

ANA PAULA GOMES SOARES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ALDEÍDO DESIDROGENASE  
GmTP55 DA SOJA (*Glycine max*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S676c  
2007

Soares, Ana Paula Gomes, 1980-  
Caracterização bioquímica da aldeído desidrogenase  
GmTP55 da soja (*Glycine max*) / Ana Paula Gomes  
Soares. – Viçosa, MG, 2007.  
xiv, 70f. : il. col. ; 29cm.

Inclui anexo.  
Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 58-68.

1. Proteínas de soja. 2. Biologia molecular. 3. Aldeído  
desidrogenase. 4. Stress (Fisiologia). 5. *Glycine max*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

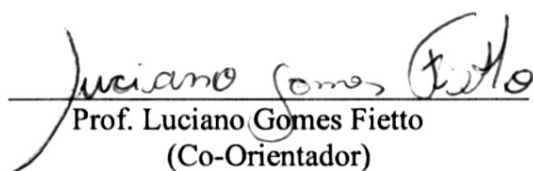
CDD 22.ed. 572.633

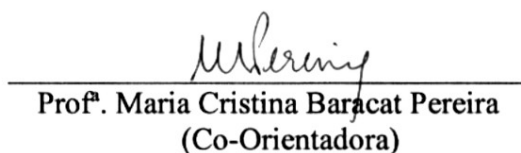
ANA PAULA GOMES SOARES

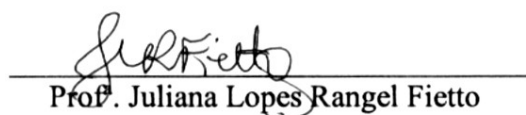
**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ALDEÍDO DESIDROGENASE  
GmTP55 DA SOJA (*Glycine max*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

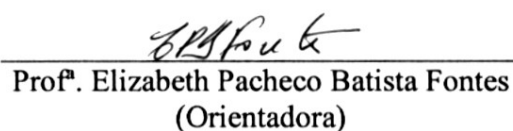
APROVADA: 21 de março de 2007.

  
Prof. Luciano Gomes Fietto  
(Co-Orientador)

  
Profª. Maria Cristina Barçat Pereira  
(Co-Orientadora)

  
Profª. Juliana Lopes Rangel Fietto

  
Prof. George Henrique Kling de Moraes

  
Profª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
(Orientadora)

A Deus.

Aos meus amados pais João Batista e  
Maria das Graças.

Aos meus irmãos Leonardo e Leandro.

Ao meu namorado Leandro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre a meu lado, sendo meu amparo constante.

Aos meus amados pais, João Batista e Graça, meus exemplos de força e coragem, por me incentivarem a ser, cada dia, uma pessoa melhor.

Aos meus queridos irmãos, Leonardo e Leandro, por todo apoio e carinho.

Ao meu namorado Leandro, pela cumplicidade, dedicação, amor e alegria.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, por toda orientação, compreensão e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao meu conselheiro, Prof. Luciano Gomes Fietto, por todo apoio, ensinamento e auxílio para concretização deste trabalho.

À Carolina pela amizade e dedicação a este trabalho.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, me ajudaram a crescer.

Às amigas, Daniela, Silvana e Anete, por toda a ajuda e pelos bons momentos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Proteômica, pelo companheirismo e auxílio para a obtenção dos resultados.

Aos funcionários do laboratório, em especial à Marlene, pela disposição constante em ajudar.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo agradável convívio e contribuição em minha formação acadêmica.

Ao Eduardo Monteiro pela paciência e cooperação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar este curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela assistência financeira.

A todos aqueles que contribuíram para o meu sucesso, o meu sincero agradecimento e reconhecimento.

## **BIOGRAFIA**

Ana Paula Gomes Soares, filha de João Batista Soares e Maria das Graças Gomes Soares, nasceu no dia 22 de julho de 1980, na cidade de Ubá, Minas Gerais.

Em 1997, concluiu o ensino médio no Colégio Universitário – COLUNI – na Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa - MG.

Em 2001, iniciou o curso de Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em janeiro de 2005. Durante a graduação teve a oportunidade de realizar iniciação científica, desenvolvendo trabalhos de pesquisa por três anos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, no BIOAGRO - UFV, tendo como orientadora a Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Em março de 2005 ingressou no curso de mestrado do programa de Pós-Graduação em Bioquímica agrícola, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Viçosa. Durante esse período atuou na área de biologia molecular, ainda no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, submetendo-se à defesa de dissertação em março de 2007.

## ABREVIATURAS

**ABA** : Acido abscísico

**ALDH**: Aldeído desidrogenase

**ATQ**: Antiquitina

**BCIP**: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

**BSA**: Albumina de soro bovino

**CaMV**: Vírus do mosaico da couve-flor

**DEPC**: Dietilpirocarbonato

**DNA**: Ácido Desoxirribonucléico

**DTT**: Ditioneitol

**EDTA**: Ácido etilenodiaminotetracético

**ERO**: Espécies reativas de oxigênio

**EST**: Etiqueta de seqüência expressa

**g**: Aceleração da gravidade

**GABA**: Ácido gama-aminobutírico

**GFP**: Proteína verde fluorescente

**IPTG**: Isopropil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo

**kb**: Quilobases

**kDa**: Quilodaltons

**NAD<sup>+</sup>**: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)

**NADP<sup>+</sup>**: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)

**NBT**: Azul-nitro tetrazólio

**Km**: Constante de Michaelis-Mentem

**O.D.:** Densidade Óptica

**PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida

**pb:** Pares de bases

**p/v:** Peso por volume

**PCR:** Reação de polimerase em cadeia

**PMSF:** Fluoreto de fenilmetilsulfonila

**pK7-GmATQ:** cDNA de GmATQ sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor.

**pK7F-GmATQ:** cDNA de GmATQ sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor e fusionado ao gene repórter *GFP*.

**RNA:** Ácido ribonucléico

**rpm:** Rotações por min

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio

**TRIS:** Tris-(hidroximetil)-aminometano

**v/v:** Volume por volume

**V<sub>máx</sub>:** Velocidade máxima

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Estresse Hídrico.....	04
2.1.1. Resistência à Seca e Estratégias de Aclimação.....	07
2.2. A superfamília das Aldeído Desidrogenases.....	11
2.2.1. Aldeído Desidrogenases: nomenclatura e classificação.....	12
2.2.2. A superfamília de genes ALDH.....	13
2.2.3. A família ALDH7.....	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1. Análise molecular da proteína GmTP55 <i>in vitro</i> .....	19
4.1.1. Preparo das células competentes e transformação de <i>Escherichia coli</i> BL21:DE3 (pLYSs) com a construção pHis-GmTP55 (pHIS-ATQ).....	19
4.1.2. Expressão heteróloga da proteína GmTP55 em <i>Escherichia coli</i> .....	20

4.1.3. Obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis.....	20
4.1.4. SDS-PAGE e “Western blot”.....	21
4.1.5. Extração em larga escala das proteínas solúveis e insolúveis do clone pHis-GmTP55.....	22
4.1.6. Purificação das proteínas recombinantes do extrato protéico bacteriano.....	23
4.1.7. Renaturação da proteína recombinante purificadas da fração protéica insolúvel.....	24
4.1.8. Ensaio da atividade enzimática da proteína recombinante GmTP55.....	24
4.2. Análise da expressão e propriedades funcionais da proteína GmTP55 em plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgênicas.....	25
4.2.1. Material vegetal.....	25
4.2.2. Obtenção de plantas transgênicas.....	26
4.2.2.1. Obtenção da construção contendo o cDNA <i>GmTP55</i> inserido em vetores binários de transformação de plantas.....	26
4.2.2.2. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101.....	26
4.2.2.3. Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> e seleção de transformantes independentes.....	27
4.2.3. Diagnóstico molecular das plantas transgênicas.....	28
4.2.3.1. Extração do DNA genômico das plantas transformadas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
4.2.3.2. Reação de PCR (Polimerase Reaction Chain).....	28
4.2.4. Expressão do transgene por RT-PCR.....	29
4.2.4.1. Extração de RNA total de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformada com as construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ.....	29
4.2.4.2. RT-PCR de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformada com as construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ.....	30
4.2.5. Análise da expressão ectópica da proteína GmTP55 em <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	31
4.2.5.1. Extração de proteína total de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas com as construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ.....	31
4.2.5.2 SDS-PAGE e “Western blot”.....	31

4.2.6. Ensaio de germinação de sementes de <i>Arabidopsis thaliana</i> em condições de estresses abiótico <i>in vitro</i> .....	32
4.2.7. Localização subcelular da proteína GmTP55 em plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
4.2.8. Análise da superexpressão da proteína GmTP55 quimérica.....	33
4.2.8.1.Obtenção do extrato protéico total.....	33
4.2.8.2. “Western blot” .....	34
4.2.9. Obtenção de plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes knock-out para o gene <i>ALDH7B4</i> .....	34
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Análise molecular da proteína GmTP55 <i>in vitro</i> .....	36
5.1.1. Análise da seqüência de aminoácidos da proteína GmTP55.....	36
5.1.2 Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da proteína GmTP55.....	39
5.2. Análise da expressão e propriedades funcionais da proteína GmTP55 em plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgênicas.....	45
5.2.1. Obtenção de plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> superexpressando a proteína GmTP55.....	45
5.2.2. Análise de expressão do transgene por RT-PCR.....	48
5.2.3. Análise da expressão ectópica da proteína GmTP55 em <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	49
5.3. Ensaio de germinação de sementes de <i>Arabidopsis thaliana</i> em condições de estresses salino <i>in vitro</i> .....	50
5.4. Localização subcelular da proteína GmTP55 em plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	52
6. DISCUSSÃO.....	54
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	58
ANEXO.....	69

## RESUMO

SOARES, Ana Paula Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007.  
**Caracterização bioquímica da aldeído desidrogenase GmTP55 da soja (*Glycine max*).** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Orientadores: Luciano Gomes Fietto e Maria Cristina Baracat Pereira.

A proteína GmTP55 (*Glycine max* turgor protein) pertence à família ALDH7, das superfamílias das aldeído desidrogenases (ALDH). As proteínas desta família apresentam estrutura primária conservada e têm sido identificadas por se acumularem em plantas submetidas a condições de estresse abiótico. Embora elas tenham sido identificadas em diversos organismos, às funções fisiológica e bioquímica das proteínas da família ALDH7 ainda não foi elucidada. Além de compartilhar uma alta conservação de estrutura primária com outros membros da família ALDH, GmTP55 possui diversos domínios e aminoácidos conservados em posições, característicos de enzimas aldeído desidrogenases. A fim de confirmar sua atividade enzimática, a proteína GmTP55 foi expressa em sistema heterólogo procaríoto de expressão e a atividade da proteína recombinante foi testada usando diversos aldeídos como substratos em potencial. A proteína GmTP55 apresentou maior atividade sobre aldeídos alifáticos de cadeia curta como propionaldeído, acetaldeído,  $\gamma$ -aminobutiraldeído e formaldeído, oxidando-os a ácidos carboxílicos na presença de  $\text{NAD}^+$ . Dentre os aldeídos oxidados, o  $\gamma$ -aminobutiraldeído e formaldeído podem ser considerados como substratos fisiológicos potenciais para GmTP55, visto que estes aldeídos são produzidos como resultado da peroxidação de lipídios que ocorre durante a imposição de estresse celular oxidativo. A análise da função fisiológica da proteína GmTP55 foi realizada com plantas de

*Arabidopsis thaliana* expressando ectopicamente o gene GmTP55. As plantas transgênicas obtidas, expressando constitutivamente a proteína, tiveram suas sementes plaqueadas em condições de estresse salino. Nestas condições, as plantas transgênicas apresentaram maior eficiência de germinação do que as plantas não transformadas. Coletivamente, estes resultados sugerem que a proteína GmTP55 está envolvida na tolerância das plantas a estresses abióticos, atuando em vias de detoxificação celular de aldeídos reativos derivados de peroxidação de lipídios.

## ABSTRACT

SOARES, Ana Paula Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2007.  
**Biochemical characterization of the soybean (*Glycine max*) aldehyde dehydrogenase GmTP55.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto and Maria Cristina Baracat Pereira.

The protein GmTP55 (*Glycine max* turgor protein) belongs to the ALDH7 family, that falls into the superfamily of the aldehyde dehydrogenases (ALDH). Proteins of this family are structurally conserved and they have been identified by their accumulation in plants under abiotic stress conditions. Although they have been identified in several organisms, the physiological and biochemical function of proteins of the ALDH7 family have not been elucidated yet. In addition to sharing a high conservation of primary structure with other members of ALDH family, GmTP55 possesses several conserved domains and conserved amino acid at common positions of aldehyde dehydrogenases. To identify the biochemical function of the protein GmTP55, we expressed the protein in a prokaryotic expression system, and the enzymatic activity of the recombinant protein was tested using several aldehydes, as potential substrates. The protein GmTP55 exhibited a larger specificity for short-chain aliphatic aldehydes, as propionaldehyde, acetaldehyde,  $\gamma$ -aminobutiraldehyde and formaldehyde, oxidizing the carboxylic acids, in the presence of  $\text{NAD}^+$ . Among the oxidized aldehydes,  $\gamma$ -aminobutiraldeido and formaldehyde may be considered as potential physiological substrates for GmTP55, as these aldehydes are produced as a result of the lipid peroxidation that occurs during the imposition of salt stress. The analysis of the physiological function of the protein GmTP55 was accomplished by using *Arabidopsis*

*thaliana* plants ectopically expressing *GmTP55* gene. Under conditions of salt stress, the seeds of transgenic plants exhibited a greater germination efficiency than the untransformed plants. Taken together, these results suggest that the protein GmTP55 is involved in plant tolerance to abiotic stresses and it acts in detoxification pathways of reactive aldehydes derived from lipid peroxidation.

## 1. INTRODUÇÃO

A escassez de água, a alta concentração salina e a baixa temperatura do solo são fatores abióticos responsáveis por promover estresse hídrico em diversas espécies vegetais (Kramer, 1983; Koyro, 1996; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997). O estresse hídrico altera o potencial osmótico das células vegetais impondo um estresse osmótico e afetando a bioquímica, a fisiologia, a morfologia e o processo de desenvolvimento das plantas. Durante o estresse hídrico, ocorre redução da abertura estomática, da expansão da área foliar, da fotossíntese e, conseqüentemente, do crescimento vegetal (Jones & Rawson, 1979). Sendo assim, o estresse hídrico é determinante para a distribuição geográfica das plantas e para a produtividade de culturas agrícolas (Bartels, 2001a).

Algumas plantas apresentam mecanismos que as tornam mais tolerantes ao estresse ambiental (Taiz & Zeiger, 2004). Se a tolerância vegetal aumenta como conseqüência da exposição anterior ao estresse, a planta se torna aclimatada ou adaptada. As plantas tolerantes ao estresse hídrico têm sua expressão gênica alterada durante a imposição do estresse (Hare *et al.*, 1996; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996; 1999). Os genes induzidos por estresse hídrico estão envolvidos em processos que mantêm o turgor, a função e a estrutura celular. De uma maneira geral, estes genes induzidos codificam proteínas que estão diretamente envolvidas na adaptação do vegetal ao estresse e proteínas que atuam na regulação de outros genes e em vias de transdução de sinal (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997). As proteínas que atuam diretamente na proteção celular estão envolvidas no processo de ajustamento osmótico,

na proteção de macromoléculas e na destruição de produtos metabólicos tóxicos, tais como as moléculas de aldeídos.

Os aldeídos e seus intermediários se acumulam na planta quando esta é exposta a condições de estresse ambiental. Estas moléculas são altamente tóxicas e podem causar a peroxidação de lipídios e modificações em proteínas e ácidos nucleicos (Sophos & Vasiliou, 2003; Sunkar *et al.*, 2003). As Aldeído Desidrogenases (ALDH) são um grupo de enzimas que catalisam a oxidação de aldeídos a seus ácidos correspondentes, não tóxicos, em uma reação irreversível dependente de  $\text{NAD(P)}^+$  (Yoshida *et al.*, 1998; Kirch *et al.*, 2001).

Nosso grupo de pesquisa, recentemente, isolou, por meio de análise de um banco de EST (“expressed sequence tag”) gerado de uma biblioteca de sementes de soja (*Glycine max*), um gene pertencente à família ALDH7, a qual é altamente conservada entre organismos filogeneticamente distantes (Rodrigues *et al.*, 2006). A dedução da sequência de aminoácidos correspondente a este gene identificou que ele codifica uma proteína de massa molecular estimada em 55.562 kDa, que possui um domínio conservado de desidrogenases. Além disto, análises comparativas da estrutura primária deduzida desta proteína demonstraram que ela é homóloga à proteína antiqutina de humanos e a proteína 26g de ervilha (*Pisum sativum*), as quais pertencem à família **ALDH7B** da superfamília de Aldeído Desidrogenases (ALDH) e estão associadas ao processo de regulação da pressão de turgor celular, pois têm suas expressões aumentadas sob condições de déficit hídrico e/ou altas concentrações salinas (Guerrero *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1994; Strocher *et al.*, 1995). Baseados nestas análises e no fato de ter seu produto gênico acumulado em diferentes órgãos em soja submetida ao estresse hídrico, este gene *ALDH* foi classificado como membro da família ALDH7A1 e denominado *GmTP55* (*Glycine max* turgor protein). Consistente com estas evidências, plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e *Arabidopsis thaliana* expressando constitutivamente a proteína GmTP55 apresentaram-se mais tolerantes quando foram submetidas às condições de estresse hídrico e oxidativo (Rodrigues *et al.*, 2006), indicando que sua função pode estar relacionada ao processo de desintoxicação de aldeídos tóxicos gerados durante a exposição da planta ao estresse abiótico.

Diversas Aldeído Desidrogenases, descritas na literatura, parecem atuar nos processos de tolerância do vegetal ao estresse abiótico, participando no mecanismo de ajustamento osmótico e/ou atuando no processo de desintoxicação celular (Perozich *et*

*al.*, 1999a). Entretanto, as funções fisiológicas e a via bioquímica de atuação das proteínas da família ALDH7 ainda não foram elucidadas.

Este trabalho visou caracterizar bioquimicamente a proteína GmTP55. Especificamente, propôs-se produzir a proteína GmTP55 em sistemas heterólogos de expressão, avaliar a atividade enzimática e a localização subcelular da proteína recombinante em *Arabidopsis thaliana*. A identificação e a compreensão das funções desta proteína em células vegetais podem proporcionar o desenvolvimento de estratégias moleculares que permitam a obtenção de cultivares agrícolas, tais como a soja, mais tolerantes às condições de seca.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Estresse Hídrico

As plantas estão constantemente sendo expostas a estímulos ambientais que influenciam seu crescimento e desenvolvimento, e que, conseqüentemente, determinam sua produtividade (Seki *et al.*, 2003). Para algumas espécies vegetais, tais estímulos, ou mudanças das condições ambientais, se tornam estressantes e alteram adversamente o desenvolvimento vegetal (Levitt, 1972; Levitt 1980). Alguns estímulos ambientais, como a temperatura do ar, podem se tornar estressantes em poucos min, outros, como o conteúdo de água do solo, podem se tornar estressantes em semanas ou meses, isto porque o impacto do estresse ambiental no desempenho e no tempo de recuperação da planta não depende somente da severidade e duração da exposição da planta ao estresse, mas depende também da informação genética da planta (Chaves, 1991; Taiz & Zeiger, 2004). No Brasil, os fatores ambientais afetam drasticamente a produtividade agrícola, sendo o clima o principal fator responsável pelas oscilações anuais de produção de grãos (Camargo, 1994).

A deficiência hídrica pode ser definida como o conteúdo de água em um tecido ou em uma célula que está abaixo do maior conteúdo de água exibido por ambos quando estes se encontram em um estado de alta hidratação (Taiz & Zeiger, 2004). Esta deficiência está intrínseca na maioria das formas de estresse. Sendo assim, a escassez de água, o estresse salino e o estresse resultante de temperaturas altas ou baixas resultam em estresse osmótico para a célula vegetal (Bartels & Nelson, 1994; Bohnert & Jensen, 1996). Por isso, a seca, a salinidade e as baixas ou alta temperaturas do solo resultam

em um ponto comum: o estabelecimento de estresse hídrico. O estresse hídrico representa o mais severo e comum estresse ambiental a afetar o desenvolvimento de cultivares agrícolas (Kramer, 1983; Rhodes *et al.*, 1990; Ashraf, 1994; Koyro, 1996). No Brasil, a produtividade de cultivares economicamente relevantes, tais como o café, feijão e a soja, é drasticamente afetada pela escassez de água no solo (Miyasaka & Medina, 1981; Bergamaschi *et al.*, 1986; Procópio, 2002; Da Matta, 2004). Em relatório sobre segurança agrícola, elaborado pelo Ministério do Planejamento (Göpfert *et al.*, 1993), consta que as secas são os eventos prioritários (71% dos casos), no que se refere aos fenômenos abióticos, para perda na produção de grãos, no país.

As plantas desenvolveram uma série de mecanismos buscando se adaptar as mudanças ambientais desfavoráveis. Uma destas mudanças, o estresse hídrico, induz uma série de respostas bioquímicas, moleculares, morfológicas e fisiológicas nos vegetais, as quais os auxiliam a se adaptarem às condições ambientais adversas impostas (Arora, 2002; Seki, 2003). Estas respostas são complexas e altamente variáveis (Ingrán & Bartels, 1996), pois incluem geralmente a expressão de genes específicos, como, por exemplo, reguladores de estresse, repressão de alguns genes ativos, alterações de vias metabólicas, produção de metabólitos secundários, mudanças estruturais celulares, como por exemplo, alterações na conformação das membranas (Hasegawa *et al.*, 2000; Ramanjulus & Bartels, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003; He & Gan, 2004). Por isso tais respostas devem funcionar coordenadamente buscando minimizar os danos estruturais e o desequilíbrio intracelular causado por este estresse, como, por exemplo, a alta concentração iônica intracelular (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001).

As diferentes espécies de plantas têm mecanismos variados de respostas ao estresse que estão relacionados entre si de maneira específica segundo a ordem ou a família das referidas espécies. Estudos indicam que os vegetais podem responder a estímulos e sinais únicos, porém possuem mecanismos de respostas similares (Bohnerd & Jensen, 1996). A resposta de cultivares ao estresse hídrico e o efeito deste na produtividade do vegetal, também variam dependendo do estágio de desenvolvimento do vegetal e da severidade deste estresse (Bray, 1993). Por exemplo, culturas de soja apresentam crescimento diferencial e alterações da biomassa dependendo do momento e da severidade do estresse imposto (Confalone & Navarro, 1999). Sob condições de estresse hídrico, as plantas de soja apresentaram estames menores na fase de germinação e emergência, aborto floral, durante a fase de florescimento e reduzido peso dos grãos, na fase de hidratação (Berlato, 1981; Fageria, 1989).

A deficiência hídrica, ao ser percebida pela planta, desencadeia nesta uma cascata de eventos moleculares, os quais são finalizados em vários níveis de respostas fisiológicas e morfológicas (Bray, 1993). As plantas absorvem água do solo, através das raízes, na presença de uma diferença de potencial osmótico entre o solo e as células vegetais, por isso, acredita-se que as raízes atuem como sensores da deficiência hídrica do solo. As células guardas dos estômatos também detectam a escassez de água rapidamente, através de moléculas sinalizadoras, como por exemplo, o ácido abscísico, enviados à parte aérea da planta, e se fecham antes de qualquer deficiência hídrica ser observada nas folhas (Zhang & Davies, 1990; Salah & Tardieu, 1997). A diferença do potencial osmótico entre as células vegetais e o solo pode provocar o estresse osmótico. Este estresse é causado por alterações nas concentrações de solutos extracelulares e um conseqüente efluxo de água a partir da célula vegetal, levando a desidratação celular (Bohnert *et al.*, 1995). A perda de água pelas células vegetais provoca uma diminuição da pressão de turgor e um aumento de concentração dos solutos intracelulares, elevando, assim, o potencial osmótico celular. Como conseqüência, a estrutura das membranas, os constituintes celulares e a expressão de variadas categorias de genes são alterados (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996; 1997 e 1999). As alterações na conformação das membranas celulares são severas para o funcionamento celular, pois promovem alterações nas proteínas transportadoras ativadas por pressão, modificações na conformação ou justaposição das proteínas sensoriais embebidas nas membranas, e alteram a continuidade entre a parede e a membrana celular.

O principal processo fisiológico afetado pela falta de água no solo é a fotossíntese. A eficiência do processo fotossintético pode ser afetada diretamente pela desidratação citoplasmática e fechamento estomático (Miyasaka & Medina, 1981). A diminuição do conteúdo de água do solo ocasiona a queda do potencial hídrico celular nas folhas, levando à perda de turgidez e à redução da condutância estomática (Bergamaschi *et al.*, 1991; Shalhevet, 1993). A reação inicial ao estresse induzido por deficiência hídrica é a alteração da condutância estomática devido à redução da abertura dos estômatos (Cornic, 2000). O fechamento estomático tem conseqüências severas e complexas, tais como a diminuição da perda de água por transpiração (Seemann, 1985), alterações na taxa respiratória, desequilíbrio iônico, alterações no fluxo de água e de nutrientes (Pell & Steffen, 1991), e diminuição da eficiência do processo fotossintético. Em condições de estresse hídrico, a área foliar, disponível para interceptar a radiação solar, é reduzida limitando, conseqüentemente, a fotossíntese (Delgado *et al.*, 1995;

Pellegrino *et al.*, 2003; 2005). Reduções na taxa fotossintética líquida das plantas sujeitas ao estresse podem ser resultados da diminuição da capacidade fotossintética do fotossistema II (Bunce, 1988). Foi observado que o cultivo de milho (*Zea mays L.*) é significativamente afetado quando este é submetido ao estresse hídrico tanto em condições de campo como em casa de vegetação. As plantas de milho apresentaram reduções nos valores das taxas fotossintéticas, condutância estomática e no potencial hídrico das folhas (Pereira *et al.*, 2003). Plantas de trigo também apresentaram redução de peso e limitação da área foliar quando submetidas à escassez de água (Katerji *et al.*; 2003).

A excessiva salinidade do solo também resulta em diversas conseqüências para o desenvolvimento vegetal. O estresse causado pela salinidade pode retardar a diferenciação do xilema primário e o do desenvolvimento do xilema secundário (Hilal *et al.*, 1997). O estresse salino também pode provocar a queda da velocidade de multiplicação e alongação celular, a limitação do extensão foliar e, em conseqüência, do crescimento vegetal (Munns, 1993). A disponibilidade limitada de água no solo também pode levar a redução do crescimento vegetal (Ludlow & Ng, 1976; Bennett & Sullivan, 1981), sendo este um dos fenótipos mais visíveis de resposta às condições de estresse hídrico (Hsiao, 1973) em diversas espécies vegetais, tais como milho (Muchow & Sinclair, 1991) e cevada (Mitroy & Goynes, 1995). A deficiência hídrica (moderado ou severo) afeta o acúmulo de biomassa vegetal independentemente da ocorrência de ótimas condições dos outros fatores ambientais, como a luz e a temperatura (Bono *et al.*, 2001).

### **2.1.1. Resistência à Seca e Estratégias de Aclimação**

A produtividade das plantas pode ser hidricamente limitada dependendo da quantidade de água disponível e da eficiência do seu uso pelo organismo. Uma planta capaz de obter mais água ou que tenha maior eficiência no seu uso resistirá melhor à seca. Os mecanismos de resistência à seca das plantas são classificados em três categorias (Turner, 1979; Turner, 1986): tolerância à seca com baixo potencial de água nos tecidos; escape e tolerância à seca com alto potencial de água nos tecidos. Plantas que apresentam um crescimento continuado ou melhdo ao enfrentar condições hídricas limitadas são consideradas tolerantes à seca (Taiz & Zeiger, 2004). Algumas espécies podem escapar da seca completando seu ciclo rapidamente antes do início da mesma ou

reproduzindo-se somente após a chuva (Alvim, 1985). Outras plantas são capazes de retardar a desidratação, pois tem a capacidade de manter a hidratação de seus tecidos, seja economizando ou despreendendo água.

Diversos genes têm sua expressão alterada sob condições de estresse hídrico (Seki, 2003). Sendo assim, a identificação e a caracterização destes genes, se torna importante, pois eles são fundamentais para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na adaptação do vegetal ao estresse. Os genes que mais frequentemente tem sua expressão alterada em resposta à seca, salinidade e frio são os genes envolvidos em vias de transdução de sinais, na regulação da expressão gênica e os genes que codificam proteínas atuantes na adaptação da célula ao estresse (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Bray, 2004). O estudo dos promotores destes genes induzidos por estresse tem levado à identificação de seqüências regulatórias específicas, cis-elementos, dependentes ou independentes do hormônio vegetal ácido abscísico (ABA), demonstrando a importância deste hormônio como um sinal anti-estresse (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Os produtos dos genes induzidos por estresse são classificados basicamente em dois grupos: as moléculas efetoras, que protegem diretamente a célula contra estresse, e as moléculas regulatórias, que são aquelas moléculas envolvidas na regulação da expressão gênica e nas vias de transdução de sinais em resposta ao estresse (Hasegawa, *et al.*, 2000). No primeiro grupo, estão incluídas proteínas que atuam na proteção das células e de macromoléculas contra a desidratação, tais como as enzimas requeridas para a biossíntese de osmoprotectores (colina monooxigenase e betaína aldeído desidrogenase) (Rhoades & Ranson, 1993), proteínas transmembranas transportadoras de íons (canais de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) (Apse *et al.*, 1999), proteínas que formam canais de passagem de água através da membrana (aquaporinas), proteínas envolvidas na proteção de macromoléculas e de membranas (*Late embryogenesis abundant proteins* - LEA, chaperonas moleculares e proteínas de ligação ao mRNA), proteases envolvidas no “turnover” de proteínas (proteases tiol e ubiquitina) e enzimas antioxidantes (glutathione S-transferase, catalases, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase). O segundo grupo de produtos gênicos inclui os fatores de transcrição, as proteínas quinases e as enzimas envolvidas no metabolismo do fosfoinositol (Bray, 1997; Shinozaki & Yamaguchi, 1997; Seki, 2003). De maneira geral, os genes induzidos por déficit hídrico estão envolvidos na proteção do citoplasma, alteração do potencial osmótico da celular,

homeostase iônica, metabolização de compostos degradados pelo estresse, regulação da expressão gênica etc. (Bray, 1993; 1997; Nepomuceno *et al.*, 2000).

A resistência ao estresse é resultado da expressão de vários genes que podem ter sido induzidos ou não por um determinado estímulo ambiental, como por exemplo, um ferimento ou a escassez de água do solo. A expressão ou silenciamento de único gene não parece ser capaz de assegurar a sobrevivência da planta em condições de estresse (Bray, 1993; Neponuceno *et al.*, 2000), pois alguns genes são essenciais para a tolerância ao estresse e o acúmulo de seus produtos contribui para uma resposta adaptativa (Bray, 1993; 1997). Assim, o processo de tolerância é considerado um mecanismo poligênico, pouco trabalhado nos programas de melhmento genético clássico (Beever, 2000).

A principal resposta que distingue plantas tolerantes de plantas sensíveis ao estresse hídrico é o acentuado acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos nas plantas tolerantes (Turner, 1986; Bohnert & Jensen, 1996). Este mecanismo, denominado de ajustamento osmótico (Munns, 1988), consiste na habilidade de várias espécies (Morgan, 1984) ajustarem osmoticamente suas células diminuindo o potencial osmótico e o potencial hídrico, em resposta ao déficit hídrico ou a salinidade (Turner 1979; 1986) sem que haja diminuição na turgidez celular (Taiz & Zeiger, 1998). Em algumas espécies vegetais, como o algodão e sorgo, tal ajustamento apresenta-se alto, em outras, como por exemplo, o girassol, o ajuste osmótico é mais moderado. Entretanto, plantas de soja e de trigo dispõem de uma baixa capacidade de ajustamento osmótico (Oosterhuis & Wullschleger, 1988).

As reduções do potencial osmótico ocorrem pelo acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos. Porém, o ajustamento osmótico não deve ser confundido com um aumento na concentração de solutos que ocorre durante a desidratação e diminuição de volume celular. O ajuste osmótico ocorrerá somente se houver acúmulo ativo de solutos (Guo & Oosterhuis, 1997), sendo este independente das alterações no volume das células resultantes da perda de água. Assim, o acúmulo ativo de solutos proporciona a manutenção da turgescência celular (Jones & Turner, 1980, Acevedo *et al.*, 1979; Ackerson & Hebert, 1981) e, conseqüentemente, permite a manutenção da abertura estomática e da fotossíntese sob condições de baixo potencial hídrico no solo (Turner, 1986; Funkhouse *et al.*, 1994; Kramer, 1995). O ajustamento osmótico não impede que a taxa fotossintética seja reduzida sob condições de estresse hídrico (Jones & Rawson, 1979) e a manutenção da turgescência permite que a fotossíntese e outras

importantes atividades fisiológicas sejam mantidas, mesmo que baixas, possibilitando a redistribuição de carbono e nitrogênio (Kobata *et al.* 1992; Palta *et al.*, 1994).

As plantas superiores podem acumular diversos solutos ativamente, como carboidratos, ácidos orgânicos e íons. Estes solutos estão envolvidos no ajuste osmótico e podem ser estocados tanto em organelas como no citossol celular. Os íons que penetram na célula, como o potássio e o sódio, são estocados em vacúolos ou exportados para o exterior celular para que não interfiram no metabolismo do citoplasma (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001). Os compostos orgânicos, que não interferem com o metabolismo, tais como a prolina, alguns carboidratos (manitol, sacarose rafinose) e glicina betaína, são chamados de solutos compatíveis e podem ser acumulados no citoplasma de forma a manter o equilíbrio hídrico entre o vacúolo e o citoplasma (Taiz & Zeiger, 1998). Estes solutos são osmoprotetores e protegem a célula pela manutenção da turgidez celular (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002). Osmoprotetores podem ser acumulados normalmente em altos níveis e reduzir os efeitos inibitórios da atividade enzimática e iônica, uma vez que aumentam a estabilidade térmica de enzimas que se encontram em solução salina sem perturbar a bioquímica celular. Os osmoprotetores têm conferido maior tolerância à deficiência hídrica quando expressos como produtos transgênicos em plantas (Bohnert & Jensen, 1996; Zhu, 2001).

Além de carboidratos, as células vegetais também acumulam proteínas específicas em resposta ao estresse abiótico (Ingram e Bartels, 1996), tais como a proteína LEA e as chaperonas moleculares (Alvim *et al.*, 2001), as quais têm demonstrado estar envolvidas na proteção de outras macromoléculas celulares durante a exposição do vegetal ao estresse (Ingram & Bartels, 1996; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002).

A diminuição do potencial osmótico na célula vegetal tem sido relacionada, também, com a produção de moléculas que buscam e destroem os radicais livres. O estresse hídrico provoca a quebra do equilíbrio oxidativo/reduutivo em organelas celulares, como o cloroplasto, causando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e alterações funcionais. As ERO promovem extensivos danos a células (Kaiser, 1979). Estudos têm demonstrado que real função do ajuste osmótico poderia estar associada à eliminação de radicais livres, mas gerando, como função adicional, a retenção de água, uma vez que plantas estressadas aumentam a produção de antioxidantes específicos, tais como carotenóides, ascorbato peroxidases, glutathione redutase, catalases e superóxidos dismutases, as quais são necessárias para a redução

das espécies reativas de oxigênio (Noctor & Foyer, 1998; Mittler, 2002). Estudos recentes vêm enfocando uma provável habilidade antioxidante das enzimas aldeído desidrogenases em plantas submetidas a condições de estresse (Sunkar *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2006).

## 2.2. A superfamília das Aldeído Desidrogenases

Os aldeídos são compostos químicos orgânicos envolvidos em diversos processos fisiológicos, biológicos e farmacológicos (Vasiliou *et al.*, 2000). Podem ser sintetizados a partir de fontes endógenas (metabolismo de aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas) ou gerados a partir de fontes exógenas (estresse abiótico e biótico) (Yoshida *et al.*, 1998; Vasiliou *et al.*, 2000; Sophos & Vasiliou, 2003; Sunkar *et al.*, 2003), sendo moléculas intermediárias e/ou produtos de várias reações metabólicas.

Por apresentarem caráter eletrofilico, os aldeídos são moléculas altamente reativas que podem facilmente reagir com grupos aminos e tióis das macromoléculas celulares (Lindahl, 1991; Vasiliou *et al.*, 2000; Kirch *et al.*, 2001). Aldeídos como o acetaldeído, gliceraldeído 3-fosfato, glicolaldeído, fenilacetaldeído, malondialdeído, propionaldeído, p-nitrobenzaldeído, 4-hidrogi-trans-2-nonenal, são considerados citotóxicos (Ting & Crabbe, 1983; Trivic & Leskovac, 1994), pois causam danos estruturais e funcionais nas macromoléculas (Bartels, 2001b) e, por isso, a concentração intracelular destes aldeídos deve ser extremamente regulada. Alguns aldeídos são também genotóxicos, podendo provocar aberrações cromossomais (Vasiliou, 2000).

Uma das maneiras da célula controlar os níveis de aldeídos tóxicos é promover a oxidação destes à ácido carboxílico. Para isto, as células contam com a ação de um conjunto de isozimas denominadas aldeído desidrogenases (ALDHs). As Aldeído Desidrogenases (ALDH; aldehyde: NAD(P)<sup>+</sup> oxiredutase, EC 1.2.1.3) representam uma superfamília protéica com estruturas primárias similares e que exercem atividades catalíticas oxidando irreversivelmente moléculas de aldeídos e reduzindo NAD(P)<sup>+</sup>. Desta forma, estas enzimas auxiliam no processo de detoxificação celular (Yoshida *et al.*, 1998; Perozich *et al.*, 1999a; Vasiliou *et al.*, 1999; Nakazono *et al.*, 2000; Kirch *et al.*, 2001; Kirch *et al.*, 2004).

A especificidades das ALDHs por seus substratos é baseada na variabilidade estrutural destas enzimas (Kirch *et al.*, 2001), as quais podem atuar na oxidação de uma ampla série de aldeídos alifáticos e aromáticos, endógenos e exógenos, sendo que, foi

observado que poucas ALDHs utilizam NADP<sup>+</sup> como coenzima (Dickison, 1989; Kirch *et al.*, 2001), sendo o NAD<sup>+</sup> um melhor cofator para estas enzimas (Yoshida *et al.*, 1998).

As ALDHs são consideradas essenciais para o metabolismo por atuarem em diversos processos celulares (Vasiliou *et al.*, 1996; Kirch *et al.*, 2001). ALDHs de diferentes subfamílias podem exercer quatro distintas funções principais: agir no processo de desintoxicação celular, participar do metabolismo intermediário, produzir NAD(P)H e atuar no processo de ajuste osmótico celular (Perozich *et al.*, 1999a). Assim, sob condições não estressantes, as ALDHs estão envolvidas no metabolismo fundamental da planta e na manutenção da concentração de aldeídos celulares a níveis não tóxicos. Entretanto, como os estresses causados por fatores abióticos perturbam o metabolismo celular, as ALDHs podem atuar na desintoxicação de aldeídos reativos gerados em função destes estresses, contribuir para o ajuste osmótico e ajudar na manutenção do balanço entre a concentração de aldeídos e o conjunto de espécies reduzidas equivalentes (Kirch *et al.*, 2004). Assim, por representar uma importante estratégia de defesa e possuir alta atividade, as ALDHs são consideradas em geral como enzimas de desintoxicação (Yoshida *et al.*, 1998). Um dos mais importantes papéis das ALDHs é a produção de NAD(P)H. O NAD(P)H produzido durante a atividade das ALDHs reduz indiretamente o acúmulo das ERO (espécies reativas de oxigênios) nas células e caracteriza as ALDHs como enzimas do sistema antioxidante celular. As moléculas de NAD(P)H são potenciais doadores de elétrons durante a redução de peróxido de hidrogênio pela enzima ascorbato peroxidase (Arora *et al.*, 2002).

### **2.2.1. Aldeído Desidrogenases: nomenclatura e classificação**

A superfamília de genes ALDH é ampla, incluindo genes que codificam diversas isozimas, as quais podem ser classificadas como: (a) semialdeído desidrogenases, tais como succinato-semialdeído desidrogenases de mamíferos (E.C. 1.2.1.24) e de *Escherichia coli* (E.C.1.2.1.16) e glutamato semi-aldeído desidrogenases (E.C.1.2.1.41); (b) ALDHs inespecíficas (E.C.1.2.1.3); (c) betáinas Aldeído Desidrogenases (E.C.1.2.1.8); (d) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase defosforilada (E.C. 1.2.1.9); (e) fenilacetaldéido desidrogenases (E.C. 1.2.1.39); lactaldéido desidrogenases (E.C. 1.2.1.22; e (g) proteínas “like-ALDH”, tais como as antiquitinas, as quais possuem estrutura primária completa ou parcialmente igual à seqüência de

aminoácidos das ALDHs (Vasiliou *et al.*, 2000). Tendo como base a especificidade pelo substrato, estas isozimas podem ser classificadas como ALDHs específicas e não específicas. As ALDHs específicas tem altas especificidades por seus substratos e incluem todos as semiAldeído Desidrogenases, as betaínas Aldeído Desidrogenases e as proteínas “like-ALDH”. As ALDHs inespecíficas reagem com uma ampla variedade de substratos (aldeídos alifáticos e/ou aromáticos), tais como as ALDHs das classes 1 e 2 (cistossólica e mitoncondriais) e os dímeros das ALDHs da classe 3 (Yoshida *et al.*, 1998), dentre outras.

A nomenclatura para as proteínas ALDHs foi estabelecida pelo Comitê de Nomenclatura do Gene ALDH (AGNC). Esta nomenclatura é baseada em um critério relativamente simples (Vasiliou *et al.*, 1999), no qual os genes *ALDH* são agrupados em famílias, e cada família é representada por um símbolo raiz (ALDH) seguido por um número (número da família). Uma letra maiúscula indica a subfamília e precede um número, o qual indica o gene individual (Kirch *et al.*, 2004).

As proteínas ALDHs foram divididas em família segundo critério estabelecido pelo AGNC, o qual estabelece que seqüências de proteínas que apresentam 40% ou menos de identidade com outras seqüências anteriormente identificadas deveriam descrever uma nova família protéica ALDH; seqüências de proteínas que apresentam mais de 40% de identidade com outras seqüências de ALDH previamente descritas compõem uma mesma família; enquanto que, seqüências que apresentam mais de 60% de identidade compõem uma subfamília de proteínas (Vasiliou *et al.*, 1999).

### **2.2.2. A superfamília de genes ALDH**

Uma superfamília de genes é definida como um conjunto de seqüências evolucionariamente relacionadas (Dayhoff, 1976) e consiste de famílias de genes homólogos. A superfamília de genes ALDH é extremamente ampla (Vasiliou *et al.*, 2000) e seus genes têm sido estudados em vários organismos, desde bactérias a mamíferos (Kirch *et al.*, 2001). Os genes *ALDHs* têm sido caracterizados em detalhes especialmente em leveduras e humanos (Navarro-Aviño *et al.*, 1999, Yoshida *et al.*, 1998).

Atualmente 555 genes que codificam proteínas ALDHs foram identificados (Sophos & Vasiliou, 2003). Pelo menos 172 genes *ALDHs* foram descobertos em eucariotos e codificam enzimas que pertencem a mais de 20 famílias de proteínas

distintas (Perozich *et al.*, 1999a; Perozich *et al.*, 1999b; Sophos *et al.*, 2001; Skibbe *et al.*, 2002; Wood & Krayesky, 2002). As enzimas ALDHs de plantas estão representadas em onze destas famílias: ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH19 e ALDH21 (Wood & Krayesky, 2002), sendo que destas três famílias são exclusivas das plantas (ALDH11, ALDH19 e ALDH21) (Chen *et al.*, 2002; BRAY, 2004). Em *Arabidopsis thaliana*, devido ao sequenciamento completo de seu genoma, foram identificadas 14 seqüências gênicas que codificam para proteínas pertencentes a nove famílias de ALDH, dentre as quais se inclui uma nova família (ALDH22), identificada exclusivamente em plantas. As demais famílias ALDH já são conhecidas e muitas delas são expressas sob condições de estresse abiótico (Kirch *et al.* 2004).

Os diversos produtos dos genes *ALDHs* foram distinguidos com base em suas características físico-químicas, propriedades enzimológicas, localização subcelular e distribuição tecidual (Deitrich, 1966; Pietruszko, 1983; Yoshida, *et al.*, 1998). A análise por comparação de seqüência entre os genes de bactérias, animais e plantas tem identificado três motivos protéicos característicos (Kirch *et al.*, 2004). Diferenças sutis em suas subunidades permitem agrupar as ALDHs em subfamílias (Vasiliou *et al.*, 1999; Sophos & Vasiliou, 2003).

Alguns produtos gênicos, relacionados aos mecanismos de tolerância ao estresse, podem ser acumulados em diferentes espécies de plantas, quando estas são submetidas ao estresse hídrico. Dentre estes produtos gênicos se encontram as Aldeído Desidrogenases (Kirch *et al.*, 2001), sugerindo que os genes *ALDHs* têm um mecanismo de regulação comum (Kirch *et al.*, 2004). Entretanto, apesar de se conhecer a função fisiológica de muitas proteínas ALDHs nos processos de resposta aos diferentes tipos de estresse, ainda existem muitas ALDHs cuja função bioquímica ainda não foi elucidada (Kirch *et al.*, 2001).

Em plantas, genes *ALDHs* pertencentes a família 3 (*ALDH3*), a família 10 (*ALDH10*) e a família 7 (*ALDH7*) têm sido alvo de estudos freqüentes e muitas de suas proteínas já foram bem caracterizadas, evidenciando uma importante função destas nos processos de desintoxicação celular e ajustamento osmótico. Genes das famílias ALDH2, ALDH5 e ALDH11 também codificam proteínas cujas atuações parecem estar relacionadas ao processo de tolerância ao estresse celular (op Den Camp & Kuhlemeier, 1997; Bouché *et al.*, 2003; Kirch *et al.*, 2004).

Genes *ALDH3* codificam diferentes proteínas da família ALDH3, as quais têm demonstrado estar envolvidas na oxidação de aldeídos aromáticos e aldeídos alifáticos de cadeia média, auxiliando na desintoxicação celular (Kirch *et al.*, 2001). As proteínas desta família foram identificadas tanto nas frações microsossomais quanto nas citossólicas (Canuto *et al.*, 1996; Kirch *et al.*, 2001). Em *A. thaliana*, a análise da proteína ALDH3H1 sugere que provavelmente esteja envolvida na via de desintoxicação destas plantas, a qual limita a concentração de aldeídos intracelulares, sob condições de estresse oxidativo (Kirch *et al.*, 2005). Plantas de *A. thaliana* e *Craterostigma plantagineum* transgênicas, expressando genes *ALDH3*, apresentaram-se mais tolerantes a diversos tipos de estresses ambientais (Sunkar *et al.*, 2003; Kirch *et al.*, 2005).

Os genes *ALDH10* são os mais amplamente estudados e têm sido caracterizados em diversas espécies (Wood *et al.*, 1996). As proteínas desta família (ALDH10) correspondem as betaínas aldeído desidrogenases, as quais possuem alta especificidade pelo seu substrato, betaína aldeído, e agem oxidando-o em glicina betaína, que, por ser um osmoprotetor, auxilia na manutenção do metabolismo normal da célula em condições de estresse osmótico (Weretilnyk & Hanson, 1990; Holmstron *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003). Devido a estas características, as vias metabólicas envolvidas na biossíntese das BADHs e seus genes correspondentes têm sido foco de constantes estudos visando à obtenção de plantas transgênicas resistentes ao estresse.

Em plantas de *Oryza sativa*, o gene ALDH2A parece estar envolvido no processo de regulação osmótica, pois codifica para uma aldeído desidrogenase cuja expressão é aumentada sob condições anaeróbicas nas quais as plantas de arroz se encontram quando submersas (Nakazono *et al.*, 2000). Um gene *ALDH5* foi identificado no genoma de *Arabidopsis*. Este gene codifica para uma succinato semi-aldeído desidrogenase (SSADH E.C.1.2.1.24). Plantas de *Arabidopsis* com mutações *ssdh* acumularam altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo o envolvimento desta proteína no processo de tolerância celular a condições de estresse oxidativo (Kirch *et al.*, 2004).

### **2.2.3. A família ALDH7**

Genes *ALDH7* codificam proteínas classificadas como “turgor-responsive protein” ou antiqutinas (ATQ) pelo fato de serem induzidos sob condições de estresse hídrico e por apresentarem alta conservação de seqüência durante a evolução (Guerrero *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1994; Stroehner *et al.*, 1995; Kirch *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*,

2006). Estas proteínas são classificadas como ALDHs, pois apesar da baixa homologia de seqüência (30%) com outras ALDHs, elas apresentam domínios conservados responsáveis pela atividade catalítica de oxidação de aldeídos das ALDHs. Embora os substratos fisiológicos das antiqutinas ainda não tenham sido determinados (Lee *et al.*, 1994; Perozich *et al.*, 1999a; Sophos *et al.*, 2001), acredita-se que estas proteínas exerçam uma função catalítica nas vias metabólicas de resposta ao estresse osmótico (Stroeher *et al.*, 1995; Perozich *et al.*, 1999b).

As proteínas pertencentes a família ALDH7 podem ser diferenciadas dentro de três subfamílias: ALDH7A, ALDH7B e ALDH7C. A subfamília ALDH7A inclui proteínas encontradas nos animais, enquanto aquelas pertencentes a família ALDH7B são encontradas nas plantas. A subfamília ALDH7C possui apenas uma proteína conhecida, a antiqutina de *Drosophila melanogaster* (Fong *et al.*, 2006).

Em plantas, o primeiro gene *ALDH7* foi identificado em ervilha (*Pisum sativum*). Este gene codifica para uma enzima denominada 26g “pea Turgor Protein”, pertencente à subfamília ALDH7B, a qual foi altamente expressa quando plantas de ervilha foram submetidas ao estresse hídrico (Guerrero *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1994). A proteína 26g de ervilha possui o domínio característico de aldeído desidrogenase pouco conservado, entretanto mantém o resíduo de cisteína característico na devida posição (Cys<sub>301</sub>) (Guerrero *et al.*, 1990). A proteína antiqutina de humanos foi descoberta, posteriormente e, por apresentar homologia relativamente alta (60%) com a proteína 26g de ervilha, foi classificada como membro da família ALDH7, porém pertence a subfamília ALDH7A (Lee *et al.*, 1994). Esta proteína é altamente expressa na cóclea, ovário, olho, coração, fígado e rins (Lee *et al.*, 1994; Skvorak *et al.*, 1997), órgãos nos quais o equilíbrio osmótico é essencial para a manutenção da função.

Proteínas antiqutinas de diversos organismos, de diferentes reinos, têm sido identificadas. A análise da estrutura primária das proteínas da família ALDH7 demonstrou que, além destas proteínas apresentarem domínios catalíticos conservados de Aldeído Desidrogenases, elas possuem uma extensa seqüência de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, localizados aproximadamente no meio da proteína, sugerindo a presença de um domínio transmembrana nestas proteínas (Lee *et al.*, 1994). A existência destes domínios conservados nas estruturas primárias das ATQ indica que a função fisiológica destas proteínas, também, deve ser conservada e fundamental para sobrevivência dos organismos. Entretanto, a real função fisiológica das ATQ permanece desconhecida e pouco se conhece sobre as vias metabólicas de atuação destas enzimas,

sendo que seus substratos fisiológicos específicos ainda não foram identificados (Tang *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 2006).

Homólogos de genes *ALDH7B* foram identificados em diversas espécies de plantas, tais como canola (*Brassica napus*), arroz (*Oryza sativa*), *Craterostigma plantagineu* e *Arabidopsis thaliana* (Strocher *et al.*, 1995; Kirch *et al.*, 2001; Kirch *et al.*, 2005; Fong *et al.*, 2006). Estes genes parecem ser induzidos em condições de estresses abióticos e seus produtos gênicos se acumulam nas plantas, podendo estar envolvidos na tolerância de vegetais ao estresse (Strocher *et al.*, 1995; Kirch *et al.*, 2005).

Em angiospermas, os genes *ALDH7B* homólogos são induzidos por diversos tipos de estresse, tais como seca, baixas temperaturas e altas concentrações de ABA (Wood & Krayesky, 2002). Em *Arabidopsis*, foi identificado um gene pertencente à família ALDH7B, cuja expressão foi induzida por estresse abiótico (Kirch *et al.*, 2004). Similarmente, o gene *ALDH7B6* da espécie de musgo *Tortula ruralis* foi induzido em resposta a NaCl, radiação ultravioleta-C e ABA (Chen *et al.*, 2002).

Em sementes de soja submetidas a estresse hídrico, foi identificado um gene desta família, denominado *GmTP55* (*Glycine max* “turgor protein”). A análise comparativa da seqüência de aminoácidos deduzida forneceu evidências de que o gene *GmTP55* codifica um homólogo das proteínas antiquitina, possuindo um domínio hidrofóbico e um domínio conservado de desidrogenases, pertencendo, assim, à família ALDH7, mais especificamente a subfamília ALDH7B. Como os demais genes *ALDH7B* identificados, este gene parece ser induzido em resposta a estresses abióticos, tal como déficit hídrico, e seu produto gênico, a proteína GmTP55, mostrou ser acumulada nos diferentes órgãos de plantas de soja estressadas por déficit hídrico, sendo que o acúmulo foi mais acentuado no caule e na raiz (Rodrigues *et al.*, 2006). Entretanto, o exato papel bioquímico da proteína GmTP55 permanece por ser elucidado, sendo necessário confirmar sua atividade de oxidação de aldeídos, a via metabólica de atuação desta proteína e seus substratos intracelulares.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

A seca e a salinidade dos solos têm causado grandes restrições à produtividade de culturas agrícolas economicamente importantes para o Brasil, entretanto pouco se conhece sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de aclimação do vegetal ao estresse hídrico. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi analisar bioquímica e fisiologicamente os mecanismos de resposta ao estresse, nos quais a proteína GmTP55 esteja envolvida, com a finalidade de desenvolver estratégias moleculares que permitam o desenvolvimento de culturas agrícolas mais tolerantes ao estresse hídrico.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos foram analisar a atividade bioquímica da proteína GmTP55 *in vitro*; analisar a tolerância das plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando GmTP55 a condições de estresse hídrico; analisar a função da proteína GmTP55 *in vivo* utilizando plantas transgênicas superexpressando GmTP55 e plantas “knock-out” para este gene e determinar a localização subcelular da proteína GmTP55 em *Arabidopsis thaliana* transgênicas em condições normais de crescimento e sob condições de estresse salino.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Análise molecular da proteína GmTP55 *in vitro*

#### 4.1.1. Preparo das células competentes e transformação de *Escherichia coli* BL21:DE3 (pLYS) com a construção pHis-GmTP55 (pHIS-ATQ).

Células competentes de *Escherichia coli* foram preparadas em CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). A construção pHis-GmTP55 (pHIS-ATQ), a qual permite a expressão da proteína GmTP55 de 417 aminoácidos fusionada à cauda de histidina na região N-terminal, foi previamente descrita (Rodrigues *et al.*, 2006).

Colônias individuais da estirpe de *E. coli* DH5 $\alpha$ , transformadas com a referida construção de DNA foram incubadas em 3 mL de meio Luria Bertani (LB) seletivo, contendo ampicilina (50 mg.L<sup>-1</sup>), e mantidas sob agitação constante a 180 rpm a 37°C por 16 hs para multiplicação celular. O DNA plasmidial destas colônias foi extraído utilizando o “Plasmid Midi Kit” (QIAGEN) segundo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* competentes, estirpe BL21(DE<sub>3</sub>) pLys, via transformação por choque térmico para que, posteriormente, houvesse a síntese da proteína GmTP55 recombinante. A confirmação dos transformantes foi realizada através de clivagem enzimática, utilizando a enzima de restrição *Bam*HI (GIBCO) seguindo as recomendações do fabricante. Uma colônia transformada foi novamente inoculada em meio líquido para armazenamento em glicerol 30 % (v/v) a -80°C.

#### 4.1.2. Expressão heteróloga da proteína GmTP55 em *Escherichia coli*

Bactérias *E. coli* BL21:DE3 (pLys), transformadas com a construção pHis-GmTP55, foram crescidas em 10 mL de meio líquido 2YT (16 g de bacto-triptona; 10 g de extrato de levedura; 5 g de NaCl), contendo ampicilina 50 mg.L<sup>-1</sup>, por 16 hs a 28 °C e 160 rpm, e utilizadas para inocular 100 mL de meio 2YT, contendo ampicilina 50 mg.L<sup>-1</sup>. Após crescimento a 28 °C e 160 rpm, até O.D.<sub>600nm</sub> 0,4-0,6, estas células foram transferidas para 1 L de meio 2YT contendo ampicilina 50 mg.L<sup>-1</sup> e crescidos até uma O.D.<sub>600nm</sub> de 0,4. A expressão da proteína recombinante GmTP55 foi induzida utilizando isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) 0,4 mM. O clone pHis-GmTP55 foi mantido sob agitação constante, a 160 rpm e 28 °C, por duas hs, para que a indução da proteína recombinante pudesse ocorrer. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 8.000 x g por 20 min e congeladas a -20° C.

#### 4.1.3. Obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis

Os extratos protéicos total, solúvel e insolúvel das bactérias transformadas com pHis-GmTP55 e induzidas por IPTG foram obtidos para análise da expressão da proteína recombinante de interesse. Para controle desta expressão, também foram extraídas proteínas totais, solúveis e insolúveis das bactérias transformadas mas não induzidas por IPTG, das células transformadas com o vetor pET-16b vazio, e das células selvagens de BL21(DE<sub>3</sub>) pLys.

Para obtenção do extrato protéico total, 1 mL de cada cultura celular foi centrifugado a 10.000 x g por 2 min, a 4° C e o precipitado ressuspendido em 100 µL de tampão de amostra para eletroforese (1X) (glicerol 10 % (v/v); SDS 2,3 % (p/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), 2- mercaptoetanol 5% (v/v) e Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8) e aquecidos por 10 min, para desnaturar as proteínas. As frações, solúvel e insolúvel, foram obtidas centrifugando-se 2 mL das culturas celulares em centrífuga refrigerada, a 4 °C, 6.500 x g por 15 min e o precipitado ressuspendido em 250 µL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, contendo 1 mg. mL<sup>-1</sup> de lisozima, Triton X-100 0,1% (v/v) e PMSF 0,8 mM). As amostras foram incubadas a 30°C por 15 min e, logo em seguida, sonicadas, utilizando-se o *Ultrasound Homogenizer* 4710 Series (COLE PARMER), com amplitude entre 60 e 80; timer 0, pulser 6, por quatro

tempos. O lisado foi centrifugado a 12.000 x g por 15 min, a 4°C e o sobrenadante retirado e transferido para outro microtubo (Fração Solúvel) e adicionado ao tampão da amostra 2x, no mesmo volume da fração. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão de amostra 1X (Fração Insolúvel). Todas as frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE em presença de β-mercaptoetanol, como descrito por Laemmli *et al.* (1970), para verificar o fracionamento da proteína recombinante expressa, após indução.

Para análise da atividade da GmTP55 recombinante, o extrato de proteínas totais foi obtido centrifugando-se 5 mL de todas as culturas celulares citadas anteriormente a 4 °C, 6.500 x g por 15 min, e ressuspendendo-se o precipitado em tampão PBS 1X [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), contendo lisozima 100 mg.L<sup>-1</sup>, Triton X-100 0,1% (v/v)] e inibidores de protease (PMSF 0,8 mM, benzamidina 1mM e thiouréia 1 mM). As suspensões celulares foram mantidas no gelo por 30 min, e posteriormente sonicadas no *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (COLE PARMER), com amplitude entre 60 e 80; timer 0, pulser 6, por oito tempos.

#### 4.1.4. SDS-PAGE e “Western blot”

A separação das proteínas extraídas foi realizada por meio de SDS-PAGE, no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, EDTA 1 mM e SDS 3,5 mM), com a voltagem constante de 100V. A concentração de acrilamida/ bis-acrilamida utilizada foi de 10% (p/v) (Laemmli *et al.*, 1970).

Após eletroforese, o gel foi revelado pela incubação com a solução corante [metanol 45% (v/v), etanol 9% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue R250 0,01% (p/v)], por 2 hs, e, em seguida, com a solução descorante [metanol 25% (v/v) e ácido acético glacial 7,5% (v/v)].

Alternativamente, as proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o sistema de transferência *Transblot* da BIORAD, segundo as recomendações do fabricante. A transferência foi realizada por 1 h, com a amperagem fixa de 350 mA. Após a transferência, utilizou-se o reagente de bloqueio *Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk* (BIORAD), por 1 h a temperatura ambiente, para bloquear a membrana. Posteriormente, lavou-se a membrana com o tampão TBS-T 1X [Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 0,015 mM, Tween-20 0,1% (v/v)].

Para imunodeteção da proteína GmTP55, utilizou-se tanto o anticorpo policlonal de coelhos contra a proteína GmTP55 (diluição de 1:1.000), quanto o anticorpo monoclonal comercial de camundongo contra a cauda de His (QIAGEN) (diluição 1:3.000), ambos diluídos em TBS-T 1X. Como segundo anticorpo, foram usados o anti IgG de coelho (SIGMA) e o anti IgG de camundongo (SIGMA), respectivamente, ambos conjugados à enzima fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5000 em tampão TBS-T 1X. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se os substratos NBT (azul-nitro tetrazólio) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) da GIBCO BRL.

#### **4.1.5. Extração em larga escala das proteínas solúveis e insolúveis do clone pHis-GmTP55**

Células de *E coli*BL21(DE<sub>3</sub>) pLys, transformadas com a construção pHis-GmTP55, foram lisadas, após indução, para obtenção das proteínas solúveis e insolúveis. Para extração em grande escala, 6 litros de cultura celular induzidas foram centrifugada a 6.500 x g por 15 min e congeladas a - 20 °C. Posteriormente, estas células foram descongeladas e ressuspendidas em 5 mL de tampão de lise 1X em condições nativas (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM), na presença de inibidores de proteases (PMSF 0,8 mM, benzamida e thiouréia 1mM), lisozima 1 mg.mL<sup>-1</sup> e Triton X-100 0,1% (v/v). A suspensão celular foi mantida no gelo por 30 min e as células foram lisadas mecanicamente por ultra-sonicação em *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (COLE PARMER), com amplitude entre 60 e 80; timer 0 e pulser 6, por 15 tempos. O lisado celular foi centrifugado por 20 min a 39.000 x g. O sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi filtrado através de uma membrana de 0,45 µm, coletado e mantido no gelo para posterior purificação. O precipitado, contendo as proteínas insolúveis, foi ressuspendido e homogeneizado em 5 mL de tampão de lise desnaturante, (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10mM pH 8,0, imidazol 10 mM, e uréia 8 M pH 8,0), na presença inibidores de proteases (PMSF 0,8 mM, benzamida e thiouréia 1mM), lisozima 1 mg.mL<sup>-1</sup> e Triton X-100 0,1% (v/v). A suspensão celular em tampão de lise desnaturante foi incubada no gelo por 30 min e sonicada em *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (COLE PARMER), por 20 tempos. Os debris celulares foram descartados após centrifugação por 20 min, a 39.000 x g. O sobrenadante, contendo, agora, as

proteínas insolúveis, foi filtrado através de uma membrana de 0,45 µm, coletado e incubado no gelo para posterior purificação.

#### **4.1.6. Purificação da proteína GmTP55 recombinante do extrato protéico bacteriano**

A proteína recombinante GmTP55, fusionada a resíduos de histidina, foi purificada a partir dos extratos protéicos solúvel e insolúvel bacteriano por cromatografia de afinidade, utilizando a resina Ni-NTA Agarose (QIAGEN), ativada com Ni<sup>+2</sup>, tanto em condições nativa (da fração solúvel) como em condições desnaturantes (da fração insolúvel).

Para purificação da proteína GmTP55 recombinante a partir do extrato protéico solúvel bacteriano, o extrato foi incubado por 2 hs, a 4° C, com 500 µL da resina Ni-NTA Agarose (QIAGEN), pré-equilibrada em tampão de lise nativo (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM). Após incubação, a resina contendo o extrato protéico solúvel bacteriano foi centrifugada por 2 min, a 1600 x g, e o precipitado (proteínas ligadas à resina) foi lavado, cinco vezes, com 10 mL de tampão de lavagem nativo (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM) e novamente centrifugado por 2 min, a 1600 x g. As proteínas recombinantes da fração solúvel foram eluídas após 1 h de incubação da resina com o tampão de eluição nativo (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM), no gelo.

Para a purificação da proteína GmTP55 recombinante a partir do extrato protéico insolúvel bacteriano, este foi incubado por 2 hs, a 4° C, com 500 µL da resina Ni-NTA Agarose (QIAGEN), pré equilibrada em tampão de lise desnaturante (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10mM pH 8,0, Imidazol 10 mM, e uréia 8 M pH 8,0). Após incubação, o extrato não ligado à resina foi recuperado e armazenado para ser analisado por SDS-PAGE. Após lavagens da resina com tampão desnaturante (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10mM pH 8,0, imidazol 60 mM, e uréia 8 M pH 8,0), as proteínas recombinantes da fração insolúvel foram eluídas após 1 h de incubação no gelo, com o tampão de eluição desnaturante (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM pH 8,0, Imidazol 250 mM, e uréia 8 M pH 8,0).

A pureza das proteínas recombinantes foi analisada por SDS-PAGE (Laemmli *et al.*, 1970) e “Western blot”, com o anticorpo comercial contra cauda de histidina (QIAGEN). Como controles da purificação, foram utilizados os extratos protéicos não

ligados à resina e as frações obtidas na segunda lavagem da resina Ni-NTA Agarose. As frações eluídas, contendo a proteína recombinante GmTP55, foram armazenadas a -20 °C.

#### **4.1.7. Renaturação da proteína recombinante purificadas da fração protéica insolúvel**

A proteína recombinante GmTP55 purificada da fração protéica insolúvel, solubilizada no tampão de eluição desnaturante contendo 8M de uréia, foi dialisada contra o tampão de diálise (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM e Tris 10 mM, pH 8,0) contendo concentrações decrescentes de uréia (7M, 6M, 5M, 4M, 3M, 2M, 1M e 0M), para a retirada gradual da uréia. Foram realizadas sete trocas de tampões, em intervalos de 40 min, durante toda a diálise, que ocorreu sob agitação magnética a 4 °C. Foi utilizada uma membrana de diálise cujos tamanhos dos poros variaram de 12 a 14.000 Da.

#### **4.1.8. Ensaio da atividade enzimática da proteína recombinante GmTP55**

Para análise da atividade de oxidação de aldeídos, utilizou-se a proteína recombinante GmTP55 purificada renaturada e as proteínas solúveis e o extrato total das bactérias *E. coli* transformadas. Como controle negativo foi utilizado o extrato protéico total de células de *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>) pLys selvagens e de *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>) pLys transformada com o vetor pET-16b vazio.

A capacidade das proteínas recombinantes GmTP55 em oxidar aldeídos foi analisada espectrofotometricamente, a 340 nm, utilizando-se o aparelho *Cobas Fara* (ROCHE), pela conversão de NAD<sup>+</sup> em NADH, à temperatura ambiente (25 °C). A absorvância foi medida de 12 em 12 segundos durante 1 min, antes da adição da GmTP55, e de 6 em 6 segundos, durante 2 min após a adição da proteína recombinante. A atividade específica foi calculada obtendo a diferença ( $\Delta$ ) entre a inclinação da reta depois da adição da GmTP55 menos a inclinação antes da adição. O valor da diferença foi usado na equação: Atividade Específica =  $\Delta_T \cdot U \cdot \xi^{-1} \cdot \beta^{-1} \cdot C^{-1} \cdot V^{-1}$ , onde  $\Delta_T$  representa a variação da absorvância/min; V representa o volume da amostra, em mL;  $\beta$  representa o caminho ótico, em cm; C representa a concentração de proteína, em mg. mL<sup>-1</sup>; U representa o volume da reação, em mL e  $\xi$  o coeficiente de extinção molar. Para cálculos, foi usado o coeficiente de extinção ( $\xi$ ) NAD(P)H = 6,22 mM<sup>-1</sup> . cm<sup>-1</sup>.

Os ensaios das reações enzimáticas foram realizados em tampão pirofosfato de sódio 100 mM, pH 9,5, na presença de NAD<sup>+</sup> 1,5 mM (SIGMA) e utilizando diferentes concentrações de aldeídos, para um volume total de reação de 200 µL. Os aldeídos utilizados nas reações como substratos foram: benzaldeído, acetaldeído, butiraldeído (SIGMA), propionaldeído (MERCK), γ-aminobutiraldeído e formaldeído (MERCK). O ensaio foi realizado em triplicata. Uma unidade de atividade de desidrogenase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 µmol de NADH por minuto por mg de proteína. As concentrações de proteína recombinante pura e de proteínas totais foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

Os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) foram determinados para o extrato protéico total das células de *E. coli* transformadas. Para determinar os valores aparentes de  $K_m$  e de  $V_{max}$  de GmTP55 recombinante as concentrações dos substratos (aldeídos) foram variadas e a concentração de NAD<sup>+</sup> foi mantida constante (1,5 mM). Cada parâmetro foi determinado com pelo menos cinco concentrações diferentes de aldeídos. Após a leitura da absorvância a 340 nm os valores obtidos foram convertidos em velocidades de formação do NADH para construção do gráfico de Michaelis-Menten, utilizando-se o “software Curve Expert”.

## **4.2. Análise da expressão e propriedades funcionais da proteína GmTP55 em plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas**

### **4.2.1. Material vegetal**

Plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col 0), foram utilizadas para este estudo. As sementes de *A. thaliana* do tipo selvagem foram semeadas em vasos plásticos contendo terra e substrato de hortaliças (1:1) ou em placas de vidro com meio MS ½ força (adaptado de Murashige e Skoog, 1962). As sementes de *A. thaliana* transgênicas foram esterilizadas e mantidas em placas contendo meio MS ½ força seletivo com canamicina 50 mg.L<sup>-1</sup>. As sementes foram incubadas a 4°C, no escuro, por três dias e depois expostas à luz branca (2500-lux). Estas sementes foram mantidas a 22° C para desenvolvimento. As plântulas foram transferidas, após um mês, para uma mistura de terra e substrato de hortaliças, na proporção 1:1. As plantas de *A. thaliana*

foram crescidas e cultivadas em câmara de crescimento a 22° C, sob condições de dia-longo (16 hs de luz/ 8 hs de escuro).

#### **4.2.2. Obtenção de plantas transgênicas**

##### **4.2.2.1. Obtenção da construção contendo o cDNA *GmTP55* inserido em vetores binários de transformação de plantas**

As construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ foram obtidas previamente e descritas em Rodrigues *et al.* (2006). De forma resumida, o cDNA de 1921 pb, que codifica GmTP55, foi amplificado por PCR utilizando a *Pfu* polimerase e oligonucleotídeos específicos com extensões apropriadas que possibilitassem a inserção do fragmento amplificado, por recombinação, no vetor de entrada pDONR201, via BP clonase (INVITROGEN), segundo as recomendações do sistema GATEWAY (Invitrogen Life Technologies Inc.). O produto desta recombinação foi utilizado para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ , por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989), resultando no clone pDON-GmATQ. Posteriormente, o cDNA de GmTP55 foi transferido do vetor pDON201 para os vetores binários, de expressão em planta, pK7WG2 e pK7FWG2, utilizando a LR clonase (INVITROGEN), produzindo, respectivamente, pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ. Em ambos os clones, o cDNA de GmTP55 está sob o controle do promotor 35S do “Cauliflower Mosaic Virus” (CaMV), possibilitando sua expressão constitutiva em células vegetais. Na construção pK7F-GmATQ, o cDNA da GmTP55 está fusionado ao gene repórter *GFP*, produzindo a proteína quimérica GmTP55-GFP, com GFP (“Green Fluorescent Protein”) na região carboxi-terminal.

##### **4.2.2.2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

Células de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 foram transformadas, por eletroporação, com as construções pK7-GmATQ (Rodrigues *et al.*, 2006) e pK7F-GmATQ. Para transformação de 40  $\mu$ L de células competentes de *Agrobacterium*, foram usadas cerca de 50  $\mu$ g das construções. As células competentes foram eletroporadas a 2500V durante 4 a 5 milisegundos. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de meio Rhizo às células, para recuperação, e estas foram incubadas por 2 hs a 28°C.

Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada por 1 min e concentrada para 100 µL. A suspensão celular concentrada foi plaqueada em meio Rhizo sólido, contendo gentamicina (40 mg.L<sup>-1</sup>) e espectinomicina (100 mg.L<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas a 28°C durante três dias. As colônias transformadas foram diagnosticadas por PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene *GmTP55*, 4076-AntiF501 (CCATGCGCTGTICTAGGATGG, coordenadas 539 a 559) e 4077-AntiR506 (GCCCAACTAGAGTCCCCTTCTC, posições 1042 a 1063). Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, Ácido Bórico 0,089 M e EDTA 0,05 M, pH 8,0), e corado com brometo de etídeo 0,1 µg. mL<sup>-1</sup>.

#### **4.2.2.3. Transformação de *Arabidopsis thaliana* e seleção de transformantes independentes**

Plantas de *A. thaliana* (ecotipo Col 0) foram transformadas com as construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ. Inicialmente, colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com estas construções e confirmadas por PCR foram inoculadas e crescidas em 4 mL de LB líquido seletivo, com gentamicina (40 mg.L<sup>-1</sup>) e espectinomicina (100 mg.L<sup>-1</sup>), por 24 h a 28° C. Posteriormente, a cultura celular foi transferida para 200 mL de meio LB seletivo e incubada por 24 h a 28° C. Após este tempo, a suspensão celular foi centrifugada, a 8.000 x g, e o precipitado ressuspenso em 250 mL de sacarose 5% (p/v), contendo Silwett L-77 3% (p/v). Esta solução foi usada para transformar *A. thaliana* Col-0 pelo método de mergulha de escapes florais (Clough & Bent, 1998).

As plantas recém transformadas foram mantidas em câmara de crescimento, a 22 °C, expostas à luz branca, até que produzissem sementes. As sementes transgênicas foram esterilizadas após incubação com uma solução de etanol 70% (v/v) e Triton X-100 0,05% (v/v), por 5 min e adição de etanol absoluto, por 1 min e, em seguida, plaqueadas em meio MS ½ força seletivo, contendo canamicina 50 mg.L<sup>-1</sup>, para seleção dos transformantes independentes. As placas com sementes transgênicas foram incubadas a 4° C, no escuro, por 3 dias, para quebra de dormência, e posteriormente transferidas para uma incubadora a 22° C iluminada com luz branca, com fotoperíodo de 16 h, na qual as plântulas foram mantidas por um mês. Após este período, os transformantes independentes foram transplantados para vasos com terra e substrato (1:1) e mantidos em câmara de crescimento, a 22° C, com fotoperíodo de 16 h, para

obtenção de sementes da geração F2 (T1). Estas foram plaqueadas e as plantas cultivadas por três gerações para a seleção, em canamicina, de plantas em homozigose.

#### **4.2.3. Diagnóstico molecular das plantas transgênicas**

##### **4.2.3.1. Extração do DNA genômico das plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana***

Para extração do DNA genômico, uma folha das possíveis plantas de *A. thaliana* transformadas foi macerada em nitrogênio líquido, em microtubos, com o auxílio de pistilos. Ao macerado foram adicionados 200 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM e EDTA 50 mM) contendo β-Mercaptoetanol 10 mM e SDS 0,5% (p/v). O extrato, em tampão de extração, foi agitado e posteriormente incubado em banho-maria a 65 °C por 10 min. Após este tempo, foram adicionados 64 µL de acetato de sódio 5M e em seguida os ácidos nucleicos foram separados por centrifugação a 16.000 x g, por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, no qual o DNA genômico foi precipitado com isopropanol 50% (v/v), lavado com etanol 70% (v/v), e, logo após, seco no *Automatic Environmental SpeedVac System AES1010* (SAVANT), por 5 min. O DNA foi ressuscitado em 30 µL de água deionizada. A quantidade e a integridade do DNA de cada amostra foram verificadas em gel de agarose 1% (p/v), em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, Ácido Bórico 0,089 M e EDTA 0,05 M, pH 8,0), corado com brometo de etídeo 0,1 mg.L<sup>-1</sup>

##### **4.2.3.2. Reação de PCR (Polimerase Reaction Chain)**

O diagnóstico das plantas de *A. thaliana* transformadas foi realizado por PCR. O DNA genômico de folhas de *A. thaliana* foi amplificado utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada gene, como indicado na Tabela 3.1. Para amplificação do DNA das construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ foram utilizados os oligonucleotídeos 4076-AntiF501 (posições 539 a 559) e 4077-AntiR506 (posições 1042 a 1063). A reação de amplificação foi realizada com 2 µL de DNA genômico, 0,4 µM dos oligonucleotídeos correspondentes, dNTPs 0,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, Tampão da Taq DNA polimerase 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 2,0 mM, pH 8,4) e 1 U de Taq

Polimerase. O volume final da reação foi de 25  $\mu$ L. As condições da reação consistiram de 3 min a 94° C, seguido de 40 ciclos (1 min a 94° C, 45 s a 53° C e 2 min a 72° C) e um tempo adicional de 10 min a 72° C. Para confirmação da construção pK7F-GmATQ também foram utilizados os oligonucleotídeos 4076-AntiF501 e 4799-PK7FGFPRvs, além dos oligonucleotídeos eGFP SalF e eGFP PstR. As condições de reação foram as mesmas, exceto pelo tempo e temperatura de anelamento (1 min a 55° C). As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador *MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler PTC 2000* e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, Ácido Bórico 0,089 M e EDTA 0,05 M, pH 8,0), e corados com brometo de etídeo 0,1 g. mL<sup>-1</sup>.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados como iniciadores em reações de PCR

Gene	Oligonucleotídeos	Seqüências
<i>GmATQ</i>	4076-AntiF501	5' -CCATGCGCTGTTCTAGGATGG-3'
	4077-AntiR506	5'-GCCCAACTAGAGTCCCCTTCTC-3'
<i>GFP</i>	4799-PK7FGFPRvs	5'-CGCCCTCGCCCTCGCC GGACAC-3'
	eGFP SalF	5' -GTGGTGGTCGACATGCTGAGCAAGGG -3'
	eGFP PstR	5' -GCATGCCTGCAGGTCAGTGGATTTTGG-3'

#### 4.2.4. Expressão do transgene por RT-PCR

##### 4.2.4.1. Extração de RNA total de *Arabidopsis thaliana* transformada com as construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ

O RNA total foi isolado a partir de plântulas e de folhas de *A. thaliana*, as quais foram coletadas separadamente. Para a obtenção do RNA total dos transformantes de *A. thaliana* e da planta selvagem (Col 0), 0,1 g de tecido vegetal foi coletado e macerado em nitrogênio líquido. Este macerado foi homogeneizado com o reagente TRIzol (SIGMA) e mantido sob agitação constante por 5 min, à temperatura ambiente.

Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio. A fase aquosa foi separada da fase orgânica após 3 min de agitação e 15 min de centrifugação a 12.000 x g, a 4° C. À fase aquosa foi adicionado 0,5 mL de isopropanol para precipitação do RNA total. A mistura foi mantida por 10 min, à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada. O precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) (preparado com água livre de RNase) e novamente centrifugado a 7.500 x g por 10 min, a 4° C. O RNA precipitado foi seco à temperatura ambiente, por aproximadamente 10 min, e, em seguida, ressuscitado em 40 µL de água livre de RNase (com DEPC – dietilpirocarbonato). A integridade do RNA total extraído foi analisada em gel de agarose 1%, em NBC 1X, corado com brometo de etídeo 0,1 µg. mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, o RNA foi estocado a – 80° C.

#### **4.2.4.2. RT-PCR de *Arabidopsis thaliana* transformada com as construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ**

Para analisar a expressão do gene *GmTP55* em plantas de *A. thaliana* transformadas foi realizado RT-PCR. Inicialmente, todo o RNA extraído foi quantificado, em espectrofotômetro *DU 650 BECKMAN*, a 260 nm, sendo a concentração do RNA expressa em µg. µL<sup>-1</sup>. Para a reação utilizaram-se 4 µg de RNA total como molde, 1 µM de oligonucleotídeo 4077-AntiR506 e 1 mM de dNTP's. O volume final da reação foi 12 µL. Esta reação foi aquecida e mantida a 65 °C por 5 min. Em seguida, transferiu-se a reação para o gelo e acrescentou-se o tampão da enzima transcriptase reversa 1X (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM, KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen Life Technologies, Inc.) e DTT 9 mM para um volume final de 18 µL. Posteriormente, a reação foi mantida a 37° C por 2 min e depois foi acrescentado 1 µL da enzima M-MLV RT Transcriptase Reversa (Invitrogen Life Technologies, Inc.). Esta mistura foi incubada a 37° C por 4 hs, para síntese de cDNA e posteriormente a enzima foi inativada a 70° C por 15 min.

Para a reação de PCR, foram utilizados 2 µL de cDNA e os oligonucleotídeos específicos do gene *GmTP55* (Tabela 1). As condições de reação foram as seguintes: 3 min a 94° C, seguido de 40 ciclos (1 min a 94° C, 1 min a 53° C e 2 min a 72° C), seguindo 10 min a 72° C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador *MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler PTC 2000* e os produtos da reação foram

analisados em gel de agarose 1% (p/v), em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, Ácido Bórico 0,089 M e EDTA 0,05 M, pH 8,0), e corado com brometo de etídeo 0,1 µg. mL<sup>-1</sup>.

#### **4.2.5. Análise da expressão ectópica da proteína GmTP55 em *Arabidopsis thaliana***

##### **4.2.5.1. Extração de proteína total de *Arabidopsis thaliana* transformada com as construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ**

Proteínas totais foram extraídas a partir de folhas de *A. thaliana* transformadas com as construções pK7-GmATQ e pK7F-GmATQ, além de plantas selvagens (Col 0). Aproximadamente 0,2 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido usando almofariz e pistilo. O macerado foi homogeneizado com a adição de 1 mL de tampão de extração de proteínas totais (0,2 M de NaOH, β-mercaptoetanol 2 % (v/v) e inibidores de proteases - PMSF, thiouréia e benzamidina a 1 mM cada) e posteriormente centrifugado a 6.000 x g, por 5 min, a 4 ° C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2 mL contendo ácido tricloro acético (TCA) 20 % (v/v) e Acetona 80 % (v/v), juntamente com β-mercaptoetanol 0,7 % (v/v). As proteínas totais foram precipitadas após a mistura protéica ser incubada por 1 h no gelo e centrifugada por 18.000 x g, por 30 min, a 4° C. O precipitado foi lavado duas vezes com acetona 100% (v/v) gelada e novamente centrifugado a 18.000 x g, por 5 min, a 4° C. O precipitado protéico foi ressuscitado em 200 µL de tampão de amostra para eletroforese (1X) [glicerol 10 % (v/v), SDS 2,3 % (p/v), azul-de-bromofenol 0,25% (p/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v) e Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8], sonificado, utilizando-se o *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (COLE PARMER), e aquecido por 10 min a 80 °C, para desnaturação protéica, antes da aplicação no gel de poliacrilamida.

##### **4.2.5.2. SDS-PAGE e “Western blot”**

As proteínas totais foram separadas por SDS-PAGE, em minigel, com concentração de acrilamida/bisacrilamida 10% (p/v) (Laemmli, 1970), no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, EDTA 1 mM e SDS 3,5 mM) e voltagem 100V. Após eletroforese, o gel foi revelado em solução corante [metanol 45% (v/v), etanol 9% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue R250 0,01% (p/v)] por 2 hs e em seguida, descorado em solução descorante [metanol 25% (v/v) e ácido acético glacial 7,5%

(v/v)]. Alternativamente, as proteínas separadas em gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o equipamento *Transblot* (BIORAD). A membrana de nitrocelulose foi incubada com o reagente de bloqueio “Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk” (BIORAD) por 1 h, à temperatura ambiente, e lavada com TBS-T [Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 0,015 mM, Tween-20 0,1% (v/v)]. A detecção da proteína GmTP55 foi realizada utilizando-se o anticorpo policlonal de coelhos contra a proteína GmTP55 (diluição 1:1.000). Como segundo anticorpo, foi utilizado o anticorpo comercial de coelho IgG (anti-coelho) (SIGMA), conjugado à enzima fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5.000. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se os substratos BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e NBT (azul-nitro tetrazólio) da GIBCO BRL.

#### **4.2.6. Ensaio de germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* em condições de estresses abiótico *in vitro***

Para simulação de estresse salino *in vitro*, as sementes de *A. thaliana* transformadas (geração T<sub>3</sub>) e as sementes não transformadas (Col 0) foram esterilizadas conforme descrito no item 4.2.2.3. e mantidas em placas contendo meio MS ½ força seletivo sólido (adaptado de Murashige e Skoog, 1962) com concentrações crescentes de NaCl (0 mM; 100 mM; 150 mM; 200 mM) (Huang *et al.*, 2000). Cada tratamento consistiu de 3 repetições com 100 sementes plaqueadas em meio MS ½ força seletivo sólido. As sementes plaqueadas foram incubadas a 4° C, no escuro, por 3 dias e, em seguida, transferidas para uma incubadora a 22° C, na presença de luz branca 2500-lux, com fotoperíodo de 16 h, na qual as plântulas foram mantidas e, após um mês de germinação, contou-se o número de sementes germinadas em condições de estresse para cada conjunto de plantas. As análises foram realizadas avaliando a média do número de sementes germinadas dentro e entre os tratamentos.

#### **4.2.7. Localização subcelular da proteína GmTP55 em plantas de *Arabidopsis thaliana***

As plantas de *A. thaliana* transformadas com a construção pK7F-GmATQ foram utilizadas para verificar a localização subcelular da proteína GmTP55. Foram avaliadas células das plantas transformadas cultivadas em meio MS ½ força seletivo

sem NaCl (adaptado de Murashige & Skoog, 1962) e células das plantas transformadas mantidas em meio MS ½ força seletivo com adição de 100 mM de NaCl, para simulação do estresse salino. Para esta análise em nível celular foram utilizadas folhas e raízes das plantas, cortadas manualmente. Para montagem das lâminas a fresco, as amostras foram imersas em água deionizada e a lamínula foi levemente pressionada sobre elas, para evitar bolhas e retirar o excesso de água. A fluorescência do material foi verificada em microscópio de fluorescência *Olympus BX 60*, com objetiva de 100x e excitação WU (cube U-MWU) com filtro de fluorescência, filtro de barreira BA 420 e espelho de diótroísmo DM400, com o auxílio do Dr. Gilberto Sachetto Martins, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As amostras que apresentaram fluorescência foram analisadas em um microscópio confocal a laser, com o apoio da Dra. Claudine Márcia Carvalho da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As imagens de confocal foram obtidas utilizando-se o sistema *LSM 510 META* invertido (ZEISS) com "argon laser" ou laser de argônio e objetiva de imersão de óleo de 63x1,4. GFP foi detectada com excitação de 488 nm, e sua emissão foi coletada de 500-530 nm. O "píhole" foi fixado fornecendo uma faixa óptica de 1 a 1,5 micrometros. Foram utilizados controles para se evitar a detecção da autofluorescência. As imagens foram processadas utilizando-se o "software LSM image browser 4" (ZEISS).

#### **4.2.8. Análise da superexpressão da proteína GmTP55 quimérica**

##### **4.2.8.1. Obtenção do extrato protéico total**

A superexpressão da proteína quimérica (GmATQ-GFP) foi avaliada nas plantas de *A. thaliana* transformadas com a construção pK7F-GmATQ submetidas ao ensaio de germinação em condições de estresse salino e, posteriormente, analisadas por microscopia confocal. As proteínas totais destas plantas foram extraídas conforme descrito no item 4.2.5.1 O extrato protéico total foi separado por SDS-PAGE com concentração de acrilamida/bisacrilamida 10% (p/v) (Laemmli, 1970), conforme descrito no item 4.2.5.2.

#### 4.2.8.2. “Western blot”

Para a detecção da proteína quimérica, as proteínas separadas eletroforeticamente por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, através do sistema de transferência da BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante, por 1 h a 35 mA. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com o “Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk” (BIORAD) por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com TBS-T [Tris HCL 10 mM, pH 7,6, NaCl 0,015 mM, Tween-20 0,1% (v/v)] três vezes, por 15 min, para lavagem. Para a imunodetecção, foram usados: o anticorpo policlonal contra GmTP55 numa diluição de 1:1.000 e o anticorpo monoclonal comercial contra a proteína GFP (INVITROGEN), numa diluição de 1:10.000. Como segundo anticorpo, foi utilizado o anticorpo comercial de coelho contra IgG conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:5.000), da Sigma. A atividade da enzima fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se os substratos NBT (azul-nitro tetrazolio) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (SIGMA).

#### 4.2.9. Obtenção de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes “knock-out” para o gene *ALDH7B4*

O gene *Ath-ALDH7B4* codifica para uma proteína antiquitina em células de *A. thaliana*. O mutante para este gene, SALK\_143309, foi selecionado a partir da biblioteca de mutantes insercionais do "Salk Institute for Biological Studies" e a seqüência do locus mutado está disponível no ABRC (“*Arabidopsis* Biological Resource Center”). As sementes mutadas de *A. thaliana* obtidas, contendo o gene *Ath-ALDH7B4* mutado, foram esterilizadas, segundo o procedimento descrito no item 4.2.2.3, plaqueadas em meio MS ½ força (adaptado de Murashige e Skoog, 1962), sem antibiótico, e, posteriormente, incubadas a 4° C, por 3 dias, no escuro. Após este período, as placas foram expostas à luz, numa incubadora a 22° C, com fotoperíodo de 16 hs, onde foram mantidas por 20 dias e transplantadas para vasos plásticos contendo uma mistura de terra e substrato (1:1). Para seleção das plantas mutantes em homozigose, as folhas foram coletadas e o DNA genômico de cada uma delas foi extraído separadamente segundo o item 4.2.3.1. A genotipagem das plantas mutantes de *A. thaliana* é baseada no número e no tamanho das bandas amplificadas por PCR. Sendo assim, a genotipagem do mutante SALK\_143309 foi realizada por PCR

utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene mutado Rv143309RP (5'-CAATCCACAAACAAACCACC-3', região flanqueadora direita do T-DNA) e Fw143309LP (5'-TCAACACAATCAGATCATGCG-3', região flanqueadora esquerda do T-DNA) e um oligonucleotídeo (senso) específico para o T-DNA SALK LB1-18. Esta reação foi realizada conforme descrito no item 4.2.3.2., com o uso simultâneo dos três oligonucleotídeos na mesma reação.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise molecular da proteína GmTP55 *in vitro*

#### 5.1.1. Análise da seqüência de aminoácidos da proteína GmTP55

A proteína GmTP55 (*Glycine max* Turgor Protein) é um membro da superfamília das Aldeído Desidrogenases (Rodrigues *et al.*, 2006) e a partir da comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas da família ALDH, usando o programa ClustalW, a proteína GmTP55 foi agrupada próxima às Aldeído Desidrogenases da família ALDH7, mais especificamente da subfamília ALDH7B (Figura 1). As proteínas desta família apresentam uma estrutura primária conservada em diversos organismos, de levedura a mamíferos (Yoshida *et al.*, 1998; Navarro-Aviño *et al.*, 1999) sendo, por isso, denominadas antiqutinas (ATQ) (Lee *et al.*, 1994).

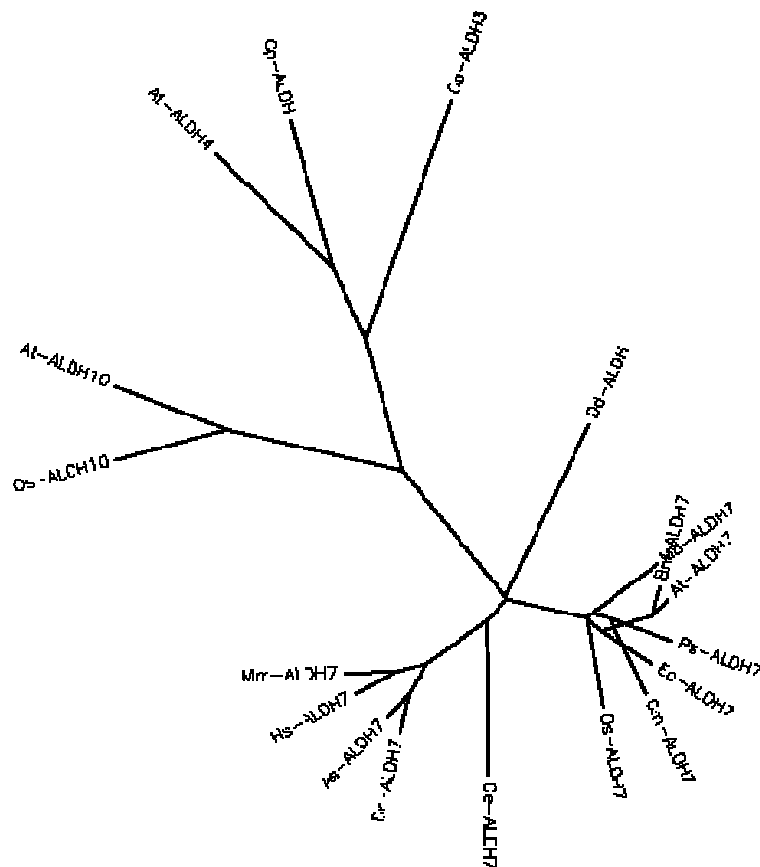


Figura 1 - Análise filogenética baseada no alinhamento de seqüências de aminoácidos das proteínas da superfamília ALDH. Foram analisadas as seqüências de proteínas de diferentes famílias de ALDHs, obtidas a partir de organismos distintos, tais como Os-ALDH3, de *Oriza sativa* (acesso AAD35089); Cp-ALDH3, de *Craterostigma plantagineum* (acesso Q8VXQ2); At-ALDH4, de *Arabidopssia thaliana* (acesso AAG30995.1); Dd-ALDH, de *Dictyostelium discoideum* (acesso AAM33716); At-ALDH10, de *A. thaliana* (acesso Q9S795); Os-ADLH10, de *Oryza sativa* (acesso O24174); Dr-ALDH7, de *Danio rerio* (acesso NP\_997889); Ac-ALDH7, de *Acanthopagrus schlegelii* (acesso AAX54912); Hs-ALDH7, de *Homo sapiens* (acesso NP\_001173); Mm-ALDH7, de *Mus musculus* (acesso NP\_613066); Os-ALDH7, de *Oryza sativa* (acesso AAG43027); At-ALDH7, de *A. thaliana* (acesso NP\_849807); Ec-ALDH7, de *Euphorbia characias* (acesso AAX09646); Ps-ALDH7, de *Pisum sativum* (acesso P25795); Ce-ALDH7, de *Caenorhabditis elegans* (acesso P46562); Md-ALDH7, de *Malus domestica* (acesso Q9ZPB7); Bn-ALDH7, de *Brassica napus* (acesso Q41247) e Gm-ALDH7, de *Glycine max* (acesso AY250704).

A seqüência de aminoácidos deduzida da antiqutina de soja (*Glycine max*), GmTP55 (acesso no GenBank AY250704) é composta por 510 aminoácidos, correspondente à tradução do quadro aberto de leitura, dos quais resíduos apolares conservados compõem uma ampla região hidrofóbica (aminoácidos entre as posições 155 e 208) no meio da proteína (Figura 2). Os resíduos hidrofóbicos de asparagina (posição 166) e prolina (posição 168) são altamente conservados nas estruturas primárias das ATQ e estão presentes na GmTP55 (Figura 2). Estes resíduos estão inseridos em um possível domínio transmembrana (aminoácidos entre as posições 155 e 208), o que poderia sugerir uma atividade transportadora para estas proteínas (Lee *et al.*,

1994; Tang *et al.*, 2002). Entretanto, estas regiões hidrofóbicas identificadas em outras proteínas ALDHs cristalizadas, estão inseridas no domínio de ligação ao NAD(P)<sup>+</sup> (aminoácidos entre as posições 150-208) (Sternmetz, *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1998;).

```

1  MGSNDNHQNLEFLKEIGLSSNIGSYINGQWKATGSSVTSVNPSSNNQSI AQ
51  VTEATLQDFEGLRACSEAAKTWMTIPAPKRGEIVRQIGEALRAKLDPLG
101 RLVSLEMGKILPEGIGEVQEIIDMCNYGVGLSRQLNGSIIIPSERPDHMMF
151 EVWNPLGIVGVISAFNFPCAVLGWNACIALVCGNCVVKGAPTPLITIA
201 VTKLVAEVLERNKLPGAIFTSFCGGADIGQAIKDTRIPLVSFTGSSKVG
251 LMVQQTVNERFVKCLLELSGNNAIIVMDDADSNWLYVYFGCCCGSTGQPV
301 YTWPCRRLFLHESIYTDVLDQLVEVYKQVKTGNPLEKGTLVGPLHTRTSV
351 ENFQKGISVIKSQGGKILTGGSVLESGGNFVQPTIVEISPDAPVVKEELF
401 GPVLYVMKFQTLDEAIALNNSVPQGLSSSIFTQRPGTIFKWIGPRGSDCG
451 IVNANIPTNGAEIGGAFGGEKATGGGREAGSDSWKQYMRSTCTINYGSE
501 LPLAQGINFG

```

Figura 2 - Seqüência de aminoácidos da proteína GmTP55. A região hidrofóbica está destacada em laranja (posição 155-208). Os domínios conservados característicos de aldeído desidrogenases estão demonstrados em azul (posição 209-218 e 265-272). Os resíduos de aminoácidos invariáveis na estrutura das antiqúitinas estão indicados em verde. Os resíduos conservados associados à atividade catalítica das ALDH estão destacados em vermelho. Os demais resíduos altamente conservados nos membros da superfamília ALDH estão destacados em negrito e sublinhados.

Resíduos conservados funcionalmente importantes para a atividade catalítica de ALDH estão presentes na estrutura primária deduzida de GmTP55 e correspondem à Gly-190 e a Pro-343, ambos sítios de ligação e de interação da proteína com a coenzima NAD(P)<sup>+</sup>, o resíduo de Gly-245, necessário para promover o posicionamento correto de resíduos de cisteínas conservados e o Glu-210, importante porque está inserido no motivo conservado (aminoácidos das posições 209-218), relacionado à atividade catalítica de oxidação de aldeídos das proteínas da superfamília ALDH (Hurley & Weiner, 1999; Perozich *et al.*, 1999b). A análise da seqüência de aminoácidos da GmTP55 possibilitou, ainda, a identificação de 3 resíduos de aminoácidos invariáveis presentes nas estruturas primárias das ALDHs (Gly-297, Glu-398 e Phe-400) (Figura 2), relacionados com a possível atividade catalítica destas enzimas (Perozich *et al.*, 1999a). As existências destes resíduos e de um domínio característico conservado de Aldeído Desidrogenases (aminoácidos das posições 265-

272) (Guerrero *et al.*, 1990) indicam que a proteína GmTP55 possivelmente atua como uma enzima, com atividade catalítica de oxidação de aldeídos nas células vegetais.

O alinhamento da seqüência de GmTP55 com as seqüências de proteínas antiquitinas de outros organismos (*Pisum sativum*, *A. thaliana*, *Oriza sativa*, *Danio rerio*, *Acanthopagrus schlegeli*, *Homo sapiens* e *Mus musculus*), Figura 3, demonstrou que a antiquitina de soja, GmTP55, apresenta maior homologia com as antiquitinas vegetais, principalmente com a antiquitina 26g de ervilha (*Pisum sativum*), também pertencente à família ALDH7B (Guerrero *et al.*, 1997), com a qual o grau de similaridade foi de 82% (Figura 3). Entretanto, a homologia entre a GmTP55 e as demais proteínas da ATQs analisadas também foi alta. Através da comparação das seqüências das ATQs alinhadas na Figura 3, foram identificados 19 resíduos de aminoácidos conservados envolvidos na atividade catalítica e na estabilidade das ALDHs, reforçando a hipótese de que a GmTP55 tenha ação catalítica sobre moléculas de aldeídos.

### **5.1.2 Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da proteína GmTP55**

A proteína GmTP55 foi obtida através de um sistema de expressão heterólogo procarioto, no qual células de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLys foram transformadas com a construção pHis-GmTP55. A proteína GmTP55 recombinante, sem o peptídeo sinal e fusionada à cauda de histidina, de massa molecular de cerca de 45 kDa, foi eficientemente expressa em grande quantidade, após indução por 2 hs, a 28° C, Figura 4. Apesar da proteína superexpressa se acumular principalmente em corpos de inclusão, na fração insolúvel do extrato celular (Figura 4), também foi identificada uma quantidade significativa dessas proteínas na fração solúvel do extrato protéico (Figura 4).

```

Gm-ALDH7  MC--SDNHQNLFLKREICLGS SMI GSYINGQMKATGSSVTSVNPSNMQSLAQVT EAT LQD FEEGLRACS EAAKTWMTI PA 78
Ps-ALDH7  MC--SD--SNNLGF LKREICLGA TMI GSF INGQMKANGPTVHESVNPS TNQVLA SVT EAT LDD YEE GLRASS EAAKTWRTVPA 77
At-ALDH7  MC--SANNYEYFLS EICLTS HNL GSYVAGKQANG PLVSTLNPANMQ PLAQVVRAS LED YBQGLRACE EAAKTWMTI PA 77
Os-ALDH7  MC--SFARKHQFLA ELGLAP RNP GSFACGAGCGSGPVVTS TNPNTNMQVIA EVVVRAS ARE YEE GMRACDYDAARTWMAI PA 78
Dr-ALDH7  MSTLLINQPKYWNLKEKELGKEDND GYYN-GSMGCGC EYVTSYCPANNE PLAEVVRQAT IAE YEE TIQKALDAMKRWADVPA 79
As-ALDH7  MSGLLINQPKYSWLKELGLSEDPN GYYN-GSMGCGC EYVTSYCPANNE PLAEVVRQAT IAE YEE TVQKTRRAMKRWADI PA 79
Hs-ALDH7  MSTLLINQPKYAWLKEKELGRE ENE GYYN-GSMGCGC EYVTSYCPANNE PLAEVVRQAS VAD YEE TVKFKAR RAMKRWADI PA 79
Mm-ALDH7  MSTLLIHPQYAWLQDLGLREDNE GYYN-GSMGCGC EYVTSYCPANNE PLAEVVRQAS LKDYEE TIGKARKAMRWADI PA 79
      * * * * *
Gm-ALDH7  PRRCEIVRQIGRALRAKLDPL GRLVSL EMCKILPEGICEVQEE IIDMCMYCVGGLS RQLNGS IIPSERPDHMMF EYVNPPLGI 158
Ps-ALDH7  PRRCEIVRQIGDALRAKLDPL GRLVAL EMCKILAEGICEVQEE IIDMCD YSVGLS RQLNGS IIPSERPEHMMF EYVNPPLGI 157
At-ALDH7  PRRCDIVRQIGDALRSKLDYL GRLLSL EMCKILAEGICEVQEEVIDMCD FAVGLS RQLNGS VIPSERPNHML EYVNPPLGI 157
Os-ALDH7  PRRCEIVRQIGDALRAKLDHHL GRLVSL EMCKILPEGICEVQEE IIDMCD YAVGLS RQLNGS IIPSERPNHMM EYVNPPLGI 158
Dr-ALDH7  PRRCEIVRQIGRALRKKIKAL CSLMSL EMCKYVVEGVEVQEE YVD VCD YAVGLS RMI GCP IIPSERPCHALI EQVNPVGL 159
As-ALDH7  PRRCEIVRQIGDALRKKIKVLSL CSLVSL EMCKYVVEGVEVQEE YVD VCD YAVGLS RMI GCP IIPSERPCHALI EQVNPVGL 159
Hs-ALDH7  PRRCEIVRQIGDALRKKIKVLSL CSLVSL EMCKYVVEGVEVQEE YVD VCD YAVGLS RMI GCP IIPSERPCHALI EQVNPVGL 159
Mm-ALDH7  PRRCEIVRQIGDALRKKIKVLSL CSLVSL EMCKYVVEGVEVQEE YVD VCD YAVGLS RMI GCP IIPSERPCHALI EQVNPVGL 159
      * * * * *
Gm-ALDH7  VGVISA FNPFCAVLGGWNAICLALVCGNCVWVNGEAPTT PLITIAVTRKILVAEVLERNKLP GAI FTS FCGGAD IGQALARDTRI 238
Ps-ALDH7  VGVITAFNFPFCAVLGGWNAICLALVCGNIVWVNGEAPTT PLITIAVTRKILIAEVFERNNLPGAI FTALCGGAD IGHAIARDTRI 237
At-ALDH7  VGVITAFNFPFCAVLGGWNAICLALVCGNCVWVNGEAPTT PLITIAVTRKILVAEVLERNKLP GAI FTAMCGGAE ICEALARDTRI 237
Os-ALDH7  VGVITAFNFPFCAVLGGWNAICLALVCGNCVWVNGEAPTT PLITIAVTRKILVAEVLERNKLP GSI FTAFCGGAD IGQALS LDTRI 238
Dr-ALDH7  VGIITAFNFPVAVYCGWNNALALITCGNACLWNGEAPTT PLISVAVTRKILVAEVL EONHLP GAI CSMTCCGAD IGMAMARDE RV 239
As-ALDH7  VGIITAFNFPVAVYCGWNNALALITCGNVCWNGEAPTT PLISVAVTRKILVAEVL EONHLP GAI CSMTCCGAD IGTAMARDE RV 239
Hs-ALDH7  VGIITAFNFPVAVYCGWNNALALITCGNVCWNGEAPTT SLISVAVTRKILVAEVL EDNLP GAI CSLTCGGAD IGTAMARDE RV 239
Mm-ALDH7  VGIITAFNFPVAVYCGWNNALALITCGNVCWNGEAPTT SLISVAVTRKILVAEVL EDNLP GAI CSLVCGGAD IGTAMARDE RV 239
      * * * * *
Gm-ALDH7  PLVSFTGSSKVG LMWQQT VNE RFGKCLLEL SCNNAI IVMDADD SNNWLY-VYFGCCCGSGTGQPVYTWPCRRLF LHESTIYTD 317
Ps-ALDH7  PLVSFTGSSKVGALVQQT VSG RFGKTLLEL SCNNAI IVMDADD IIT LAWRSI FFAAVGTAG QBC TT--CRRLYLHE SVYAN 315
At-ALDH7  PLVSFTGSSRFGSMVQQT VNA RSGKTLLEL SCNNAI IVMDADD IQ LAA RSV LFAAVGTAG QBC TT--CRRLLEH SVYDK 315
Os-ALDH7  PLVSFTGSTRKVG LMWQQQ VNA RFGKCLLEL SCNNAI IVMDADD IQ LAWRSV LFAAVGTAG QBC TT--CRRLLEH STYRT 316
Dr-ALDH7  GLLSFTGSTHVGKQVAMHWQERFGKQLLEL SCNNAI IVF EDADLS LWVPSAVFA SVGTAG QBC TT--TRRLMLHE SHDE 317
As-ALDH7  DLLSFTGSTHVGKQVAMHWQERFGKQLLEL SCNNAI IVF EDADLNLWVPSAVFA SVGTAG QBC TT--TRRLMLHE SHDE 317
Hs-ALDH7  NLLSFTGSTQVCKQVAMHWQERFGKSLLEL SCNNAI IAF EDADLS LWVPSALFAAVGTAG QBC TT--ARLFLHE SHDE 317
Mm-ALDH7  NLLSFTGSTQVCKQVAMHWQERFGKSLLEL SCNNAI IAF EDADLS LWVPSVLF AAVGTAG--QBC TT--VRLFLHE SHNE 317
      * * * * *
Gm-ALDH7  VLDQLVEVYKQVKTGNPL EKC TLVGLLHTRTSV ENF QRCISV IKS QGCKIL TCCSVL ESGCNFVQP TIVE-I SPDAPVVK 396
Ps-ALDH7  VLEQLTALYKQVKTGNPL EEC TLVGLLHTRSAVENF RNC ISA IKS QGCKIV TCCSVL ESEGNFVVP TIVE-I SADAAVVK 394
At-ALDH7  VLEQLLTSYKQVKTGNPL EKC TLLGLLHTRP ESKRNF EKCIEV IKS QGCKIL TCGRAVECE GNFVPE TII E-I SADAAVVK 394
Os-ALDH7  FLDQLVEVYKQVRIGDPL EKC TLLGLLHTRPASRDAF LKCIQT IRS QGCKIL YCCSAI ESEGNFVQP TIVE-I SPSPAVVR 395
Dr-ALDH7  VVE RIAKAYKQVRIGDPWD PNTLYGLLHTRQAVQY LAA IREQ ARQ QCG TLVCGCKIMDRP GNYVEP TII TGLPHNASIVH 397
As-ALDH7  VVE RIAKAYKQVRIGDPWD PNTLYGLLHTRQAVQY LAA IREQ ARQ QCG TLVCGCKIMDRP GNYVEP TII TGLPHNASIVH 397
Hs-ALDH7  VVNRLKAYAQI RVCNPD PNVLYGLLHTRQAVSMP LGA VEE ARK ECG TVVYCGKIMDRP GNYVEP TIV TGLCHDASTAH 397
Mm-ALDH7  VVDRLRSAYSQI RVCNPD PNVLYGLLHTRQAVSMP VRA VEE ARK QCG TVVYCGKIMDRP GNYVEP TIV TGLAHDAPIVH 397
      * * * * *
Gm-ALDH7  EELFEPVLYVVKFQT LDEALA LNNVSPQCL SSS IFTQRP GTI FRWIGP RGSDDG IVNANI PTNGAR ICGAFCGCKATCGC 476
Ps-ALDH7  EELFEPVLYVVKFRD LREALA LNNVSPQCL SSS IFTQRP STI FRWIGP RGSDDG IVNANI PTNGAR ICGAFCGCKATCGC 474
At-ALDH7  EELFEPVLYVVKFKS FGEAVA LNNVSPQCL SSS IFTQRP RNI FRWIGP RGSDDG IVNANI PTNGAR ICGAFCGCKATCGC 474
Os-ALDH7  EELFEPVLYVVKVQMLKRAVE LNNVSPQCL SSS IFTQRP DII FRWIGP RGSDDG IVNANI PTNGAR ICGAFCGCKATCGC 475
Dr-ALDH7  TET FVP ILYVVKFKT EEEAFS WNNVVKQCL SSS IFTQDMGRV FRWIGP RGSDDG IVNANI PTS GAR ICGAFCGCKHTGCG 477
As-ALDH7  TET FVP ILYVVKFKT EEEAFS WNNVVKQCL SSS IFTQDLGRV FRWIGP RGSDDG IVNANI PTS GAR ICGAFCGCKHTGCG 477
Hs-ALDH7  TET FEP ILYVVKFRM EEEVFA WNNVVKQCL SSS IFTQDLGRI FRWIGP RGSDDG IVNANI PTS GAR ICGAFCGCKHTGCG 477
Mm-ALDH7  QET FEP ILYVVKFQD EEEVFE WNNVVKQCL SSS IFTQDLGRI FRWIGP RGSDDG IVNANI PTS GAR ICGAFCGCKHTGCG 477
      * * * * *
Gm-ALDH7  REACSD SWKQYMRBS TCT INY GSE LPLAQC INF G 510
Ps-ALDH7  REACSD SWKQYMRBS TCT INY GSE LPLAQC INF G 508
At-ALDH7  REACSD SWKQYMRBS TCT INY GSE LPLAQC INF G 508
Os-ALDH7  REACSD SWKQYMRBS TCT INY GSE LPLAQC INF G 509
Dr-ALDH7  RES CSD SWKQYMRBS TCT INY SKD LPLAQC IKF E 511
As-ALDH7  RES CSD SWKQYMRBS TCT INY SKD LPLAQC IKF E 511
Hs-ALDH7  RES CSD SWKQYMRBS TCT INY SKD LPLAQC IKF Q 511
Mm-ALDH7  RES CSD SWKQYMRBS TCT INY STS LPLAQC IKF Q 511
      * * * * *

```

Figura 3 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteínas antiqutinas da família ALDH7A. As seqüências das proteínas Gm-ALDH7 (*Glycine max* ALDH7, acesso AY250704), Ps-ALDH7 (*Pisum sativum* ALDH7, acesso P25795), Os-ALDH7 (*Oryza sativa* ALDH7, acesso AAG43027), At-ALDH7 (*A. thaliana* ALDH7, acesso NP\_849807), Dr-ALDH7 (*Danio rerio* ALDH7, acesso NP\_997889), Ac-ALDH7 (*Acanthopagrus schlegelii* ALDH7, acesso AAX54912); Hs-ALDH7 (*Homo sapiens* ALDH7, acesso NP\_001173), Mm-ALDH7 (*Mus musculus* ALDH7, acesso NP\_613066) foram alinhadas através do programa clustralW e as seqüências de aminoácidos das antiqutinas analisadas foram obtidas no GeneBank. A região hidrofóbica está destacada em laranja (coordenadas 155-208). Os domínios conservados característicos de aldeído desidrogenases estão demonstrados em azul (posição 209-218 e 265-272). Os resíduos de aminoácidos invariáveis na estrutura das antiqutinas estão indicados em verde. Os resíduos conservados associados à atividade catalítica das ALDH estão destacados em vermelho. Os demais resíduos altamente conservados nos membros da superfamília ALDH estão destacados em negrito e indicados com \*.

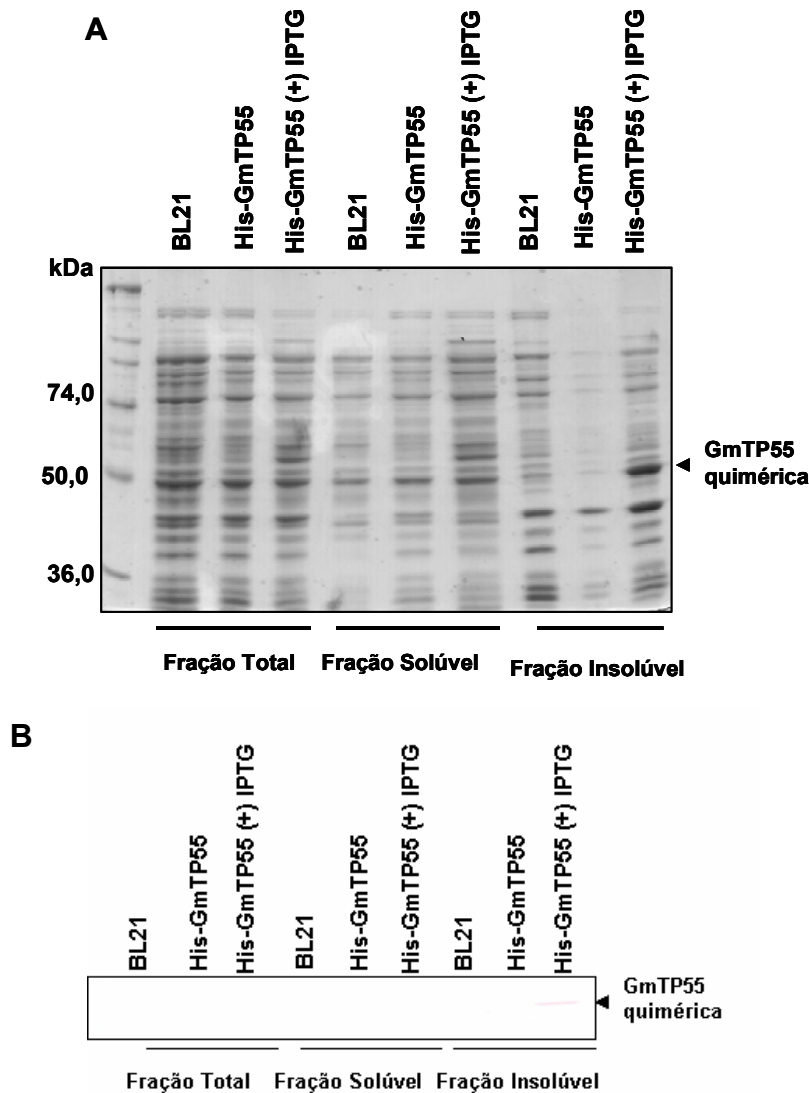


Figura 4 - Expressão da proteína GmTP55 em células de *Escherichia coli* BL(21)DE3 transformadas com a construção pHis-GmTP55. (A) Fracionamento em SDS-PAGE dos extratos total, solúvel e insolúvel e coloração com “Coomassie Brilliant Blue R-250”. (B) “Western blot” da indução, com IPTG, da proteína GmTP55 em *E. coli* transformada. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e reveladas com anticorpo monoclonal contra cauda de His. As células de *E. coli* não transformadas, indicadas como BL21, e as células transformadas com o clone pHis-GmTP55 mas não induzidas com IPTG, indicada com His-GmTP55, são controles negativos.

A proteína GmTP55 fusionada à seqüência de histidina na região N-terminal foi purificada (Figura 5) utilizando-se a resina Ni-NTA. Foram purificadas, separadamente, as proteínas recombinantes presentes na fração solúvel (Figura 5A) e insolúvel do extrato protéico celular bacteriano (Figura 5B). As proteínas recombinantes expressas em corpos de inclusão, presentes na fração insolúvel, foram purificadas na presença de 8 M de uréia para que fossem solubilizadas. O sistema de expressão procarioto possibilitou, em média, a obtenção de 0,40 mg da proteína

recombinante purificada da fração solúvel e 0,67 mg da proteína His-GmTP55 purificada da fração insolúvel, por litro de cultura celular induzida, sendo no total induzidos 8 litros de cultura. Apesar da purificação ter sido realizada de acordo com as recomendações do fabricante (QIAGEN), alguns contaminantes, de massa molecular na faixa de 70-80 kDa, foram co-eluídas na fração da proteína recombinante purificada da fração solúvel. Estes contaminantes podem corresponder as proteínas da bactéria ligadas à proteína recombinante His-GmTP55 ou a proteínas contendo uma seqüência rica em histidinas.

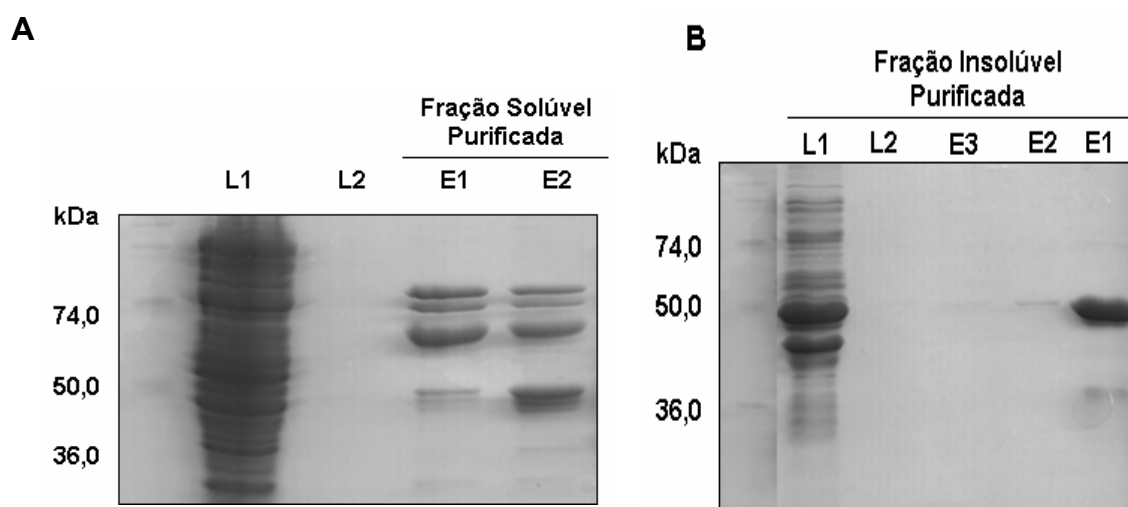


Figura 5 - Purificação da proteína recombinante GmTP55. (A) Purificação da proteína GmTP55 a partir do extrato protéico solúvel, em condições nativas. (B) Purificação da proteína GmTP55 a partir do extrato protéico solúvel, em condições desnaturantes. L1 - é a fração de proteínas não ligadas à resina de Ni-NTA, L2 - é a segunda lavagem da resina. E1 e E2 são, respectivamente, primeiras e segundas eluições. O marcador de peso molecular utilizado foi o “Broad Range” e os valores de massa molecular estão indicados à esquerda, em kDa.

Para caracterizar bioquimicamente a proteína GmTP55, foram realizados ensaios de atividade enzimática, nos quais diversos aldeídos, com funções fisiológicas distintas, foram testados como substratos, utilizando-se o NAD<sup>+</sup> como co-enzima, pois este parece ser a co-enzima preferencial para as enzimas ALDHs (Kirch *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2003). A atividade da enzima no extrato protéico de *E. coli*, induzidas com IPTG foi analisada utilizando-se diferentes aldeídos como substratos. Dentre os aldeídos testados, o propionaldeído foi aquele que proporcionou maior atividade enzimática específica (Figura 6 e anexo, Tabela 1), embora o acetaldeído também tenha resultado numa alta atividade específica da GmTP55 recombinante. Os outros aldeídos testados, o gama-aminobutiraldeído, formaldeído e butiraldeído, também foram oxidados pela enzima

recombinante do extrato protéico total de *E. coli* transformada, porém em uma menor intensidade. O extrato total de células de BL21(DE3) pLys transformada com o vetor pET16b vazio e células transformadas com a construção pHis-GmTP55, porém não induzidas, não demonstrou nenhuma atividades sobre os aldeídos utilizados como substratos nestes ensaios.

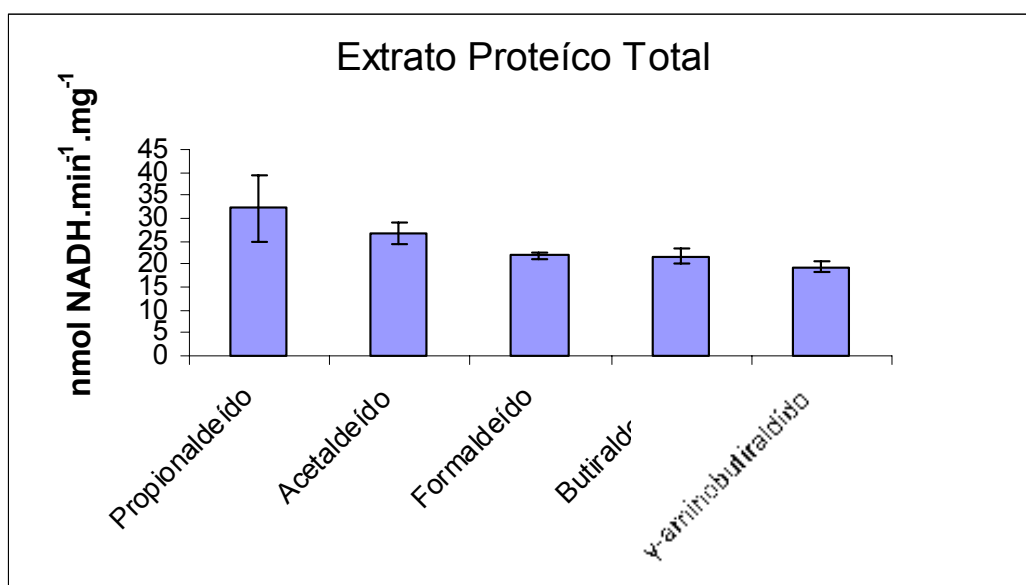


Figura 6 - Atividade específica da enzima recombinante GmTP55 no extrato total protéico de células de *Escherichia coli* induzidas com IPTG. No eixo X estão representados os aldeídos utilizados como substrato. No eixo Y está representada a atividade da proteína em nmol.NADH . min<sup>-1</sup> . mg<sup>-1</sup> de proteína.

Para testar a atividade da proteína nativa, purificada da fração solúvel, e da renaturada, purificada da fração insolúvel do extrato protéico total, os mesmos aldeídos anteriormente citados foram utilizados como substratos. A proteína GmTP55 recombinante nativa purificada exibiu atividade específica catalítica semelhante à do extrato protéico total bacteriano induzido, exceto com o butiraldeído e o benzaldeído, os quais não foram substratos para a GmTP55 purificada (Figura 7 e anexo, Tabela 2). A atividade da proteína recombinante purificada foi maior utilizando-se o propionaldeído como substrato, na presença do NAD<sup>+</sup>. O formaldeído, gama-aminobutiraldeído e o acetaldeído também foram substratos para a enzima GmTP55 recombinante purificada. A proteína recombinante renaturada também apresentou atividade sobre alguns dos aldeídos testados como substrato (acetaldeído, benzaldeído e butiraldeído). Porém esta atividade foi muito baixa quando comparada às demais (dados não mostrados),

provavelmente porque, durante o processo de renaturação, a proteína tenha adquirido uma conformação não nativa.

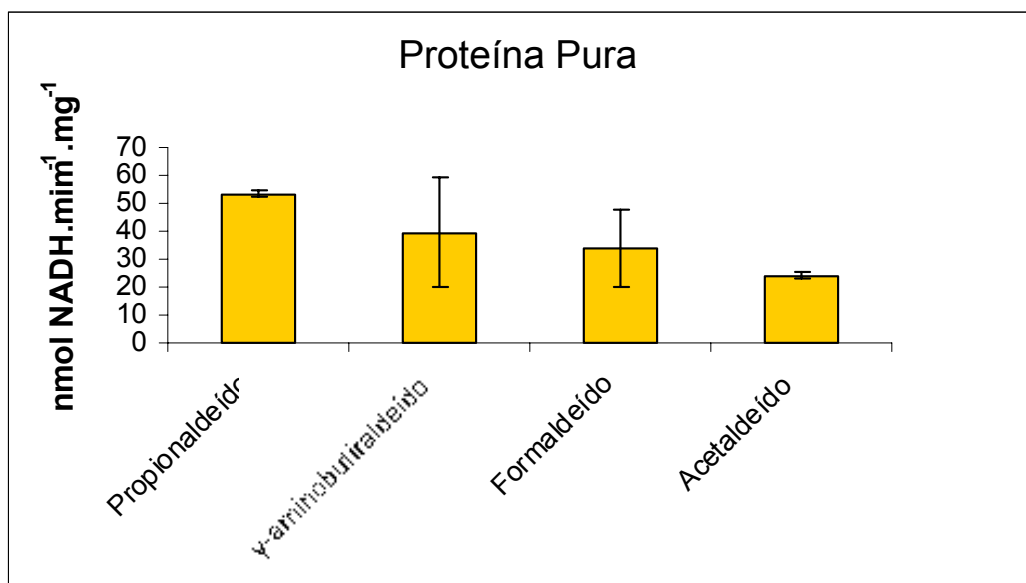


Figura 7 - Atividade específica da enzima recombinante GmTP55, purificada da fração solúvel do extrato total bacteriano induzido com IPTG. No eixo X estão representados os aldeídos utilizados como substrato. No eixo Y está representada a atividade da proteína em nmol NADH . min<sup>-1</sup> . mg<sup>-1</sup> de proteína.

A diferença de especificidade apresentada pela enzima purificada com relação ao extrato protéico total pode ser devido à baixa concentração da GmTP55 recombinante purificada, quando comparada com a concentração desta no extrato protéico total induzido, pois as atividades enzimáticas obtidas demonstram uma alta concentração de proteínas GmTP55 superexpressas no extrato protéico celular induzido. A purificação também pode influenciar na atividade enzimática da proteína recombinante purificada uma vez que, durante o processo, moléculas essenciais para estabilidade e atividade enzimática podem ser eliminadas.

Devido à menor estabilidade e concentração da proteína GmTP55 purificada da fração solúvel, os parâmetros cinéticos desta proteína recombinante foram determinados utilizando-se o extrato protéico total de células de *E. coli* transformadas e induzidas com IPTG. Os valores aparentes de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram determinados para o propionaldeído, gama-aminobutiraldeído e formaldeído (Tabela 2), uma vez que estes aldeídos foram mais eficientemente oxidados pela proteína recombinante. A proteína recombinante, do extrato, oxidou o propionaldeído, o gama-aminobutiraldeído e o formaldeído com valores de  $K_m$  aparente de 1,25, 0,26 e 0,34 mM, respectivamente.

Estes valores demonstram que a enzima GmTP55 recombinante, presente no extrato protéico total de *E. coli*, tem maior afinidade pelos gama-aminobutiraleído e para o formaldeído, quando comparado ao propionaldeído, que é cerca de cinco vezes menor. Estes dados são confirmados pela determinação de valores da eficiência catalítica (Tabela 2), sendo que  $V_{max}/K_m$  do propionaldeído foi cerca de 3-4 vezes menor quando comparada com a do gama-aminobutiraleído e a do formaldeído. Apesar de alto, o  $K_m$  para o propionaldeído, está em conformidade com os valores de  $K_m$  determinados para outras antiquitinas da família ALDH7A (Tang *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003).

**Tabela 2 – Parâmetros cinéticos da proteína recombinante GmTP55 presente na fração total**

Substratos Variados	Substratos constantes	$K_m$ (app) [mM]	$V_{max}$ [nmol NADH X ml <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup> ]	$V_{max}/K_m$ (app) <sup>b</sup>
Formaldeído <sup>a</sup>	NAD <sup>+</sup>	0,3491	16,8763	48,34
γ-Aminobutiraleído <sup>a</sup>	NAD <sup>+</sup>	0,2624	15,8918	60,56
Propionaldeído <sup>a</sup>	NAD <sup>+</sup>	1,2593	20,0608	15,94

As atividades enzimáticas foram medidas no extrato de *Escherichia coli* transformada.

<sup>a</sup> 1mM a 32 mM; <sup>b</sup> Eficiência catalítica foi expressa como  $V_{max}/K_m$ (app) X 10<sup>4</sup>

Os dados cinéticos obtidos demonstram que a GmTP55 atua fortemente sobre aldeídos de cadeia curta, tais como o gama-butiraleído e o formaldeído. Além disso, os dados sugerem que estes aldeídos podem ser substratos fisiológicos para a GmTP55, visto que plantas transgênicas de tabaco, superexpressando esta proteína, foram mais tolerantes ao estresse oxidativo (Rodrigues *et al.*, 2006).

## 5.2. Análise da expressão e propriedades funcionais da proteína GmTP55 em plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas

### 5.2.1. Obtenção de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando a proteína GmTP55

A construção pK7F-GmATQ (Figura 8A), a qual contém o cDNA de GmATQ inserido no vetor binário de expressão de planta pK7FWG2, foi utilizada para transformar plantas de *A. thaliana* (ecotipo Col 0), através do método mergulhia floral

(Clough & Bent, 1998). Os transformantes independentes foram selecionados por PCR (Figura 9), a partir das sementes T1 germinadas, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *GmATQ* (Figura 9A), cujo amplicon foi de 0,5 kb, oligonucleotídeos específico para o gene *GFP* (Figura 9B), que amplificaram um fragmento de 1 kb e oligonucleotídeos para o gene quimérico *GmATQ-GFP* (Figura 9C), os quais amplificaram um fragmento de 1,2 kb. Foram confirmados três transformantes independentes (GmATQ1-GFP, GmATQ4-GFP; GmATQ8-GFP), que permitiram a expressão ectópica da proteína quimérica GmATQ-GFP, sob controle transcricional do promotor CaMV35S. Das plantas transgênicas de *A. thaliana* transformadas com a construção pK7-GmATQ (Figura 9B) (Rodrigues *et al.*, 2006), na qual o gene *GmATQ* está sob controle do promotor CaMV35S, foram selecionados dois transformantes independentes (GmATQ8 e GmATQ12), os quais foram confirmados por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *GmATQ*, cujo fragmento de DNA amplificado corresponde a 0,5 Kb.

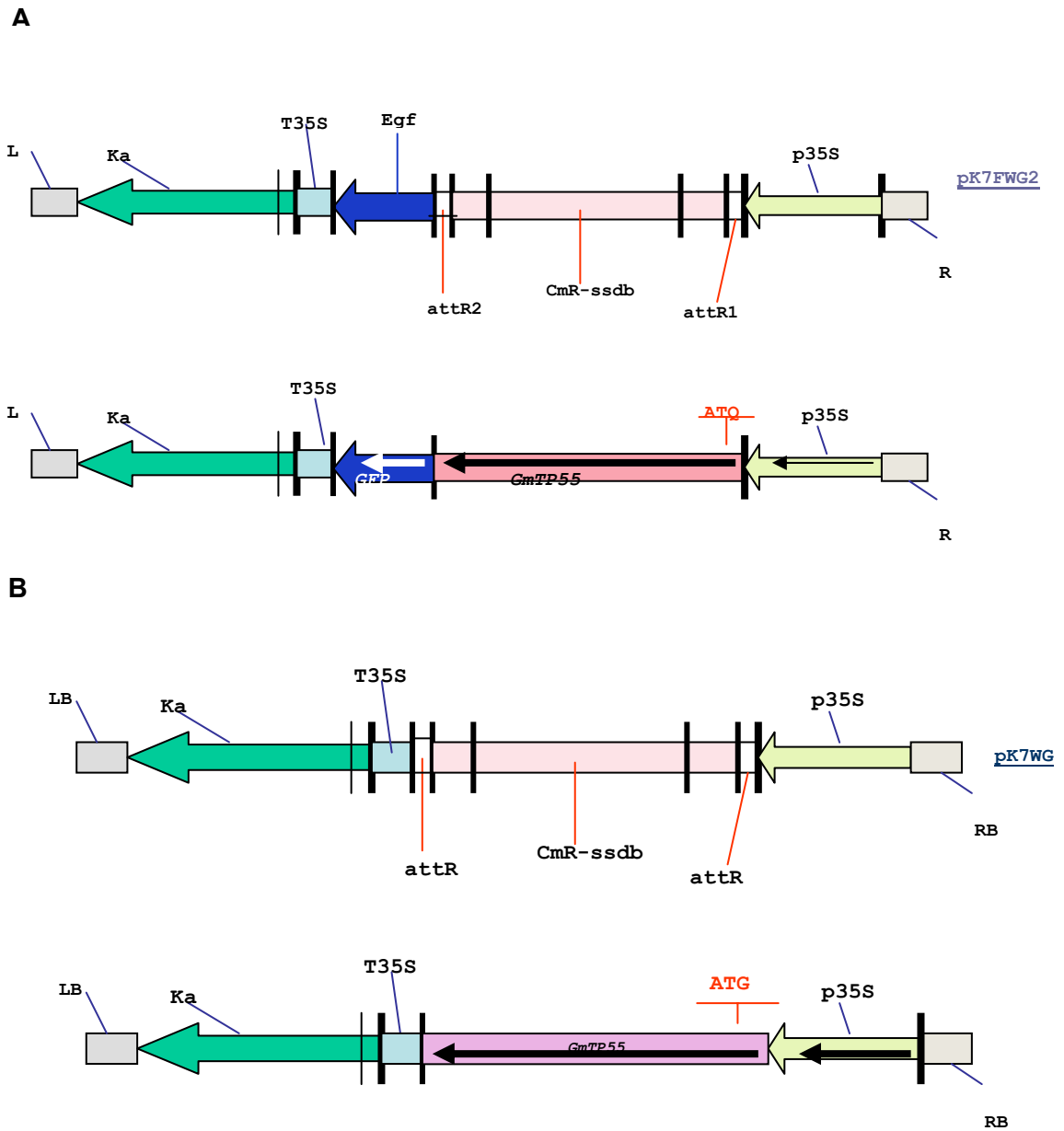


Figura 8 - Diagrama esquemático da construção quimérica do homólogo da antiqutina de soja, *GmATQ*, usadas para transformar *A. thaliana*. (A) cDNA de *GmATQ* inserido no sentido senso no vetor de expressão em plantas, pK7FWG2 por recombinação obtendo-se o clone pK7F-GmATQ (B) A seqüência foi inserida no vetor binário, de transformação de planta, pK7WG2, resultando em pK7-GmATQ. Em ambos o cDNA de *GmATQ* substituiu o gene *CmR-ccdB* ficando sob o controle do promotor CaMV35S. LB e RB correspondem às bordas esquerda e direita do T-DNA. As posições de alguns sítios de restrição são indicadas. Kan representa o gene *nptII* que confere resistência a kanamicina.

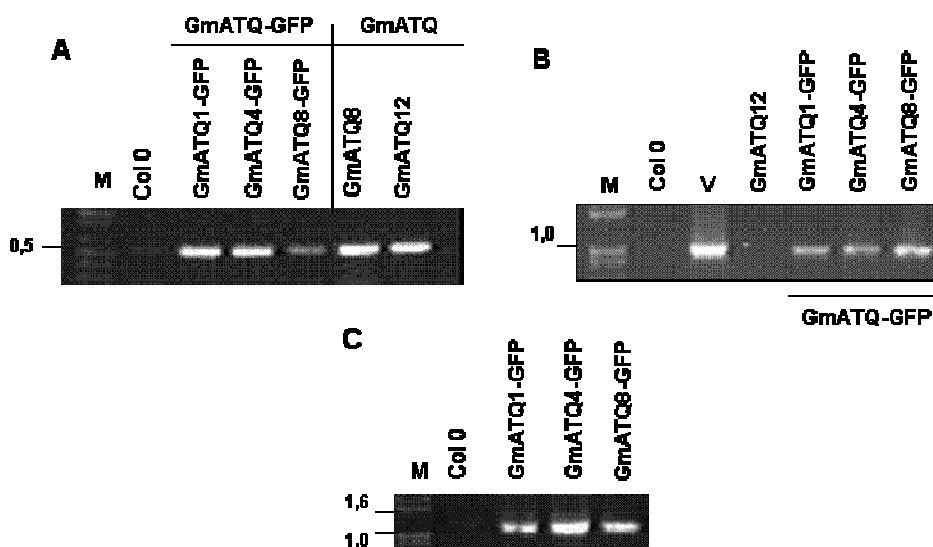


Figura 9 - Diagnóstico molecular de plantas de *A. thaliana* transformadas. (A) PCR diagnóstico das linhagens GmATQ e GmATQ-GFP - com oligonucleotídeos 4076 (senso) e 4077 (antisenso), específico para o gene *GmTP55*; (B) PCR diagnóstico das linhagens GmATQ-GFP - com oligonucleotídeos eGFPSal (senso) e eGFPPst (anti-senso); (C) PCR diagnóstico das linhagens GmATQ-GFP - com oligonucleotídeo 4076 (senso) específico para o gene *GmATQ* e o oligonucleotídeo 4799 (anti-senso) para o gene *GFP*. Col 0 corresponde a linhagem selvagem e V corresponde ao vetor pK7FWG2 vazio. M é o marcador de tamanho molecular. Os tamanhos correspondentes estão indicados ao lado em kb.

### 5.2.2. Análise de expressão do transgene por RT-PCR

O padrão de expressão do gene *GmATQ* foi avaliado através de RT-PCR semi-quantitativo nas linhagens transgênicas de *A. thaliana* GmATQ e GmATQ-GFP. Este gene foi constitutivamente expresso em folhas dos transformantes independentes pK7-GmATQ8 e pK7-GmATQ12 (Figura 10 - colunas 1 a 4), pK7F-GmATQ1 (Figura 10 - coluna 5), pK7F-GmATQ4 (Figura 10 - colunas 6 e 7) e pK7F-GmATQ8 (Figura 10 - coluna 8). O padrão de expressão deste gene nas folhas de *A. thaliana* transformadas foi analisado em comparação com a expressão dos genes em planta de *A. thaliana* não transformada, Col 0 (Figura 10 – WT). Estes resultados demonstram o acúmulo do transcrito do transgene nas plantas transformadas e confirmam a especificidade dos oligonucleotídeos usados, que foram capazes de discriminar o gene endógeno *ALDH7B4*, homólogo de *GmTP55* (Kirch *et al.*, 2004).

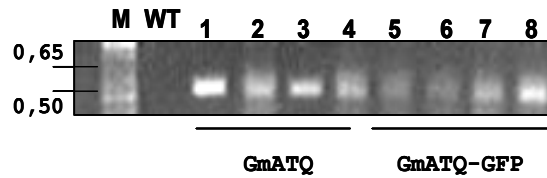


Figura 10 - Expressão do gene *GmATQ* em plantas transgênicas de *A. thaliana*. O acúmulo de transcritos de *GmTP55* foi verificado nos transformantes independentes GmATQ8 (colunas 1 e 2), GmATQ12 (colunas 3 e 4), GmATQ1-GFP (coluna 5), GmATQ4-GFP (coluna 6 e 7), GmATQ8-GFP (coluna 8), com oligonucleotídeos específicos para o gene *GmATQ*. A planta selvagem (Col 0) está representada como WT. M é o marcador de tamanho molecular. Os tamanhos correspondentes estão indicados ao lado em kb.

### 5.2.3. Análise da expressão ectópica da proteína GmTP55 em *Arabidopsis thaliana*

As proteínas totais dos transformantes independentes de *A. thaliana*, foram eficientemente extraídas; contudo, não foi possível a identificação da proteína GmATQ e da proteína GmATQ-GFP através de “Western blot”, mesmo controlando o tempo de revelação. A proteína GmTP55 possui uma massa molecular e 55 kDa, e apresenta uma mobilidade eletroforética em SDS-PAGE, muito similar à da subunidade maior da Rubisco, a qual se acumula em altas concentrações em folhas. Quando sondada com o anticorpo policlonal contra GmTP55, várias proteínas de massas moleculares semelhantes foram inespecificamente identificadas, inclusive a subunidade maior do Rubisco, a qual foi fortemente identificada. Sendo assim, a confirmação da expressão da proteína GmTP55 em *A. thaliana* não foi tecnicamente viável por “Western blot”.

### **5.3. Ensaio de germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* em condições de estresses salino *in vitro***

Foi demonstrado previamente que a expressão ectópica da proteína GmATQ confere às plantas transgênicas de *A. thaliana* tolerância a estresses oxidativos (Rodrigues *et al.*, 2006). Com a finalidade de analisar se a ligação de GFP ao carboxi-terminal de GmTP55 manteve a proteína quimérica em uma conformação estruturalmente funcional, sementes dos transformantes independentes GmATQ1-GFP e GmATQ8-GFP foram plaqueadas em meio MS ½ força seletivo com concentração crescente de sal. As linhagens transgênicas superexpressando GmATQ e GmATQ-GFP apresentaram-se mais tolerantes, ao estresse simulado, exibindo maior eficiência de germinação, em condições de estresse salino quando comparadas as plantas controle (Col 0) (Figura 11). Nos dois experimentos independentes realizados, os resultados mostraram-se recorrentes, sendo os fenótipos das plantas comparadas semelhantes (Figura 11). Estes resultados sugerem que as proteínas GmATQ55 e GmATQ-GFP estão sendo expressas nas linhagens de *A. thaliana* transformadas e que a proteína quimérica (GmATQ-GFP) é funcional, aumentando a tolerância das plantas transgênicas a estresse salino.

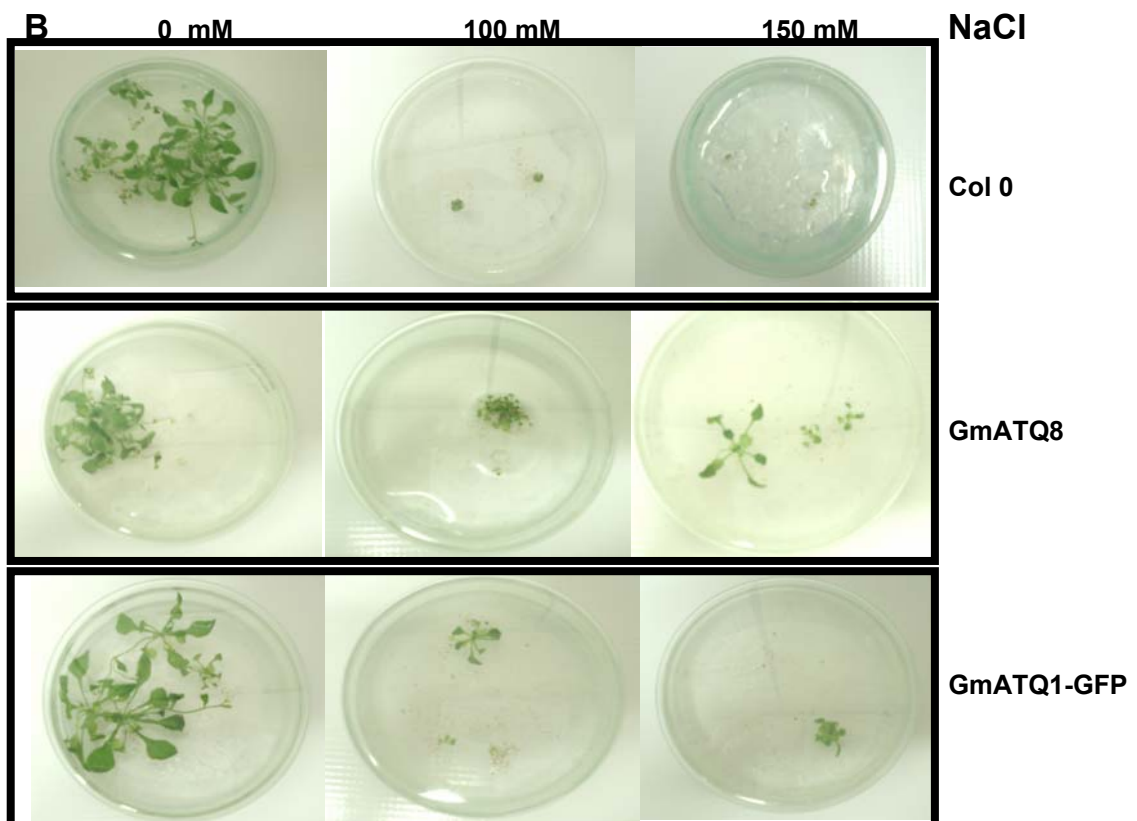
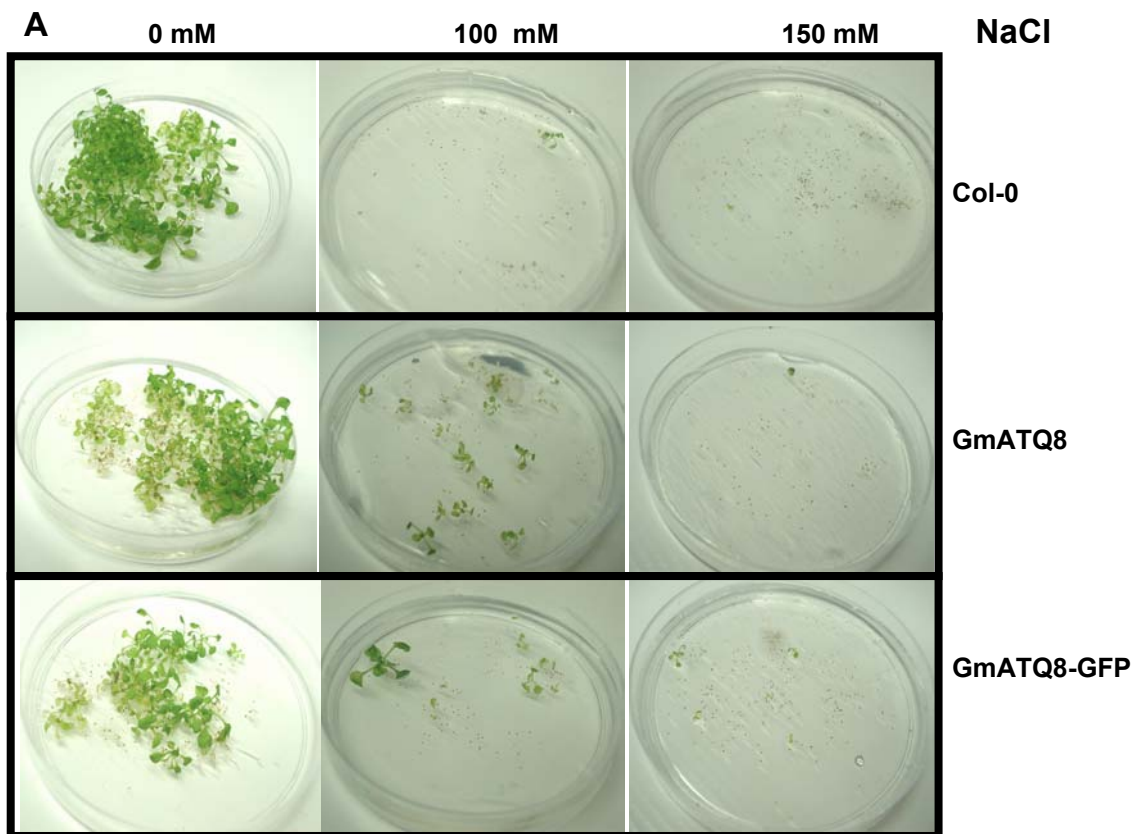


Figura 11 - Fenótipo de ensaio de germinação das sementes de *A. thaliana* após um mês (A) e após dois meses (B) do plaqueamento, em experimentos independentes. Sementes das linhagens GmATQ8, GmATQ1-GFP, GmATQ8-GFP e da planta selvagem (Col 0) foram plaqueadas em meio contendo 0 mM, 100 mM e 150 mM de NaCl.

#### 5.4. Localização subcelular da proteína GmTP55 em plantas de *Arabidopsis thaliana*

A localização subcelular de GmATQ foi inicialmente sondada nas linhagens transgênicas GmATQ1 e GmATQ8 de *A. thaliana* transformadas com a construção pK7F-GmATQ. Nestas linhagens, as células de raízes e de folhas transgênicas analisadas em microscópios de fluorescência e confocal não apresentaram nenhuma fluorescência significativa correspondente a GFP. As folhas e raízes de plantas submetidas a estresse salino também foram analisadas, e apresentaram resultados similares. Esses resultados indicam que a proteína quimérica GmTP55-GFP pode estar sendo expressa nas linhagens transgênicas de *A. thaliana* analisadas em níveis abaixo do limite de detecção de fluorescência para GFP.

Para avaliar esta possibilidade, a expressão da proteína GmTP55-GFP foi avaliada com os anticorpos contra GmATQ e contra GFP, através de “Western blot” de proteínas totais extraídas de transformantes independentes de *A. thaliana*, submetidos e não submetidos ao estresse salino. Nas linhagens testadas por microscopia confocal, não se detectou o acúmulo da proteína quimérica por “immunoblottings”. Provavelmente, nestas linhagens avaliadas, o T-DNA foi inserido em regiões da cromatina, transcricionalmente inativas, ou o fenômeno de silenciamento de transgenes foi ativado. Alternativamente, na obtenção da construção de DNA, utilizada para transformação das plantas, foi introduzida alguma mutação no cDNA quimérico que impedisse a tradução correta da proteína quimérica. Para distinguir entre estas possibilidades, a localização de GmTP55-GFP foi analisada em ensaios transientes de folhas de *A. thaliana* bombardeadas com o vetor binário pK7F-GmATQ e a expressão da proteína avaliada por microscopia de fluorescência. Uma intensa fluorescência de GFP foi observada no citoplasma e no núcleo das células transformadas da epiderme foliar (Figura 12). Estes resultados podem indicar uma expressão correta da proteína quimérica a partir da construção pK7F-GmATQ e podem indicar a associação correta do fenótipo de tolerância ao estresse salino com a expressão ectópica da proteína quimérica GmTP55-GFP nas linhagens transformadas (Figura 12).

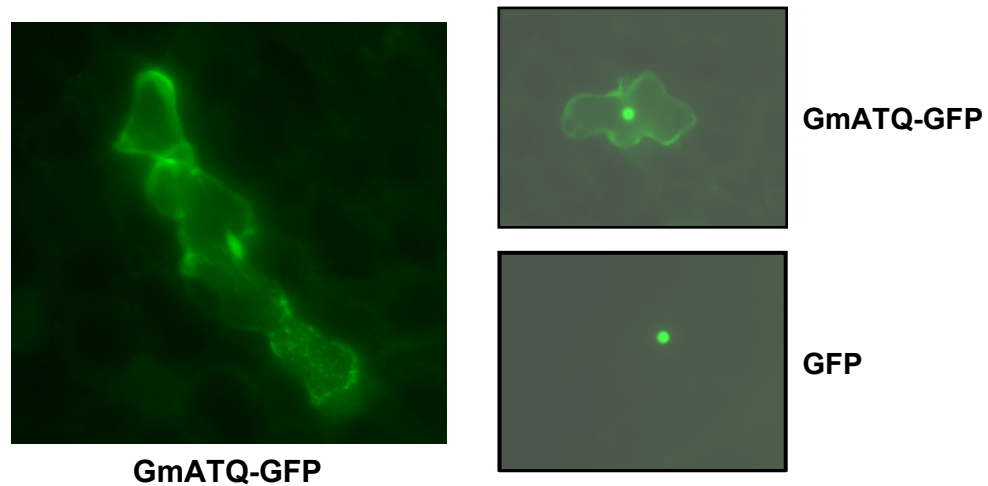


Figura 12 - Expressão transitente de GmATQ-GFP em folhas de *A. thaliana*. Imagens de microscopia de fluorescência de células da epiderme de folhas de *A. thaliana*, bombardeadas com pK7F-GmATQ (GmATQ-GFP) e pK7F-GFP (GFP), sob o controle do promotor CaMV35S.

## 6. DISCUSSÃO

Os vegetais estão constantemente sendo submetidos a diversos tipos de estresses (biótico e abiótico) que limitam seu crescimento e produtividade. Algumas espécies vegetais têm desenvolvido mecanismos de resposta a estes estímulos que envolvem a expressão de alguns genes e o acúmulo de seus produtos. Diversas isozimas da superfamília ALDH, dentre elas as antiquitinas, têm demonstrado ser expressas em respostas a diversos tipos de estresse em diferentes espécies de plantas (Guerrero *et al.*, 1990; Stroehrer *et al.*, 1995; Chen & Murata, 2002; Kirch *et al.*, 2003). Em plantas de soja foi verificado o acúmulo da proteína GmTP55 quando estas foram submetidas ao estresse hídrico. Plantas de tabaco transgênicas, superexpressando GmTP55, também foram mais tolerantes ao estresse hídrico (Rodrigues *et al.*, 2006). Embora a função fisiológica da proteína GmTP55 tenha sido relacionada ao estresse, o mecanismo de atuação, assim como o papel da proteína nas vias metabólicas de resposta a estresse oxidativo, ainda não foi elucidado.

A proteína GmTP55 possui 510 resíduos de aminoácidos, correspondentes à tradução do quadro aberto de leituras e, a seqüência destes aminoácidos é similar à das Aldeído Desidrogenases apresentando maior identidade com as proteínas da família ALDH7, também conhecidas como antiquitinas. A proteína GmTP55 possui muitos dos aminoácidos invariáveis essenciais para a atividade catalítica de Aldeído Desidrogenases (Perozich *et al.*, 1999; Kirch *et al.*, 2001), além dos domínios conservados de ALDH de ligação ao NAD(P)<sup>+</sup> (Steinmetz *et al.*, 1997; Johanson *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1998).

A comparação da seqüência de aminoácido das proteínas vegetais e animais desta família com a seqüência da GmTP55 demonstrou que esta proteína tem maior identidade de seqüência com as ALDH7 vegetais (70%), principalmente com a proteína 26g de ervilha (82%), pertencendo, assim, a subfamília ALDH7B. E, apesar de menos intensa, a identidade de seqüência de GmTP55 com ALDH animais também é alta (60%). Esta conservação evolutiva da seqüência de aminoácidos das antiquitinas é um indicativo da conservação funcional, bioquímica, e fisiológica dessas proteínas em diferentes organismos.

Várias ALDHs foram descritas e, por serem induzidas em condições de estresse, têm sido atribuída a estas proteínas uma função biológica associada à tolerância a diversos tipos de estresse abiótico (Guerrero *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1994; Stroehner *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1996; Nakazono *et al.*, 2000; Kirch *et al.*, 2001). Esta identidade fisiológica poderia ser explicada através da função bioquímica destas proteínas nas células vegetais e nas rotas nas quais elas estão envolvidas. Dentro desse contexto, particularmente relevante é a observação de que as moléculas de aldeídos reativas, produzidas durante o estresse abiótico, são prováveis substratos para esta classe de enzimas. Proteínas ALDH2A que oxidam eficientemente acetaldeído *in vitro* demonstraram aumentar a tolerância das plantas às condições anaeróbicas (Nakazono *et al.*, 2000).

A proteína GmTP55 demonstrou ter atividade catalítica de aldeído desidrogenase oxidando diferentes aldeídos na presença de  $\text{NAD}^+$ . Os aldeídos testados têm funções fisiológicas diferentes, porém podem ser sintetizados a partir de um estímulo comum: o estresse oxidativo. Esta enzima oxidou preferencialmente gama-aminobutiraldeído e formaldeído ( $K_m$  0,26 mM e  $K_m$  0,34 mM, respectivamente). Entretanto, ela também demonstrou atividade sobre propionaldeído e acetaldeído. Sendo assim, a GmTP55 parece ter maior afinidade por aldeídos alifáticos de cadeia curta. O gama-aminobutiraldeído e o formaldeído podem ser sintetizados a partir da peroxidação de lipídios durante estresse oxidativo, sendo um de seus produtos principais (Benedetti *et al.*, 1981; Bouché *et al.*, 2003; Sunkar *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2005). O propionaldeído e o acetaldeído são aldeídos altamente reativos e citotóxicos que podem causar danos estruturais e funcionais às células vegetais (Ting & Crabbe, 1983; Trivic & Leskovac, 1994). Pouco se conhece a respeito dos substratos fisiológicos das antiquitinas e das Aldeído Desidrogenases da família ALDH7 identificadas. As antiquitinas de *Danio rerio* e de *Acanthopagrus schlegelii* parecem não atuar sobre o

gama-aminobutiraldeído e o formaldeído (Tang *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2005), enquanto que proteínas ALDHs de outras famílias atuam sobre uma ampla faixa de aldeídos (Kirch *et al.*, 2001).

Muito embora a afinidade da proteína pelo seu substrato dependa da estrutura conformacional (Vasiliou *et al.*, 2000), devido à conservada identidade de seqüência das ALDHs, observam-se padrões de atuação catalítico semelhantes entre algumas delas (Yoshida *et al.*, 1998.) Assim como as ALDH3, as proteínas da família ALDH7 caracterizadas têm demonstrado terem valores-padrão altos de Km aparente (de 0,8 a 28 mM) para aldeídos de cadeia alifática curta (Lindahl & Pettersen, 1991). Por exemplo, para o propionaldeído, os valores de Km das antiquitinas de *Ctenopharyngodon idellus* e de *Acanthaparus schlegellii* foram 1,43 mM e 1,20 mM, respectivamente (Chan *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2005). Estes valores são consistentes com o valor de Km aparente determinados para GmTP55, para o propionaldeído (1,25 mM), embora este seja cerca de 3x menor que os valores encontrados para os demais aldeídos citados.

A alta afinidade da GmTP55 pelo gama-aminobutiraldeído e pelo formaldeído indica que estes aldeídos possam ser substratos fisiológicos para esta enzima. Embora uma das vias metabólicas de biossíntese de GABA (ácido gama-aminobutírico) seja caracterizada (Bouché *et al.*, 2003), à existência de uma via alternativa na qual, através da ação de uma aldeído desidrogenase, o gama-aminobutiraldeído seja convertido em ácido gama-aminobutírico, é uma possibilidade. Uma vez sendo gerados durante a peroxidação de lipídeos nas plantas, o gama-aminobutiraldeído e o formaldeído têm sido associados aos efeitos patofisiológicos apresentados por elas durante a exposição a um estresse oxidativo (Esterbauer *et al.*, 1991). Para limitar estes efeitos, as plantas contam com um sistema antioxidante, no qual atuam várias enzimas, cuja expressão e atividade são aumentadas durante condições de estresse (Storz & Imlay, 1999). Em soja foi identificada uma aldeído/aldose redutase (MsALR) que parece estar envolvida neste processo de redução de aldeídos tóxicos (Oberschall *et al.*, 2000). A GmTP55 poderia estar atuando no processo detoxificação celular, aumentando a tolerância das plantas transgênicas ao estresse abiótico, uma vez que esta enzima pode agir sobre aldeídos reativos tóxicos, acumulados na célula como resultado direto da produção de ERO (espécie reativa de oxigênio) durante este estresse abiótico.

Para analisar a função fisiológica e a localização subcelular da proteína GmTP55, plantas de *A. thaliana*, superexpressando, separadamente, GmTP55 e a proteína quimérica GmTP55-GFP, foram obtidas. Nas linhagens de plantas transformadas, a expressão do gene foi confirmada pelo acúmulo de transcrito. Algumas ALDHs vegetais têm sido relacionadas à tolerância ao estresse com base no acúmulo do mRNA transcrito (Kirch *et al.* 2001; Chen *et al.*, 2002). Em *Tortula ruralis*, o nível de transcritos de ALDH21A1 estáveis aumentou em resposta a estresses hídrico, salino, luminoso e também em resposta a ABA (Chen *et al.*, 2002). Entretanto, não foi possível realizar a localização subcelular da proteína antiqutina de soja, GmTP55, pois a expressão da proteína GFP das linhagens analisadas não foi confirmada.

As sementes de *A. thaliana* expressando ectopicamente o gene *GmTP55*, plaqueadas em meios com altas concentrações salinas, demonstraram maior eficiência de germinação quando comparadas sementes das linhagens não transformadas (Col 0). As plantas selvagens apresentaram um desenvolvimento retardado, pois o excesso de NaCl do meio pode alterar o metabolismo e a estrutura celular, acarretando prejuízos ao organismo, tal como a redução da multiplicação e alongação celular (Munns, 1993). Foi demonstrado que células foliares de uma planta, expostas ao excesso de sal, apresentaram paredes celulares endurecidas, reduzindo o nível de turgor e, por conseqüência, tiveram sua taxa de expansão celular limitada, se comparadas às células-controle da mesma planta (Cosgrove, 1993).

Os resultados demonstraram que a GmTP55 exibe atividade catalítica sobre determinados aldeídos alifáticos de cadeia curta e que esta enzima apresenta muitos resíduos de aminoácidos conservados de ALDH essenciais para sua atividade. Desta forma, estes resultados comprovam que GmTP55 exibe atividade enzimática consistente com sua classificação molecular como aldeído desidrogenase. Coletivamente, os resultados dessa investigação sugerem que a função fisiológica da GmTP55 está relacionada a vias celulares de respostas adaptativas a estresse abiótico e indicam que a proteína poderia estar atuando diretamente no processo de detoxificação de aldeídos tóxicos.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Acevedo E, Fereres TC, Hsiao TC, Henderson DW (1979). Diurnal growth trends, water potential and osmotic adjustment of maize and sorghum leaves in the field. *Plant Physiology* 64:476-480.

Ackerson RC, Herbert RR (1981). Osmoregulation in cotton in response to water stress. *Plant Physiology* 67: 484-488.

Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Artinez CA, Otoni WC, Fontes EPB (2001). Enhanced Accumulation of BiP in Transgenic Plants Confers Tolerance to Water Stress. *Plant Physiology* 126: 1042-1054.

Alvim PT (1985). *Theobroma cacao*. In: Halevy AH (Ed.) Handbook of flowering. CRC Press, Boca Raton, FL.

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 289: 2338–2342.

Arora A, Sairam RK, Seivastava GC (2002). Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Current Science* 82: 1227-1238.

Ashraf M (1994). Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*. *Biologia Plantarum* 26: 255-259.

Bartels D (2001a). Molecular mechanisms of desiccation tolerance in plants. Molecular Mechanisms of Metabolic Arrest: life in limbo, edited by K B Storey, *BIOS Scientific Publishers Ltd*, Oxford, p.187-196.

Bartels D (2001b). Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends Plant Science* 6: 284-286.

- Bartels D, Nelson D (1994). Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant Cell Environmental* 17: 659-667.
- Beever D (2000). Os transgênicos e o futuro da agricultura. *Biotechnologia e Desenvolvimento* 15: 4-7.
- Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimical Biophysics Acta* 620: 281-296.
- Bennett JM, Sullivan CY (1981). Effect of water stress preconditioning on net photosynthetic rate of grain *Sorghum*. *Photosynthetica* 15: 330-337.
- Bergamaschi H, Vieira HJ, Angelocci LR (1991). Efeito de variáveis micrometeorológicas e disponibilidade hídrica no solo sobre resistência estomática à difusão gasosa em feijoeiro. *Turrialba*, 41, São Jose, p.445-451.
- Bergamaschi, H, Berlato, MA, Matzenauer, R (1986). Evapotranspiração máxima da soja e relações com a evotranspiração calculada pela equação de Penman, evapotranspiração de tanque “classe A” e radiação solar global. Porto Alegre: Agronomia Sulriograndense. p.243-259.
- Berlato MA (1981). Carta de aptidão climática da soja no Rio Grande do Sul. In: Miysaka, Shiro & Medina, Júlio César. *A Soja no Brasil*. (Ed), São Paulo. p.1062.
- Bohnert HJ, Jensen RG (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* 14: 89-97.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Bono L, Bergamaschi H, Rosa LMG, França S, Radin B., Santos AO, Berginci JI (2001). Alterações no padrão de resposta à luz da condutância estomática do milho causadas pelo déficit hídrico. *Revista Brasileira de Agrometeorologia* 9: 27-34.
- Bouché N, Fait A, Bouchez D, Møller SG, Fromm H (2003). Mitochondrial succinic semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100: 6843–6849.
- Bourot S, Sire O, Trautwetter A, Touzé T, Wu LF, Blanco C, Bernard T (2000). Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *Journal Biology Chemistry* 275: 1050-1056.
- Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bray EA (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035-1040.

- Bray EA (2004). Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55: 2331-2341.
- Bray EA (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Science* 2: 48-54.
- Bohnert, HJ, Jensen, RG (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* 14: 89-97.
- Bunce JA (1988). Nonstomatal inhibition of photosynthesis by water stress. Reduction of photosynthesis at high transpiration rate without stomatal closure in field grown tomato. *Photosynthesis Research* 18: 357-362.
- Camargo MBP (1994). *Exigências bioclimáticas e estimativa da produtividade para cultivares de soja no Estado de São Paulo*. (Tese de mestrado), Piracicaba, SP.
- Canuto RA, Ferro M, Maggiora M, Federa R, Brossa O, Bassi AM, Lindahl R, Muzic G (1996). In: Hepatoma cell lines restored lipid peroxidation affects cell viability inversely to aldehyde metabolizing enzyme activity. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 414: 113-122.
- Chang WM, Tang WK., Cheng CHK, Fong WP (2003). Purification, N-terminal sequence determination and enzymatic characterization of antiquitin from the liver of grass carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 136: 443-450.
- Chaves MM (1991). Effects of water deficit on carbon assimilation. *Journal of experimental Botany* 42: 1-16.
- Chen TH, Murata N (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion Plant Biology* 5: 250-257.
- Chen X, Zeng Q, Wood AJ (2002). The stress-responsive *Tortula ruralis* gene ALDH21A1 describes a novel eukaryotic aldehyde dehydrogenase protein family. *Journal Plant Physiology* 159: 677-684.
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735-743.
- Confalone A, Navarro MD (1999) Influencia do “déficit” hídrico sobre a eficiência da radiação solar em soja. *Revista Brasileira de AGROCIÊNCIA* 5: 195-198.
- Cornic G (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant science* 5: 187-188.
- Cosgrove DJ (1993). Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake and hydraulic conductance. *Journal Plant Science* 154: 10-21.
- Dayhoff MO (1976). The origin and evolution of protein superfamilies. *Federation. Proceedings* 35: 2132-2138.

- Deitrich RA (1966). Tissue and subcellular distribution of mam-*P*malian aldehyde-oxidizing capacity. *Biochemical Pharmacology* 15: 1911-1922.
- Delgado E, Vadell J, Aguilo F, Escalona JM, Medrano H (1995). Irrigation and grapevine photosynthesis. In: Mathis P (Ed.) *Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol IV*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p. 693–696.
- Esterbauer H, Schauer RJ, Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biological Medicine* 11: 81-128.
- Fageria NK (1989). Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, p. 381-392.
- Fong WP, Cheng CHK, Tang WK (2006). Antiquitin, a relatively unexplored member in the superfamily of aldehyde dehydrogenases with diversified physiological functions. *Cell Molecular Life Science* 63: 2881-2885.
- Fong WP, Cheng CHK, Tang WK (2003). Purification and characterization of two distinct aldehyde-oxidizing enzymes from the liver of black seabream. *Chemical Biological Interactions* 143: 159–167.
- Göpfert H, Rossetti LA, Souza J (1993). Eventos generalizados e segurança agrícola. Brasília: IPEA, Ministério do Planejamento, p. 78.
- Guerrero FD, Jones JT, Mullet JE (1990). Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Molecular Biology* 15: 11-26.
- Guo C, Oosterhuis DM (1997). Effect of water-deficit stress and genotypes on pinitol occurrence in soybean plants. *Environmental and Experimental Botany* 37: 2-5.
- Hare PD, Cress WA (1996). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- He Y, Gan SA (2004). Novel zinc-finger protein with a proline-rich domain mediates ABA-regulated seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 54: 1-9.
- Hilal M, Castagnaro AP, Moreno H, Massa EM (1997). Specific location of the respiratory alternative oxidase in meristematic and xylematic tissues from developing soybean roots and hypocotyls. *Plant Physiology* 155: 1499-1503.
- Hsiao TC (1973). Plant responses to water stress. *Annual Reviews Plant Physiology* 24: 519-570.

- Huang J, Hirj IR, Adam L, Rozwadowski L, Hammerlindl JK, Keller WA, Selvara J (2000). Genetic engineering of Glycine-betaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiology* 122: 747-756.
- Hurley TD, Weiner H (1999). Evaluation of the roles of the conserved residues of aldehyde dehydrogenase. In: Weiner H (Eds.) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, Kluwer Academic Publishers, p. 45-52.
- Ingrain J, Bartels D (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plant. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 377-403.
- Johansson K, El-Ahmad M, Ramaswamy S, Hjelmqvist L, Jornvall H, Eklund H (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Science* 7: 2106–2117.
- Jones MM, Turner NC (1980). Osmotic adjustment in expanding and fully expanded leaves of sunflower in response to water deficits. *Australian Journal of Plant Physiology* 7: 181-192.
- Jones MM, Rawson, HM (1979). Influence of the rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency and osmotic potential in sorghum. *Physiologic Plantarum*, 5: 103-111.
- Kaiser WM (1979). Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of the oxidative pentose phosphate cycle in isolated chloroplast by hydrogen peroxide. *Planta* 145: 377-382.
- Katerji N, Van Hoorn JW, Hamdy A, Mastrorilli M (2003). Salinity effect on crop development and yield analysis of salt tolerance according to several classification methods. *Agricultural Water Management* 62: 37-66.
- Kirch HH, Bartels D, Sunkar R (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *A. thaliana* in transgenic plants improve stress tolerance. *The Plant Journal* 35: 452-464.
- Kirch HH, Schingensiepen S, Kotchonil S, Sunkar R, Bartels D (2005). Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 57: 315–332.
- Kirch HH, Bartels D, Wei Y, Schnable PS, Wood AJ (2004). The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* 9: 71-377.
- Kirch HH, Nair A, Bartels D (2001). Novel ABA-dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 28: 555-567.
- Kobata T, Palta JA, Turner NC (1992). Rate of development of postanthesis water deficits and grain filling in spring wheat. *Crop Science* 32: 1238-1242.

- Koyro HW (1996). Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Environmental and Experimental Botany* 56: 136-146.
- Kramer PJ, Boyer JS (1995). Water relations of plants and soils. San Diego: Academic Press. p. 495.
- Kramer PJ (1983). Water relations of plants. New York, Academic Press. p. 439.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee P, Kuhl W, Gelbart T, Kamimura T, West C, Beutler E (1994). Homology between a human protein and a protein of the garden pea. *Genomics* 21: 371-378.
- Levitt J (1980). Response of Plants to Environmental Stress. New York and London: Academic Press. v. I–II.
- Levitt J (1972). Responses of Plants to Environmental Stresses. New York and London: Academic Press.
- Lindahl R (1991). Aldehyde dehydrogenase and their role in carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27: 283-335.
- Lindahl R., Petersen DR (1991). Lipid aldehyde oxidation as a physiological role for class 3 aldehyde dehydrogenases. *Biochemical Pharmacology* 41: 1583-1587.
- Ludlow MM, NG TT (1976). Effect of water deficit on carbon dioxide exchange and leaf elongation rate of *Panicum maximum* var. trichoglume. *Australian Journal of Plant Physiology* 3: 401-413.
- Mitroy SP, Goyne PJ (1995). Leaf area development in barley-model construction and response to soil moisture status. *Australian Journal of Agricultural Research* 46: 845-860.
- Miyasaka S, Medina JC (1981). A soja no Brasil. São Paulo: ITAL. p. 1-174.
- Moore SA, Baker HM, Blythe TJ, Kitson KE, Kitson TM, Baker EN (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* 6: 1541–1551.
- Morgan JM (1984). Osmorrugulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 299-319.
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science* 7 :405-410.
- Muchow RC, Sinclair TR (1991). Water deficit effects on maize yields modeled under current and “greenhouse” climates. *Agronomy Journal* 83:1052-1059.

- Munns R (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, cell & environment* 16: 15-24.
- Munns R (1988). Why measure osmotic adjustment? *Australian Journal of Plant Physiology* 15: 717-726.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nakazono M., Tsuji H, Li Y, Saisho D, Arimura S, Tsutsumi N, Hirai A (2000). Expression of a Gene Encoding Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase in Rice Increases under Submerged Conditions. *Plant Physiology* 124: 587-598.
- Navarro-Aviño JP, Prasad R, Miralles VJ, Benito, RM, Serrano M (1999) A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. *Yeast* 15: 829-842.
- Nepomuceno AL, Stewart JM, Oostehuis DM, Turley R, Neumaier N, Farias JRB (2000). Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 1407-1416.
- Noctor G, Foyer CH (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 49: 249–279.
- Oberschall A, Deak M, Torok K, Saa L, Vass L, Kovacs I, Feher A, Dutis D, Horvath GV (2000). A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant Journal*, 24: 437-446.
- Oosterhuis D, Wullschleger SD (1988). Drought tolerance and osmotic adjustment of various crops in response to water stress. *Arkansas Farm Research*, p. 12, 1988.
- op Den Camp RGL, Kuhlemier C (1997). Aldehyde dehydrogenase in tobacco pollen. *Plant Molecular Biology* 35: 355-365.
- Palta JA, Kobata T, Turner NC, Fillery IR (1994). Remobilization of carbon and nitrogen in wheat as influenced by postanthesis water deficits. *Crop Science* 34: 118-124.
- Pell EJ, Steffen KL (1991). Active oxygen/oxidative stress in plant metabolism. *American Society Annual Society Plant Physiology*. p. 145-155.
- Pellegrino A (2003). Elaboration d'un outil de diagnostic du stress hydrique utilisable sur la vigne en parcelle agricole par couplage d'un modele de bilan hydrique et d'indicateurs de fonctionnement de la plante thesus, *E. cole* Nationole suoeieri Agronomique. Motpellur. p. 138.
- Pellegrino A, Leboni E, Simonneau T, Wery J (2005). Towards a simple indicator of water stress in grapevine (*Vitis vinifera* L.) based on the differential sensitivities of vegetative growth components. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 306-315.

- Pereira PG, Bergonci JI, Bergamasch H, Rosa LMG, França S (2003). Efeitos de diferentes níveis de déficit hídrico na fotossíntese e condutância foliar em milho. *Revista Brasileira de Agrometeorologia* 11: 53-62.
- Perozich J, Nicholas HBJR, Wang BC, Lindahl R, Hempel J (1999a). Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science* 8: 137-146.
- Perozich J, Nicholas HBJR, Lindahl R, Hempel J (1999b). The big book of aldehyde dehydrogenase sequences: an overview of the extended family. In: Weiner H. (Eds.) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, Kluwer Academic Publishers, 463: 1-7.
- Pietruszko R (1983). Aldehyde dehydrogenase isozymes. In: Rattazzi MC, Scandalios JG, Whitt AS (Eds) *Isozymes: Current topics in biological and medical research* 8: 195-217. New York.
- Procópio SO, Santos JB, Silva AA, Costa LC (2002). Análise do crescimento e eficiência no uso da água pelas culturas de soja e do feijão e por plantas daninhas. *Acta Scientiarum*, 24: 1345-1351.
- Ramanjulus S, Bartels D (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environmental* 25: 141-151.
- Rhoades D, Hanson AD (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44: 357-384.
- Rhodes D, Loveday J (1990). Salinity in irrigated agriculture. In: Rhoades.D, Loveday J. (Eds.) *Agronomy Monograph*, American Society of Agronomist, Madison, WI, p. 1089-1142.
- Rodrigues SM, Andrade MO, Gomes APS, DaMatta FM, Baracat MCP, Fontes EPB (2006). *Arabidopsis thaliana* and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 57:1909-1918.
- Salah HBH, Tardieu F (1997). Control of leaf expansion rate of drought maize plants under fluctuating evaporative demand. *Plant Physiology* 114: 893-900.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seemann JR, Critchley C (1985). Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behavior and photosynthetic capacity on salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* (L.). *Planta* 164: 151-162.
- Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology* 14:194-199.

- Shalhevet J. (1993) Plants under salt and water stress. In: Fowden L, Mansfield T, Stoddart J. *Plant adaptation to environmental stress*. London, Chapman & Hall, p. 133-154.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress response. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 410-417.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1999). Molecular responses to drought stress in cold, drought, heat and salt stress in higher plants. Texas, USA: Biotechnology Intelligence Unit.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* 115: 327-334.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 161-167.
- Skibbe DS, Liu F, Wen TJ, Yandeu MD, Cui X, Cao J, Simmons CR, Schnable OS (2002). Characterization of the aldehyde dehydrogenase gene families of *Zea mays* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 48: 751–764.
- Skvorak AB, Roberpson NG, Yin Y, Weremowicez S, Her H, Bieber FR, Beier DR, Morton CC (1997). Ancient conserved gene expressed in the human inner ear: identification, expression analysis, and chromosomal mapping of human and mouse antiquitin (ATQ1). *Genomics* 46: 191-199.
- Sophos N, Vasiliou V (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chemical Biological Interactions* 143:144: 5-22.
- Sophos NA, Pappa A, Ziegler T, Vasiliou V (2001). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chemical Biological Interactions* 130-132: 323-337.
- Steinmetz CG, Xie P, Weiner H, Hurley T.D (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5: 701–711.
- Storz G, Imlay JA. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion Microbiology* 2: 188-194.
- Stroeher VL, Boothe JG, Good AG (1995). Molecular cloning and expression of a turgor-responsive gene in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* 27: 541-551.
- Sunkar R, Bartels D, Kirch H (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal* 35: 452-464.
- Taiz L, Zeiger E (1998). *Plant Physiology*. Sunderland, Sinauer Associates (2<sup>nd</sup> Ed.).
- Taiz L, Zeiger E (2004). *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre, Artmed Editora (3<sup>rd</sup> Ed.). p.613.

- Tang WK, Chang CB, Cheng CHK, Fong WP (2005) Seabream antiquitin: Molecular cloning, tissue distribution, subcellular localization and functional expression. *Febs Letters* 579: 3759-3764.
- Tang WK, Cheng CHK, Fong WP (2002). First purification of the antiquitin protein and demonstration of its enzymatic activity. *Febs Letters* 516: 183–186.
- Ting HH, Crabbe MJ (1983). Bovine lens aldehyde dehydrogenase: kinetic and mechanism. *Biochemistry Journal*, 215: 361-368.
- Trivic S, Leskuvac V (1994). Kinetic mechanism of yeast alcohol dehydrogenase with primary aliphatic alcohols and aldehydes. *Biochemistry and Molecular Biology International* 32: 399-407.
- Turner N.C (1986). Adaptation to water deficits: a changing perspective. *Australian Journal Plant Physiology* 13: 175-190.
- Turner NC (1979). Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. In: Mussel H, Staples RC (Eds.). *Stress Physiology in Crop Plants*. New York, Wiley Interscience, p. 468-478.
- Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chemical Biological Interactions* 129: 1-19.
- Vasiliou V, Bairoch A, Tipton KF, Nebert DW (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* 9: 421-434.
- Vasiliou V, Kozaka CA, Lindahl R, Nebert DW (1996). Mouse Microsomal Class 3 aldehyde dehydrogenase: ALHD3 cDNA sequence, inducibility by dioxin and clofibrate, and genetic mapping, DNA. *Cell Biology* 15: 234-245.
- Weretilnyk EA, Hanson AD (1990). Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 87: 2745-2749.
- Wood AJ, Krayesky S (2002). The role of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in plant stress tolerance. In: Wood AJ (Ed.) *Biochemical & Molecular Responses of Plants to the Environment*. Research Signpost. p. 1–14.
- Wood AJ, Sneoka H, Rhodes D, Joly RJ, Goldsbrough PB (1996). Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. *Plant Physiology* 110: 1301-1308.
- Yamaguchi-Shinizaki K, Kasuga M, Lui Q, Nakashima K, Sakuma Y, Abe H, Shinwari ZK, Seki M, Shinozaki K (2002). Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS Working Report*.
- Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Febs European Journal of Biochemistry*, 251: 549-557.

Zhang J, Davies WJ (1990). Changes in concentration of ABA in the xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant, Cell and Environment* 13: 271-285.

Zhu, JK (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.

## **ANEXO**

## ANEXO

**Tabela 1** - Atividade de oxidação de aldeídos do extrato protéico total de células de *Escherichia coli* transformadas

Aldeídos	Atividade enzimática [nMol X min <sup>-1</sup> X mg <sup>-1</sup> ]
Propionaldeído	32,22 ± 7,34
Acetaldeído	26,63 ± 2,36
γ-Aminobutiraldeído	19,38 ± 1,11
Formaldeído	21,83 ± 0,84
Butiraldeído	21,61 ± 1,67

\*ND: Não detectada (menos de 1% da atividade máxima usando propionaldeído como substrato)

Os extratos protéicos controles de *Escherichia coli* transformada com o vetor pET16B vazio e células transformadas não induzidas não apresentaram atividades catalíticas de aldeído desidrogenase significativas com nenhum dos substratos. Estes dados foram medidos em dois experimentos independentes.

**Tabela 2** – Atividade de oxidação de aldeídos da proteína recombinante GmTP55 purificada expressa em *Escherichia coli*.

Aldeídos	Atividade enzimática [nMol NADH x Min <sup>-1</sup> X mg <sup>-1</sup> ]
Propionaldeído	53,24 ± 1,00
Acetaldeído	24,20 ± 1,00
γ-Aminobutiraldeído	39,32 ± 19,68
Formaldeído	33,80 ± 13,69
Butiraldeído	ND*
Benzaldeído	ND*

\*ND: Não detectada (menos de 1% da atividade máxima usando propionaldeído como substrato)