

# MODULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE GENES ASSOCIADOS À FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA EM GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDOS À DESIDRATAÇÃO RADICULAR

<u>José Ribamar Costa Ferreira Neto<sup>1</sup></u>; Monique M. Rodrigues Costa<sup>2</sup>; Valesca Pandolfi<sup>3</sup>; Roberta L. de Oliveira Silva<sup>3</sup>; Kaesel J. Damasceno e Silva<sup>4</sup>, Alexandre Lima Nepomuceno<sup>5</sup>; Rosana P. Vianello Brondani<sup>6</sup>; Ana M. Benko-Iseppon<sup>3</sup>; Éderson Akio Kido<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo S/N, Recife, PE. E-mail: netocostaferreira@gmail.com
<sup>2</sup>Bióloga, graduanda Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, Recife, PE. E-mail
<sup>3</sup>Pesquisador, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo S/N, Recife, PE.
<sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650, Teresina, PI.
<sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, Londrina, PR.
<sup>6</sup>Pesquisador, Embrapa Arroz e feijão, Rodovia GO-462, km 12, Sto Antônio de Goiás, GO.

**Resumo** – Mitocôndrias são conhecidas como as "estações energéticas" da célula. Elas abrigam o processo de fosforilação oxidativa, através do qual o transporte de elétrons por meio de carreadores é acoplado ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranar gerando um gradiente eletroquímico que fornece energia para a síntese de ATP. Tal molécula é de suma importância para os organismos vivos, pois cede energia para os processos celulares. No presente trabalho, foi analisada, via *unitags* SuperSAGE e de acordo com a base de dados KEGG, a regulação dos genes associados a enzimas participantes da fosforilação oxidativa, em genótipos contrastantes de feijão-caupi cultivados em hidroponia e submetidos à desidratação radicular por até 150 min. Resultados apresentaram um painel de genes diferencialmente regulados, sendo as principais divergências transcricionais entre os genótipos associadas a diferenças na regulação dos genes formadores dos complexos II, IV e V. Entretanto, maiores análises são necessárias para observar como essas diferenças influenciam fisiologicamente a espécie analisada.

Palavras-chave: Vigna unguiculata, transcriptômica, SuperSAGE, bioinformática.

# Introdução

As mitocôndrias são as "estações energéticas" das células. Eventos de suma importância para a sobrevivência celular ocorrem nesse sítio. Dentre esses, processos envolvidos na sinalização celular tais como biossíntese de lipídeos, aminoácidos e controle do *status* redox podem ser citados. Adicionalmente, tal organela tem sua importância acentuada por abrigar o processo de fosforilação oxidativa. Durante esse evento, elétrons derivados de NADH e FADH<sub>2</sub> são oxidados por diferentes enzimas e os elétrons liberados por essas reações são transportados entre moléculas chamadas carreadoras de elétrons. Ao longo dessa cadeia de transporte de elétrons, energia vai sendo liberada e conjugada ao transporte de prótons para a matriz do espaço intermembranar das mitocôndrias. Isso gera um gradiente eletroquímico que é utilizado para a síntese de ATP. Tal molécula é responsável pelo armazenamento de energia em suas ligações químicas, e é empregada para a manutenção dos processos celulares e de desenvolvimento durante as diferentes situações às quais estão submetidos os organismos vivos. O aparato responsável por tal atividade é composto por cinco grandes complexos proteicos (Figura 1 A e B) que ancoram as enzimas responsáveis pela oxidação de NADH e FADH<sub>2</sub>,



além da síntese de ATP. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar, via tecnologia SuperSAGE e dados alocados na base de dados KEGG, a expressão de genes codificadores das enzimas oxidantes de NADH e FADH<sub>2</sub> em genótipos contrastantes (tolerante e susceptível) de feijão-caupi cultivados em hidroponia e submetidos à desidratação radicular por até 150 min., analisando similaridades e diferenças entre os mesmos e sugerindo possíveis efeitos de indução e/ou repressão desses genes à luz da literatura científica.

#### Material e Métodos

## 1. Material biológico, desenho experimental e aplicação do estresse

Dois genótipos de feijão-caupi com comportamentos contrastantes perante a desidratação, Pingo de Ouro (tolerante) e Santo Inácio (susceptível), foram submetidos separadamente e em paralelo, a diferentes tempos de estresse por déficit hídrico (desidratação radicular), após suspensão das plantas de sistema hidropônico de cultivo, variando de: controle (0 min) e tratamentos (seis tempos, com intervalos de 25 minutos, até 150 min).

## 2. Geração das Bibliotecas SuperSAGE

Foram geradas quarto bibliotecas SuperSAGE: duas para cada genótipo, sendo uma controle e a outra reunindo os diferentes tempos de tratamento. As bibliotecas foram construídas segundo Matsumura *et al.* (2005), com seqüenciamento via SOLEXA (GenXPro GmbH, Frankfurt, Alemanha).

#### 3. Análises estatísticas, anotação das unitags e mapeamento das unitags na via da fosforilação oxidativa

As *tags* de feijão-caupi, oriundas das bibliotecas SuperSAGE, foram analisadas via software DiscoverySpace 4.1, objetivando identificar *tags* únicas (*unitags*) e quais dessas foram diferencialmente expressas (P<0,05), tendo sido excluídas aquelas sequenciadas apenas uma vez (*singlets*). Para anotação, as *unitags* foram alinhadas (BlastN) contra transcritos de feijão-comum alocadas no banco de dados Phytozome (http://www.phytozome.net/), seguindo os critérios de Kido *et al.* (2011). Para o mapeamento das *unitags* na via analisada, de acordo com a base de dados KEGG (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html), usou-se o software PAICE (http://sourceforge.net/projects/paice/).

#### Resultados e Discussão

A figura 1 (A e B) apresenta a orquestração gênica da via da fosforilação oxidativa em ambos os genótipos. Segundo o esquema da base de dados KEGG, 12 genes associados a enzimas responsáveis pelas reações de oxidorredução e à síntese de ATP participam do processo. Para o Pingo de Ouro (genótipo tolerante) oito genes foram diferencialmente expressos, sendo que dois ancoraram *unitags* estritamente induzidas e seis ancoraram *unitags* induzidas e reprimidas. O Santo Inácio (genótipo susceptível), por sua vez, também expressou oito genes, sendo que um ancorou *unitags* estritamente reprimida e sete ancoraram *unitags* induzidas e reprimidas. No que se refere ao transcriptoma associado à via estudada, observou-se que o genótipo tolerante expressou 74 (42 induzidas e 30 reprimidas; Tabela 1) *unitags*, potenciais codificantes das enzimas aqui estudadas, enquanto que o susceptível expressou 88 (35 induzidas e 53 reprimidas; Tabela 1).





Figura 1. Painel comparativo da regulação de genes participantes da fosforilação oxidativa entre genótipos contrastantes [A. Pingo de Ouro (genótipo tolerante); B. Santo Inácio (genótipo susceptível)] de feijão-caupi submetidos a estresse por desidratação (xh). Box verde indica gene ancorando *unitags* estritamente induzidas; Box vermelho indica gene ancorando *unitags* estritamente reprimidas; e Box amarelo indica gene ancorando *unitags* induzidas e reprimidas.

Comparando a resposta dos genótipos aqui utilizados vemos que ambos apresentam seis genes regulados de forma similar, nominalmente: *NADH dehydrogenase* (EC 1.6.5.3), *NADH dehydrogenase* (EC 1.6.99.3), ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b/c1 subunit (EC 1.10.2.2), *inorganic pyrophosphatase* (EC 3.6.1.1), *F-type H<sup>+-</sup>transporting ATPase subunit a* (EC 3.6.3.14), *H<sup>+-</sup> transporting ATPase* (EC 3.6.3.6; Figura 1). Todos esses genes ancoraram *unitags* induzidas e reprimidas (Figura 1). De outra forma, encontramse, adicionalmente, diferenças na regulação gênica entre os genótipos. O gene *succinate dehydrogenase* (*ubiquinone*) *flavoprotein subunit* (EC 1.3.5.1) foi induzido no tolerante e reprimido no susceptível; enquanto que o gene *cytochrome c oxidase cbb3-type subunit I* (EC 1.9.3.1) foi estritamente induzido no tolerante e, na sua contraparte susceptível, ancorou *unitags* induzidas e reprimidas. No que tange aos transcritos produzidos (*unitags* expressas), os dados indicam que o genótipo susceptível, provavelmente, reprime a via, uma vez que há um maior volume de *unitags* reprimidas do que induzidas (Tabela 1); tal fato é o oposto para o genótipo tolerante, uma vez que ocorre um maior volume de *unitags* induzidas, quando comparado com o volume de *unitags* reprimidas (Tabela 1).



Tabela 1. Apresentação dos genes diferencialmente expressos para via da fosforilação oxidativa: identificação via EC (*Enzyme Commission number*) e número total de respectivas *unitags* as quais foram ancoradas em transcritos de feijão-comum, bem como a quantidade de *unitags* induzidas e reprimidas para cada genótipo (TOL, tolerante; SUS, susceptível).

Genótipo	Regulação	EC 1.6.5.3	EC 1.6.5.3/1.6.99.3	EC 1.3.5.1	EC 1.10.2.2	EC 1.9.3.1	EC 3.6.1.1	EC 3.6.3.14	EC 3.6.3.6	TOTAL
TOL		3	13	5	5	2	17	13	16	74
	UR	3	7	5	3	2	11	3	8	42
	DR	0	6	0	2	0	6	8	8	30
SUS		5	16	3	8	6	20	8	22	88
	UR	1	10	0	3	1	14	1	5	35
	DR	4	6	3	5	5	6	7	17	53

A regulação de cada gene diferencialmente expresso, à luz dos dados disponíveis na literatura, e o possível efeito dessas regulações na fisiologia do vegetal, perante o estresse estudado são discutidos a seguir.

## 1. Complexo I (NADH: ubiquinone oxidoreductase; EC 1.6.5.3)

É representada pela primeira enzima da cadeia transportadora de elétrons, a qual cataliza a transferência de dois elétrons de NADH à ubiquinona, acoplada à translocação de dois prótons através da membrana mitocondrial interna. Nesse complexo, os elétrons, num primeiro momento, migram de NADH para o FMN (flavina mononucleotídeo). A partir desse ponto, os elétrons são então transferidos através de diversos centros de ferro-enxofre até, finalmente, reduzirem a ubiquinona, produzindo ubiquinol (LODISH *et al.*, 2004).

A Figura 1 (A, B) mostra três enzimas com os respectivos ECs: 1.6.5.3, 1.6.99.3 e 1.6.99.5. As enzimas *NADH dehydrogenase* (EC 1.6.5.3) e *NADH dehydrogenase* (quinone) (EC:1.6.99.5), segundo a base de dados KEGG, não catalizam reações de oxirredução tendo a ubiquinona como aceptor final de elétrons, nem apresentam a capacidade de promover o bombeamento de prótons, podendo ser consideradas como *NADH dehydrogenases* tipo II (Rasmusson *et al.*, 2008). Essas enzimas podem atuar no transporte de elétrons não acoplado com a fosforilação oxidativa, visando à manutenção do *status* redox da célula. Tal situação é oposta para *NADH:ubiquinone oxidoreductase* (EC 1.6.5.3), a qual é a única que apresenta especificidade para a realização da reação de oxidação do NADH, tendo a ubiquinona como aceptor final (além de promover o bombeamento de prótons para o espaço intermembranar mitocondrial), sendo portanto, a primeira enzima da cadeia transportadora de elétrons acoplada ao bombeamento de prótons. O gene codificador dessa enzima apresenta regulação similar em ambos os genótipos, ancorando *unitags* induzidas e reprimidas. Para o genótipo tolerante, 16 *unitags* foram diferencialmente expressas (10 induzidas e 10 reprimidas). O grande número de *unitags* 



diferencialmente expressas pode representar um complexo mecanismo de regulação das cerca de 40 subunidades polipeptídicas, as quais compõem o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (LODISH *et al.*, 2004). Até o momento, não há na literatura nenhum relato abrangendo expressão gênica de NADH:ubiquinone oxidoreductase e estresse vegetal, sendo necessárias maiores análises para o entendimento dessa relação.

### 2. Complexo II (Succinate-CoQ Reductase)

A enzima *succinate dehydrogenase* representante do complexo II oxida a molécula de succinato a fumarato. Dois elétrons são liberados nessa conversão e transferidos ao FAD o qual os transfere em seguida para um aglomerado de Ferro-enxofre e finalmente pra a CoQ (coenzima Q; LODISH *et al.*, 2004). Tal reação de oxirredução não libera energia suficiente para realizar o bombeamento de prótons para o espaço intermembranar da mitocôndria, não contribuindo para a geração do gradiente eletroquímico.

Na figura 1 (A e B), estão representadas, com respectivos ECs, duas subunidades desse complexo: a *succinate dehydrogenase flavoprotein subunit* (EC 1.3.99.1) e a *succinate dehydrogenase* (ubiquinone; EC 1.3.5.1). A última é a responsável pela oxidação do succinato tendo como aceptor final de elétrons a ubiquinona, gerando ubiquinol (LODISH *et al.*, 2004). O gene codificador dessa enzima apresentou regulação contrastante entre os genótipos analisados. O genótipo tolerante apresentou cinco *unitags* estritamente induzidas, enquanto que o susceptível apresentou três *unitags* estritamente reprimidas. Em ensaio recente, Gleason *et al.* (2010) mapearam mutação no complexo II, na subunidade catalítica SDH1-1 (*succinate dehydrogenase1-1*), sendo que tal complexo teve sua atividade reduzida para 20 % da normal e o mutante exibiu maior susceptibilidade a patógenos, quando comparado ao tipo selvagem. Os autores observaram também que a atividade do complexo II é importante para o vegetal, uma vez que constitui fonte de  $H_2O_2$  envolvida na defesa deste e ativação de genes responsivos a estresses. Logo, o genótipo susceptível, potencialmente, seria afetado de forma negativa pela repressão do gene associado ao complexo; entretanto, análises são necessárias para confirmar se e como isso ocorre em feijão-caupi.

### 3. Complexo III (CoQH2–Cytochrome *c* Reductase)

O ubiquinol gerado pelos complexos I ou II doa dois elétrons à enzima *ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome* (EC 1.10.2.2). Concomitantemente, são liberados dois prótons para o espaço intermembranar, auxiliando na geração do gradiente eletroquímico. Dentro do complexo III, os elétrons liberados são transferidos pela ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome a um aglomerado de ferro-enxofre e então são transferidos ao citocromo C (LODISH *et al.*, 2004).

O gene codificador da enzima responsável pelo processo de oxidação nesse complexo foi regulado de forma semelhante nos genótipos, ancorando *unitags* induzidas e reprimidas [Figura 1 (A e B)]. O genótipo tolerante apresentou duas *unitags* induzidas e três reprimidas, e o susceptível, três *unitags* induzidas e cinco reprimidas (Tabela 1). Até o momento, não há dados associados à expressão gênica e atividade do complexo III, nem envolvendo mutantes, entretanto, o complexo é um dos principais sítios produtores de ROS na mitocôndria (CHEN *et al.*, 2003), e o funcionamento dessa estrutura é de importância para a manutenção do equilíbrio redox da célula em tempos de estresse. Análises devem ser feitas para aventar possibilidades de como a orquestração dessas *unitags* auxiliam na cadeia de transporte de elétrons durante a resposta ao estresse analisado.



# 4. Complexo IV (Cytochrome *c* Oxidase)

Após a redução do citocromo c no complexo III, essa molécula transfere elétrons para a enzima citocromo c oxidase a qual os repassa a uma série de carreadores de elétrons até o aceptor final, oxigênio, produzindo duas moléculas de H<sub>2</sub>O. Durante esse deslocamento de elétrons, dois prótons são bombeados para o espaço intermembranar (LODISH *et al.*, 2004).

O gene codificador dessa enzima foi regulado de forma diferente nos genótipos: no tolerantefoi estritamente induzido (duas *unitags*); no susceptível, o gene ancorou uma *unitag* induzida e cinco reprimidas (Tabela 1). Em termos transcricionais, esse gene [juntamente com o gene codificador de *succinate dehydrogenase flavoprotein subunit* (EC 1.3.99.1)] é candidato para diferenciar os genótipos aqui analisados sob o estresse de desidratação radicular (de até 150 min), pois sua expressão foi, basicamente, oposta. Igualmente aos complexos I e III, o complexo IV não possui estudos relacionando alterações transcricionais de seus genes codificadores a estresses (bióticos ou abióticos), nem estudos de mutantes associados; apenas estão disponíveis estudos de caracterização estrutural. Estudos são necessários para inferir sua importância à manutenção da homeostase vegetal, em períodos de estresse.

## 5. Complexo V ( $F_0F_1$ complex ou ATP synthase)

Nesse sítio, é realizado um complexo grupo de reações que culminam na síntese de ATP ou na sua degradação (maiores detalhes, vide LODISH *et al.*, 2004).

A figura 1 (A e B) apresentou ambos os genótipos se comportando de forma semelhante para as enzimas analisadas, ou seja, os genes associados ao complexo V ancoraram *unitags* com regulação contrastante. A regulação do gene codificador da enzima *F-type H+-transporting ATPase subunit a* (EC 3.6.3.14), cuja principal função é a síntese de ATP (atpsynthase.info, 2013) foi basicamente reprimida em ambos os genótipos (Tabela 1). A repressão da síntese dessa molécula durante períodos de estresse hídrico vem sendo relatada (Tezara *et al.*, 1999). A outra enzima associada ao complexo V foi a *H+-transporting ATPase* (EC 3.6.3.6; Tabela 1), uma *ATPase* tipo P,a qual foi igualmente induzida e reprimida no genótipo tolerante (Tabela 1), sendo basicamente reprimida no genótipo susceptível. O envolvimento de genes codificadores dessa enzima com estresses, incluindo alta salinidade, desidratação, baixas temperaturas, vem sendo relatado (JANICKA-RUSSAK, 2011). Entretanto, análises são necessárias para observar a influencia dessa regulação contrastante na fisiologia dos genótipos.

#### Conclusão

A identificação de *unitags* SuperSAGE associadas à via metabólica da fosforilação oxidativa proporcionou observar similaridades e diferenças na regulação dessa via entre os genótipos de feijão-caupi, contrastantes para desidratação radicular, aqui analisados. Dados indicaram que os complexos II, IV e V foram regulados, basicamente, de formas diferentes e em determinadas situações, opostas entre os genótipos, sugerindo potenciais alvos moleculares como candidatos para essa diferenciação. Entretanto, maiores detalhes são necessários para examinar como essa divergência influencia o comportamento fisiológico de ambos.



## Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa e ao CNPq, pelo financiamento e bolsas, e as unidades Embrapa Arroz

e feijão, Embrapa Meio-Norte e Embrapa Soja pelos apoios diversos de seus pesquisadores e coordenação.

## Referências

LODISH, H.; BERK A, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL J. Molecular Cell Biology, 5. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. 973p.

RASMUSSON, A.G.; GEISLER, D.A.; MØLLER; I.M. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. Mitochondrion, v.8, n. 1, p.47-60, 2008.

http://www.atpsynthase.info/FAQ.html#Sec3, acessado em 02/04/2013.

GLEASON, C.; HUANG, S.; THATCHER, L.F.; FOLEY, R.C.; ANDERSON, C.R.; CARROLL A.J.; HARVEY, A.M.; SINGH, K.B. Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America, v. 108, n. 26, p. 10768-10773, 2011.

CHEN, Q.; VAZQUEZ, E.J.; MOGHADDAS, S.; HOPPEL, C.L.; LESNEFSKY, E.J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. The Journal of Biological Chemistry, v. 278, n.38, p.36027-36031, 2003.

TEZARA, W.; MITCHELL, T.J; DRISCOLL, S.D; LAWLOR, D.W. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. Nature, v. 411, p. 914-917, 1999.

JANICKA-RUSSAK, M. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. In: Abiotic stress response in plants - physiological, biochemical and genetic perspectives. 1. ed. Shanker, A. (ed.). Intech, p. 197-218.

MATSUMURA, H.; ITO, A.; SAITOH, H.; WINTER, P.; KAHL, G.; REUTER, M.; KRÜGER, D.H.; TERAUCHI, R. SuperSAGE. Cell Microbiology. v.7, n.1,p.11-8, 2000.

KIDO, E.A.; BARBOSA P.K.A.; FERREIRA NETO J.R.C.; PANDOLFI V.; HOULLOU-KIDO L.M.; CROVELLA S.; MOLINA C.; KAHL G.; BENKO-ISEPPONA.M. Identification of plant protein kinases in response to abiotic and biotic stresses using SuperSAGE. Current Protein and Peptide Science, v. 12, p.643-656.