnold S, Kadenbach B** (1997) Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur J Biochem* **249**: 350–4
- Arnold S, Kadenbach B** (1999) The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically<sup>1</sup>. *FEBS Lett* **443**: 105–108
- Atkinson DE** (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* **7**: 4030–4
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J** (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938–42
- Bologa KL, Fernie AR, Leisse A, Loureiro ME, Geigenberger P** (2003) A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiol* **132**: 2058–2072
- Cavalcanti JHF, Esteves-Ferreira AA, Quinhones CGS, Pereira-Lima IA, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Araújo WL** (2014) Evolution and functional implications of the tricarboxylic acid cycle as revealed by phylogenetic analysis. *Genome Biol Evol* **6**: 2830–48
- Corpas FJ, Hayashi M, Mano S, Nishimura M, Barroso JB** (2009) Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of Arabidopsis plants. *Plant Physiol* **151**: 2083–2094
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ** (2004) Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 254–261
- Fiermonte G, De Leonardis F, Todisco S, Palmieri L, Lasorsa FM, Palmieri F** (2004) Identification of the mitochondrial ATP-Mg/Pi transporter: Bacterial expression, reconstitution, functional

characterization, and tissue distribution. *J Biol Chem* **279**: 30722–30730

- Gebert M, Meschenmoser K, Svidová S, Weghuber J, Schweyen R, Eifler K, Lenz H, Weyand K, Knoop V** (2009) A root-expressed magnesium transporter of the MRS2/MGT gene family in *Arabidopsis thaliana* allows for growth in low-Mg<sup>2+</sup> environments. *Plant Cell* **21**: 4018–4030
- Geigenberger P** (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 247–256
- Geigenberger P, Riewe D, Fernie AR** (2010) The central regulation of plant physiology by adenylates. *Trends Plant Sci* **15**: 98–105
- Gout E, Rébeillé F, Douce R, Bligny R** (2014) Interplay of Mg<sup>2+</sup>, ADP, and ATP in the cytosol and mitochondria: unravelling the role of Mg<sup>2+</sup> in cell respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E4560–7
- Gupta KJ, Igamberdiev AU** (2016) Reactive Nitrogen Species in Mitochondria and Their Implications in Plant Energy Status and Hypoxic Stress Tolerance. *Front Plant Sci* **7**: 1–6
- Haferkamp I, Fernie AR, Neuhaus HE** (2011) Adenine nucleotide transport in plants: Much more than a mitochondrial issue. *Trends Plant Sci* **16**: 507–515
- Haferkamp I, Hackstein JHP, Voncken FGJ, Schmit G, Tjaden J** (2002) Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. *Eur J Biochem* **269**: 3172–3181
- Haferkamp I, Schmitz-Esser S** (2012) The plant mitochondrial carrier family: functional and evolutionary aspects. *Front Plant Sci* **3**: 2
- Junge W, Nelson N** (2015) ATP Synthase. *Annu Rev Biochem* **84**: 631–57
- Khlyntseva S, Bazel' Y, Vishnikin A, Andruch V** (2009) Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides. *J Anal Chem* **64**: 657–673
- Kirchberger S, Tjaden J, Ekkehard Neuhaus H** (2008) Characterization of the *Arabidopsis* Brittle1 transport protein and impact of reduced activity on plant metabolism. *Plant J* **56**: 51–63
- Klingenberg M** (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1778**: 1978–2021
- Leroch M, Neuhaus HE, Kirchberger S, Zimmermann S, Melzer M, Gerhold J, Tjaden J** (2008) Identification of a novel adenine nucleotide transporter in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 438–451
- Mustroph A, Barding GA, Kaiser KA, Larive CK, Bailey-Serres J** (2014)

Characterization of distinct root and shoot responses to low-oxygen stress in *Arabidopsis* with a focus on primary C- and N-metabolism. *Plant, Cell Environ* **37**: 2366–2380

**Nunes-Nesi A, Santos Brito D, Inostroza-Blancheteau C, Fernie AR, Araújo WL, Poschenrieder C, al. et, Ma JF, Kochian LV, al. et, et al** (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends Plant Sci* **19**: 399–407

**Palmieri F** (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): Physiological and pathological implications. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **447**: 689–709

**Palmieri F, Pierri CL, De Grassi A, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: A review with new insights. *Plant J* **66**: 161–181

**Palmieri L, Santoro A, Carrari F, Blanco E, Nunes-Nesi A, Arrigoni R, Genchi F, Fernie AR, Palmieri F** (2008) Identification and Characterization of ADNT1, a Novel Mitochondrial Adenine Nucleotide Transporter from *Arabidopsis*,. *Plant Physiol* **148**: 1797–1808

**Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F** (2004) The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **9**: 138–46

**Pradet A, Raymond P** (1983) Adenine Nucleotide Ratios and Adenylate Energy Charge in Energy Metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* **34**: 199–224

**Pucciariello C, Voeselek LACJ, Perata P, Sasidharan R** (2014) Plant responses to flooding. *Front Plant Sci* Editor. doi: 10.3389/fpls.

**Reiser J, Linka N, Lemke L, Jeblick W, Neuhaus HE** (2004) Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**: 3524–36

**Rieder B, Neuhaus HE** (2011) Identification of an *Arabidopsis* plasma membrane-located ATP transporter important for anther development. *Plant Cell* **23**: 1932–1944

**Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, et al** (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**: 374–8

**Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**: 501–6

**Tanaka K, Choi J, Cao Y, Stacey G** (2014) Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Front Plant Sci* **5**: 446

**Thuswaldner S, Lagerstedt JO, Rojas-St??tz M, Bouhidel K, Der C,**

**Leborgne-Castel N, Mishra A, Marty F, Schoefs B, Adamska I, et al** (2007) Identification, expression, and functional analyses of a thylakoid ATP/ADP carrier from Arabidopsis. *J Biol Chem* **282**: 8848–8859

**Traba J, Satrústegui J, del Arco A** (2009) Transport of adenine nucleotides in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: Interactions between the ADP/ATP carriers and the ATP-Mg/Pi carrier. *Mitochondrion* **9**: 79–85

**Trentmann O, Horn M, van Scheltinga ACT, Neuhaus HE, Haferkamp I** (2007) Enlightening energy parasitism by analysis of an ATP/ADP transporter from chlamydiae. *PLoS Biol* **5**: e231

**Zabalza A, van Dongen JT, Froehlich A, Oliver SN, Faix B, Gupta KJ, Schmäzlin E, Igal M, Orcaray L, Royuela M, et al** (2009) Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol* **149**: 1087–1098

**CAPÍTULO II**  
**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO TRANSPORTADOR DE**  
**NUCLEOTÍDEO DE ADENINA (ADNT1) EM PLANTAS DE *Arabidopsis***  
***thaliana***

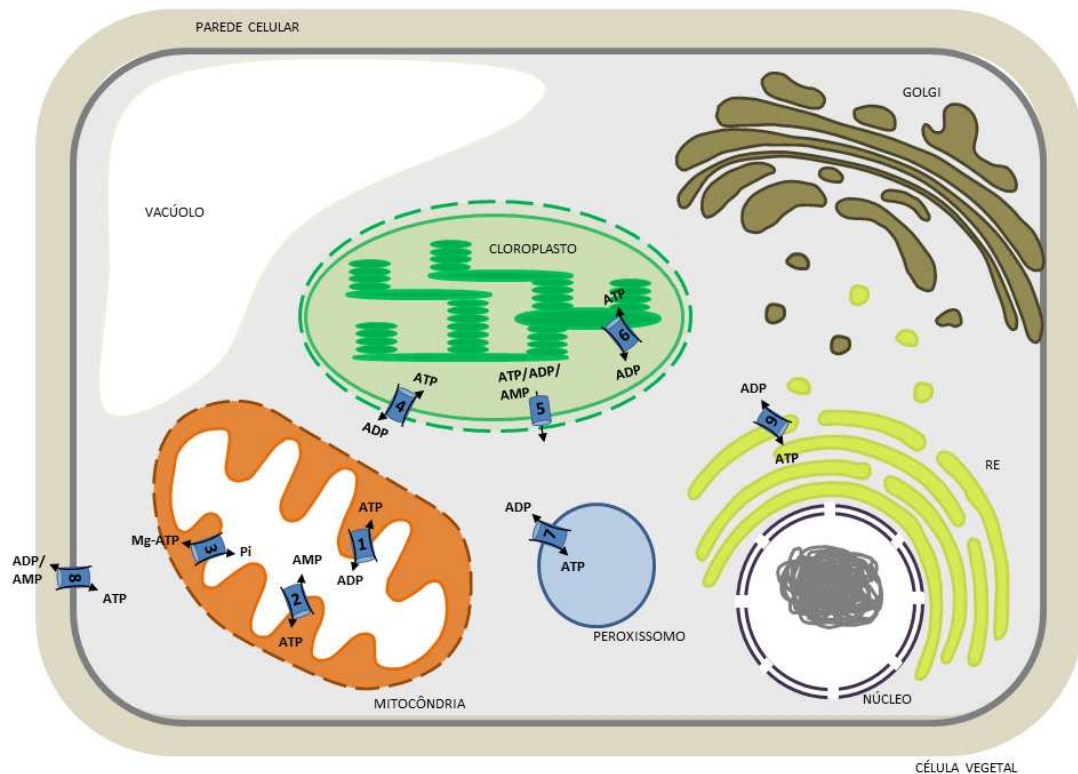
## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, a célula eucariótica passou a ser compartimentalizada por meio de invaginações da membrana de seus ancestrais procarióticos, surgindo assim à necessidade de transporte de moléculas de um compartimento a outro da célula (Bogorad, 1975). A partir dessa necessidade de transporte surgiram proteínas transmembranas com a capacidade de transportar substratos específicos entre as organelas e o citosol. A maioria das biomoléculas possuem características físico-químicas que as tornam impermeáveis à membrana celular. Desse modo é necessário a existência de proteínas de membranas para permitir a comunicação metabólica entre os diferentes compartimentos celulares (Geigenberger et al., 2010).

No contexto do metabolismo celular os nucleotídeos estão presentes em inúmeros processos vitais, atuando como, carreadores de energia através de toda a célula, constituintes dos ácidos nucleicos e também atuando como cofatores de inúmeras enzimas (Haferkamp et al., 2011). Nos últimos anos foram identificados, descritos e caracterizados alguns transportadores de adenilatos de células vegetais por meio da reconstituição destes em lipossomos (Haferkamp et al., 2011; Palmieri et al., 2011). Esses transportadores medeiam um fluxo desses metabólitos através das organelas da célula conectando o metabolismo destas. Dentre todos os compostos transportados entre as organelas, talvez o ATP seja o de maior importância, pois está envolvido na maior parte das vias bioquímicas presentes em uma célula vegetal. Neste contexto, os transportadores de ATP têm um papel essencial no acoplamento das reações endergônicas e exergônicas. Tendo em conta que o ATP é sintetizado principalmente na cadeia transportadora de elétrons cloroplastídica e na mitocôndria, transportadores de ATP são necessários para garantir o fornecimento de energia para as reações metabólicas que ocorrem no citosol e em outras organelas (Figura 1). Em *Arabidopsis* a maioria dos transportadores de ATP caracterizados como AAC1, AAC2, AAC3, ATBT1, ER-ANT1 atua como antiporte, principalmente por ADP, mas também por AMP (Kirchberger et al., 2008; Klingenberg, 2008; Leroy et al., 2008).

Recente estudo permitiu à identificação de uma proteína transmembrana transportadora de ATP, pertencente à família de transportadores mitocondriais (Família MCF) de *Arabidopsis thaliana* (Palmieri et al., 2008). Neste estudo, verificou-se que o gene At4g01100, codifica uma proteína denominada ADNT1, capaz de realizar o transporte mitocondrial de nucleotídeos de adenina. Esse mesmo estudo revelou que ADNT1 está presente na membrana mitocondrial interna e sua função primária é catalisar a troca de AMP citosólico por ATP mitocondrial, e de forma menos pronunciada de ADP citosólico por ATP da matriz mitocondrial (Figura 1). A expressão de ADNT1 ocorre principalmente em radículas de plântulas e nas extremidades de raízes de plantas adultas (Palmieri et al., 2008). Evidenciando uma possível função fisiológica do transportador em tecidos heterotróficos. Além disso, foi observado uma expressão considerável de ADNT1 em folhas senescentes (Palmieri et al., 2008).

A função fisiológica de ADNT1 em plantas ainda não foi definida. O estudo inicial realizado caracterizou o mutante *adnt*<sup>1</sup> em condições ótimas ao desenvolvimento de *Arabidopsis* (Palmieri et al., 2008). Esta caracterização sugere que a ausência de ADNT1 afeta principalmente o crescimento de tecidos heterotróficos, reduzindo a taxa de respiração nas raízes e conseqüentemente diminuindo o crescimento das mesmas (Palmieri et al., 2008). Recentemente, uma caracterização do transportador ADNT1 foi realizada em plantas de *Arabidopsis* ecótipo Columbia 0 (Fonseca *et al.*, 2012). Neste trabalho foi verificado que a baixa expressão de ADNT1 antecipou a senescência natural das plantas em condições normais e de deficiência de carbono por escuro prolongado (Fonseca *et al.*, 2012).



**Figura 1** – Transportadores de nucleotídeos de adenina descritos e caracterizados em células vegetais. O transportador de ATP/ADP ACC1 (1), o transportador de ATP/AMP ADNT1 (2) e o transportador de ATP-Mg/Pi ATMGT7 (3) estão localizados na membrana interna da mitocôndria e representam membros típicos da família de transportadores mitocondriais (MCF). O exportador de ATP/ADP/AMP ATBT1 (4) e o transportador de ATP/ADP NTT1 (6) se encontram na membrana interna do envelope plastidial e o transportador ATP/ADP TAAC se localiza na membrana do tilacóide (6). Estes transportadores estão localizados nas duas organelas “fonte” de ATP existentes na célula vegetal. Os demais transportadores se encontram no peroxissomo, retículo endoplasmático e membrana plasmática, denominados ATPNC1 (7), ER-ANT1 (9) e PM-ANT (8) respectivamente. Esses transportadores realizam o antiporte de ATP/ADP, com exceção do PM-ANT que também transporta AMP em troca de ATP.

Sabe-se que em tecidos vegetais heterotróficos, tais como raízes, AMP é um nucleotídeo abundante no citosol (Roberts et al., 1997). Também já foi descrito que os níveis citosólicos de AMP aumentam pronunciadamente durante estresses abióticos, tais como hipóxia, e é

essencialmente convertido a ATP durante o período de recuperação a partir desse estresse (Saglio et al., 1980). O ATP exportado a partir da matriz mitocondrial em troca do AMP citosólico pode ser convertido no espaço intermembrana pela cinase do adenilato mitocondrial (mAK) em duas moléculas de ADP, as quais reentrariam na matriz mitocondrial por meio do transportador ADP/ATP para suportar a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa (Roberts et al., 1997). Dessa forma, dadas as características de transporte de ADNT1 é provável que plantas com expressão reduzida deste transportador sejam mais sensíveis a condições de estresse por hipóxia. Visto que, em tais circunstâncias, a importação do AMP citosólico pela mitocôndria seria de fundamental importância para a exportação de ATP e manutenção do fornecimento da energia necessária para sustentar o metabolismo nesses tecidos. Portanto, existe a necessidade de estudos mais detalhados acerca do transportador ADNT1, de modo a caracterizar em que extensão o mesmo é importante para sustentar a produção de ATP em tecidos vegetais sob condições de estresse por deficiência de oxigênio.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas em todos os experimentos plantas selvagens (WT) de *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0) e duas linhas transgênicas com expressão reduzida para o gene *ADNT1* via RNA antisense (AS). Em adição às linhas transgênicas, foi utilizada uma linha mutante (*adnt1*), cuja expressão do *ADNT1* foi reduzida via inserção de T-DNA. Tanto o mutante quanto as linhas transgênicas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alisdair R. Fernie, Instituto Max Planck para Fisiologia Molecular de Plantas, Golm-Potsdam, Alemanha.

As sementes de *A. thaliana* foram esterilizadas em 1mL de etanol 70% por 2 minutos e em 1mL de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas repetidamente (6x) em água ultrapura autoclavada. Após a esterilização, as sementes foram distribuídas em placas de petri (90x15mm) sobre meio MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado com 1% de sacarose (p/v), contendo a metade dos sais e vitaminas. Posteriormente, as placas contendo as sementes foram estratificadas no escuro a 4°C por cinco dias. Após este período, foram então transferidas para germinadores de câmara (BOD), sob radiação luminosa de 150  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura média de 21 °C, 60 % de umidade e fotoperíodo de 8h luz e 16h escuro.

### 2.2 Testes de germinação

Os testes de germinação foram conduzidos em três condições diferentes: com sacarose (1%), sem sacarose e manitol (200 mM). Para cada condição foram utilizadas cinco placas de petri (90x15mm). Cada placa foi dividida em quatro campos, nos quais 35 sementes esterilizadas de cada genótipo (WT, *adnt1*, AS-L10, AS-L22) foram distribuídas. As placas foram colocadas em germinadores de câmara (BOD) nas condições citadas no item 2.1. A contagem de sementes germinadas foi efetuada diariamente. A

protrusão da radícula foi o critério de germinação utilizado. Os resultados foram avaliados em termos de porcentagem diária de sementes germinadas.

### **2.3 Crescimento Radicular**

O crescimento radicular foi realizado conforme Palmieri et al (2008) com algumas modificações. Foram germinadas verticalmente em placas quadradas (120x120mm) contendo meio MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado com 1% de sacarose (p/v) 36 sementes por genótipo. As placas foram transferidas para uma sala climatizada ( $165 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura máxima de 22°C e mínima de 18°C, 70% de umidade relativa, UR) com fotoperíodo de 8h de luz/16h de escuro. A primeira medição foi realizada no quarto dia após a germinação.

### **2.4 Experimento de hipóxia**

Passados dez dias da germinação, as plântulas foram transferidas para vasos de 80 ml contendo substrato comercial Tropstrato HT (Vida Verde, tecnologia em substratos) e mantidas em germinadores de câmara (BOD) por quatro semanas sob as mesmas condições citadas no item 2.1. Após esse período, as plantas foram submetidas à hipóxia do sistema radicular por meio de alagamento, submergindo os vasos em bandejas com água, formando uma lâmina de 0,2 cm acima do substrato. Durante o tratamento foram coletadas amostras de folhas e raízes na metade do período de luz. As coletas foram realizadas antes e 3, 7 e 12 dias após o início do alagamento.

#### **2.4.1 Determinação de Fluorescência da clorofila a**

A proporção de  $F_v/F_m$ , que corresponde ao rendimento quântico potencial das reações fotoquímicas do PSII, foi medida em folhas completamente expandidas de plantas com quatro semanas. A fluorescência da clorofila a foi determinada pelo fluorômetro de luz modulada MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Após as plantas estarem adaptadas ao período

sem luz, foi determinada a fluorescência mínima ( $F_0$ ). Em seguida, um pulso de luz saturante foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ) (Oh et al., 1996).

## **2.4.2 Análises bioquímicas**

### **2.4.2.1 Processamento das amostras e extração de metabólitos**

As amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido e posteriormente os metabólitos foram extraídos em uma série etanólica (98%, 80% e 50%) (Gibon et al., 2004). As frações solúveis foram combinadas num único tubo para posterior quantificação de açúcares, aminoácidos e pigmentos foliares. Enquanto que, o precipitado foi lavado duas vezes em etanol 80% para posterior quantificação de amido e de proteínas (Gibon et al., 2004). Ambos foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **2.4.2.2 Determinação de pigmentos em tecidos foliares**

Utilizando um leitor de microplacas (Optimax Tunable Leitor de Microplacas) as leituras de absorvância foram tomadas de cada amostra a 645 e 665 nm. Uma vez obtidas as absorvâncias, as concentrações de clorofila a e b foram calculadas, sendo o conteúdo total normalizado pelo fresco peso da amostra (Porra et al., 1989).

### **2.4.2.3 Determinação de açúcares**

Os níveis de glicose, frutose e sacarose foram determinados na fração solúvel de etanol. As leituras de absorvância foram realizadas a 340 nm em intervalos de um minuto (Fernie et al., 2001).

### **2.4.2.4 Determinação de proteínas**

O teor de proteína foi determinado a partir do precipitado. No leitor de microplacas, a absorvância foi determinada a um comprimento de onda de

595 nm. O teor de proteína de cada amostra foi determinado utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). O teor de proteína foi normalizado pelo peso fresco das amostras (Gibon et al., 2004).

#### **2.4.2.5 Determinação de amido**

O teor de amido foi determinado a partir do precipitado. As leituras foram realizadas a 340 nm em um leitor de microplacas em intervalos de um minuto. Os valores foram normalizados pelo peso fresco das amostras (Ferne et al., 2001).

#### **2.4.2.6 Determinação de aminoácidos**

Aminoácidos totais foram determinados utilizando o leitor de microplaca citado acima, onde as leituras foram feitas a 570 nm. Para a determinação do teor total de aminoácidos nas amostras foi realizada uma curva padrão de Leucina: 0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,01 e 0,25 mM. Os valores foram normalizados pelo peso fresco da amostra (Gibon et al., 2004).

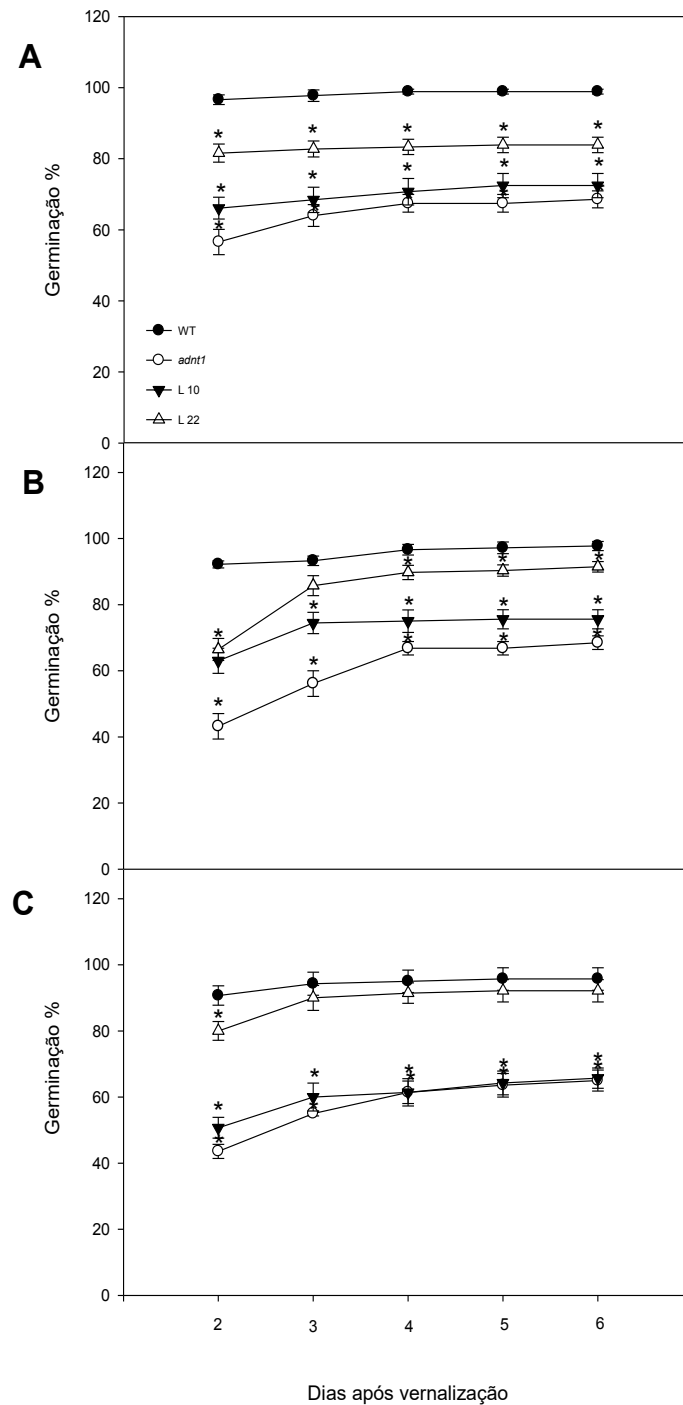
### **2.5 Análise estatística**

Os experimentos consistiram de quatro genótipos, cujos delineamentos foram inteiramente casualizados. Para avaliar o crescimento radicular foram utilizadas três repetições e quatro para o teste de germinação. Enquanto que para o experimento de hipóxia foram utilizadas seis repetições de cada genótipo. Testes *t* foram realizados utilizando o algoritmo incorporado no Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EUA). Variâncias desiguais foram assumidas e tomadas em consideração nos cálculos. Foram considerados significativos os valores com  $P < 0,05$  com o teste *t*.

### 3 RESULTADOS

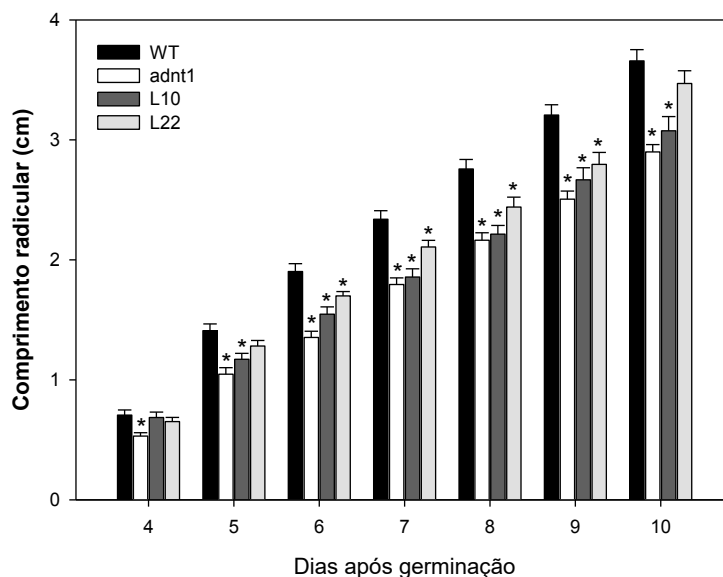
Devido a grande quantidade de AMP em sementes durante a germinação (Saglio et al., 1980), decidiu-se investigar se o transportador ADNT1 teria importância nesse processo. Foram feitos então testes de germinação nas plantas com deficiência no transportador ADNT1 e no tipo selvagem. As sementes foram germinadas em três diferentes condições a saber: meio sem sacarose (1A), meio com sacarose (1B) e meio com manitol (1C). Em todos tratamentos, as plantas com deficiência na expressão do transportador apresentaram uma taxa de germinação significativamente menor quando comparada com a germinação apresentada pelo tipo selvagem. As plantas com deficiência também apresentaram uma menor velocidade de germinação, principalmente no teste com presença de sacarose (Figura 1).

No experimento de germinação não foi observado nenhuma diferença no estabelecimento das plântulas entre os genótipos, se notou apenas uma diferença entre os diferentes meios de germinação. As plântulas que cresceram em meio com sacarose, apresentaram um desenvolvimento mais acelerado em relação ao meio sem sacarose (Osuna et al., 2015), e as plântulas que cresceram em meio com manitol, apresentaram um desenvolvimento das plântulas mais lento em relação aos meios com e sem sacarose.



**Figura 1.** Efeito de diferentes condições de germinação de genótipos de *Arabidopsis thaliana* com expressão reduzida de ADNT1 em meio MS, sem sacarose (A), com sacarose (1%) (B) e com manitol (200 mM) (C). Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de cinco amostras independentes. O asterisco indica valores que foram determinados pelo teste t Student como significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) a partir do tipo selvagem (WT), massa fresca (MF).

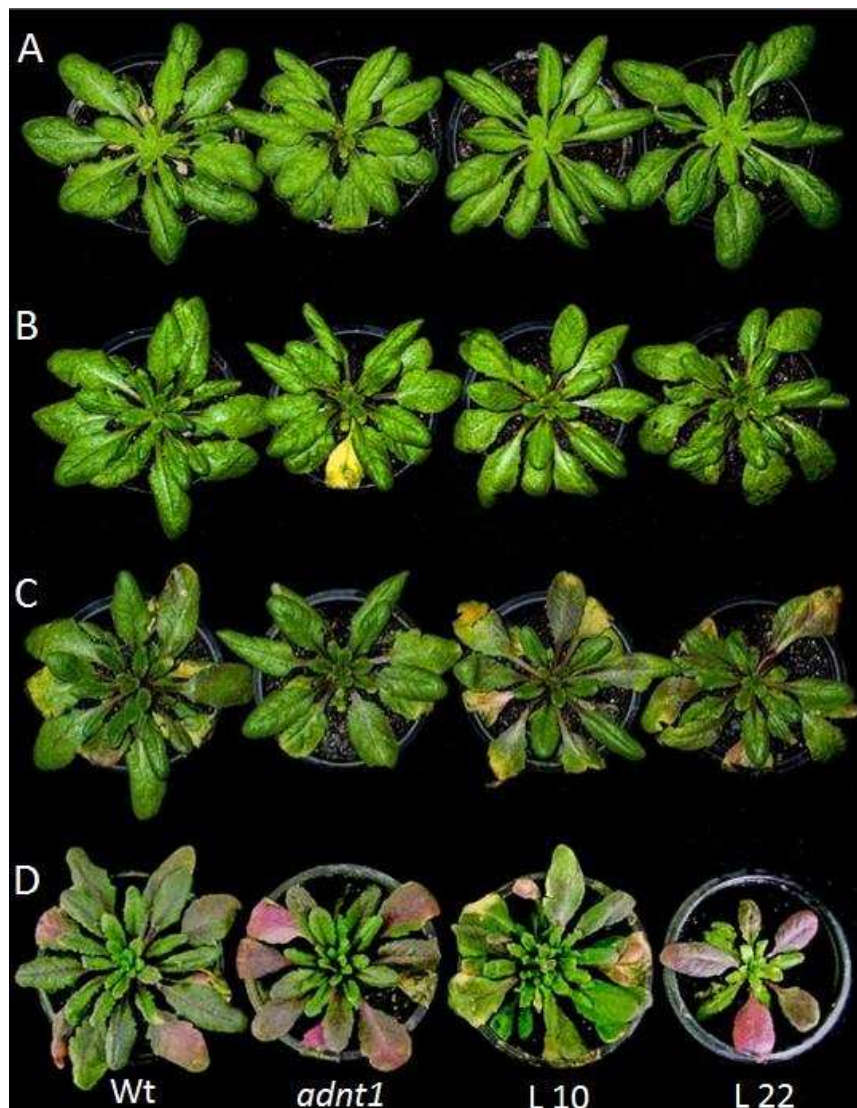
Para confirmar a importância de *ADNT1* no desenvolvimento de raízes, foi feita uma análise de crescimento radicular sob condições normais. Assim, como observado anteriormente, as plantas com redução no transportador apresentaram um crescimento menor do sistema radicular em comparação ao tipo selvagem (Palmieri et al., 2008).



**Figura 2.** Análise de crescimento radicular de genótipos de *Arabidopsis thaliana* com expressão reduzida de ADNT1 e tipo selvagem em meio MS. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de cinco amostras independentes. O asterisco indica valores que foram determinados pelo teste t Student como significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) a partir do tipo selvagem (WT), massa fresca (MF).

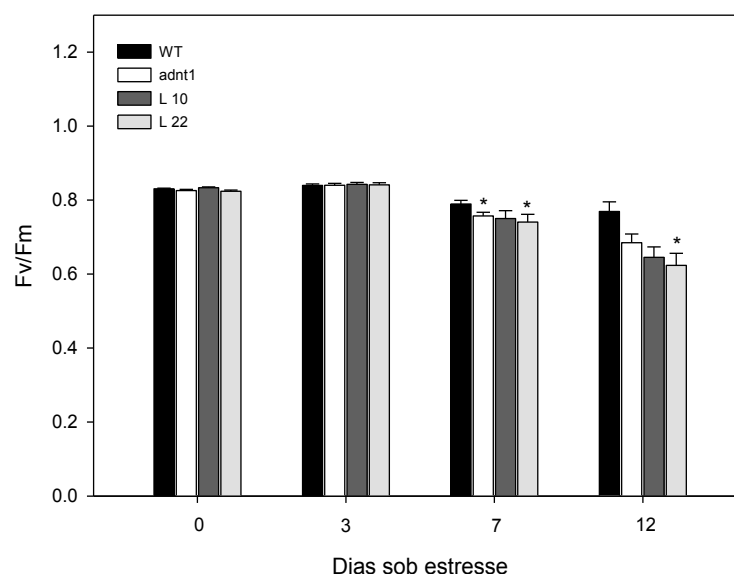
O fenótipo das plantas com expressão reduzida do transportador ADNT1 e do tipo selvagem, foi semelhante ao fenótipo anteriormente observado (Palmieri et al., 2008) em condições ótimas de crescimento, não apresentando fenótipos anormais visíveis nos mutantes durante o crescimento vegetativo. Após quatro semanas de cultivo as linhas antisense e plantas homozigotas (ADNT1) foram transferidas para condições de hipóxia juntamente com as do tipo selvagem. Todos os genótipos começaram a apresentar sinais de senescência após sete dias de deficiência de oxigênio, ao passo que as linhas antisense exibiram sinais

levemente mais acentuados quando comparadas com o tipo selvagem (Figura 3). Após 12 dias de estresse foram observados sinais mais evidentes nas plantas causados pela condição de baixa disponibilidade de oxigênio. Nos genótipos com deficiência do transportador ADNT1, observou-se a presença de folhas arroxeadas e lesões em uma extensão levemente maior em comparação com as apresentadas no tipo selvagem, sugerindo que a falta do transportador pode acentuar a sensibilidade da planta ao estresse.



**Figura 3.** Caracterização fenotípica dos genótipos de *Arabidopsis* com expressão reduzida de ADNT1 em condições de hipóxia. Imagens das plantas no tempo 0 dias (A), 3 dias (B), 7 dias (C) e 12 dias (D).

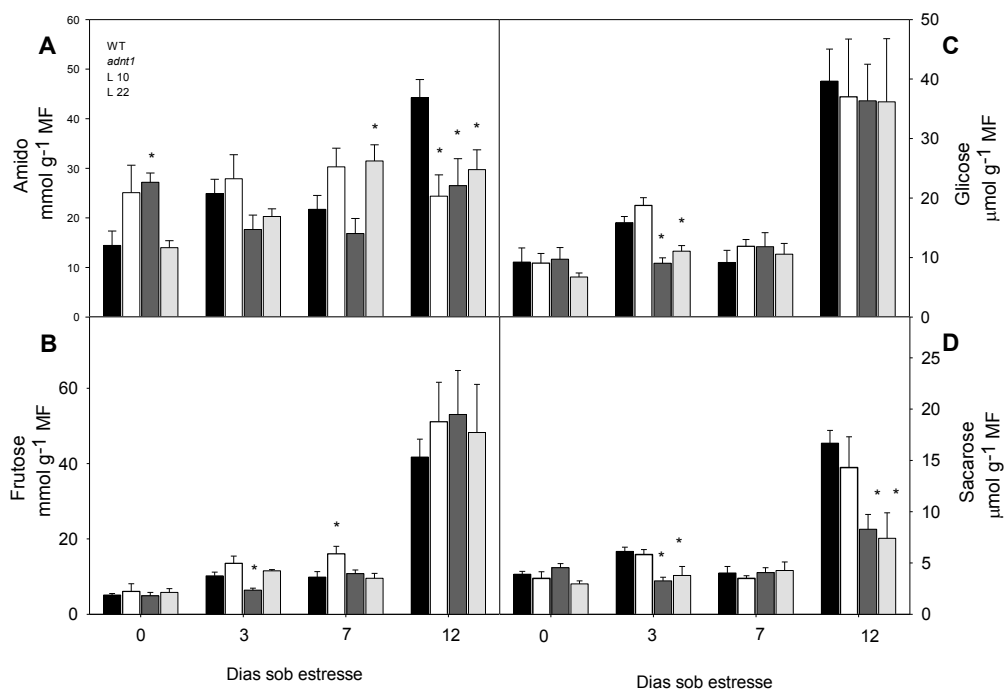
Para avaliar os possíveis danos causados ao aparato fotossintético devido ao estresse de hipóxia por alagamento do sistema radicular foi feita a medição de  $F_v / F_m$ , o máximo rendimento quântico de transporte de elétrons do PSII, em folhas de plantas de *Arabidopsis*, os genótipos com deficiência no transportador ADNT1 apresentaram menores valores de fluorescência nos tempos 7 e 12 dias quando comparados com o tipo selvagem (Figura 4).



**Figura 4.** O máximo rendimento quântico de transporte de elétrons PSII em genótipos de *Arabidopsis* com expressão reduzida de ADNT1 sob tratamento em baixa disponibilidade de oxigênio. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de 15 amostras independentes. Os valores foram determinados pelo teste t Student ( $P < 0,05$ ) a partir do tipo selvagem (WT).

Para uma caracterização mais detalhada da função do transportador ADNT1, foram realizadas análises bioquímicas em folhas, onde se quantificou os níveis de alguns compostos do metabolismo primário. Em relação aos níveis de carboidratos solúveis (frutose, glicose e sacarose, Figura 5B, C e D, respectivamente) foi observado um aumento ao longo do período de estresse em todos os genótipos. Entretanto, três dias após o estresse, as linhas antisense apresentaram um menor teor de glicose quando comparado com o tipo selvagem. O mesmo foi observado para os teores de sacarose nas linhas antisense, que além de apresentar níveis

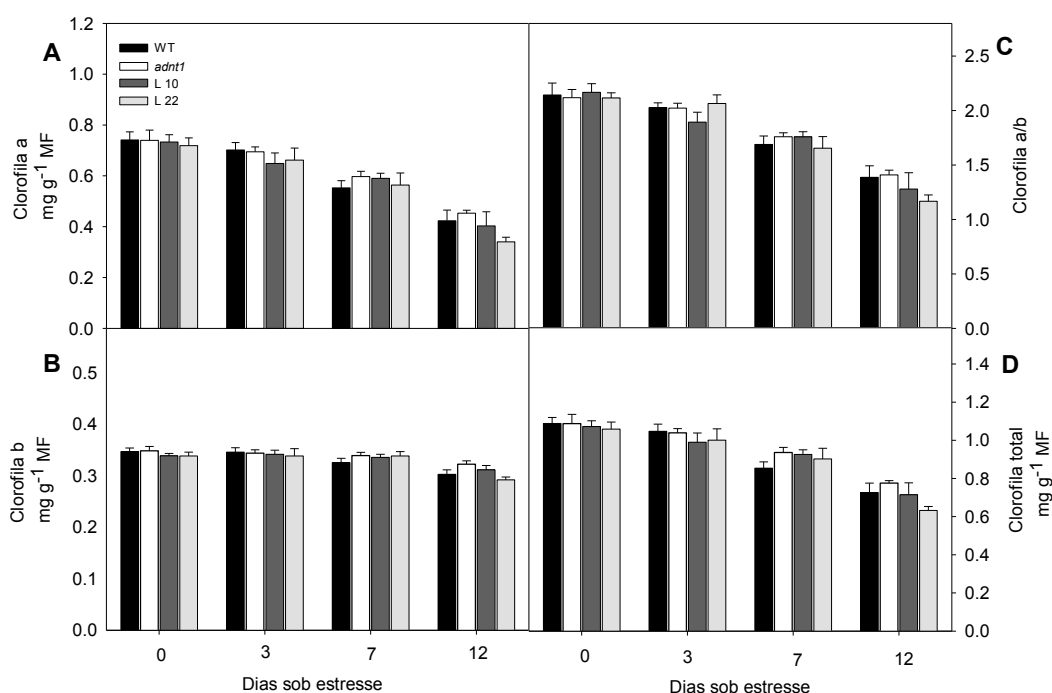
baixos no terceiro dia também apresentaram níveis baixos no décimo segundo dia de estresse. Em frutose ocorreu diferença significativa em dois pontos ao longo do estresse nas plantas com expressão reduzida do ADNT1 em comparação com o tipo selvagem. No primeiro, a linha antisense L10 apresentou menor teor de frutose no terceiro dia de estresse, e o mutante *adnt1*<sup>-1</sup> apresentou um maior nível de frutose no sétimo dia de estresse em relação ao tipo selvagem (Figura 5B). Os níveis de amido mantiveram-se estáveis ao final do período de estresse em relação ao tempo zero, no mutante *adnt1*<sup>-1</sup> e na linha antisense L10. Já no tipo selvagem e na linha antisense L22 ocorreu um aumento no nível de amido, sendo que este foi mais pronunciado no tipo selvagem. No tempo zero o nível de amido foi maior no mutante *adnt1* e na linha antisense L10 em relação ao tipo selvagem, sendo que o nível do amido na linha antisense L10 foi significamente diferente. Já no décimo segundo dia de estresse tanto o mutante *adnt1*<sup>-1</sup> quanto as linhas antisense L10 e L22 apresentaram um nível menor de amido em relação ao tipo selvagem.



**Figura 5.** Evolução dos principais compostos relacionados com o carbono em folhas de genótipos de *Arabidopsis thaliana* com expressão reduzida de ADNT1

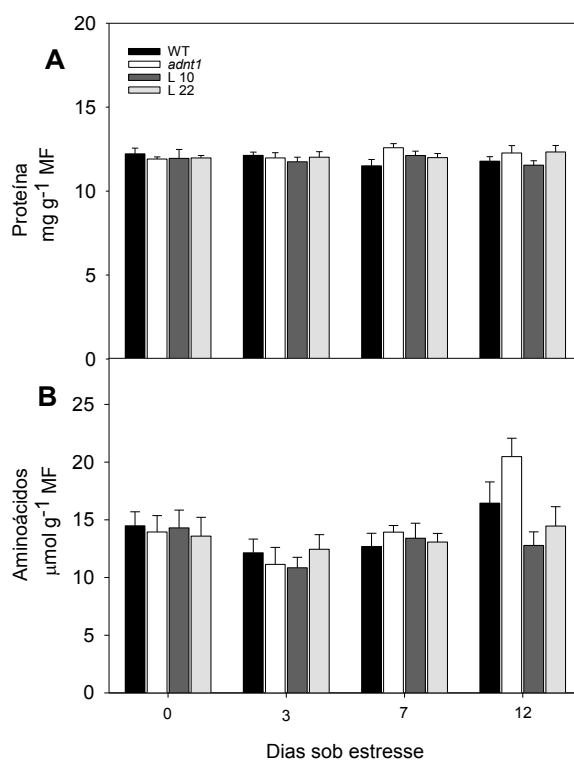
cultivadas sob condições de hipoxia. Níveis de amido (A), frutose (B), glicose (C) e sacarose (D) foram medidos. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de seis amostras independentes. O asterisco indica valores que foram determinados pelo teste t Student como significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) a partir do tipo selvagem (WT), massa fresca (MF).

Para investigar os efeitos da baixa expressão do transportador ao aparato fotossintético, foi medido o teor de clorofila *a* (6A), *b* (6C), razão clorofila *a/b* (6B) e clorofila total (6D). Durante o período de estresse os teores de clorofila *a*, razão *a/b* e clorofila total apresentaram redução ao longo do tempo. Já os teores de clorofila *b* mantiveram-se estáveis durante o período de baixa disponibilidade de oxigênio. No entanto, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os genótipos em comparação com o WT em nenhum dos parâmetros citados acima.



**Figura 6.** Variação nos teores dos pigmentos fotossintéticos em folhas de plantas de *Arabidopsis* com expressão reduzida do transportador ADNT1, cultivadas sob hipoxia. Teor de clorofila *a* (A), razão do teor de clorofila *a/b* (B), teor de clorofila *b* (C) e teor de clorofila total (D). Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de seis amostras independentes. Os valores foram determinados pelo teste t Student ( $P < 0,05$ ) a partir do tipo selvagem (WT), massa fresca (MF).

Para verificar a influência da deficiência do transportador no metabolismo do nitrogênio em plantas sob condições de hipóxia, foram avaliados os teores de proteína (7A) e aminoácidos (7B). Tanto os teores de aminoácidos quanto os de proteína mantiveram-se estáveis ao longo do período de estresse, com exceção ao décimo segundo dia de estresse, onde o mutante *adnt1*<sup>-1</sup> apresentou um leve aumento no teor de aminoácidos totais, mas esse aumento não foi estatisticamente diferente do tipo selvagem.



**Figura 7.** Mudanças nas principais compostos nitrogenados em folhas de genótipos de *Arabidopsis* com expressão reduzida de ADNT1 sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio. Os níveis de proteína total de (A) e aminoácidos totais (B) durante período de hipóxia. Os valores são médias ± erro padrão de seis amostras independentes. Os valores foram determinados pelo teste t Student ( $P < 0,05$ ) a partir do tipo selvagem (WT), massa fresca (MF).

## 4 DISCUSSÃO

Ao contrário de outros transportadores de ATP/ADP, ADNT1 é o único que catalisa o antiporte de ATP/AMP em plantas, e em menor grau, ADP e os nucleótidos desoxiadenina correspondentes (Palmieri et al., 2008). Sabe-se que, em tecidos heterotróficos, tais como raízes, AMP é o nucleótideo predominante no citosol (Mustroph et al., 2014). Além disso, o AMP citosólico é marcadamente elevado em sementes após a dormência, sendo convertido em ATP durante a germinação (Saglio et al., 1980; Raymond et al., 1985). Dadas estas características e a função primária ADNT1 de transporte de AMP, o presente trabalho sugere uma função importante do transportador ADNT1 durante a germinação, já que as plantas deficientes no transportador apresentaram uma menor taxa de germinação em relação ao tipo selvagem (Figura 1). Esta hipótese é consistente com o papel proposto para ADNT1 no fornecimento da energia necessária para suprir o crescimento nos tecidos heterotróficos da planta (Palmieri et al., 2008).

Uma vez que a deficiência de ADNT1 não parece alterar significativamente tanto o metabolismo fotossintético quanto o crescimento vegetativo (Figura 1). O transportador aparentemente não é essencial em condições de crescimento padrão, como observado anteriormente (Palmieri et al., 2008). Assim como AMP é abundante em sementes na germinação, ele também é um nucleótideo presente em raízes num nível superior quando comparado com tecidos autotróficos como citado anteriormente (Mustroph et al., 2014). Sendo que em condições de hipóxia o nível de AMP nas raízes se eleva (Saglio et al., 1980), nesta condição acredita-se que a deficiência de ADNT1 gera um acúmulo maior de AMP no citosol já que a função primária do transportador é carrear AMP para a matriz mitocondrial em troca de ATP. Assim gerando um estresse maior nas plantas deficientes em ADNT1 (Baena-González et al., 2007). Embora nas análises realizadas no primeiro capítulo ADNT1 não tenha apresentado aumento na expressão nas situações de estresse. Adicionalmente ADNT1 foi coexpresso com um gene relacionado a degradação de proteína sob condições de estresse. Foi observado no tempo 0 do experimento, antes das plantas serem submetidas ao estresse por alagamento, que dois dos três genótipos com deficiência do

transportador apresentaram maior teor de amido em folha (Figura 5A). Acredita-se que este maior teor de amido nas plantas deficientes em relação ao tipo selvagem seja oriundo da menor taxa de respiração radicular apresentada (Palmieri et al., 2008). Ao final do período de hipóxia os genótipos deficientes apresentaram um menor teor de amido, indicando que provavelmente a deficiência do transportador resultou em um desbalanço na razão ATP/ADP mais precoce do que no tipo selvagem. Levando as plantas com deficiência do transportador a quebrarem o amido mais cedo para suprir o aumento da glicólise. A qual é responsável pela produção de ATP em condições de baixa disponibilidade de oxigênio (Zabalza et al., 2009). Resultando em um menor teor de amido nas plantas com deficiência no transportador em comparação com o tipo selvagem ao final do período de estresse. Acredita-se que o aumento nos níveis de amido ao final do período de estresse no tipo selvagem tenha ocorrido devido a manutenção da fotossíntese, já que o aparato fotossintético sofreu poucos danos, como apresenta os valores de fluorescência (Figura 4). O acúmulo de amido observado no tipo selvagem em condições de hipóxia (Figura 5) já foi observado em outros trabalhos (Rocha et al., 2010).

Os teores de clorofila sofreram um decréscimo ao longo do estresse, mas não se observou diferença significativa entre os genótipos. Entretanto quanto ao máximo rendimento quântico, pode-se notar uma tendência de decréscimo maior nas plantas com expressão reduzida de ADNT1, mas o decréscimo apresentado foi brando e ocorreu já no final do período de hipóxia, o que pode primariamente justificar o acréscimo de amido ocorrido no tipo selvagem, pois provavelmente a fotossíntese foi pouco afetada no início do estresse o que gerou um acúmulo de fotoassimilados resultando em um maior teor de amido no tipo selvagem (Mustroph et al., 2014).

## **5 CONCLUSÃO**

Os resultados deste trabalho sugerem que o transportador ADNT1 tem uma relevância fisiológica no processo de germinação e no crescimento de tecidos heterotróficos como as raízes. Além disso, ADNT1 apresentou importância em tecidos autotróficos sob condições de alagamento (hipóxia), particularmente no metabolismo do carbono.

## 6 REFERÊNCIAS

- Alder NN, Theg SM** (2003) Energy use by biological protein transport pathways. *Trends Biochem Sci* **28**: 442–51
- Arai Y, Hayashi M, Nishimura M** (2008) Proteomic identification and characterization of a novel peroxisomal adenine nucleotide transporter supplying ATP for fatty acid beta-oxidation in soybean and Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 3227–40
- Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, et al** (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *Plant Cell* **22**: 1549–63
- Arnold S, Kadenbach B** (1997) Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur J Biochem* **249**: 350–4
- Arnold S, Kadenbach B** (1999) The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically <sup>1</sup>. *FEBS Lett* **443**: 105–108
- Atkinson DE** (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* **7**: 4030–4
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J** (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938–42
- Bogorad L** (1975) Evolution of organelles and eukaryotic genomes. *Science* **188**: 891–8
- Bologa KL, Fernie AR, Leisse A, Loureiro ME, Geigenberger P** (2003) A

bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiol* **132**: 2058–2072

**Cavalcanti JHF, Esteves-Ferreira AA, Quinhones CGS, Pereira-Lima IA, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Araújo WL** (2014) Evolution and functional implications of the tricarboxylic acid cycle as revealed by phylogenetic analysis. *Genome Biol Evol* **6**: 2830–48

**Corpas FJ, Hayashi M, Mano S, Nishimura M, Barroso JB** (2009) Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* **151**: 2083–2094

**Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ** (2004) Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 254–261

**Fernie AR, Roessner U, Geigenberger P** (2001) The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiol* **125**: 1967–77

**Fiermonte G, De Leonardis F, Todisco S, Palmieri L, Lasorsa FM, Palmieri F** (2004) Identification of the mitochondrial ATP-Mg/Pi transporter: Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. *J Biol Chem* **279**: 30722–30730

**Gebert M, Meschenmoser K, Svidová S, Weghuber J, Schweyen R, Eifler K, Lenz H, Weyand K, Knoop V** (2009) A root-expressed magnesium transporter of the MRS2/MGT gene family in *Arabidopsis*

thaliana allows for growth in low-Mg<sup>2+</sup> environments. *Plant Cell* **21**: 4018–4030

**Geigenberger P** (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen.

*Curr Opin Plant Biol* **6**: 247–256

**Geigenberger P, Riewe D, Fernie AR** (2010) The central regulation of plant physiology by adenylates. *Trends Plant Sci* **15**: 98–105

**Gibon Y, Bläsing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JHM,**

**Fisahn J, Höhne M, Günther M, Stitt M** (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: Depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the followin. *Plant J* **39**: 847–862

**Gout E, Rébeillé F, Douce R, Bligny R** (2014) Interplay of Mg<sup>2+</sup>, ADP, and ATP in the cytosol and mitochondria: unravelling the role of Mg<sup>2+</sup> in cell respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E4560–7

**Gupta KJ, Igamberdiev AU** (2016) Reactive Nitrogen Species in

Mitochondria and Their Implications in Plant Energy Status and Hypoxic Stress Tolerance. *Front Plant Sci* **7**: 1–6

**Haferkamp I, Fernie AR, Neuhaus HE** (2011) Adenine nucleotide transport in plants: Much more than a mitochondrial issue. *Trends Plant Sci* **16**: 507–515

**Haferkamp I, Hackstein JHP, Voncken FGJ, Schmit G, Tjaden J** (2002)

Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. *Eur J*

Biochem **269**: 3172–3181

**Haferkamp I, Schmitz-Esser S** (2012) The plant mitochondrial carrier family: functional and evolutionary aspects. *Front Plant Sci* **3**: 2

**Junge W, Nelson N** (2015) ATP Synthase. *Annu Rev Biochem* **84**: 631–57

**Khlyntseva S, Bazel' Y, Vishnikin A, Andruch V** (2009) Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides. *J Anal Chem* **64**: 657–673

**Kirchberger S, Tjaden J, Ekkehard Neuhaus H** (2008) Characterization of the Arabidopsis Brittle1 transport protein and impact of reduced activity on plant metabolism. *Plant J* **56**: 51–63

**Klingenberg M** (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1778**: 1978–2021

**Leroch M, Neuhaus HE, Kirchberger S, Zimmermann S, Melzer M, Gerhold J, Tjaden J** (2008) Identification of a novel adenine nucleotide transporter in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 438–451

**Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497

**Mustroph A, Barding GA, Kaiser KA, Larive CK, Bailey-Serres J** (2014) Characterization of distinct root and shoot responses to low-oxygen stress in Arabidopsis with a focus on primary C- and N-metabolism. *Plant, Cell Environ* **37**: 2366–2380

**Nunes-Nesi A, Santos Brito D, Inostroza-Blancheteau C, Fernie AR, Araújo WL, Poschenrieder C, al. et, Ma JF, Kochian LV, al. et, et al** (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum

resistance. *Trends Plant Sci* **19**: 399–407

**Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH, Nam HG** (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Mol Biol* **30**: 739–54

**Osuna D, Prieto P, Aguilar M** (2015) Control of Seed Germination and Plant Development by Carbon and Nitrogen Availability. *Front Plant Sci* **6**: 1023

**Palmieri F** (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): Physiological and pathological implications. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **447**: 689–709

**Palmieri F, Pierri CL, De Grassi A, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: A review with new insights. *Plant J* **66**: 161–181

**Palmieri L, Santoro A, Carrari F, Blanco E, Nunes-Nesi A, Arrigoni R, Genchi F, Fernie AR, Palmieri F** (2008) Identification and Characterization of ADNT1, a Novel Mitochondrial Adenine Nucleotide Transporter from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **148**: 1797–1808

**Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F** (2004) The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **9**: 138–46

**Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determinations of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. acta Int. J. Biochem. Biophys.*

- Pradet A, Raymond P** (1983) Adenine Nucleotide Ratios and Adenylate Energy Charge in Energy Metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* **34**: 199–224
- Pucciariello C, Voesenek LACJ, Perata P, Sasidharan R** (2014) Plant responses to flooding. *Front Plant Sci* Editor. doi: 10.3389/fpls.
- Raymond P, Al-Ani A, Pradet A** (1985) ATP Production by Respiration and Fermentation, and Energy Charge during Aerobiosis and Anaerobiosis in Twelve Fatty and Starchy Germinating Seeds. *Plant Physiol* **79**: 879–84
- Reiser J, Linka N, Lemke L, Jeblick W, Neuhaus HE** (2004) Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**: 3524–36
- Rieder B, Neuhaus HE** (2011) Identification of an *Arabidopsis* plasma membrane-located ATP transporter important for anther development. *Plant Cell* **23**: 1932–1944
- Roberts J, Aubert S, Gout E, Bligny R, Douce R** (1997) Cooperation and Competition between Adenylate Kinase, Nucleoside Diphosphokinase, Electron Transport, and ATP Synthase in Plant Mitochondria Studied by <sup>31</sup>P-Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol* **113**: 191–199
- Rocha M, Licausi F, Araujo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR, van Dongen JT** (2010) Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicus*. *PLANT Physiol* **152**: 1501–1513
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, et al** (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis.

Biotechniques **34**: 374–8

**Saglio PH, Raymond P, Pradet A** (1980) Metabolic Activity and Energy Charge of Excised Maize Root Tips under Anoxia: control by soluble sugars. *Plant Physiol* **66**: 1053–1057

**Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**: 501–6

**Tanaka K, Choi J, Cao Y, Stacey G** (2014) Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Front Plant Sci* **5**: 446

**Thuswaldner S, Lagerstedt JO, Rojas-St?tz M, Bouhidel K, Der C, Leborgne-Castel N, Mishra A, Marty F, Schoefs B, Adamska I, et al** (2007) Identification, expression, and functional analyses of a thylakoid ATP/ADP carrier from *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **282**: 8848–8859

**Traba J, Satrústegui J, del Arco A** (2009) Transport of adenine nucleotides in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: Interactions between the ADP/ATP carriers and the ATP-Mg/Pi carrier. *Mitochondrion* **9**: 79–85

**Trentmann O, Horn M, van Scheltinga ACT, Neuhaus HE, Haferkamp I** (2007) Enlightening energy parasitism by analysis of an ATP/ADP transporter from chlamydiae. *PLoS Biol* **5**: e231

**Zabalza A, van Dongen JT, Froehlich A, Oliver SN, Faix B, Gupta KJ, Schmäzlin E, Igal M, Orcaray L, Royuela M, et al** (2009) Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol* **149**: 1087–1098

## **CONCLUSÃO GERAL**

Em síntese, os resultados obtidos com esse trabalho sugerem que os transportadores de adenilatos são de grande importância no transporte de moléculas energéticas para a manutenção do metabolismo, incluindo a respiração sob condições de estresse. Adicionalmente, ADNT1 demonstrou ser importante no metabolismo do carbono sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio e na germinação dentro dos parâmetros avaliados.