Armando Jorge Gomes Teixeira

Estudo das isoformas da glutamina sintetase em *Solanum tuberosum* L.

Departamento de Botânica

Faculdade de Ciências
Universidade do Porto

Porto
2002

Armando Jorge Gomes Teixeira

Estudo das isoformas da glutamina sintetase em *Solanum tuberosum* L.

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Doutor
(nº 1 do Art. 8 do Decreto-Lei 388/70, de 18 de Agosto)

Orientador – Professor Doutor Roberto Salema; Faculdade de Ciências, Universidade do Porto
Co-orientador – Prof. Doutora Susana Pereira; Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Departamento de Botânica

Faculdade de Ciências
Universidade do Porto

Porto
2002

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo programa PRAXIS XXI, através da bolsa de doutoramento com a referência PRAXIS XXI / BD / 9663 / 96

Aos meus Pais

Às minhas irmãs

Aos meus sobrinhos

Ao abrigo do disposto no nº2 do Artigo 8º do Decreto-Lei 388/70 foram utilizados na elaboração desta dissertação resultados incluídos nas seguintes comunicações:

- "Isolation of Glutamine Synthetase cDNA sequences from *Solanum tuberosum* L. and expression of this enzyme in different organs of the plant" - S. Pereira, **A. J. Teixeira**, J. Pissarra, C. Sunkel & R. Salema. X Congresso Nacional de Bioquímica, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 31 Outubro - 2 Novembro de 1996.

- "Characterization of three glutamine synthetase-related cDNAs in *Solanum tuberosum* L." – **Teixeira, J.**; Duarte, P.; Pereira, S. & Salema, R.. XI Congresso Nacional de Bioquímica, Hotel dos Templários, Tomar, Portugal, 28 – 30 Novembro de 1998.

- "Differential expression of glutamine synthetase isoforms during senescence in potato". - **Teixeira J**, Pereira S & Salema R. 1999. Workshop on recent advances in plant biology – From stress and oxygen radicals to programmed cell death and senescence. IBMC. Porto, Portugal.

- "Glutamine synthetase expression in potato plants (*Solanum tuberosum* L.)". – **Teixeira, J.**; Pereira, S.; Ávila, C.; Cánovas, F. & Salema, R. XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal / VI Congreso Hispano-Luso , Sevilha, Espanha, 19 – 22 de Novembro de 1999.

- **Teixeira, J**; S Pereira & R Salema. Differential accumulation of cytosolic GS-related transcripts during leaf ageing in potato plants. "4º Workshop de Biotecnologia de Plantas – Das Potencialidades à Realidade". Universidade de Évora. 27 e 28 de Abril de 2000.

- **Teixeira, J**; Pereira, S & Salema, R. A simple method to obtain 5' ends of mRNA sequences. "Simpósio de Biotecnologia de Plantas – Realizações Passadas e Perspectivas Futuras". Departamento de Botânica e Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), U.P. Porto (2000).

- **Teixeira, J**; Pereira, S & Salema, R. Differential expression of glutamine synhetase genes and polypeptides in potato plants. "XII Congresso Nacional de Bioquímica". Póvoa de Varzim. Portugal (2000).

- **Teixeira, J**, Queiroz, F, Fidalgo, F, Pereira, S & Salema, R. 2001. "Effect of salinity on glutamine synthetase (GS) polypeptide accumulation and on proline and protein levels in potato callus tissue." – "6th International Symposium on inorganic nitrogen assimiltion: from the field to the genome; and 4th FOHS Biostress Symposium". Reims. France.

- **Teixeira, J**, Pereira, S & Salema, R. 2001. "Glutamine synthetase gene expression during drought and NaCl stresses in potato plants." – 2nd International meeting on Cellular Responses to Oxidative Stress. Sensing, signalling and gene expression. Póvoa de Varzim. Portugal

AGRADECIMENTOS:

Ao meu orientador Professor Doutor Roberto Salema, a quem dedico grande estima e consideração, pela oportunidade que me concedeu em continuar o estudo iniciado durante a realização do trabalho de Mestrado e que resultou nesta tese. Gostaria de agradecer particularmente a confiança que depositou em mim, os seus ensinamentos, conselhos e apoio disponibilizados durante todo este tempo e que resultaram num aumento de auto-confiança e num melhor sentido de responsabilidade e de organização.

À minha co-orientadora Doutora Susana Pereira, por incentivar e estimular o meu interesse através dos vários "brain-stormings" que fizemos desde sempre. Agradeço-lhe também a amizade que nasceu e cresceu ao longo do tempo.

Ao Doutor Cláudio Sunkel, a oportunidade que proporcionou para realizar a primeira parte deste trabalho disponibilizando o Laboratório da Genética Molecular da Mitose e as condições necessárias à aprendizagem e execução das técnicas de Biologia Molecular utilizadas.

Ao Professor Francisco Cánovas (Faculdade de Ciências da Universidade de Málaga, Espanha) a oportunidade que proporcionou para a aprendizagem das técnicas de extracção e manuseamento de RNA de plantas e a análise bidimensional de proteínas, assim como às críticas construtivas em relação ao trabalho.

À Professora Doutora Isabel Santos, cuja atitude perante a ciência é contagiante, aliada à docência das disciplinas de Fisiologia Vegetal, o que me deu grande entusiasmo e paixão por esta área.

Ao Professor José Pissarra, pelo apoio, críticas construtivas e disponibilidade oferecidos durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas e investigadores do Departamento de Botânica pelo apoio e amizade demonstrados. Aos colegas dos laboratórios da Genética Molecular da Mitose e da "Microbiologia", pela disponibilidade constante e pelo ambiente de trabalho que proporcionaram.

Aos colegas do Departamento Stresse em Plantas, pelo apoio e companheirismo que me incentivaram na realização deste trabalho.

Um agradecimento especial para os meus Pais, que me permitiram seguir o meu caminho de acordo com os meus instintos, apoiando-me sempre nas decisões que tomei. À minha família por ter sido um suporte tão sólido e um porto de abrigo quando as coisas corriam pior.

Aos meus grandes amigos Tó, Bé, Luis, Ana Sofia, Sofia e Maria João pelo incentivo e por estarem presentes quando precisei deles, pela força e ânimo que me deram. Um agradecimento muito especial vai para os amigos que fiz em Espanha – Nandi e Ignácio – pelo carinho, apoio e companhia que me proporcionaram durante a minha estadia em Málaga.

A todos aqueles aqui não mencionados de que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

O azoto é um dos principais factores que limitam o crescimento das plantas. A enzima glutamina sintetase (GS) corresponde à enzima mais importante do metabolismo do azoto porque catalisa a formação de glutamina a partir de amónia e glutamato, ocupando a mesma posição chave que a RuBisCo ocupa no metabolismo do carbono. Existem duas isoformas da GS nas plantas superiores. Uma corresponde à GS1 e surge no citosol das células que compõem os órgãos da planta; a outra é a GS2, que surge no estroma dos cloroplastos das células fotossintéticas e dos plastídios das células dos tecidos não fotossintéticos. Estas isoformas acumulam-se diferencialmente nas plantas desempenhando papeis distintos no metabolismo do azoto, apesar de poderem coexistir num mesmo órgão. A GS2 das folhas é responsável pela incorporação da amónia resultante da assimilação primária ou proveniente da fotorrespiração. A GS1 presente nas raízes funciona na assimilação primária da amónia; nas folhas parece estar envolvida com a produção de glutamina para exportação devido à sua associação preferencial com o floema.

A batateira (*Solanum tuberosum* L.) é uma planta de elevado interesse económico, correspondendo à quarta cultura mais importante e à primeira dicotiledónea mais cultivada em todo o mundo, consistindo por isso numa das principais fontes de alimentação para o Homem. Durante o seu ciclo de vida sofre alterações no desenvolvimento que traduzem processos de produção, mobilização e utilização de compostos azotados em toda a planta, sendo por isso importante o estudo deste metabolismo nesta espécie. A elevada salinidade e a secura são factores ambientais que constituem dos problemas mais graves na agricultura em muitas regiões. A resposta do metabolismo do azoto da batateira, e em especial da sua enzima chave, a estas condições ambientais revela ser de elevado interesse não só fisiológico como económico. Já foram detectadas ambas as isoformas da GS nas folhas de batateira, estando a GS2 presente no estroma dos cloroplastos das células de mesófilo e a GS1 no citosol das células de companhia de floema. Nos tubérculos foi detectada apenas a GS1, a qual surgiu no floema interno. Até à data foi isolado e caracterizado um clone de cDNA relacionado com a GS2 e isolado um clone de cDNA relacionado com a GS1.

Neste trabalho continuou-se a caracterização bioquímica e molecular da GS em batateira. Foi isolado um terceiro clone de cDNA, o qual está relacionado com a GS1 e é distinto do previamente isolado. A caracterização dos cDNAs da GS foi feita por determinação das suas sequências, e comparação destas com outras disponíveis em bases de dados, e por técnicas de biologia molecular como "Southern", "Western", "Northern blotting" e RT-PCR. As sequên-

cias de nucleótidos dos cDNAs utilizados neste estudo foram submetidas na base de dados GenBank. Verificou-se que a expressão da GS é finamente regulada ao longo do desenvolvimento da batateira e em resposta às condições ambientais a que a planta está exposta. Esta regulação ocorre principalmente ao nível da transcrição sendo, no caso dos tubérculos, a regulação pós-transcricional notória. A GS da batateira é representada por três polipeptídeos que são codificados por uma pequena família nuclear multigénica com expressão diferencial. A GS2 é codificada por um gene, surge apenas nos órgãos aéreos e corresponde à isoforma cuja acumulação é mais afectada na planta, uma vez que com o envelhecer das folhas e em resposta a situações de secura e salinidade (250 mM; 100 e 200 mM NaCl) assiste-se a um declínio das suas expressão e acumulação. A GS1 é resultado da expressão diferencial de dois genes. Nas raízes só um desses genes é expresso, enquanto que nos restantes órgãos analisados são ambos. Desde o início do desenvolvimento foliar até à senescência há um aumento gradual da expressão do gene da GS1 que não é expresso nas raízes, colocando-o no grupo dos "Senescence Associated Genes"; em simultâneo ocorre um decréscimo na expressão e acumulação dos outros genes da GS após o início deste processo fisiológico. A regulação da expressão dos genes que codificam a GS nas diferentes fases de desenvolvimento foliar está relacionada com as possíveis vias de utilização de glutamina: local – para a biossíntese de constituintes azotados; exterior – para a translocação de compostos azotados e a utilização destes noutros locais da planta.

Padrão comum de resposta à salinidade por parte dos diferentes órgãos da planta e do tecido caloso (exposto a 50 e 100 mM de sal) consiste no aumento do teor de GS1 e a diminuição do teor de GS2. A diminuição de GS2 é reflexo da destruição dos plastídios aliada à diminuição da expressão do gene que a codifica. O aumento de GS1 em resposta às condições de salinidade observado em todos os órgãos analisados deve-se essencialmente ao aumento da expressão do gene que é expresso nas raízes. O padrão de expressão deste gene, aliado à elevada homologia com o cDNA *gln 1-5* de tabaco, sugere o envolvimento desta forma da GS1 na manutenção do teor de prolina na batateira, o qual aumentou em todas as situações estudadas nas plantas sujeitas a salinidade e secura, e que funciona como osmoprotector e osmorregulador. A indução da expressão *de novo* do outro gene da GS1 nas raízes expostas a salinidade e secura sugere o papel crucial desta forma na manutenção do metabolismo do azoto nestes órgãos em resposta às condições externas desfavoráveis. A regulação da expressão deste gene aparenta ser dependente do órgão e de outros factores ainda não identificados, onde se poderão incluir o balanço hormonal e a razão C/N nesse órgão, por exemplo.

ABSTRACT

Nitrogen is one of the major factors that limit plant growth. The most important enzyme in the nitrogen metabolism is glutamine synthetase (GS) because it catalyses the formation of glutamine from ammonia and glutamate, therefore occupying the same key position as RuBisCo occupies in the carbon metabolism. There are two isoforms of GS in higher plants. One corresponds to GS1 and appears in the cytosol of the plant cells; the other is GS2, and appears in the stroma of the chloroplasts of photosynthesising cells and of the plastids of the non-photosynthetic cells. These isoforms accumulate differentially and play distinct roles in the nitrogen metabolism, although they may coexist in the same organ. The leaf GS2 is responsible for the incorporation of ammonia derived from the primary assimilation or from photorespiration. GS1 present in roots functions in the primary assimilation of ammonia and in the leaves appears to be involved with the production of glutamine to be exported because of its association with the phloem.

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is a plant that carries a great economical importance, being the fourth most important crop and the first most cultivated dicotyledonous plant in the world, consisting in one of the major sources of food for mankind. During its life cycle potato plants suffer changes in their development that translate processes of production, mobilization and use of nitrogenous compounds within the plant. This is why the study of nitrogen metabolism is so important. High salinity and drought are environmental factors that constitute the major agricultural problems in many regions. The response of the potato nitrogen metabolism, and specially its key enzyme, to these environmental conditions is of great physiological and economical importance.

The two GS isoforms have been detected in potato leaves, being GS2 present in the chloroplast stroma of the mesophyll cells and GS1 in the cytosol of the phloem companion cells. In the tubers only GS1 was detected, being associated with the phloem. Until this date there were isolated and characterised one cDNA clone related to GS2 and one cDNA clone related to GS1.

In this work the biochemical and molecular characterisation of GS in potato was continued. A third cDNA clone was isolated, which is related to GS1 and different from the cDNA previously isolated. The cDNA characterisation was done by sequencing and by comparison of their sequences to others available in data banks; and by molecular biology techniques as Southern, Western, Northern-blotting and RT-PCR. The nucleotide sequences of these cDNAs were submitted to the GenBank data bank.

It was possible to verify that the expression of GS is finely regulated throughout plant development an in response to environmental conditions. This regulation occurs mainly at the transcriptional level, being in the case of tubers notorious some level of pos-transcriptional regulation. Potato GS is represented by three polypeptides coded by a small multigenic family with differential expression. GS2 is coded by one gene, is present at the upper organs only and corresponds to the isoform which accumulation is most affected within the plant, since there was observed a decline of its expression and accumulation throughout leaf development and in response to drought and salinity (250 mM; 100 and 200 mM NaCl). GS1 is the result of the differential expression of two genes. In roots only one of these genes is expressed but both are expressed in the rest of the organs studied. The gene that is not expressed in roots has a gradual increase of expression throughout leaf development, which makes it as belonging to the "Senescence Associated Genes" group. Simultaneously there is a decrease in the expression and accumulation of the other GS-coding genes during this time. The regulation of the expression pattern of the GS genes during leaf development is related to the possible pathways of glutamine utilization: local – biosynthesis of nitrogenous compounds; exterior – transport of nitrogenous compounds and their use in other parts of the plant.

A common pattern in the response to salinity by the different organs of the plant and callus tissue (exposed to 50 and 100 mM salt) is an increase in the levels of GS1 and a decrease in GS2 levels. The decrease in GS2 is a reflex of the plastid destruction allied to the decrease in the GS2-gene expression. The increase of GS1 observed in response to the salinity conditions observed in all organs is due to the increased expression of the gene that is expressed in the roots. The expression pattern of this gene, allied to its high homology with the tobacco *gln 1-5* cDNA, suggests that this isoform is related with the increased proline levels observed in all organs in response to drought and salinity, which will act as an osmoregulator and an osmoprotector. The *de novo* induction of the other GS1 gene in roots exposed to salinity and drought suggests that this isoform plays a crucial role in maintaining the nitrogen metabolism within these organs in response to unfavourable external conditions. This gene expression regulation appears to be organ dependent and also dependent of other unidentified factors, like the hormonal balance and the C/N balance within that organ in question.

RÉSUMÉE

L'azote est l'un des principaux facteurs qui limitent la croissance des plantes. L'enzyme glutamine synthetase (GS) est l'enzyme la plus importante du métabolisme de l'azote parce qu'elle catalyse la formation de la glutamine à partir d' ammoniaque et de glutamate, occupant la même position-clef que la RuBisCo dans le métabolisme du carbone. Il y a deux isoformes des GS dans les plantes supérieures. L'une correspond à la GS1 et elle apparaît dans le cytosol des cellules des organes de la plante; l'autre est la GS2, qui apparaît dans le l'estrome des chloroplastes des cellules photosynthétiques. Ces isoformes s'accumulent différemment dans les plantes jouant des rôles distincts dans la métabolisme de l'azote, bien qu'elles puissent exister dans le même organe. La GS2 des feuilles est responsable de l'incorporation de l'ammoniaque résultant de l'assimilation primaire ou de la photorespiration. La GS1 présente dans les racines fonctionne dans l'assimilation primaire de l'ammoniaque; dans les feuilles elle semble être impliquée dans la production de glutamine à exporter à cause de son association au phloéme. La plante de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est une plante de grand intérêt économique, correspondant à la quatrième culture la plus importante et à la première dicotylédone la plus cultivée dans le monde entier, soient donc une des principales sources d'alimentation pour l'homme. Pendant son cycle de vie, elle souffre des changements dans son développement qui expliquent les processus de production, mobilisation et utilisation des composés d'azote dans toute la plante. Il est donc important de faire l'étude de ce métabolisme dans cette espèce. La salinité élevée et la sécheresse sont des facteurs environnementaux qui constituent les problèmes les plus sérieux dans l'agriculture dans plusieurs régions. La réponse du métabolisme de l'azote de la plante de la pomme de terre, en particulier de son enzyme la plus importante, à ces conditions environnementales a une grande importance physiologique et économique. On a déjà découvert les deux isoformes de la GS dans les feuilles de la plante de pomme de terre: la GS2 présente dans l'estrome des chloroplastes de cellules de mesophile et la GS1 dans le cytosol des cellules de compagnie de phloéme. Dans les tubercules, on a découvert seulement la GS1, qui a surgi dans le phloéme interne. Jusqu'à present, il a été isolé et caractérisé un clone de ADNc lié à la GS2 et isolé un clone de ADNc lié à la GS1. Dans ce travail, on a poursuivi la caractérisation biochimique et moléculaire de la GS dans la plante de pomme de terre. On a été isolé un troisième clone d'ADNc, qui est lié a la GS1 et différent de celui qui a été isolé. La caractérisation des ADNc de la GS a été faite par détermination de leurs séquence, et par comparaison de celles-ci avec d'autres disponibles, et par des techniques de biologie moléculaire comme "Southern", "Northern", "Western blotting" et RT-PCR. Dans ce travail on a vérifié que l'expression

de la GS est finalement régulée au cours du développement de la plante de pomme de terre et en réponse à des conditions environnementales auxquelles la plante est exposée. Cette régulation survient principalement au niveau de la transcription etant, dans le cas des tubercules, une régulation pos-transcricionnel évidente. La GS de la plante de pomme de terre est représentée par trois polypeptides codés par une petite famille nucléaire multigénique d'expression différentielle. La Gs2 est codée par un gène, apparaît seulement dans les organes aériens et correspond à l'isoforme dont la accumulation est la plus affectée dans la plante avec vieillissement des feuilles, et en réponse à des situations de sécheresse et de salinité on peut noter le déclin de cette expression et accumulation. La GS1 est le résultat de la différente dans l'expression de deux gènes. Dans les racines, seulement l'un des gènes s'exprime, pendant que dans les autres organes analisés ils les deux s'expriment. Du début du développement foliaire jusqu'à la sénescence, il y a une augmentation graduelle de l'expression du gène de la GS1 qui n'est pas exprimé dans les racines, c'est le groupe des "Senescence Associated Genes". Au même temps, il y a une décroissance dans l'expression et l'accumulation des autres gènes de la GS après le début de ce processus physiologique. La régulation de l'expression des gènes qui codifient la GS dans les différentes phases du développement foliaire est rapportée avec les possibles voies d'utilisation de glutamine – locale – pour la biosynthèse des constitues azotés – extérieur – pour la translocation des composés azotés et son utilisation dans d'autres endroits de la plante. Le modèle commun de réponse à la salinité de la part des différents organes de la plante et du tissu caleux (exposé à 50 et 100 mM de sel) consiste en l'augmentation de la teneur en GS1 et la diminution de la teneur de GS2 qui est le réflexe de la destruction des plastides liée à la diminution de l'expression du gène codant. L'augmentation de la GS1 en réponse aux conditions de salinité observée dans tous les organes analisés est dûe surtout à l'augmentation de l'expression du gène qui s'exprime dans les racines. Le modèle d'expression de ce gène, lié à l'homologie élevé avec l'ADNc *gln 1-5* du tabac, suggère l'implication de cette forme de la GS1 dans le maintien de la teneur en proline dans la plante de pomme de terre, dont l'augmentation a été vérifiée dans toutes les situations étudiées à partir des plantes exposées à des conditions de la salinité et sécheresse, et qui fonctionne comme osmoprotecteur et osmorégulateur. L'induction de l'expression *de novo* de l'autre gène de la GS1 dans les racines exposées à la salinité et sécheresse suggère un rôle très important de cette forme dans la manutien du métabolisme de l'azote dans ces organes en réponse à des conditions externes défavorables. La régulation de l'expression de ce gène semble être dépendant de l'organe et d'autres facteurs comme le bilan hormonal et la raison C/N dans cet organe, par exemple.

ÍNDICE:

1 – INTRODUÇÃO 7
1.1 – A ASSIMILAÇÃO DO AZOTO EM GLUTAMINA E GLUTAMATO 8
I – Assimilação primária da amónia 9
II – Reassimilação da amónia proveniente da fotorrespiração 9
III – Reassimilação do azoto reciclado 11
1.2 –O CICLO GS-GOGAT 12
1.3 – O METABOLISMO DA GLUTAMINA E DO GLUTAMATO 14
1.4 – A ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE (GS) 15
1.4.1 – A estrutura quaternária da GS e a modulação da actividade enzimática 15
1.4.2 – Heterogeneidade das isoenzimas da GS 18
1.4.3 – A estrutura primária das subunidades da GS 20
1.4.4 – A subunidade da GS2 22
1.4.5 – As subunidades da GS1 26
1.4.6 – Estrutura dos mRNAs 34
1.5 – CONTROLO METABÓLICO E CONTROLO PELA LUZ DO METABOLISMO DO AZOTO 35
1.6 – A GS E A SENESCÊNCIA FOLIAR 36
1.7 – A GS, A SALINIDADE E A SECURA 42
1.8 – A BATATEIRA 45
1.9 – ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA BATATEIRA 47
Desenvolvimento da plântula 47
O sistema radicular 48
O porte aéreo 48
O caule 48
A estrutura da folha 49
Os caules subterrâneos 49
O tubérculo 50
1.10 – A BATATEIRA, A SALINIDADE E A SECURA 52
1.11 – A GS E A BATATEIRA 55
Órgãos verdes 56
Órgãos não verdes 58
OBJECTIVOS 60
2 – MATERIAL E MÉTODOS 62
MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTURA 63
Material vegetal 63
Estirpes bacterianas 64
Vectores 64
DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DA BIBLIOTECA FÁGICA DE cDNA 64
PREPARAÇÃO DE SONDAS DE DNA MARCADAS COM ^{32}P-dCTP 65
Marcação 65
Filtração 65
PLAQUEAMENTO E RATREIO DA BIBLIOTECA COM SONDA DE DNA MARCADA COM ^{32}P-dCTP 66
Primeiro rastreio: 67
Segundo e terceiro rastreios: 68
PREPARAÇÃO DE LISADOS DE FAGO 68
EXTRACÇÃO DO DNA DE FAGO LAMBDA 68
EXCISÃO DO FRAGMENTO DE INSERÇÃO DO GENOMA DE FAGO 69
EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DO GEL 70

AMPLIFICAÇÃO DOS cDNAs POR PCR 70
EXCISÃO *in vivo* DO FAGUEMÍDIO PSK CONTENDO O cDNA DE INTERES-SE DO VECTOR FÁGICO λZAPII 71
SUBCLONAGEM DO cDNA EXCISADO DO VECTOR λgt11 EM FAGUEMÍDIO pGEMZ11f (+) 73
PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES XLI-Blue/DH5α 73
PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES JM109 74
TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES 74
ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DOS RECOMBINANTES 75
ISOLAMENTO (mini-preps) DE DNA PLASMÍDICO 75
ISOLAMENTO (midi-preps) DE DNA PLASMÍDICO 75
DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DO FRAGMENTO DE INSERÇÃO APÓS SUBCLONAGEM EM FAGUEMÍDIO/EXCISÃO *IN VIVO* 76
SEQUENCIAÇÃO DE DNA EM CADEIA DUPLA 77
I - Sequenciação com o "kit" "T7 Sequencing Kit" (Amersham Pharmacia Biotech - EUA) 77
II - Sequenciação com o "kit" "PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Perkin Elmer Cetus, EUA) 79
III - Sequenciação com o "kit" "DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit" (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) 79
EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO 80
EXTRACÇÃO DE RNA DOS VÁRIOS ORGÃOS DE BATATEIRA 81
QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS 85
DIGESTÃO DE DNA GENÓMICO PARA "SOUTHERN BLOTTING" 86
CORRIDA DOS PRODUTOS RESULTANTES DA DIGESTÃO DE DNA GENÓMICO PARA "SOUTHERN BLOTTING" 86
TRANSFERÊNCIA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS SEPARADOS POR "SOUTHERN BLOTTING" 87
"NORTHERN BLOTTING" 88
Transferência alcalina do RNA no sentido descendente 89
Transferência do RNA no sentido ascendente 91
DOT- BLOT DE RNA 91
MARCAÇÃO DE SONDAS NÃO ISOTÓPICAS PELA INCORPORAÇÃO DE NUCLEÓTIDOS MARCADOS COM DIGOXIGENINA 92
A) Preparação do DNA a ser usado como molde na reacção de marcação 93
B) Marcação de sondas de DNA de cadeia dupla por incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR 94
C) Marcação de sondas de DNA de cadeia simples por incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR assimétrico 96
HIBRIDAÇÃO DAS MEMBRANAS RESULTANTES DO "NORTHERN-BLOTTING" COM SONDAS MARCADAS COM ^{32}P-dCTP 97
HIBRIDAÇÃO DAS MEMBRANAS RESULTANTES DAS TRANSFERÊNCIAS DOS ÁCIDOS NUCLEICOS COM SONDAS MARCADAS COM DIG-11-dUTP 98
DETECÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS MARCADOS COM DIGOXIGENINA 100
TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) ACOPLADA A PCR 101
5' RACE – "Rapid Amplification of cDNA Ends" 102
A) – "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0" 103
B) – "Marathon cDNA Amplification Kit" (Clontech, EUA) 105
C) – 5' RACE por ligação directa dos híbridos cDNA-mRNA a um faguemídio 107
ANÁLISE DA ACUMULAÇÃO DOS POLIPEPTÍDEOS POR SDS-PAGE 108
a) extracção de proteínas solúveis 109

b) determinação do teor de proteínas solúveis presentes no extracto 109
c) preparação das amostras para a corrida em SDS-PAGE 109
d) separação electroforética em gel descontínuo de SDS-PAGE 110
COLORAÇÃO DO GEL SDS-PAGE COM NITRATO DE PRATA 110
COLORAÇÃO DO GEL SDS-PAGE COM AZUL DE COOMASSIE R-250 111
TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS DE GEL DESNATURANTE SDS-PAGE PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE 111
a) transferência líquida utilizando a unidade de transferência TE22 (Hoefer Scientific Instruments, EUA) 112
b) transferência líquida utilizando a unidade de transferência Hoefer MiniVe (Hoefer Scientific Instruments, EUA) 113
c) transferência "semi-seca" 113
IMUNODETECÇÃO DA GS EM MEMBRANAS DE NITROCELULOSE 114
ANÁLISE BIDIMENSIONAL DA ACUMULAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS 114
A) Primeira dimensão 115
B) Segunda dimensão 116
EXTRACÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS 117
EXTRACÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROLINA 117
3 – RESULTADOS 119
SUBCLONAGEM DO cDNA 121
SEQUENCIAÇÃO DOS cDNAS 122
ANÁLISE DE HOMOLOGIAS 125
RACE 5' 140
CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA DE GENES DA GS 145
"SOUTHERN BLOTTING" 145
"RT-PCR" 148
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM A GS COM UMA SONDA CONSERVADA 149
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM A GS COM SONDAS ESPECÍFICAS 151
ANÁLISE DA ACUMULAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS DA GS 154
ESTUDO DO EFEITO DA SECURA E DA ELEVADA SALINIDADE (NaCl 250 mM) NA ACUMULAÇÃO DA GS NA PLANTA 158
ESTUDO DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE SALINIDADE (NaCl 100 E 200 mM) NA ACUMULAÇÃO DA GS NA PLANTA 166
ESTUDO DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE SALINIDADE (NaCl 50 E 100 mM) NA ACUMULAÇÃO DA GS EM TECIDO CALOSO 169
4 – DISCUSSÃO 174
Isolamento e caracterização dos clones de cDNA relacionados com a GS1: 175
RACE 5' 178
Análise por "Southern blotting" 181
Caracterização da acumulação da GS 182
Efeito da secura e da salinidade (NaCl 250 mM) na acumulação da GS na planta 192
Efeito de concentrações crescentes de salinidade (NaCl 100 e 200 mM) na acumulação da GS na planta 201
Efeito de concentrações crescentes de salinidade (NaCl 50 e 100 mM) na acumulação da GS no tecido caloso de batateira 204
5 - CONCLUSÕES 208
6 - APÊNDICES 216
1 - Estirpes bacterianas 217
2 - Meios de cultura utilizados para o crescimento de bactérias e bacteriófagos: 217

3 - Tampões e soluções usados: 220
4 - Vectores: 225
5 - Marcadores de tamanhos moleculares de ácidos nucleicos 229
7 - BIBLIOGRAFIA 230

Abreviaturas

A – ampere
ADP – adenosina bifosfato
APS – persulfato de amónia
AS – asparagina sintase
ATP – adenosina trifosfato
BAP – benzilaminopurina
bp – pares de bases
BSA – albumina bovina sérica
cDNA – DNA complementar
CSPD – fenil fosfato 3-(4-metoxispiro{1,2-dioxietano-3,2'-(5'-cloro)triciclo[3.3.1.1^{3,7}] decano}-4-il) dissódico
CTAB – hexadeciltrimetlamónio
D.O. – densidade óptica
Da – Dalton
dATP – 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP – 2'-desoxicitosina 5'-trifosfato
ddATP – 2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
ddCTP – 2',3'-didesoxicitosina 5'-trifosfato
ddGTP – 2',3'-didesoxiaguanosina 5'-trifosfato
ddTTP – 2',3'-didesoxitimidina 5'-trifosfato
DEPC – dietilpirocarbonato
dGTP – 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DIG – digoxigenina
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido dexoxirribonucleico
DNase – desoxirribonuclease
dNTP – 2',3'-didesoxinucleótido 5'-trifosfato
dsDNA – DNA de cadeia dupla
DTT – ditiotreitol
dTTP – 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
g – força centrífuga relativa; grama
GDH – glutamato desidrogenase
GOGAT – glutamato sintase
GS – glutamina sintetase
GUS – β-glucoronidase
IEF – focagem isoeléctrica
IgG – imunoglobulina
IPTG – isopropiltio-β-D-galactosídeo
kb – kilobases
k_m – constante de Michaelis
LB – meio de Luria-Bertani
M – molar
m – mole/mili
MOPS – ácido 3-[*N*-morfolino] propanosulfónico
mRNA – RNA mensageiro
NADH – nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)
NiR – nitrito redutase
NR – nitrato redutase
PAGE – electroforese em gel de poliacrilamida
PBS – tampão fosfato salino
PCR – ("polymerase chain reaction") – reacção de polimerização em cadeia
PEG – polietilenoglicol
pfu – ("plating forming units")
Pi – fosfato inorgânico
PVP – plivinilpolipirrolidona
RACE – ("Rapid Amplification of cDNA Ends") – amplificação rápida de extremidades de cDNA
RNA – ácido ribonucleico
RNase – ribonuclease
rpm – rotações por minuto
RT-PCR – ("Polymerase chain reaction coupled reverse transcription") – transcrição reversa acoplada a PCR
RuBisCo – Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – electroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
ssDNA – DNA de cadeia simples
TEMED – *N, N, N', N'*-tetrametiletilenodiamina
Tris – tris (hidroximetil) aminometano
Tween 20 – monolauratato de polioxietilenosorbitano
V – Volt
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-galactosídeo
α – alfa
β – beta
λ – lambda
μ – micro
μCi – microcurie

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – A ASSIMILAÇÃO DO AZOTO EM GLUTAMINA E GLUTAMATO

As plantas superiores são organismos autotróficos porque conseguem sintetizar os seus componentes moleculares orgânicos a partir de nutrientes inorgânicos obtidos do meio ambiente que as rodeia.

Muitos dos componentes bioquímicos presentes nas células vegetais contêm azoto na sua constituição, como por exemplo, os nucleótidos e os aminoácidos que formam os ácidos nucleicos e as proteínas. O azoto é o nutriente mineral que mais limita o crescimento vegetal (189). Este nutriente está presente sob muitas formas na biosfera. A atmosfera contém grandes quantidades de azoto (N_2 – 78 %), mas, para a maioria dos organismos, à excepção das plantas leguminosas simbiontes, este reservatório de azoto não se encontra directamente disponível. A aquisição de azoto da atmosfera requer a quebra da ligação covalente tripla existente entre os dois átomos de azoto para que se produza amónia (NH_3) ou nitrato (NO_3^-). As reacções acabadas de descrever são designadas de fixação do azoto (189).

As plantas obtêm azoto principalmente da absorção de amónia e de nitrato a partir do solo. O nitrato pode ser armazenado nos tecidos em grandes quantidades, ou pode ser translocado de tecido para tecido sem provocar efeitos deletérios nas plantas. Contrastando com o nitrato, os níveis elevados de amónia são tóxicos para as plantas. A amónia provoca a dissipação dos gradientes transmembranares de protões, os quais são necessários para o transporte de electrões na fotossíntese e na respiração, e para o sequestro de metabolitos nos vacúolos. As plantas assimilam rapidamente a amónia perto do local de absorção (raízes) ou donde foi gerada e armazenam o excesso não assimilado nos vacúolos, evitando os efeitos tóxicos nas membranas e no citosol (65, 189).

Todo o azoto absorvido pelas plantas tem de ser inicialmente reduzido a amónia antes de ser incorporado numa forma orgânica (113). As enzimas envolvidas neste processo são a nitrato redutase (NR; E.C.1.6.1.1) e a nitrito redutase (NiR; 1.7.99.3). A nitrato redutase catalisa a seguinte reacção no citosol:

$$NO_3^- + NAD(P)H + H^+ + 2\,e^- \rightarrow NO_2^- + NAD(P)^+ + H_2O$$

na qual NAD(P)H indica NADH ou NADPH. O nitrito formado é altamente reactivo e potencialmente tóxico para a células, sendo imediatamente transportado do citosol para os cloroplastos (folhas) ou plastídios (raízes). Nestes organelos, a enzima nitrito redutase reduz o ni-

trito a amónia, utilizando a ferredoxina (Fd) como dador de electrões de acordo com a seguinte reacção:

$$NO_2^- + 6\ Fd_{red} + 8\ H^+ + 6\ e^- \rightarrow NH_4^+ + 6\ Fd_{ox} + 2\ H_2O$$

Nas plantas, quer as raízes quer as folhas, têm capacidade de assimilar o nitrato em amónia; no entanto, para a maioria das plantas, este processo é executado nas folhas. As células impedem a acção tóxica da amónia convertendo-a rapidamente em aminoácidos (189). A amónia é então assimilada em glutamina e em glutamato, os quais funcionam como compostos transportadores de azoto das fontes para os reservatórios, quer em leguminosas, quer em não leguminosas. As principais enzimas envolvidas neste processo são a glutamina sintetase (GS; E.C.6.3.1.2), a glutamato sintase (GOGAT, glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase; E.C.1.4.7.1), que compõem o ciclo GS-GOGAT, e a glutamato desidrogenase (GDH; E.C.1.4.1.2). Estas enzimas desempenham as suas funções nos três principais processos de assimilação de amónia: assimilação primária de amónia, reassimilação da amónia proveniente da fotorrespiração e a reassimilação do azoto reciclado (113).

I – Assimilação primária da amónia

Nas plantas leguminosas, a amónia pode ser formada pela fixação directa do azoto atmosférico (N_2) dentro dos nódulos radiculares pela acção do *Rhyzobium*. Nas plantas não leguminosas, esta amónia é gerada pelas acções combinadas das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, como descrito anteriormente, sendo, na maioria das espécies tropicais e subtropicais, o nitrato transportado das raízes para as folhas e aí reduzido a amónia nos plastídios (113).

II – Reassimilação da amónia proveniente da fotorrespiração

O ciclo do azoto proveniente da fotorrespiração representa o maior fluxo de azoto nas folhas iluminadas da maioria das plantas com fotossíntese C3 (209). Este processo bioquímico é iniciado pela actividade oxigenase da RuBisCo (106, 113). As reacções da fotorrespiração ocorrem em três compartimentos celulares (figura I.1): o cloroplasto, o peroxissoma e a mitocôndria. No cloroplasto, a actividade oxigenase da RuBisCo conduz à formação de fosfo-

glicerato (PGA) e de fosfoglicolato. O fosfoglicolato é desfosforilado a glicolato, o qual passa para o peroxissoma onde é convertido em glicina. A glicina deixa o peroxissoma e, na mitocôndria, sofre descarboxilação oxidativa conduzindo à formação de CO_2 e NH_3. Por cada duas moléculas de glicina geradas pela fotorrespiração, forma-se uma molécula de CO_2, uma molécula de NH_3 e uma de serina. A serina é exportada da mitocôndria para o peroxissoma, onde é convertida em glicerato. O glicerato entra no cloroplasto onde é convertido em fosfoglicerato, o qual pode ser incorporado no ciclo de Calvin, que ocorre no estroma deste organelo (115, 185, 189).

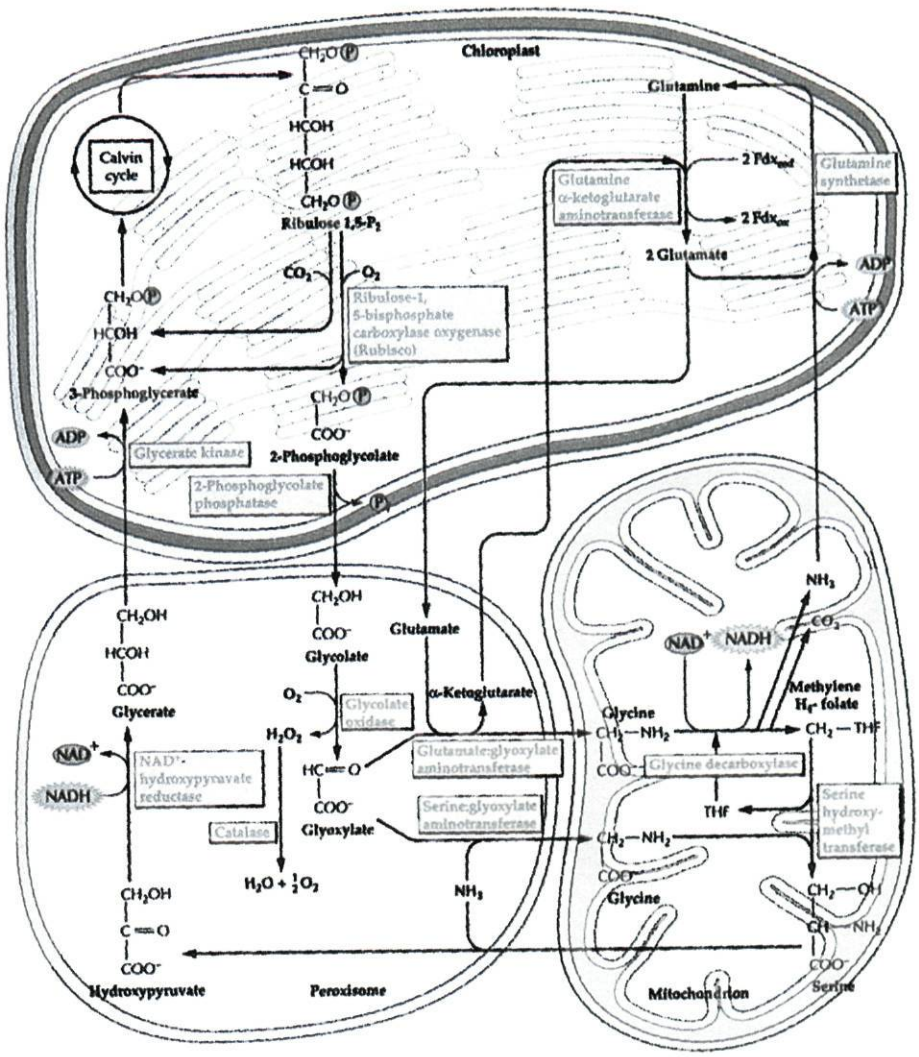


Figura I.1: Diagrama esquemático representando as reacções envolvidas na fotorrespiração e a localização subcelular das mesmas. (Retirado de (24)).

Estas reacções conduzem à libertação de CO_2 e de amónia. Nas plantas com fotossíntese C3, a amónia libertada por este processo pode exceder em dez vezes a assimilação primária de azoto (113). Se ocorrer diminuição das actividades da GS e da GOGAT poderá haver diminu-

ição do teor proteico foliar. Esta diminuição ocorrerá durante a exposição à luz e poderá ser parcialmente recuperada durante a obscuridade.

A diminuição do teor de aminoácidos limita a biossíntese de proteínas em geral, e em particular da RuBisCo. Esta observação implica que, pelo menos sob situações que promovam a fotorrespiração, ocorram alterações no metabolismo as quais vão exercer efeitos retroactivos sobre o metabolismo de azoto e de carbono (81). O ciclo GS-GOGAT é fundamental para que a planta possa sobreviver, uma vez que permite a reassimilação desta amónia proveniente da fotorrespiração em glutamina e glutamato (113, 210).

III – Reassimilação do azoto reciclado

A amónia também pode ser libertada durante alguns processos bioquímicos tais como o catabolismo proteico, a desaminação dos aminoácidos e algumas reacções específicas na biossíntese da metionina, da isoleucina, dos fenilpropanoides e da lenhina (66, 113).

Apesar de ocorrer constantemente reciclagem da amónia nas plantas, existem duas alturas principais no ciclo de vida de uma planta em que ocorre reassimilação de quantidades maciças de amónia em glutamina e glutamato para posterior translocação. Uma dessas alturas corresponde à germinação da semente. Durante este período, as proteínas de reserva da semente são degradadas e o azoto libertado é transportado na forma de glutamina para as plântulas em desenvolvimento. Mais tarde, as proteínas das folhas senescentes são degradadas e o azoto nelas contido é assimilado em glutamina para ser transportado para as partes em desenvolvimento da planta (25, 66, 113).

A assimilação da amónia é levada a cabo pela acção das diferentes isoformas da glutamina sintetase que catalisam a produção de glutamina a partir da amónia e do glutamato através do ciclo GS-GOGAT (113). A glutamina é essencial nos processos de assimilação, transporte e reassimilação de compostos azotados na planta de tal modo que se considera que este aminoácido ocupa um lugar chave no fluxo de azoto na biosfera e que a glutamina sintetase (GS) representa no metabolismo do azoto um papel comparável ao da RuBisCo no metabolismo do carbono (66).

1.2 –O CICLO GS-GOGAT

A enzima glutamina sintetase (GS; E.C.6.3.1.2) combina a amónia com o glutamato para originar glutamina. Esta reacção requer a hidrólise de uma molécula de ATP e envolve um catião bivalente, como o Mg^{2+}, o Mn^{2+} ou o Co^{2+} como cofactor. A enzima glutamato sintase (GOGAT; glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase; E.C.1.4.7.1/ E.C.1.4.1.14) transfere o grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato (ou α-cetoglutarato), originando duas moléculas de glutamato (figura I.2). As plantas possuem duas formas da GOGAT: uma delas aceita electrões do NADH, enquanto que a outra aceita electrões da ferredoxina (Fd). A GOGAT que recebe os electrões do NADH (NADH-GOGAT; E.C.1.4.1.14) está localizada nos plastídios das células não fotossintéticas, como as raízes, e nas bainhas perivasculares das folhas em desenvolvimento. Nas raízes, a NADH-GOGAT está envolvida na assimilação primária da amónia absorvida da rizosfera; na bainha perivascular a NADH-GOGAT assimila a glutamina translocada das raízes ou das folhas senescentes. A GOGAT dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT; E.C.1.4.7.1) pode ser encontrada nos cloroplastos dos rebentos e folhas ou nos plastídios das raízes de plantas que estejam submetidas a uma nutrição azotada rica em nitratos. Nos cloroplastos, a Fd-GOGAT está envolvida no metabolismo do azoto proveniente da fotorrespiração, nas raízes pensa-se que actua na assimilação da glutamina formada a partir da redução do nitrato absorvido (113, 189).

Como resultado final da actuação conjunta destas duas enzimas (GS e GOGAT) ocorre conversão dos iões amónia e de α-cetoglutarato em glutamato, através da glutamina, com gastos de ATP e poder redutor. A GS incorpora um grupo amida no glutamato e produz glutamina. A GOGAT retira esse grupo da glutamina e acrescenta um grupo amina ao α-cetoglutarato originando duas moléculas de glutamato. Como o glutamato é um substrato para a GS, uma das moléculas formadas pode ser utilizada para repor a quantidade de glutamato para uma subsequente reacção catalisada pela GS, o destino da segunda molécula de glutamato formada poderá ser funcionar como dador do grupo amina na formação de outros compostos azotados (193). Por haver esta "reciclagem" do glutamato esta via é designada por ciclo GS-GOGAT (113) (figura I.2).

A glutamina e o glutamato produzidos deste modo podem ser utilizados para a síntese de todos os outros compostos azotados essenciais para a planta(66, 107).

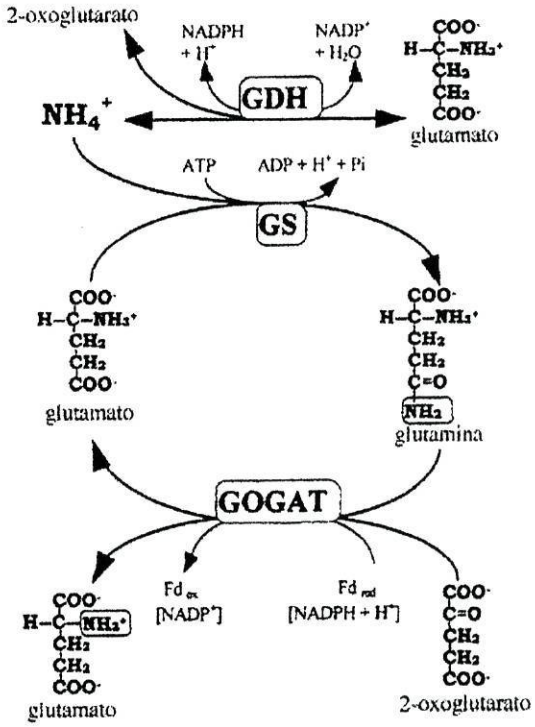


Figura I.2: As vias possíveis para a assimilação da amónia. As enzimas envolvidas são: a glutamato desidrogenase (GDH), a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT). A caixa evidencia a incorporação da amónia no grupo amida da glutamina e subsequentemente no grupo amina do glutamato. (Adaptado de (206)).

No entanto, a amónia pode ser assimilada através de uma via alternativa. A enzima glutamato desidrogenase (GDH; E.C.1.4.1) catalisa uma reacção reversível de síntese / desaminação do glutamato (figura I.2). É possível detectar a presença de uma forma da GDH dependente do NADH (NADH-GDH; E.C.1.4.1.2) nas mitocôndrias e de uma forma dependente do NADPH (NADPH-GDH; E.C.1.4.1.4) nos cloroplastos dos órgãos fotossintéticos. Apesar de ambas as formas serem relativamente abundantes, as suas funções específicas ainda estão por ser descobertas, porque, apesar da fotorrespiração conduzir à libertação de amónia nas mitocôndrias, esta enzima não parece ser responsável pela sua reassimilação (189, 203). De facto, a K_m da GDH para a amónia é bastante elevada, factor que desfavorece a sua possível intervenção na assimilação primária deste composto. O uso do inibidor específico da GS, metionina sulfoximina, bloqueia a incorporação da amónia em glutamina ou glutamato, o que revela a incapacidade da GDH de substituir o ciclo da GS-GOGAT na assimilação da amónia, apesar dos níveis de amónia e da actividade da GDH manterem-se elevados. Todos estes factores refutam a hipótese da GDH estar envolvida nos processos de biossíntese, sendo atribuída uma função catabólica – a desaminação do glutamato – uma vez que a actividade desta enzima aumenta durante a germinação e a senescência, dois períodos em que ocorre catabolismo de aminoácidos (113, 175, 189, 206).

1.3 – O METABOLISMO DA GLUTAMINA E DO GLUTAMATO

Após a assimilação da amónia em glutamina e glutamato, estes dois aminoácidos actuam como dadores importantes de azoto em muitas reacções celulares, e em particular, na biossíntese de aspartato e asparagina (113). O azoto é incorporado nestes aminoácidos através de reacções de transaminação catalisadas por aminotransferases. Uma das enzimas envolvidas neste processo é a aspartato aminotransferase (AAT; AspAT; E.C.2.6.1.1) que catalisa a reacção

Glutamato + oxaloacetato → aspartato + 2-oxoglutarato

na qual o grupo amina do glutamato é transferido para o átomo carboxilo do aspartato. O aspartato é um aminoácido que participa no vaivém do malato-aspartato, o qual permite a transferência de equivalentes redutores da mitocôndria e do cloroplasto para o citosol. Nas plantas com fotossíntese C4, o aspartato também está envolvido no transporte de carbono das células do mesófilo para as células da bainha perivascular. As aminotransferases podem ser encontradas no citosol, nos cloroplastos, nas mitocôndrias, nos glioxissomas e nos peroxissomas. As que estão localizadas nos cloroplastos parecem desempenhar um papel importante na biossíntese de aminoácidos. (113, 189).

O aminoácido asparagina é uma amida que funciona não só como percursor das proteínas, mas também como um composto chave no transporte e armazenamento de azoto devido à sua elevada estabilidade e à sua elevada razão azoto:carbono (2N:4C), enquanto que a glutamina apresenta uma razão 2N:5C e o glutamato 1N:5C (110, 113, 189). A principal via de biossíntese de asparagina envolve a transferência do azoto localizado no grupo amida da glutamina para o aspartato através da reacção

Glutamina + aspartato + ATP → asparagina + glutamato + AMP + PPi

catalisada pela enzima asparagina sintetase (AS; E.C.6.3.5.4), a qual está localizada no citosol das células das folhas e das raízes. A amónia é um substrato possível da AS, particularmente sob condições em que os níveis desta são tóxicos, funcionando, nestes casos, como fonte do grupo amida (189). Por esta razão, a asparagina também é considerada um produto resultante da desintoxicação da amónia (113).

Os esqueletos carbonatados envolvidos nas reacções de transaminação descritas são o 2-oxoglutarato e o oxaloacetato. A intervenção destes dois compostos intermediários do ciclo de Krebs, e a necessidade de ATP e de poder redutor, unem intimamente o metabolismo do azoto ao metabolismo do carbono (71, 192).

1.4 – A ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE (GS)

Como já foi referido, a GS é a primeira enzima na via principal de assimilação da amónia nas plantas superiores, ocupando a mesma posição chave no metabolismo do azoto que a ribulose bifosfato carboxilase (RuBisCo) ocupa no metabolismo do carbono (66).

O estudo da biologia molecular da GS iniciou-se em 1983 com a clonagem e análise da sequência completa do gene estrutural que a codifica (*glnA*) da cianobactéria *Anbaena* (Tumer *et al*, 1983 *in* (66)). Após este trabalho seguiram-se rapidamente outros sobre a GS de animais e de plantas (ver referências em (66)). Desde então, as sequências genómicas e de mRNAs relativas à GS de animais e plantas têm sido clonadas e utilizadas para estudar a organização, a estrutura, a evolução e a expressão dos genes que codificam esta enzima e para deduzir, a partir das suas sequências nucleotídicas, a estrutura primária das suas subunidades (66).

1.4.1 – A estrutura quaternária da GS e a modulação da actividade enzimática

A GS das plantas superiores apresenta uma massa molecular estimada entre 350 – 400 kDa e é formada por oito subunidades idênticas ou muito semelhantes entre si. Estas subunidades estão dispostas em dois conjuntos de tetrâmeros planos sobrepostos paralelamente. As GS até à data estudadas apresentam propriedades catalíticas e regulatórias muitos semelhantes, incluindo um requerimento de catiões bivalentes, assim como uma susceptibilidade à retroinibição pela glicina, pela alanina e pelo fosfato de carbamilo, sendo inactivadas pela L-metionina-S-sulfoximina, o que sugere semelhança entre os centros activos e os mecanismos de reacção nas diferentes GS estudadas. Com base nestas características e propriedades, Eisemberg e seus colaboradores (1987 *in* (66)) propuseram um modelo para o arranjo das subunidades que compõem a enzima octamérica, extrapolando-o da estrutura tridimensional da GS de *Salmonela typhimurium*. Este modelo refere-se à disposição de duas camadas de tetrâmeros como compostas por dois pares de subunidades, formando cada par um centro acti-

vo. Segundo este modelo, ocorreriam, no total, quatro centros activos na GS. No entanto, outros trabalhos conduziram à obtenção de resultados que são mais consistentes com a existência de oito centros activos por enzima (90); (ver referências em (66)).

A GS catalisa a biossíntese da glutamina através da reacção

$$\text{ATP} + \text{L-glutamato} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{L-glutamina} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

Esta reacção necessita de um catião bivalente metálico como cofactor e de uma fonte de energia na forma de ATP. Nesta reacção, a amónia, depois de assimilada, é transformada no grupo amida da molécula glutamina.

A actividade biossintética da GS pode ser determinada utilizando a hidroxilamina como substrato em vez de amónia, a qual conduz à formação de γ-glutamil hidroxamato, de acordo com a seguinte reacção

$$\text{ATP} + \text{L-glutamato} + \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \gamma\text{-glutamil hidroxamato} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

Há evidências que a velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) da enzima para a hidroxilamina e para a amónia são semelhantes e de que a sua afinidade para outros substratos não é afectada pela hidroxilamina (147). Por esta razão, esta reacção e frequentemente usada para determinar a actividade biossintética *in vitro*, por determinação colorimétrica de γ-glutamil hidroxamato formado.

A determinação da actividade transferase da GS pode ser feita na presença de arsenato, ADP e do ião metálico apropriado. Nestas condições, a GS catalisa a reacção de transferência do γ-glutamil, levando à formação de γ-glutamil hidroxamato a partir da glutamina e da hidroxilamina com libertação de amónia, de acordo com a reacção que se segue

$$\text{glutamina} + \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \gamma\text{-glutamil hidroxamato} + \text{NH}_3$$

Esta reacção necessita de grandes quantidades de nucleótidos catalíticos. A reacção de transferase não tem função fisiológica conhecida mas, *in vitro*, apresenta normalmente níveis bastante mais elevados que a reacção biossintética, razão pela qual é mais usada para medir a actividade em extractos proteicos brutos.

A caracterização da regulação da actividade da GS iniciou-se entre as décadas de 60 70 e incidiu principalmente sobre a influência de compostos químicos, essencialmente de iões

metálicos, nesta actividade. Foi possível verificar a ocorrência de uma forte inibição por parte dos iões Cu^{2+}; Hg^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+} e Fe^{3+} na actividade da GS isolada e purificada das raízes de plantas de arroz crescidas em culturas hidropónicas, contendo amónia como única fonte azotada; a presença de Co^{2+} parece ter conduzido a uma estimulação da enzima. As K_m para o L-glutamato e para o ATP foram estimadas em 2,75 mM e 0,44 mM, respectivamente (100). Na mesma planta, foi possível separar as duas isoformas da GS e estimar, para a GS1 e para a GS2, o K_m para o glutamato, que assumiu os valores 2 e 20 mM, respectivamente. Ainda foi possível verificar que o pH óptimo para a GS2 era 8,0 e que esta enzima era lábil ao calor e inibida pela glucosamina-6-fosfato, enquanto que para a GS1 o pH óptimo era 7,5 e a enzima era muito estável ao calor e não era inibida por este composto (85). Em ervilheira, o pH óptimo para a actividade enzimática varia entre 5,0 e 8,2, dependendo da concentração do tipo de catião bivalente presente e da concentração de ATP. A estabilidade da enzima aumenta na presença de magnésio ou manganês (147). Estudos semelhantes foram executados em espinafre, nos quais a GS de folha foi purificada e caracterizada, apresentando uma K_m para o L-glutamato e para o ATP de 6,7 e 1,8 mM, respectivamente, e um pH óptimo de 8,3. Esta GS apresentou inibição irreversível pelos inibidores competitivos metionina sulfoximina e fosfoinotricina (58).

O ATP e o ADP parecem influenciar a actividade da GS da ervilha. Ambos competem entre si para se ligarem ao local alostérico da enzima. O ADP possui maior afinidade que o ATP e a sua ligação conduz à activação da enzima, enquanto que se for o ATP a ligar-se ao local alostérico, a enzima fica inactiva. Foi possível concluir que o ATP pode ligar-se à GS, não só no centro activo, como também num local alostérico, inibindo a sua actividade quando presente neste último (103). Também se verificou que o ADP actua como inibidor competitivo na isoforma da GS purificada de folhas de tomateiro, a qual sofre inibição pelo aspartato e pela fosfoserina (31). Ainda em tomateiro, foi possível isolar um factor proteico dos extractos de raízes, com massa molecular aparente de 110 kDa, responsável pela inibição da GS isolada das folhas. Este factor proteico parece actuar ou como um inibidor competitivo da GS para com o ATP, ou formando complexos com a GS (70).

As culturas de tecido caloso representam um sistema bastante controlado e ideal para estudar o efeito dos reguladores de crescimento sobre o objecto de estudo. Com este propósito foi investigado o efeito das auxinas e das citocininas na actividade da GS em culturas de tecido caloso de *Canavalina ensiformes* L.. Foi possível verificar que na presença do ácido indoleacético (IAA) e do ácido nafatalenoacético (NAA) a actividade da GS aumenta, tendo o NAA conduzido a um valor superior de actividade. Os ensaios efectuados em tecido caloso

incubado em várias razões citocinina/auxina permitiram verificar a ocorrência de um efeito dose-resposta por parte da actividade da enzima (200).

Em algumas plantas é possível verificar que as condições de nutrição azotada influenciam a actividade da GS. Na planta de beterraba foi possível verificar que a amónia conduz ao aumento da actividade da GS, enquanto que o nitrato não exerce qualquer efeito (126).

Sobe o ponto de vista molecular, a regulação da GS pode ser feita a diferentes níveis:

1) Transcrição
2) Processamento e estabilidade do mRNA
3) Tradução
4) Localização subcelular, processamento ou modificação dos polipeptídeos primários da GS
5) Montagem das enzimas octaméricas
6) Modulação da actividade das holoenzimas
7) Degradação da GS

Há evidências de que a regulação da transcrição corresponderá ao principal ponto de regulação da actividade da GS nas plantas (113, 206).

1.4.2 – Heterogeneidade das isoenzimas da GS

Nas plantas é possível encontrar duas classes de isoenzimas da GS, as quais estão localizadas em compartimentos celulares distintos e que podem ser identificadas por cromatografia de troca iónica (66, 113). As folhas verdes das plantas superiores geralmente possuem duas isoenzimas, designadas por GS1 e GS2, e que estão localizadas no citosol e no cloroplasto, respectivamente (113). As duas isoformas da GS foram designadas GS1 e GS2 de acordo com a ordem de eluição em coluna de troca iónica (85).

Como já referido, estas duas isoformas apresentam características bioquímicas distintas, como por exemplo, a estabilidade térmica, o pH óptimo de actuação e as afinidades para o glutamato e o ATP.

Na maioria das espécies estudadas, verificou-se por SDS-PAGE que as subunidades da GS2 apresentam uma massa molecular ligeiramente superior (43-45 kDa) às da GS1 (37-43 kDa) (ver referências em (66)). Apesar de distintas, as subunidades da GS apresentam homologias de aminoácidos que permitem a utilização de anticorpos capazes de, na maioria dos casos, reconhecer ambas as isoformas com a mesma eficiência (87).

Na maioria das espécies vegetais a GS é codificada por uma família de genes nucleares homólogos, um deles codificando a GS2 e os restantes codificando subunidades relacionadas com a GS1 (66, 113, 206). A razão porque as plantas possuem vários genes a codificar a GS é ainda desconhecida. Uma das razões poderá ser o facto das diferentes isoenzimas da GS possuírem propriedades bioquímicas diferentes, sendo por isso necessárias para assimilar a amónia nos diferentes compartimentos celulares. Uma outra possibilidade reside no facto de ser possível atingir mais facilmente o controlo da transcrição de um determinado número de genes nos diferentes tipos celulares, do que estabelecer um leque enorme de controlos para um único gene (41).

A cristalografia efectuada por raios-X da GS codificada pelo gene *glnA* de *Salmonella typhimurium* revelou que os centros activos são formados entre cadeias, na interface entre os domínios C e N terminais de subunidades adjacentes e não dentro da mesma subunidade (2).

De todas as espécies vegetais onde a GS foi caracterizada, há duas que se salientam por esta enzima estar bem estudada e que são o feijoeiro e a ervilheira. Em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) existem pelo menos quatro genes distintos a codificar a GS. Desses quatro, três codificam subunidades da GS1, as quais são diferentes umas das outras (α, β, e γ), e o restante codifica a subunidade da GS2 (δ) (12, 41, 42, 67, 121). Na ervilheira (*Pisum sativum* L.), os cDNAs correspondentes aos polipeptídeos da GS "GS1", "GSn" e "GS2" foram clonados e as suas sequências de aminoácidos deduzidas (196, 197, 202). O mecanismo de montagem destas isoenzimas parece ser semelhante naquelas duas espécies de leguminosas. Os polipeptídeos da GS1 produzidos apresentam massa molecular semelhante entre eles mas pontos isoeléctricos diferentes. Com base nestes resultados foi formulado um modelo que visa explicar a montagem das isoenzimas da GS na planta (figura I.3), no qual explicam que estes polipeptídeos podem associar-se uns com os outros, em diferentes proporções, produzindo uma gama de formas hetero-octaméricas (66, 113, 206), o qual foi confirmado por cromatografia líquida de troca iónica (11)] e pela elaboração de enzimas funcionais cujos domínios C e N terminais haviam sido trocados (34). Segundo este modelo, a associação das diferentes subunidades da GS numa variedade de isoenzimas hetero-octa-méricas, poderá trazer implicações nas funções biológicas da enzima, uma vez que os octâmeros assim formados poderão possuir propriedades cinéticas diferentes das propriedades dos homo-octâmeros correspondentes (66).

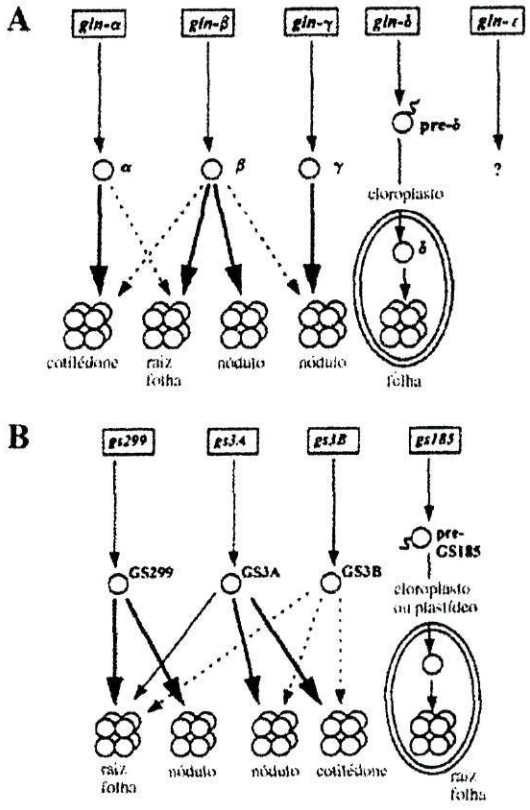


Figura I.3: Expressão da glutamina sintetase em duas leguminosas. A) feijoeiro; B) ervilheira. Os diagramas revelam o modelo de associação das diferentes subunidades em isoenzimas hetero-octaméricas. (Adaptado de (206)).

1.4.3 – A estrutura primária das subunidades da GS

Algumas das sequências aminoacídicas das subunidades que compõem as GS de plantas, mamíferos e bactérias foram deduzidas a partir de cDNAs clonados e comparadas entre si. Da comparação das sequências de aminoácidos foi possível verificar a existência de quatro regiões fortemente conservadas, organizadas na mesma ordem linear e nos três tipos de subunidades. Esta observação indica que as subunidades da GS actualmente existentes evoluíram de um ancestral comum e que partilham de uma estrutura terciária semelhante. Estas regiões conservadas foram designadas por I, II, III e IV (figura I.4), e é sabido que fazem parte do cilindro que forma o centro activo da enzima de *S typhimurium*. Esta elevada conservação sugere que a estrutura tridimensional das enzimas dos procariotas e dos eucariotas seja muito semelhante (66).

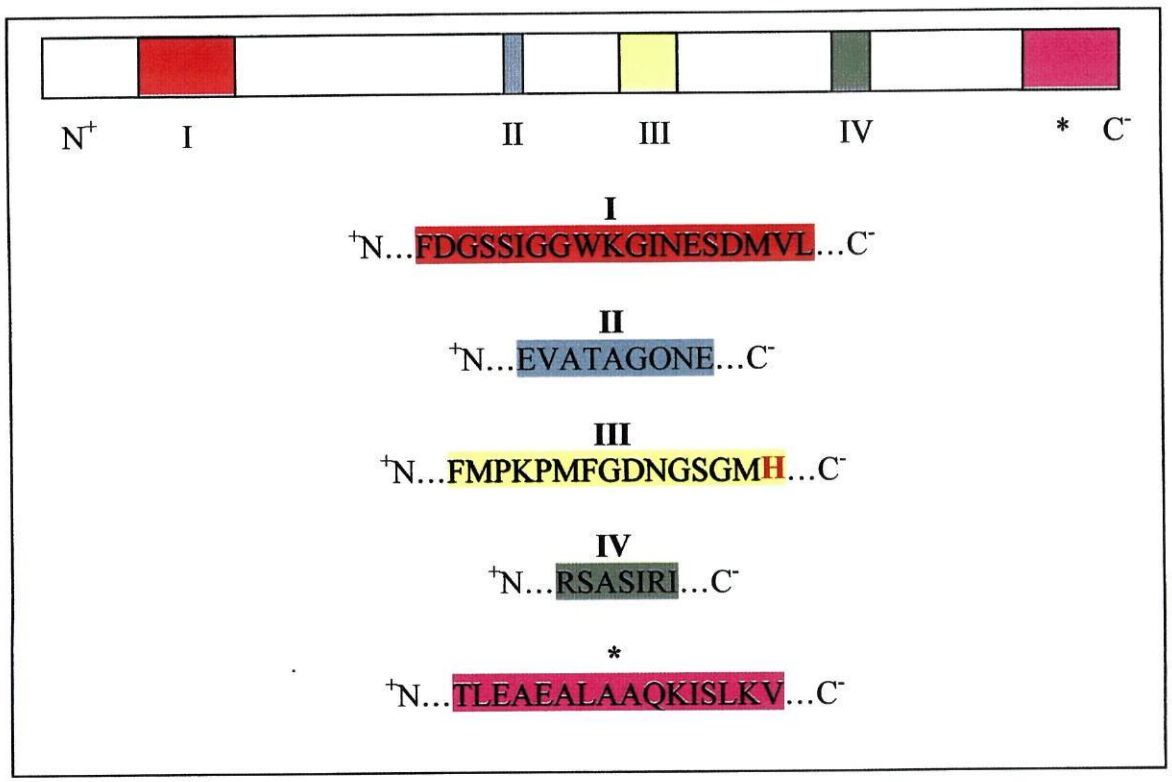


Figura I.4: Esquema representativo de polipeptídeo maduro hipotético da GS. I, II, III e IV representam as quatro regiões conservadas referidas no texto; o asterisco (*) corresponde aos dezasseis resíduos de aminoácidos característicos dos polipeptídeos que compõem a GS2.

Para além destas quatro regiões ou segmentos conservados, também é possível reconhecer determinados resíduos de aminoácidos cuja presença é conservada entre as subunidades da GS dos diferentes grupos do organismos. Existem dois resíduos de cisteína nos centros activos das GS vegetais. Pelo menos um desses resíduos, e possivelmente ambos, parecem ser essenciais para que a enzima seja activa, possivelmente por estarem localizados perto ou no local de ligação ao Mg^{2+} e ao ATP. A maioria das subunidades da GS1 possui três resíduos de cisteína, um dos quais está localizado no domínio N-terminal em *S. typhimurium* e parece estar envolvido na actuação do centro activo da enzima. Existe um resíduo de histidina como componente essencial do centro activo pelo que a sua perda é suficiente para inactivar a enzima. Este resíduo está localizado no segmento conservado III (assinalado a vermelho na figura I.4) e parece estar envolvido na ligação do L-glutamato ao centro activo (referências em (66)). A substituição de um resíduo do ácido glutâmico, que ocupa a posição 297 no polipeptídeo α da GS de *P. vulgaris*, por um resíduo de alanina conduziu a um aumento da resistência à inibição da actividade biossintética pela acção do inibidor metionina sulfoximina. Esta alteração na sequência de aminoácidos conduziu a uma redução da actividade transferase da GS, e a um aumento da K_m para a amónia de cerca de 100 vezes, não se manifestando na capacidade

imunorreactiva da enzima, o que indica que não ocorreram alterações significativas da conformação desta (37).

A revelação de resíduos de aminoácidos e de sequências peptídicas potencialmente essenciais poderá ser de grande utilidade em futuros trabalhos que visem elucidar a estrutura da enzima e a relacionar com a sua actividade.

1.4.4 – A subunidade da GS2

A localização intracelular das isoformas da GS foi inicialmente investigada por fraccionamento subcelular em meio aquoso e não aquoso. A GS2 foi encontrada na fracção cloroplastidial. Foram preparados anticorpos específicos para a GS da folha de espinafre para estudar a sua localização intracelular por imunofluorescência indirecta. Esta experiências confirmaram a localização da GS2 no cloroplasto (ver referências em (17)). As técnicas de imunocitoquímica acopladas à microscopia electrónica revelaram ser um instrumento importante no estudo e caracterização das isoformas da GS das plantas. Através do uso desta técnica foi possível detectar a localização da GS2 no estroma dos cloroplastos das folhas e dos cotilédones de tomateiro (17). Resultados semelhantes a estes foram subsequentemente obtidos noutras espécies vegetais. Na planta da soja foi possível verificar a presença de GS2 no estroma dos cloroplastos das folhas e no estroma dos plastídios dos nódulos (19); a GS2 surge no estroma dos cloroplastos de feijoeiro (46), de tabaco (33), da planta do arroz (98), de milho (9) e de batateira (155).

O gene que codifica a subunidade plastidial da GS2 codifica um polipeptídeo percursor que é transportado para os plastídios. Este polipeptídeo percursor é constituído por um peptídeo sinal de 56 a 60 resíduos de aminoácidos que está localizado na extremidade N-terminal, e cuja remoção na altura da entrada para o cloroplasto ou plastídio resulta num polipeptídeo maduro. O polipeptídeo da GS2 possui ainda uma porção C-terminal conservada entre todas as subunidades da GS2, constituída por 16 resíduos de aminoácidos, cuja função ainda é desconhecida. A compartimentalização dos polipeptídeos plastidiais nos cloroplastos resulta numa isoforma de composição homogénea (figura I.4 – peptídeo δ no esquema A; peptídeo GS185 no esquema B) uma vez que só é produzido um tipo de produto génico pela célula (66, 206).

A GS2 do feijoeiro é formada por subunidades inicialmente sintetizadas como percursores de 47 kDa, com uma pré-sequência, de cerca de 50 resíduos de aminoácidos, que permite a

importação destas subunidades para o interior do cloroplasto, sendo aí processadas num polipeptídeo maduro de 42 kDa (121).

A GS2 da planta da mostarda (*Sinapis alba* L.) é a única isoforma da GS presente na planta e é composta por oito subunidades de igual massa molecular (50 kDa), organizadas em dois grupos sobrepostos de quatro subunidades, formando oito centros reactivos por enzima. Para que se mantenha a integridade enzimática é necessária a presença de ATP e de Mg^{2+} (90). Estes resultados forma confirmados por "Southern" e ""Northern blottings", verificando-se que o mRNA que codifica para esta subunidade apresenta um tamanho de aproximadamente 1,7 kb (88). Em *Asparagus officinalis* L. as suas subunidades apresentam uma massa molecular de 44 kDa (49), assim como na ervilheira (196, 197), no milho (119), na planta do arroz (98) e em *Percea americana* Mill. (123) enquanto que em *Raphanus sativus* L. apresenta uma massa molecular de 42 kDa (101). Na família SOLANACEAE pode ser encontrada na planta do tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), sendo composta por 4 subunidades glicosiladas de 44 - 45 kDa (87, 142); em *Nicotiana plumbaginifolia* encontra-se no estroma dos cloroplastos e é composta por subunidades de 44 kDa (195) e em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é composta por subunidades de 44 kDa e 45 kDa (157).

Verificou-se que o gene da GS2 é principalmente expresso em tecidos verdes, sendo o início da sua expressão coincidente com a maturação dos cloroplastos de ervilheira (54, 202) e o desenvolvimento de cotilédones funcionais em feijoeiro (38), o que sugere haver para além de uma relação entre a luz e a sua expressão, uma expressão específica no que respeita ao tecido. No milho, o mRNA da GS2 só foi detectado nas folhas e verificou-se que a sua acumulação estava relacionada com a ontogenia da folhas (166, 168). Um outro trabalho revelou que a expressão da GS2 é influenciada pela luz consistiu em fazer-se o tratamento de plântulas de beterraba pela obscuridade, o qual conduziu a uma diminuição da acumulação dos transcritos da GS2; após a transferência das plântulas para a luz os níveis de mRNAs da GS2 elevaram-se para os valores iniciais (101).

Em *Arabidopsis* a GS2 é formada por subunidades de 43 kDa e a sua expressão é induzida pela luz, só ocorrendo nas folhas (160). A GS2 foi detectada em caules e folhas de tomateiro. Nesta planta foi possível verificar que esta isoforma sofre flutuações diurnas de acumulação, sendo os níveis dos seus transcritos mais elevados no início do que no final do dia (8).

A transformação de plantas de tabaco com um gene formado por uma porção de 1,3 kb da região promotora do gene da GS2 da planta de arroz fundido ao gene GUS permitiu estabelecer uma relação entre a expressão da GS2, a luz e a diferenciação dos plastídios. Neste trabalho foi possível verificar que a transferência das plantas transformadas, adaptadas à obscu-

ridade, para uma situação de exposição à luz conduziu ao aumento da actividade GUS nas folhas (104). A transferência de feijoeiros adaptados à obscuridade para uma situação de luz conduziu ao aumento da expressão do gene que codifica a GS2, indicando que a expressão deste gene deverá ser regulada essencialmente ao nível da transcrição e estará intimamente relacionada com o desenvolvimento da capacidade fotossintética (38). Na gimnospérmica *Pinus pinaster*, a ontogenia dos cloroplastos é feita de modo independente da luz, pelo que se verifica que plantas crescidas na obscuridade e na presença da luz acumulam clorofilas de modo semelhante. Nesta espécie verificou-se que a acumulação dos mRNAs da única isoforma da GS ocorria de modo independente da luz, sugerindo que será o desenvolvimento da capacidade fotossintética o principal factor a regular a expressão deste gene (30, 73).

O uso de plantas transgénicas de tabaco, nas quais se introduziu o promotor do gene que codifica a GS2 de ervilheira fundido ao gene GUS, permitiu verificar que a expressão do GUS estava direccionada para os diferentes tipos de tecidos fotossintéticos de uma modo dependente da luz (56).

A irradiação de ervilheiras estioladas com a luz vermelha conduziu a uma acumulação gradual do mRNA e dos polipeptídeos da GS2. O padrão de acumulação obtido é semelhante ao padrão obtido com os genes que se sabem responder ao fitocromo (54, 196). A expressão da GS2 em tomateiro também é induzida pela luz vermelha (8). Os níveis de mRNA da GS2 são induzidos pela luz vermelha, sendo este efeito revertido pela luz vermelho-distante (146). Estes resultados indicam que a expressão da GS2 é regulada pela luz e que essa regulação é mediada, em parte, pelo fitocromo. As plantas mutantes *aurea* de tomateiro, caracterizadas por não possuírem fitocromos espectrofotometricamente activos, facultaram o estudo do envolvimento da luz vermelha na regulação da expressão do gene da GS2. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que a luz vermelha induz a transcrição do gene que codifica a GS2, e que nesta regulação parece estar envolvido um fotorreceptor específico para a luz azul/UV-A (134).

Na tentativa de identificar os factores *cis* responsáveis pela especificidade tecidular e pela resposta da expressão dos genes da GS2 à luz procedeu-se à clonagem das regiões promotoras de alguns genes que codificam a GS2. Essas regiões foram sequenciadas e utilizadas na elaboração de plantas transgénicas (39, 198). Num desses estudos, fundiu-se o gene GUS à região promotora do gene da GS2 de ervilheira e transformaram-se plantas de tabaco e *Arabidopsis*. Estas plantas foram transformadas com delecções a 3' e a 5' do local de início de transcrição, na tentativa de localizar a posição dos elementos *cis* responsáveis pela regulação génica. Verificou-se que existe uma sequência localizada a 323 bp a 5' do local de início de

transcrição que é suficiente para conferir a regulação da expressão deste gene pela luz, quer em tabaco, quer em *Arabidopsis*, o que sugere que os elementos *trans* responsáveis pelo reconhecimento desta sequência seja conservados (198).

A expressão do gene da GS2 também parece ser regulada pelo metabolismo da célula em resposta aos níveis de hidratos de carbono e de azoto aí presentes. Em ervilheira, os hidratos de carbono – sacarose, frutose e glucose – induzem a acumulação da GS em plantas adaptadas e mantidas na obscuridade. Os conhecimentos adquiridos até à data sugerem que a expressão máxima da GS2 necessita de um componente ambiental (luz – via fitocromo) e de um componente metabólico (indução da produção de metabolitos de carbono pela luz) para que possa ocorrer. Os aminoácidos – aspartato, asparagina, glutamina e glutamato – provocam efeitos antagónicos aos da sacarose, enquanto que a adição de 2-oxolutarato não parece ter qualquer efeito nos níveis de mRNA da GS2 (146).

Nas plantas de milho, de girassol, de arroz e em culturas de células de plantas de arroz verificou-se que a adição de nitrato como única fonte de azoto conduziu ao aumento a actividade e expressão da GS2 (47, 84, 166, 168, 188).

A função *in vivo* da GS2 foi elucidada através de estudos moleculares dos genes e de plantas mutantes na GS2. O isolamento de plantas de cevada mutantes em GS2 cloroplastidial permitiu verificar a importância desta isoforma no metabolismo de azoto durante a fotorrespiração. Estes mutantes apresentavam um crescimento normal quando submetidos a condições que não conduziam à fotorrespiração, conseguindo inclusive produzir sementes viáveis. No entanto, quando as plantas eram transferidas para condições que promoviam a fotorrespiração, verificava-se que em poucos dias produziam clorose e apresentavam concentrações muito elevadas de amónia nas folhas, acabando por morrer (203). Estes mutantes não morriam devido à acumulação de níveis tóxicos de amónia mas sim devido à perda do azoto orgânico, uma vez que suplementando estes mutantes a crescer em condições conducentes à fotorrespiração com alanina, asparagina e glutamina é impedida a sua morte (ver referências em (113)). Foi possível concluir que as principais funções da GS2 consistem na reassimilação da amónia libertada durante a fotorrespiração e na assimilação da amónia proveniente da assimilação primária. Deste modo, a actuação do ciclo GS-GOGAT é absolutamente necessário para que ocorra reassimilação da amónia durante a fotorrespiração das plantas superiores C3 (203). A apoiar estes resultados verificou-se que em ervilheira os níveis de transcritos da GS2 aumentaram sob condições indutoras da fotorrespiração (54) e que plantas transgénicas de arroz e de tabaco que produziam a GS2 em excesso nas folhas apresentavam uma capacidade fotorrespiratór-

ria superior às plantas não transformadas, indicando que a GS2 desempenha, de facto, um papel chave neste processo (91, 106).

Foram criadas plantas de tabaco transformadas pela introdução de um gene resultante da fusão da região promotora do gene que codifica a subunidade pequena da RuBisCo de soja com o cDNA da GS2 de tabaco, tendo como objectivo promover uma expressão forte e localizada deste cDNA nas folhas. Verificou-se que estas plantas apresentavam níveis elevados de mRNA e de polipeptídeos da GS2, de glutamina e de glutamato, enquanto que os níveis de amónia na folha baixaram, não parecendo ocorrer qualquer alteração do teor proteico foliar. Este o aumento de actividade da GS2 implicou um aumento dos pesos fresco e seco das plantas (133).

O passo limitante na fotorrespiração corresponde à reassimilação pela GS2 da amónia libertada. Se houver GS2 suficiente para reciclar a amónia, a fotorrespiração poderá permitir o funcionamento do ciclo de Calvin-Benson e proteger as plantas da fotooxidação (106). A fotorrespiração é importante para a sobrevivência das plantas C3 a crescer sob condições de stresse oxidativo porque permite dissipar a energia fotoquímica em excesso, assim como permite reciclar o NADP. As plantas transgénicas que sobreexpressam a GS2 apresentam um aumento de tolerância à radiação excessiva. Sob estas condições ocorre degradação e formação de agregados de GS2 porque esta enzima parece ser um alvo inicial dos danos oxidativos, apresentando uma elevada sensibilidade na presença da luz e do metilviologénio (150).

Nas folhas das plantas superiores a GS2 actuará na assimilação primária da amónia produzida pela redução do nitrato, assim como na reassimilação da amónia libertada durante a fotorrespiração nas plantas C3. Nos plastídios das raízes actuará essencialmente na assimilação da amónia aí absorvida (110).

1.4.5 – As subunidades da GS1

Como referido anteriormente, a designação utilizada para esta isoforma da GS teve origem nos perfis de eluição obtidos por cromatografia de troca iónica, devido ao facto esta isoforma aparecer primeiro.

Devido ao facto da GS1 ser uma das enzimas envolvidas na fixação da amónia resultante da fixação simbiótica de azoto pelo *Rhyzobium*, os primeiros estudos dos genes que codificam a GS1 forma feitos em leguminosas onde se verificou a ocorrência de vários genes a codificar a GS1.

Foi possível isolar a GS1 da fracção citosólica dos nódulos de *Lupinus angustifolius* e verificar que esta isoforma é formada por oito subunidades. Esta enzima revelou-se sensível ao calor e apresentava um valor de pH óptimo de actuação compreendido entre 7,5 e 8,0, na presença de 10 mM de $MgSO_4$. Também se verificou que diminuindo a concentração de magnésio o pH óptimo de actuação aumentava, por sua vez diminuindo com o aumento da concentração de magnésio. A actividade da GS1 isolada foi determinada na presença de alguns aminoácidos e verificou-se que esta diminuiu na presença de aspartato na concentração de 2 mM, enquanto que a presença quer de glutamina, quer de asparagina, a baixas concentrações não pareceu haver alterações notórias na actividade. Estes aminoácidos só revelaram ter efeitos inibitórios da GS nas concentrações 20 mM e 30 mM, respectivamente. O AMP inibiu a GS por competição com o ATP; o ADP também exerceu um efeito inibitório, só que não competitivo (130).

Do rastreio de uma biblioteca de cDNA de ervilheira foi possível isolar dois clones – pGS134 e pGS341 – que codificam subunidades citosólicas da GS. Estes clones reconhecem mRNAs de 1,4 kb cuja acumulação aumenta após a nodulação e que codificam polipeptídeos de 38 kDa. Estes polipeptídeos acumulam-se nos nódulos e também podem ser encontrados nas raízes, segundo um padrão que não é influenciado pela luz (197). Os genes que codificam a GS1 em ervilheira podem ser agrupados em duas classes: uma é constituída por dois genes que partilham 99 % de homologia (designados pelos autores de genes gémeos); a segunda classe é formada apenas por um gene cuja sequência difere significativamente da dos da primeira classe. Foi possível verificar que os genes gémeos apresentam uma expressão coordenada durante a formação dos nódulos, e nos cotilédones, durante a germinação, enquanto que o outro gene era expresso coordenadamente com os primeiros durante a nodulação mas não apresentava o mesmo padrão de expressão nos cotilédones. Segundo estes resultados, os autores sugeriram que os genes que codificam a GS nos nódulos desempenham funções não redundantes: os genes gémeos estariam envolvidos na produção de glutamina para o transporte intercelular, enquanto que o terceiro gene estaria envolvido na produção de glutamina para uso intracelular, impedindo a acumulação de níveis tóxicos de amónia nos nódulos. Foi ainda possível observar que a expressão destes genes não pareceu ser influenciada pela amónia (202).

Em *Phaseolus vulgaris* foram identificados três polipeptídeos da GS1 ao nível dos nódulos: α, β e γ. Verificou-se que as subunidades β e γ podem associar-se entre si para originar octâmeros heterólogos; no entanto, as subunidades β também podem associar-se entre si para originar octâmeros homólogos. A subunidade γ parece ser específica dos nódulos (41). Os es-

tudos de imunocitoquímica permitiram localizar GS1 no citosol das células que compõem os nódulos, as raízes, os caules e as folhas de feijoeiros (46). O estudo da expressão dos genes que codificam as subunidades α e β permitiu detectar a presença destas nas folhas. Os estudos da sua acumulação específica através de "Northern blot-tings" permitiu verificar que os níveis de mRNA acumularam-se com um padrão semelhante à acumulação dos respectivos polipeptídeos durante o desenvolvimento da folha, tendo sido encontrados teores mais elevados enquanto as folhas eram jovens (38). Quando as regiões promotoras dos genes que codificam as subunidades β e γ de feijoeiro foram unidas ao gene GUS e introduzidas em *Lotus corniculatus* verificou-se que estes genes apresentavam expressão diferencial: o promotor do gene γ direccionou a expressão do GUS para as células infectadas pelo *Rhyzobium* nos nódulos enquanto que o promotor do gene β direccionava a expressão para as raízes e para os nódulos, estando a sua expressão restrita à vasculatura dos nódulos maduros. Nos outros órgãos também foi possível detectar uma certa expressão do gene γ, indicando que não se trata de um gene com expressão específica nos nódulos (67).

Em *Medicago truncatula* foram identificados dois genes a codificar a subunidade citosólica da GS. Ambos os genes codificavam transcritos de 1,4 kb e apresentavam expressão diferencial: o gene MtGSa era altamente expresso nos nódulos e em caules, tendo sido detectados com níveis mais baixos de expressão nos pecíolos, nas flores, nas sementes e em sementes em germinação; o gene MtGSb apresentou maior expressão nas raízes e em sementes em germinação, sendo moderadamente expresso nos outros tecidos estudados. A expressão destes genes nas raízes não pareceu ser influenciada pelo tipo de nutrição azotada (182).

A região promotora do gene GS3A que codifica uma subunidade da GS1 de ervilheira foi usada para fazer construções de fusões de várias delecções a 5' com o gene GUS. Estas construções génicas foram introduzidas em plantas de tabaco e de luzerna. Verificou-se que o promotor intacto dirigiu a expressão do GUS para o floema e para a vasculatura das folhas, dos caules e das raízes nas duas espécies de plantas transformadas. Esta expressão direccionada permaneceu activa até mesmo quando o promotor foi delectado até –132 bp do local de início de transcrição (20). A expressão da GS1 para a vasculatura revelou ser específica do floema, uma indicação que a GS1 poderá desempenhar uma função importante na produção de compostos azotados para o transporte intercelular (56).

Uma estratégia semelhante foi utilizada para estudar a região promotora do gene que codifica a subunidade da GS1 de soja (λGS15). A actividade GUS foi detectada em raízes de tabaco e de luzerna, indicativo que o promotor retém a capacidade de promover a expressão específica para um tecido até mesmo noutras espécies. Estes resultados sugerem que o(s) ele-

mento(s) *cis* responsáveis pela especificidade de tecido pode(m) ser reconhecido(s) por factores *trans* presentes quer em leguminosas, quer em não leguminosas (132). Este trabalho também permitiu verificar que a aplicação exógena de amónia não conduziu a nenhum aumento de actividade GUS em tabaco, enquanto que em *Lotus corniculatus* verificou-se um aumento desta actividade. Estes resultados mostraram que o gene da GS1 de soja pode ser regulado pela disponibilidade de amónia nas plantas leguminosas e sugerem a existência de um outro elemento *cis* responsável pela regulação da actividade do promotor por este composto, o qual necessita do envolvimento de factores *trans* existentes apenas em leguminosas (132). Um outro trabalho, semelhante ao acabado de descrever, permitiu verificar que os elementos *cis* responsáveis pela indução do gene que codifica a subunidade da GS1 de soja (λGS15) pela amónia estão localizados na região compreendida entre –3,5 kb e –1,3 kb relativamente ao local de início de transcrição. Os elementos envolvidos na expressão específica deste gene para os pulvínulos estão localizados entre –1,3 kb e –0,7 kb e apenas 240 bp parecem ser suficientes para conduzir a expressão deste gene para as anteras (127). Este promotor, com 3467 bp, é indispensável para que ocorra expressão regulada pela amónia. A remoção de parte desse promotor conduz à perda da capacidade de indução do gene pela amónia. Esta perda de indutibilidade é devida à alteração de um elemento *cis* fortemente constitutivo, designado SCPE, que está localizado nas primeiras 400 bp da região distal do promotor. Para além desta região, verificou-se serem necessários outros elementos *cis* que modulam a actividade do SCPE, como por exemplo, o direccionamento da expressão deste gene para tecidos específicos (194).

A comparação das sequências das regiões promotoras dos genes que codificam as diferentes subunidades da GS1 das leguminosas sugere haver uma variabilidade de sequências reguladoras múltiplas responsáveis pela expressão de um determinado gene da GS1. Deste modo, é possível explicar as diferenças nas respostas da expressão dos vários genes que codificam a GS1 nas diferentes leguminosas (127).

Há trabalhos que sugerem a possibilidade das diferentes subunidades da GS1 poderem associar-se formando octâmeros heterólogos (29, 77, 114), podendo resultar dessas associações formas enzimáticas com propriedades distintas capazes de responderem às exigências do tecido onde estão presentes. Estas evidências foram confirmadas quando se preparou um constructo a codificar o domínio N-terminal da subunidade GS1b e o domínio C-terminal da subunidade GS1a de *Medicago truncatula*. Com esta estratégia, tentou-se produzir polipeptídeos cujos domínios estivessem trocados de modo que, ao associarem-se, originassem uma enzima cujos centros activos seriam quiméricos, mimetizando a associação heteromérica entre estas subunidades *in vivo*. Após a introdução deste gene em bactérias de *Escherichia coli* de-

ficientes em glutamina sintetase, verificou-se que estas enzimas eram catalítica e fisiologicamente activas porque conseguiram compensar a mutação destas bactérias (34).

Nas plantas não leguminosas foi possível identificar mais do que um gene a codificar subunidades da GS1.

No arrozeiro foram isolados dois cDNAs (λGS8 e λGS28) que codificam dois polipeptídeos distintos de 39 kDa (171). A região promotora correspondente ao clone λGS28 foi isolada e um fragmento de 2 kb foi utilizado para construir um gene resultante da fusão deste fragmento com o gene GUS. Por sua vez, esta construção foi introduzida em plantas de tabaco e a actividade GUS foi determinada. Verificou-se que esta actividade era mais elevada nas folhas do que nas raízes, à semelhança do que ocorria na planta nativa. Também foi possível verificar que a actividade mais elevada foi detectada nas folhas mais velhas e mais jovens, diminuindo nas folhas expandidas. A adição de amónia ou de nitrato conduziu a um aumento da actividade do gene GUS. Face a estes resultados, os autores concluíram que o fragmento de 2 kb possui os elementos *cis* responsáveis pela expressão específica nos tecidos e pela regulação pela fonte azotada (105). Através da técnica de "Western tissue printing" foi possível descriminar, utilizando anticorpos específicas para cada isoforma da GS, os locais de acumulação das diferentes isoformas em folhas de arrozeiro. Verificou-se que a GS1 estava localizada nas nervuras das folhas, permanecendo presente mesmo durante a senescência foliar (98). A determinação do teor de GS1 também foi feita verticalmente ao longo da planta de arrozeiro. Os resultados obtidos revelaram que o teor de GS1 aumentava das folhas mais jovens para as folhas mais velhas (207). Durante a senescência foliar de folhas de plantas crescidas em culturas hidropónicas também verificou-se ocorrer um aumento do teor de GS1 e dos seus transcritos (98, 99).

A actividade da GS aumenta nas raízes de cevada crescidas e nutridas com nitrato como única fonte azotada. No entanto, a nutrição das plantas de cevada exclusivamente com amónia induz o aparecimento de uma nova banda da GS1 em "Western blottings". Por imunocitoquímica foi possível verificar que a GS1 surge em maior quantidade nas células de parênquima cortical do que nas células do cilindro vascular, sendo esta marcação mais elevada nas plantas crescidas na ausência de azoto (153).

As isoformas citosólicas da GS que surgem nas raízes de milho (GSr e GS1) podem ser separadas por SDS-PAGE. Verificou-se que após nutrição das plantas exclusivamente com amónia ocorreu aumento da actividade da GS neste órgão que é devido ao aumento da acumulação da forma GSr. A forma GSr revelou ser mais sensível ao calor que a forma GS1 e a sua estrutura octamérica tornou-se menos estável quando em concentrações baixas dos catiões

bivalentes Mg^{2+} e Mn^{2+}. No entanto, apesar de mais sensível, a forma GSr apresentou uma actividade biossintética maior, indicação de poder ser esta a isoforma principal responsável pela assimilação primária da amónia ao nível das raízes de milho (169, 170). Foram identificados cinco clones que codificam a GS1 no milho, todos reconhecendo transcritos com 1,4 kb. Os estudos de expressão revelaram que três destes clones surgiam com uma acumulação preferencial nas raízes (clones 1, 2 e 5); os restantes (3 e 4) acumulavam-se com maior abundância no caule, no embrião, no endosperma e no pólen (119). A existência de genes que codificam a GS1 no milho cujos produtos são acumulados preferencialmente nas raízes, enquanto que para outros genes os seus produtos são acumulados noutros órgãos, é um dado que apoia a expressão diferencial dos genes da GS1. A expressão simultânea destes genes, com diferentes níveis de expressão, num mesmo órgão pode ser indicativo da presença de isoformas da GS1 heterólogas e portanto, com características bioquímicas diferentes, possivelmente capazes de melhor responder às necessidades metabólicas do tecido onde estão localizadas.

No girassol existem duas formas distintas de GS citosólica: a GSs – que surge em sementes e em plântulas e a GS1. Estas duas formas estão envolvidas na translocação de nutrientes nas fases iniciais de germinação. Há medida que os cotilédones se desenvolvem verifica-se que as formas da GS citosólica são substituídas pela GS2. Foi possível verificar que a luz e a nutrição com nitrato conduziram à diminuição dos níveis da GS1 e estimularam a acumulação da GS2 nas plântulas em desenvolvimento (47).

O teor em polipeptídeos e mRNA da GS1 aumenta durante a senescência induzida pela obscuridade nos cotilédones de *Raphanus sativus* (beterraba) (101). Nesta espécie foram isolados três clones que codificam subunidades da GS1. Apenas dois destes três genes é que revelaram ser expressos durante este tipo de senescência, mantendo-se o nível de expressão de um deles baixo. Quando se aplicou azoto inorgânico verificou-se um retardamento da senescência, acompanhado pela diminuição da expressão de um dos genes e pela activação do outro; estes resultados sugerem que a expressão destes genes poderá ser regulada pelo tipo de forma azotada disponível para a planta. A aplicação de citocininas nos cotilédones senescentes reprime a expressão destes dois genes, sugerindo o envolvimento (directo ou indirecto) destas fito-hormonas na regulação da transcrição (204). O tratamento com etileno de células lacticíferas de *Hevea brasilensis* conduziu ao aumento da actividade da GS1. Este aumento foi correlacionado pelo aumento da acumulação de mRNAs e de polipeptídeos (162).

Na videira foi possível isolar dois clones de cDNA que codificam a GS1. A análise das sequências nucleotídicas dos dois clones permitiram verificar que são derivados de genes homólogos e distintos. Ambos os clones codificam polipeptídeos de 39 kDa e reconhecem trans-

critos de 1,4 kb, os quais são acumulados diferencialmente na planta: o clone pGS1:1 reconhece transcritos na raiz, nas folhas, nos frutos e no tecido caloso; o clone pGS1:2 detecta os seus transcritos na raiz, nos caules e no tecido caloso, sendo menos expresso nas folhas e nos frutos. Para avaliar o efeito da nutrição azotada na expressão dos genes relativos a estes dois clones foram feitas culturas de células em suspensão. Foi possível observar que o nitrato não exerce um efeito significativo na expressão destes genes; no entanto, verificou-se que a amónia conduz ao aumento da acumulação de mRNAs relativos ao clone pGS1:1 e à diminuição dos teores de mRNAs do clone pGS1:2 (122).

A espécie *Brassica napus* é um híbrido anfidiploide resultante do cruzamento entre as espécies *B. campestris* e *B. olearacea*, possuindo, no total, seis genes a codificar a GS: dois codificam a GS2 e quatro codificam a GS1. Com base na elevada homologia existente entre os genes das duas plantas parentais, os autores agruparam-nos aos pares e avaliaram a expressão de um elemento de cada par. A expressão de dois genes da GS1 foi estudada nestas plantas e verificou-se ocorrer uma grande acumulação dos seus transcritos nos tecidos fotossintéticos; nas raízes uma isoforma da GS1 era mais abundante que a outra, possivelmente será esta isoforma a responsável pela assimilação da amónia absorvida (144). Esta acumulação diferencial vem suportar a hipótese das diferentes isoformas da GS desempenharem funções diferentes nos vários órgãos da planta. A GS desta espécie pode ser fosforilada, e, como fosfoproteína, a sua actividade pode ser regulada pós-tradução por fosforilação reversível. Verificou-se que quando desfosforilada a GS1 era inactiva e ficava mais susceptível a ser degradada; pelo contrário, quando fosforilada, ficou activa e mais protegida contra a degradação. A GS pertence ao grupo das fosfoproteínas que interactuam com as proteínas 14-3-3. Estas proteínas têm a capacidade de modificar o estado de actividade das fosfoproteínas: quando a GS1 está fosforilada e as proteínas 14-3-3 estão presentes verifica-se possuir uma actividade mais elevada (63).

Foi detectada a presença de GS1 (39 kDa) em extractos foliares da planta de tabaco em "Western bottings". A imunocitoquímica permitiu comprovar estes resultados facultando a visualização da localização da GS1 no citosol das células de companhia do floema (33, 51). A fusão do promotor do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV-35S) ao cDNA da GS1 de soja (λGS15) e a sua introdução em plantas de tabaco permitiu obter uma expressão constitutiva deste cDNA nas folhas. A GS de soja era funcional e localizava-se no citoplasma das células da folha de tabaco. Contudo, a expressão da GS1 de soja em tabaco conduziu à indução da expressão da GS1 nativa (86). A acumulação da GS1 é induzida nas folhas de tabaco durante o desenvolvimento foliar. Nesta mesma espécie isolaram-se dois clones que codificam subu-

nidades da GS1: *gln 1-3* e *gln 1-5*. Apenas o teor dos transcritos relacionados com o clone *gln 1-3* aumentou durante o envelhecimento foliar (23). A técnica de "RNase protection assay" permitiu descriminar a expressão diferencial dos dois genes da GS1 de tabaco. Foi possível verificar que o gene *gln 1-3* era muito expresso nas raízes e em todos os órgãos florais; a expressão do gene *gln 1-5* foi detectada com níveis elevados de acumulação nos caules, e com menores níveis de acumulação nos órgãos florais e nas nervuras das folhas. A hibridação *in situ* permitiu determinar a ocorrência de expressão diferencial dos dois genes da GS1 ao nível das raízes: os transcritos do gene *gln 1-5* apareciam sempre associados aos tecidos vasculares, enquanto que os transcritos do gene *gln 1-3* apresentavam uma distribuição uniforme por todo órgão. Nenhum destes transcritos foi detectado nas células que compõem a lâmina foliar. Os resultados obtidos por esta equipa sugerem que, para além das funções não sobreponíveis das isoformas da GS, parece haver distribuição das funções entre as isoformas da GS1: o gene *gln 1-5* parece estar envolvido no transporte de azoto nos tecidos vasculares, enquanto que o gene *gln 1-3* parece ter uma acção mais ubíquota na assimilação e desintoxicação da amónia numa variedade de órgãos (51). Para avaliar o impacto fisiológico do decréscimo na actividade da GS no floema, um gene que codifica a GS foi especificamente expresso no tecido vascular de tabaco no sentido "anti-sense". A expressão deste gene foi direccionada para o floema para inibir a expressão específica da GS nativa aí expressa. As principais consequências foram, para além da diminuição da actividade da GS no floema, o decréscimo do teor em prolina nas raízes, nos caules e nas folhas quando foi fornecida amónia como única fonte azotada. Estes resultados sugerem que a GS expressa no floema é responsável pelo controlo da produção de prolina (22).

Em tomateiro, a GS1 é formada por subunidades de 39 kDa (157). A infecção de folhas de tomateiro com *Pseudomonas syringae* pv tomato ou o tratamento com fosfoinotricina (PTT) conduziram a uma alteração do padrão de expressão das isoformas da GS caracterizado pela predominância da GS1 sobre a GS2. Foi possível observar um aumento da acumulação da GS1 após os tratamentos. Por microscopia electrónica, associada às técnicas de imunocitoquímica, foi possível observar GS1 no citosol das células do mesófilo. A análise bidireccional das proteínas presentes nos extractos foliares demonstrou o surgimento de um polipeptídeo da GS1 adicional em relação ao constitutivo já existente (158). Durante a senescência natural as folhas de tomateiro assistiu-se a uma diminuição da actividade total da GS devido à diminuição da quantidade de GS2. O teor de mRNAs da GS1 aumentou com a progressão da senescência foliar mas não foi correlacionado com os níveis de proteína (159).

O rastreio de uma biblioteca de cDNA, construída a partir de uma população de mRNA extraído de sementes de alface embebidas e irradiadas com luz vermelha, permitiu isolar um cDNA que codifica a GS1. Os estudos de expressão efectuados permitiram verificar que a acumulação dos transcritos era estimulada pelo fitocromo (172). Estes resultados sugerem que este gene da GS1 poderá ser regulado via fitocromo.

Em *Arabidopsis* os genes que codificam a GS1 também revelaram apresentar expressão diferencial. Todos codificam transcritos de 1,4 kb, tendo sido dois expressos na raiz, enquanto que um terceiro, para além de expresso nas raízes, também surgiu com alguma expressão nas folhas e em sementes germinadas (160). Foi possível verificar que a luz induz o aumento da acumulação e da actividade da GS1; no entanto, a irradiação com luz vermelha não exerceu qualquer efeito nos níveis da GS1, indicando que a luz terá um efeito indirecto. De facto, quando se trataram plantas adaptadas à obscuridade com sacarose, frutose ou glucose, ocorreu um aumento de transcritos da e de actividade da GS1. O mesmo efeito teve a aplicação de 2-oxoglutarato. Pelo contrário, a aplicação dos aminoácidos aspartato, asparagina, glutamina e glutamato conduziu a efeitos antagónicos aos obtidos com a sacarose (146). Estes resultados sugerem que a actividade da GS1 esteja condicionada pela razão carbono/azoto, em que uma razão elevada conduz ao aumento da actividade desta isoforma e uma razão baixa à diminuição dessa actividade.

1.4.6 – Estrutura dos mRNAs

A maioria das espécies estudadas até à data possui uma família multigénica a codificar a GS. Da análise dos cDNAs e genes clonados até à data foi possível concluir que na maioria das espécies existem pelo menos dois genes a codificar a subunidade citosólica e um a codificar a subunidade plastidial (66).

As moléculas de mRNA que codificam a GS possuem um tamanho estimado compreendido entre 1,4 a 1,6 kb, sendo o mRNA relativo à GS2 maior do que o da GS1 em cerca de 100 a 200 nucleótidos. As sequências não traduzidas a 5' dos mRNAs da GS são, ao contrário das sequências codificantes, geralmente pouco conservadas entre si. O códão de iniciação AUG dos mRNAs da GS difere significativamente do consenso dos mRNAs das plantas (AACAAUGGC), apresentando, no entanto um C na posição +5 e um A na posição –3, como no consenso. A conservação destes nucleótidos nestas posições parece estar relacionada com a eficiência da tradução destes mRNAs. Nas sequências não traduzidas a 3' o motivo

AAUAAA, que geralmente está localizado 10 a 30 bases a montante do local de poliadenilação, parece estar ausente nos mRNAs das GS das plantas. Estes, ou não possuem por inteiro este motivo ou então apresentam uma sequência equivalente – AAUAAU/C – localizada 18 a 30 nucleótidos a montante do local de poliadenilação (66).

1.5 – CONTROLO METABÓLICO E CONTROLO PELA LUZ DO METABOLISMO DO AZOTO

O processo de assimilação do azoto em aminoácidos está sujeito ao controlo metabólico e ao controlo pela luz a nível molecular. A luz exerce um efeito positivo na expressão de genes envolvidos na assimilação de amónia em glutamina e glutamato, como a GS2 e a Fd-GOGAT. (54, 160, 168, 169, 196), tendo sido reportado o envolvimento do fitocromo em algumas experiências (54, 111, 112, 196). Apesar de ser sabido que o fitocromo é o receptor primário da luz, as vias de tradução deste sinal responsáveis pelo controlo da expressão da GS ainda não são conhecidas. Por isso, o conhecimento dos elementos que fazem parte dos promotores dos genes responsáveis pela resposta à luz poderão ser importantes para esclarecer este processo (113). Em ervilheira foi possível verificar que os genes que codificam a asparagina sintetase (AS) são negativamente regulados pela luz, sendo a sua expressão induzida com os tratamentos pela obscuridade. Esta regulação pela luz ocorre ao nível da transcrição e é mediada pelo fitocromo (198). Sob condições de luminosidade o azoto é assimilado em glutamina e glutamato sendo transportado e utilizado como tal nas reacções anabólicas na da planta. Sob condições de obscuridade, em que a razão carbono / azoto orgânicos é baixa, as plantas direccionam a assimilação do azoto para asparagina a qual será transportada a longa distância ou será armazenada (113).

A caracterização dos factores que regulam directamente a transcrição dos genes da GS e da AS (assim como de outros genes envolvidos na biossíntese de outros aminoácidos) permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão destas enzimas pelo meio ambiente e ao longo do desenvolvimento das plantas (198).

A sacarose consegue mimetizar os efeitos da luz na expressão dos genes relacionados com o metabolismo do azoto tais como os que codificam a nitrito redutase, a nitrato redutase, a GS, a Fd-GOGAT, a GDH e a AS (111, 112, 146). Esta regulação dos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do azoto por parte do carbono metabólico celular reflecte a inter-relação existente entre o metabolismo do carbono e do azoto nas plantas (113).

Para além do controlo por parte do carbono metabólico celular, também foi proposto que a abundância relativa de azoto metabólico poderá regular a assimilação do azoto (113, 146). Verificou-se que o bloqueio da via biossintética da histidina, com o herbicida IRL 1803, conduziu ao decréscimo da expressão da GS (79), possivelmente devido a um mecanismo de retroinibição provocado pelo aumento do teor em glutamato. Em *Arabidopsis* os aminoácidos aspartato, asparagina, glutamato e glutamina inibem a acumulação de mRNAs da GS (146).

Em *Escherichia coli* foi identificado uma proteína que funciona como efector alostérico, designado PII, que regula indirectamente a glutamina sintetase, actuando ao nível da transcrição e da pós-tradução. No modelo vegetal *Arabidopsis* foi possível isolar uma proteína semelhante à PII de *E. coli* que parece fazer parte de uma rede complexa de tradução do sinal envolvida na percepção do estado do carbono e azoto orgânicos (92).

Possivelmente será a razão entre o carbono e o azoto orgânicos existentes na célula o principal factor responsável pelo controlo metabólico da assimilação de azoto nas plantas (113). A compreensão dos mecanismos envolvidos na sinalização mediada pelos metabolitos e a expressão génica nas plantas terá impacto no conhecimento dos mecanismos de controlo do metabolismo do azoto e consequentemente, na compreensão da regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (146).

1.6 – A GS E A SENESCÊNCIA FOLIAR

A senescência corresponde a uma fase de desenvolvimento da planta altamente regulada e complexa, que resulta na degradação coordenada das macromoléculas e subsequente mobilização dos seus componentes para outras partes da planta. De facto, a senescência é uma fase tão importante como o crescimento e a maturação do órgão. Durante o seu período de vida, a folha passa por três fases de desenvolvimento. Inicialmente sofre uma expansão rápida, importando carbono e azoto, ocorrendo uma síntese intensa até que a capacidade fotossintética máxima seja atingida. Nesta altura, a folha madura contribui para o fornecimento de compostos orgânicos carbonatados. Esta actividade continua a ocorrer até que as condições internas ou externas induzam o início da senescência (25).

A senescência corresponde a um período de mobilização intensa de azoto, de carbono e de minerais para as outras partes da planta (figura I.5) (25). Trata-se de um processo altamente regulado em que as células passam por uma desorganização dos organelos e por uma alte-

ração dramática do metabolismo celular. Apesar de ser um processo deteriorativo, é um processo crítico para a planta e é considerado um processo genético evolutivo (141).

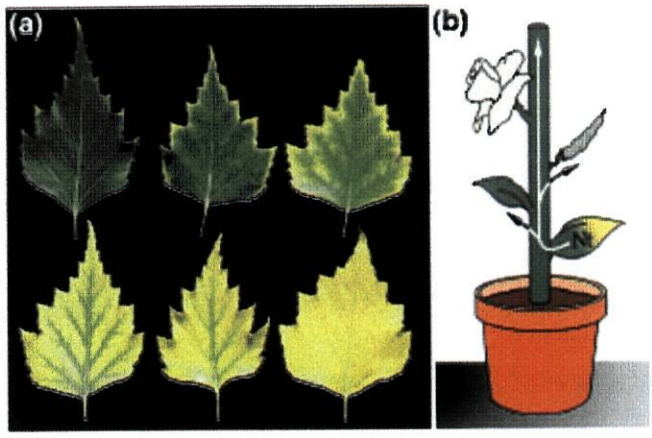


Figura I.5: (a) As folhas senescentes podem ser reconhecidas pela característica perda da clorofila. Frequentemente as últimas áreas foliares a senescer localizam-se perto das nervuras, possivelmente porque estas são necessárias para a exportação dos nutrientes. A folha do topo à esquerda encontra-se no início da senescência; a de baixo à direita encontra-se na fase mais avançada. (b) Há medida que a folha senesce, os nutrientes nela contidos (Nt) como o azoto, o fósforo e os iões metálicos são transportados para outras partes da planta, como as sementes e folhas em desenvolvimento (164).

A primeira e a mais significativa alteração da estrutura celular é a degradação do cloroplasto, organelo que contém até 70 % da proteína foliar. Do ponto de vista metabólico, a fotossíntese (assimilação de carbono) é substituída pelo catabolismo das clorofilas e de outras macromoléculas, como as proteínas, os lípidos membranares e RNA, para que alguns dos nutrientes seus constituintes possam ser reciclados (72). O núcleo, necessário para a transcrição dos genes, e as mitocôndrias, essenciais para o fornecimento de energia, mantêm-se intactos até às fases finais da senescência (164). De facto, a senescência do cloroplasto ocorre sob controlo do núcleo (72).

Durante a senescência verifica-se que a grande maioria dos genes deixa de ser expressa enquanto que a expressão de outros aumenta (72). Os SAGs "Senescence Associated Genes" são definidos como os genes cuja expressão aumenta durante a senescência natural em comparação com as outras fases de desenvolvimento da folha. Alguns destes SAGs incluem: lipases, responsáveis pela degradação dos lípidos; proteases e endopeptidases, responsáveis pela degradação das proteínas; RNases, que degradam o RNA e por isso permitem a remobilização do fosfato; e alguns genes relacionados com o stresse, como os genes envolvidos no stresse oxidativo e as proteínas relacionadas com a patogénese, que participam na protecção da integridade celular necessária para que a senescência decorra e se complete (72, 141). A

senescência foliar não é conduzida por um único conjunto de genes específicos mas utiliza genes que estão envolvidos noutros processos celulares. A maioria dos SAG pode ser induzida por factores adversos internos ou externos mas, no entanto, as senescências provocadas por factores diferentes diferem entre si do ponto de vista molecular, o que implica que o processo de senescência foliar envolva a perfeita sintonia da expressão destes genes SAG de modo a incorporar os sinais ambientais no programa de senescência (141). A regulação dos SAG é bastante complexa e poderão ocorrer várias vias de controlo da senescência foliar, o que implica que o bloqueio de uma via poderá não ter um efeito significativo na progressão da senescência – esta característica é referida como plasticidade da senescência (72).

Os SAG podem ser organizados em duas classes de acordo com os seus padrões de expressão temporais: a classe I é formada pelos SAGs específicos da senescência, isto é, os seus mRNAs só são detectados durante este processo; a classe II consiste naqueles SAGs cujos transcritos são detectáveis durante as fases iniciais do desenvolvimento foliar, isto é, que possuem uma certa expressão basal, a qual aumenta durante a senescência (figura I.6) (72).

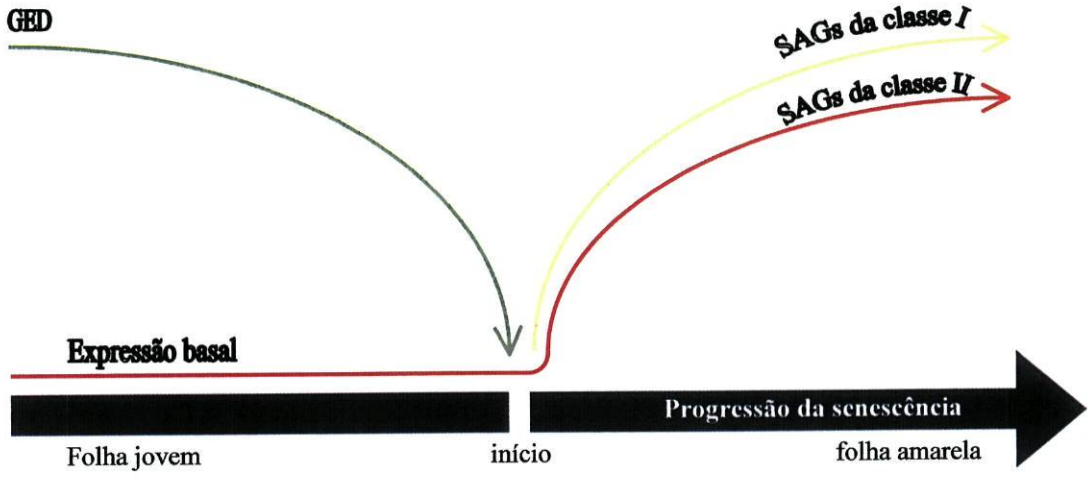


Figura I.6: Expressão diferencial dos genes durante a senescência. Os genes cuja expressão decresce (GED) incluem genes envolvidos na fotossíntese. Os SAGs são aqueles genes cuja expressão é aumentada durante a senescência. Os SAGs da classe I são expressos apenas durante a senescência (específicos da senescência). Os SAGs da classe II apresentam um nível basal de expressão desde o início do desenvolvimento foliar, mas este nível aumenta durante a senescência (72).

Com base no padrão de expressão dos genes e na função dos seus produtos proteicos, foram propostas dez classes de genes envolvidos na senescência (figura I.7). A classe 1 contém genes de manutenção que controlam actividades metabólicas essenciais para a célula e que são expressos num nível constante durante toda a vida da folha – estes genes não são específicos da senescência. As classes 2 e 3 consistem em genes que são expressos nas folhas verdes e cuja expressão reflecte-se nas fases finais da senescência. Estes genes estão activos

antes do início da senescência e deixam de ser expressos bem antes desta iniciar. As proteínas da classe 2 ficam activas durante a senescência enquanto que as proteínas da classe 3 podem provocar a senescência quando ausentes. A classe 4 inclui genes reguladores que são expressos imediatamente antes ou no início da senescência e cuja expressão é efémera. Os produtos génicos da classe 5 estão envolvidos nos processos de mobilização que ocorrem especificamente durante a senescência. A classe 6 consiste de genes cujos produtos estão envolvidos na mobilização dos produtos de reserva, podendo também funcionar durante as fases de desenvolvimento foliar. Os genes das classes 5 e 6 são expressos desde o início da senescência até à morte foliar.

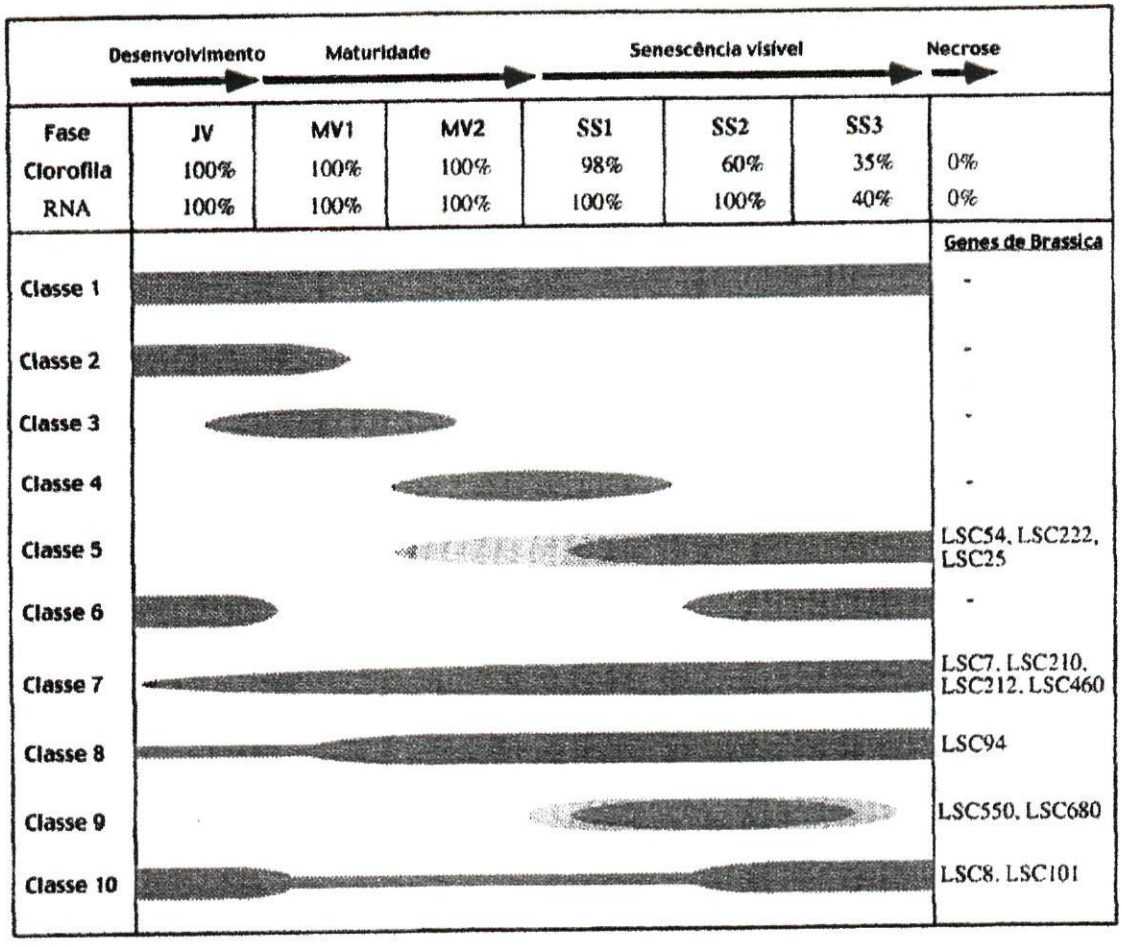


Figura I.7: Esquema representativo da expressão dos genes (de *Brassica napus*) durante o desenvolvimento foliar. As barras representam os diferentes padrões de expressão mencionados no texto. As fases de desenvolvimento são: JV – folha verde jovem; MV1 – folha verde e madura colhida na altura da floração; MV2 – folha verde e madura colhida no início da formação dos frutos; SS1, SS2 e SS3 – folhas senescentes com 98 %, 60 % e 35 % de clorofilas na altura da colheita, respectivamente. Adaptado de (25).

Os genes das classes 7, 8 e 10 caracterizam-se por serem expressos no início do desenvolvimento foliar e depois durante a senescência. Os transcritos dos genes da classe 7 aumen-

tam gradualmente durante o período de desenvolvimento foliar, desde as folhas jovens até à senescência. Os genes da classe 8 apresentam um padrão semelhante aos da classe 7, diferindo no que respeita aos níveis de mRNA que são baixos nas fases iniciais de desenvolvimento, aumentando dramaticamente numa dada altura da senescência. Os genes da classe 9 caracterizam-se por a sua expressão ser induzida numa determinada altura da senescência, não continuando a ser expressos até ao final deste processo. Os genes da classe 10 caracterizam-se por apresentarem dois picos de expressão forte: um no início do desenvolvimento foliar e outro durante a senescência (25).

Há evidências que uma via dependente do fitocromo e os níveis de fotossintetizados estarão envolvidos no arranque da senescência. A idade da folha é o principal factor a influenciar a iniciação de senescência – esta inicia-se quando a taxa fotossintética desce abaixo de um determinado patamar, que possivelmente estará perto do ponto em que a folha já deixou de contribuir com carbono fixado para o resto da planta. As cinco principais classes de fitohormonas, nomeadamente auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abcísico e etileno, assim como os jasmonatos influenciam a senescência: as três primeiras classes inibem-na, enquanto que as restantes aceleram-na (72).

Do ponto de vista metabólico, uma das alterações mais marcantes que ocorre ao nível da senescência é a rápida queda da fotossíntese. Já há bastantes evidências que implicam a influência dos açúcares na senescência, mas serão necessários mais estudos para determinar que relações poderão estar por detrás deste processo. É sabido que níveis elevados de açúcares reprimem a expressão de genes associados à fotossíntese. Plantas de *Arabidopsis* mutantes numa hexocínase eram insensíveis à glucose e apresentaram senescência retardada. Estes estudos sugerem que as hexocínases poderão estar envolvidas na percepção dos açúcares nas plantas superiores, estando deste modo relacionadas com a senescência (164).

Nas folhas das plantas superiores com fotossíntese C3 a maior parte do azoto encontra-se no cloroplasto. A RuBisCo é a principal proteína do estroma do cloroplasto, podendo contribuir com cerca de 50 % do total das proteínas solúveis presentes nas folha. No entanto, existe ainda uma percentagem considerável de proteínas associadas às membranas; por exemplo, a proteína que faz parte do complexo de captura da luz e que se encontra associada à clorofila (LHPC) é o polipeptídeo predominante nos tilacoides. O azoto constituinte destas macromoléculas tem de ser reassimilado pela planta e utilizado na produção de novos tecidos de outras partes da planta. A clorofila também é degradada e os catabolitos resultantes desta degradação são acumulados no vacúolo, impedindo a reutilização deste azoto por parte da planta (60).

O azoto presente nas proteínas e nos ácidos nucleicos é crucial para a formação de compostos que possam ser carregados no floema. As proteínas têm de ser convertidas em aminoácidos de transporte, em particular, nas amidas glutamina e asparagina, que são os principais aminoácidos presentes no floema transportado das folhas senescentes (60, 97).

Nas folhas de *Arabidopsis* verificou-se ocorrer utilização de L-arginina e/ou L-citrulina quando estes compostos são fornecidos como única fonte azotada, originando amónia que pode ser reassimilada em glutamina (124). Durante a senescência há libertação de amónia por desaminação dos aminoácidos e do catabolismo dos ácidos nucleicos a qual é convertida em glutamina pela GS. Durante esta fase a actividade total da GS diminui, assim como as actividades das enzimas glutamato sintase e alanina aminotransferase. No entanto, foi possível verificar a ocorrência da variação do padrão de algumas isoformas enzimáticas durante a senescência, tais como da glutamina sintetase, glutamato sintase, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (60). Num número considerável de espécies foi possível verificar um aumento gradual da acumulação de mRNAs que codificam a GS1 desde o início do desenvolvimento foliar, que continua durante a senescência (23, 97-99, 101, 135, 143, 159, 204). Deste modo, e tendo em consideração este padrão de acumulação, os genes da GS1 poderão ser considerados como pertencentes à classe II dos SAG, segundo (72), ou como pertencentes à classe 7 de acordo com (25).

A expressão da GS1 parece ser principalmente confinada aos feixes vasculares onde, presumivelmente, estará envolvida na formação de glutamina para o transporte intercelular. Este postulado é apoiado pelo facto de não se verificar a acumulação de aminoácidos em folhas senescentes, o que é indicação de que o floema é carregado de um modo eficiente (60). Nas folhas da planta de tabaco foi possível localizar a GS nas células de mesófilo e de parênquima em paliçada e nas células de companhia do floema; as células do mesófilo e de parênquima em paliçada só possuíam GS2 uma vez que a GS apenas surgia nos cloroplastos; as células de companhia possuíam GS no citosol (GS1) (33). Na mesma planta foi possível detectar em folhas senescentes ainda verdes, GS2 nos cloroplastos das células de mesófilo e de parênquima em paliçada. No entanto, nesta situação, também foi possível detectar GS1 no citosol destas células (23). Quando o mesmo estudo foi feito em folhas senescentes amarelas verificou-se que a marcação citosólica das células de mesófilo era mais intensa, indicando a ocorrência de um aumento na acumulação da GS1 neste tipo celular. Durante todo o processo de senescência assistiu-se a um decréscimo da quantidade de GS1 localizada nas células de companhia do floema. Estes resultados sugerem que o metabolismo do azoto foliar sofre uma mudança de local durante a senescência, passando dos cloroplastos para o citosol das células de

mesófilo (23). Seria interessante determinar as semelhanças entre os transcritos e genes que apresentam um comportamento semelhante de modo a descriminar possíveis mecanismos comuns envolvidos na regulação da remobilização do azoto durante a senescência.

1.7 – A GS, A SALINIDADE E A SECURA

Dado que os aminoácidos e outros compostos solúveis desempenham funções essenciais no metabolismo das plantas, é de grande interesse estudar a influência do stresse ambiental no seu metabolismo. Para além do mais há evidências que implicam a actuação de alguns compostos azotados na susceptibilidade ou resistência a situações de stresse ambiental particulares (183).

A acumulação de sais nos solos irrigados é um dos principais factores que diminuem a produção agrícola devido ao facto de a maioria das culturas não serem halofitas (91).

Os genes induzidos nas plantas sujeitas a secura funcionam não só na protecção das células devido à produção de proteínas e protectores celulares, mas também na regulação de genes envolvidos na tradução do sinal em resposta ao stresse (178). Na maioria das plantas, o stresse salino conduz a alterações da expressão génica; a maioria dos genes cuja expressão é estimulada deverão codificar produtos que actuarão contra os efeitos deletérios dos níveis aumentados de sal, de modo a proteger o crescimento e a sobrevivência da planta sujeita ao stresse salino. Uma forma de adaptação das plantas superiores à salinidade e à secura envolve a síntese de osmoprotectores e de osmorreguladores (205).

Já foram realizados muitos estudos sobre a influência de elevadas concentrações salinas (sobretudo NaCl) no metabolismo do azoto nas plantas. As elevadas concentrações de sódio inibem a absorção de potássio e de cálcio pela planta. Verificou-se que na maioria das plantas estudadas ocorre acumulação de aminoácidos e aminas – foram encontrados níveis elevados de prolina e de compostos quaternários metilados de amónia, como a glicina-betaína e a β-alanina – nos tecidos vegetais. A acumulação destes compostos difere com as espécies, podendo haver acumulação de apenas um deles até mesmo a combinação de vários. De um modo geral, as espécies que acumulam prolina contêm níveis baixos deste aminoácido quando crescidas em solos não salinos mas que aumentam marcadamente quando crescidas em solos salinos. Esta acumulação não está restrita às folhas, ocorrendo também em raízes, rizomas e inflorescências. Este aumento de prolina nas células das plantas sujeitas a stresse pode resultar

de um aumento da taxa biossintética e na diminuição da taxa de utilização, ou do relaxamento da retroinibição da biossíntese da prolina, que se manifesta no aumento da taxa biossintética.

A diminuição do potencial de água das folhas, resultante da exposição a situações de secura, comporta alterações na composição e na concentração da fracção azotada solúvel, particularmente no teor de prolina. Quando as condições hídricas são restauradas os níveis de prolina diminuem. Este aumento do teor de prolina é devido ao aumento da sua biossíntese e não resultado da proteólise (183).

A principal via biossintética da prolina ocorre via redução e ciclarização do glutamato, podendo também ter origem na ornitina e na asparagina (183). No entanto, estudos recentes revelaram não ser o glutamato, mas sim a glutamina, o principal aminoácido utilizado na síntese de prolina (22). Na planta do tabaco existem dois genes a codificar a GS1: os transcritos do gene *gln 1-5* são acumulados essencialmente no floema, enquanto que os mRNAs do gene *gln 1-3* acumulam-se no citosol das células das raízes e dos órgãos florais. Para elucidar o papel que a GS1 desempenha nos tecidos vasculares, inibiram especificamente a sua expressão no floema, utilizando a região promotora do gene que codifica a superóxido dismutase Cu/Zn de *Nicotiana plumbaginifolia*, à qual fundiram 274 bp do cDNA *gln 1-5* na orientação "anti-sense". Obtiveram plantas transformadas que apresentavam expressão quase nula da GS1 nas nervuras. Essa diminuição da expressão deveu-se à diminuição da expressão do gene *gln 1-5*, uma vez que a expressão do outro gene não foi alterada. Quando estas plantas cresciam em condições de nutrição azotada composta exclusivamente por amónia foi possível verificar que os níveis de prolina no floema e no xilema era mais baixos que nas plantas não transformadas. Quando as plantas transformadas eram sujeitas a tratamentos com 25 mM de NaCl verificou-se que apresentavam sintomatologia pronunciada de toxicidade como resposta ao stresse imposto, e que os níveis de prolina eram bastante mais baixos quando comparados com plantas não transformadas e crescidas nas mesmas situações. Com este estudo foi possível concluir que a inibição da expressão da GS1 no floema conduziu a uma diminuição acentuada da actividade da GS nos órgãos ricos em tecidos vasculares (raízes, caules e folhas), acompanhada pela diminuição do teor de prolina nesses mesmos órgãos, implicando que a GS1 localizada no floema desempenhará um papel fundamental na regulação da síntese de prolina na planta (22).

A salinidade e a secura provocam efeitos tóxicos e perturbações metabólicas, como por exemplo a perda da actividade nos cloroplastos (205), para além disso também provocam stresse oxidativo. Nestas condições, o ácido abcísico promove o fecho dos estomas limitando o fornecimento de CO_2 às células e a actividade fotossintética diminui. Como consequência,

ocorre redução em excesso da cadeia fotossintética transportadora de electrões e a RuBisCo actua como oxigenase, activando a fotorrespiração e conduzindo à formação de espécies reactivas de oxigénio que irão afectar a integridade membranar e enzimática (91). A fotorrespiração pode funcionar como uma via possível de dissipação do excesso de energia luminosa e de poder redutor. Através deste processo há produção de fosfoglicerato e CO_2 que entram no ciclo de Calvin-Benson e conduzem ao consumo de ATP e NADPH, contribuindo para a diminuição do estado de redução da cadeia fotossintética transportadora de electrões (91). Como anteriormente referido, o passo limitante da fotorrespiração é a reassimilação de amónia, libertada pela descarboxilação da glicina, pela acção da GS2. As plantas transgénicas de tabaco que sobreexpressam GS2 revelaram possuir um aumento da capacidade fotorrespiratória e um aumento da tolerância à elevada intensidade luminosa (106).

As plantas de tomateiro sujeitas a secura responderam com floração prematura e produção de frutos pequenos. O stresse imposto às plantas induziu a degradação proteica que se reflectiu na diminuição do teor proteico e no aumento dos níveis de aminoácidos livres. Esta resposta envolveu a remobilização de azoto das folhas e o transporte dos aminoácidos libertados para os órgãos reprodutores em desenvolvimento. Nestas plantas verificou-se que os níveis de mRNA da GS2 diminuíram ligeiramente, enquanto que os níveis de mRNAs e de polipeptídeos da GS1 aumentaram ligeiramente. No entanto, o teor de polipeptídeos da GS2 não sofreu alterações. O facto de não ter ocorrido variação do teor de GS2 pode reflectir a importância desta isoforma no processo de fotorrespiração. O aumento da acumulação de GS1 pode ser reflexo da necessidade que a folha teve em exportar os aminoácidos para as partes em crescimento da planta (7).

Foram produzidas plantas transformadas de arroz com o gene da GS2 na tentativa de elucidar o papel desta isoforma no envolvimento da resposta ao stresse salino. Obtiveram-se duas linhas de transformastes: uma apresentando níveis elevados de GS2 e outra com níveis muito baixos de GS2 – e verificou-se haver uma forte correlação entre a capacidade fotorrespiratória e os níveis de GS2. Durante duas semanas de exposição à salinidade verificou-se que os níveis de polipeptídeos da GS2 diminuíram, enquanto que os da GS1 mantiveram-se constantes. As plantas que sobreexpressavam a GS2 apresentavam maior resistência ao stresse salino, estando a sua resistência correlacionada com a capacidade fotorrespiratória (91).

Os resultados acabados de descrever parecem indicar o envolvimento de ambas as isoformas da GS na resposta a situações de secura e de salinidade. A GS1 localizada no floema parece estar envolvida no controlo da síntese de prolina, um aminoácido acumulado nestas situações devido à sua função osmoprotectora e osmorreguladora; a GS2 é responsável pelo

passo limitante da fotorrespiração, sendo a sua actividade directamente correlacionada com a actividade fotorrespiratória e com a tolerância ao stresse hídrico/salino.

1.8 – A BATATEIRA

A batateira é uma planta com origem ancestral apesar do conhecimento existente dos seus tempos iniciais de domesticação não ser preciso, o que não acontece com outras culturas, como o trigo e a cevada. Foi domesticada na América do Sul e daí foi dispersada pelo Homem por uma área considerável desde a altura em que os espanhóis aí chegaram, no século dezasseis (82).

Os dados obtidos a partir das crónicas da pós-conquista da América do Sul pelos espanhóis, assim como os dados arqueológicos, demonstram claramente que a batateira já era uma cultura domesticada pelo povo sul americano aquando da chegada dos espanhóis. Para além do mais, existem ainda, na zona da Bolívia e do Peru, muitas espécies selvagens, das quais se pensa que a batateira derivou (82).

O termo que originou o nome actual desta planta teve origem na palavra índia do povo Arawak, das Caraíbas, *batata*, que utilizavam para chamar a batata doce, do género *Ipoema*. Isto é devido ao facto dos espanhóis terem encontrado a batata doce primeiro, e não possuindo um nome para um tubérculo daquele género, utilizaram esta palavra índia, a qual foi espalhada pelo mundo inteiro (*batata* – batata - patata – potato, por exemplo) (82).

A batateira apareceu na Europa durante o último quarto do século dezasseis. Isto implica que teve de ocorrer uma selecção artificial muito forte desde 1570 até cerca de 1750, até Lineu ter descrito a espécie europeia de batateira *Solanum tuberosum* L.. Esta espécie terá originado várias subespécies de modo semelhante ao que ocorreu durante o milénio anterior quando foi utilizada pelas tribos índias desde os Andes até ao Chile. As batateiras provenientes dos Andes, quando crescidas nos dias longos de Verão da Europa, tuberizavam muito tarde e os seus caules continuavam a crescer, produzindo fileiras atrás de fileiras de flores e longos caules subterrâneos ramificados que frequentemente originavam novas plantas. Os seus caules eram mais finos e mais frequentes que os caules da subespécie *S. tuberosum* L.. O rendimento em tubérculos era fraco devido às baixas temperaturas nocturnas e à morte das plantas pelo frio (82).

As batateiras foram consideradas, no início da sua introdução na Europa, como curiosidades botânicas, e não foram cultivadas no campo até meados do século dezoito, apesar de

isso ser feito correntemente na América do Sul. A sua introdução na Europa deu-se em duas ocasiões: primeiro em Espanha, em 1570, e depois na Inglaterra um pouco mais tarde, entre 1580 e 1593 (figura I.8). Os dados históricos apontam que a introdução da batateira em Portugal ocorreu antes de ter ocorrido em Espanha. De Espanha difundiu-se através do continente europeu e parte da Ásia; depois da introdução em Inglaterra espalhou-se para a Escócia, Irlanda e Gales, assim como para as partes do norte da Europa. Da Grã-Bretanha difundiu-se para as colónias além mar, incluindo os actuais Estados Unidos da América. Só a partir de 1780 é que a batateira começou a ser cultivada em grande escala, tornando-se popular a partir do século dezanove (82).

Actualmente a batateira é uma cultura de importância mundial, ocupando o quarto lugar na produção mundial, a seguir ao trigo, ao arroz e ao milho (82).

Todas as batateiras comercializadas pertencem à espécie *Solanum tuberosum* L. e são tetraploides (4 x 12 cromossomas), possuindo um genoma relativamente pequeno (de baixa complexidade). Esta espécie pode ser facilmente transformada, podendo ser utilizada qualquer parte da planta para tal; é propagada através de clones (vegetativamente) (14, 26, 82).

Há mais exemplos de plantas desta família que são comercializadas, algumas de interesse alimentar, outras como plantas ornamentais ou com outro interesse comercial, e que incluem: o tomateiro (*Lycopersicum esculentum* L.), a malagueta (*Capsicum* spp.), a petúnia (*Petunia*), o tabaco (*Nicotiana* spp.) e a *Atropa* (82).

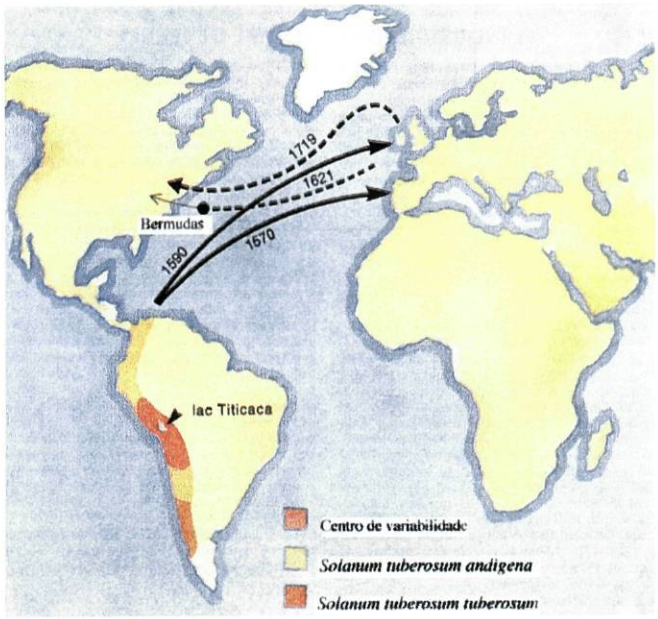


Figura I.8: Origem e difusão da batateira pelo mundo. Adaptado de (52).

1.9 – ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA BATATEIRA

O aspecto morfológico e o ciclo de vida estão esquematizados na figura I.9. A batateira é geralmente propagada vegetativamente. O modo de reprodução assexuada efectua-se a partir do tubérculo, o qual teve origem no engrossamento de caules subterrâneos modificados (A). Após colheita, os tubérculos entram num estado de dormência (B). Durante o armazenamento, passam por várias etapas fisiológicas que conduzem, a qualquer momento, à formação de gomos seguidos de brolhos, ao nível dos "olhos" do tubérculo (C e D). É neste estado que o tubérculo é geralmente plantado. Se o armazenamento se prolongar formam-se cada vez mais brolhos, os quais se alongam e ramificam (E) e depois tuberizam (F) (52).

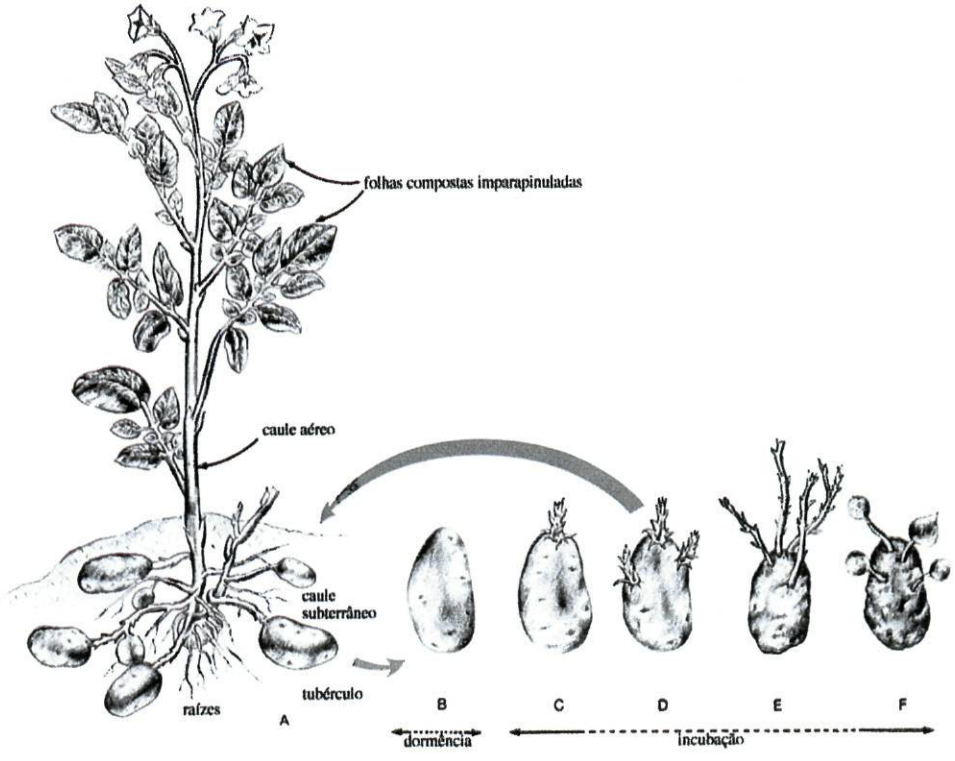


Figura I.9: Diagrama esquemático do aspecto morfológico e do ciclo de vida da batateira.. Adaptado de (52).

Desenvolvimento da plântula

A batateira raramente é produzida a partir de sementes. Quando é originada a partir de uma semente apresenta uma germinação epigeal, isto é, os cotilédones crescem acima da superfície do solo devido ao alongamento do hipocótilo. A radícula surge da extremidade relativa ao micrópilo e é aprumada, formando muito cedo raízes laterais. (figura I.10).

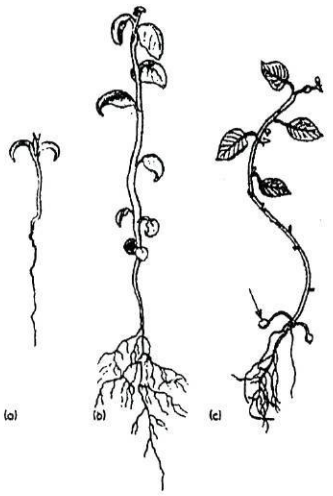


Figura I.10 : Desenvolvimento de plântulas de batateira. A idade da planta aumenta de (a) para (c). A seta indica a formação de um tubérculo a partir de um caule subterrâneo. Adaptado de [Cutter, 1992 #340].

As primeiras folhas são ovais e muito pubescentes. Quando as plantas apresentam poucos centímetros de altura, formam-se caules especializados nas axilas dos cotilédones que após a penetração no solo, formam tubérculos muito pequenos (44).

O sistema radicular

O sistema radicular é muito ramificado e bastante fibroso, sendo formado a partir da raiz da plântula ou por raízes adventícias, no caso das plantas propagadas por tubérculos (44). O sistema radicular é superficial, mantendo-se na camada superior do solo, mas uma ou outra raiz pode ser aprofundante penetrando no solo (74).

O porte aéreo

A batateira é uma planta herbácea com filotaxia em espiral. A parte aérea é inicialmente erecta, tornando-se mais tarde procumbente e morrendo no final da estação; a planta mantém-se viva nos tubérculos. As características morfológicas da parte aérea diferem nas diferentes variedades (44).

O caule

Os caules podem ser simples ou ramificados. Os caules principais podem ser unos, pouco abundantes (dois a três); medianamente abundantes (quatro a nove) ou abundantes (dez ou

mais). O caule pode ser redondo ou angular, sendo o seu interior oco na maioria das variedades (26). Os caules são verdes ou pigmentados de roxo e quase sempre pubescentes (74).

A estrutura da folha

As folhas são compostas imparipinuladas, com um número variável de pares de folíolos primários mais um folíolo terminal, podendo possuir folíolos secundários, mais pequenos, entre os folíolos primários. Os folíolos podem apresentar-se com a forma elíptica, oval ou oblonga (26).

A folha madura apresenta apenas uma camada de parênquima em paliçada e três a cinco filas de células, separadas por espaços intercelulares grandes, de parênquima lacunoso a formar o mesófilo, podendo ocorrer alguma variação do número de fiadas de acordo com as condições ambientais. A epiderme consiste numa camada de células cujas paredes são sinuosas. Os estomas são anomocíticos, ocorrendo em ambas as páginas, sendo, no entanto, mais numerosos na página inferior; o seu número varia com as variedades da espécie. O tamanho dos estomas e o número de plastídios nas células oclusivas também variam consoante as variedades, sendo o número de plastídios um indicativo do grau de ploidia da planta em questão. A epiderme pode possuir dois tipos de tricomas: um tipo cobre a epiderme e é unisseriado, enquanto que o outro é glandular e de extremidade ovalada uni ou pluricelular, sendo ambos de utilidade taxonómica. Inicialmente são bastante densos ficando progressivamente mais separados à medida que ocorre crescimento nas regiões localizadas entre eles. Pensa-se que estes tricomas constituem o que resta de um mecanismo de defesa contra os organismos afídeos que se alimentavam da batateira (44).

Os caules subterrâneos

Os caules subterrâneos das batateiras são caules laterais, formados usualmente a partir dos nós mais basais, que se localizam abaixo da superfície do solo.

Quando dão origem aos tubérculos, verifica-se que os formam a partir das regiões subapicais. A formação de tubérculos é considerada a soma de dois processos: a formação do caule subterrâneo e a tuberização da extremidade deste caule. O local e a formação destes

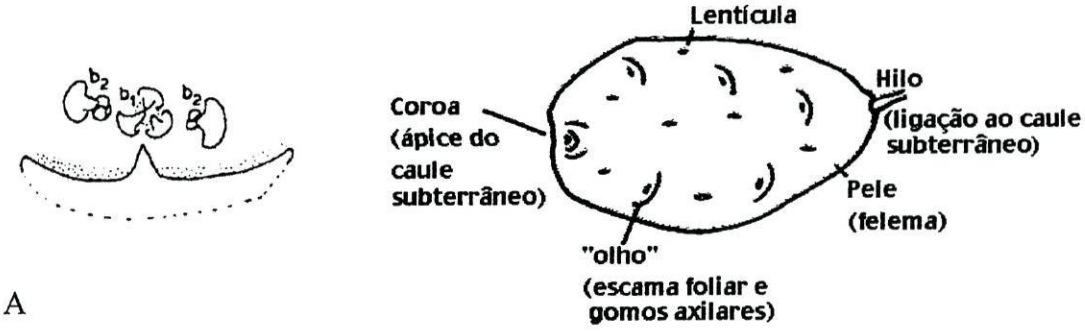
caules são afectados por vários factores ambientais tais como as condições nutricionais e a humidade do solo (44).

O tubérculo

Os tubérculos da variedade Désirée são grados, oval-alongados, de olhos superficiais, polpa amarelo-clara e pele vermelha (74). Como referido, os tubérculos formam-se nas extremidades dos caules subterrâneos. Os primeiros tubérculos a aparecer formam-se a partir dos caules subterrâneos mais profundos e tendem a permanecer dominantes sobre os tubérculos que se formam depois. Estes órgãos são importantes para a planta porque aproximadamente 75 a 85% da matéria seca total, produzida pela planta, é aí acumulada (44).

O tubérculo é um caule modificado caracterizado por possuir um eixo alargado e reduzido em comprimento, com folhas muito pouco desenvolvidas. É um caule cujos entrenós se apresentam muito distendidos no seu plano radial (44).

O "olho" do tubérculo é uma escama foliar que protege um gomo axilar, o qual possui uma sequência de primórdios foliares dispostos em espiral, dando a impressão do "olho" conter gomos dispostos na forma de um triângulo obtuso (figura I.11-A). No *hilo* pode ser encontrada a ligação do caule subterrâneo ao tubérculo ou a cicatriz dessa ligação. Na extremidade oposta ao hilo, a *coroa*, está localizado o gomo apical do caule subterrâneo (figura I.11-B) (44).



A

Figura I.11: A – Diagrama esquemático do "olho" do tubérculo da batata, onde é possível observar uma escama foliar a proteger um gomo axilar (b1), as duas primeiras folhas desse gomo, as quais protegem os próprios gomos axilares (b2). Adaptado de (44). B – Diagrama esquemático da morfologia externa do tubérculo da batateira (120).

O primeiro sinal de tuberização é um aumento de grossura na região sub-apical da extremidade do caule subterrâneo. A tuberização ocorre no sentido acrópeto (do hilo para a co-

roa) e envolve alguma extensão longitudinal e várias expansões consideráveis transversais dos entrenós sucessivos. A tuberização ocorre cedo quando as plantas estão sujeitas a baixas temperaturas e é atrasada quando sujeitas a temperaturas elevadas. O fotoperíodo também influencia a tuberização: as plantas crescidas em regimes de dias curtos produzem tubérculos mais cedo que as plantas sujeitas a dias longos (44).

O crescimento do tubérculo depende essencialmente da divisão e alargamento das células do parênquima de reserva. Parece ocorrer um decréscimo no tamanho das células do parênquima de reserva do hilo para o ápice. O tubérculo possui uma grande abundância de fiadas de floema interno e externo, podendo este tecido corresponder a 5% do volume de um tubérculo maduro. O floema é formado por elementos de tubo crivoso, células de companhia e células de parênquima de reserva especializadas. Estas últimas possuem inclusões proteicas cristalinas, plastídios e praticamente não possuem amido. As células do parênquima de reserva são mais ou menos isodiamétricas e possuem amiloplastos com grãos de amido volumosos. As que possuem maior teor em amido estão localizadas perto dos feixes vasculares. O teor de amido dos tubérculos corresponde a 10 a 25% do peso fresco, dependendo da variedade. A proporção do xilema no tubérculo maduro é pequena (44).

A organização interna do tubérculo está esquematizada na figura I.12. A acumulação de proteínas ocorre principalmente na periferia dos tubérculos, em células de parênquima especializadas, podendo também ocorrer na medula. Estas proteínas formam cristais cúbicos de dimensões compreendidas entre 10 a 25 μm e parecem ser proteínas de reserva uma vez que durante o abrolhamento desaparecem. A maior parte das proteínas acumuladas nos tubérculos corresponde ao grupo das patatinas (44).

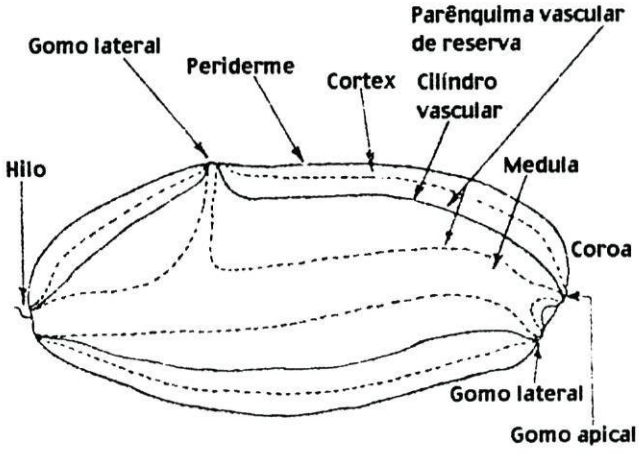


Figura I.12: Esquema representativo de uma secção longitudinal de um tubérculo revelando as principais características estruturais. Adaptado de (180).

No início do desenvolvimento do tubérculo ocorrem divisões periclinais nas camadas de células da epiderme e da hipoderme que vão originar a periderme a qual é formada por seis a dez camadas de felema dependendo este número da temperatura. Nos locais inicialmente ocupados pelos estomas ocorre formação de lentículas nesta fase inicial de desenvolvimento. O número de lentículas formadas depende do tipo de tubérculo, do tipo de solo e das condições climatéricas (44).

Durante o abrolhamento, o ápice original do caule subterrâneo recomeça o crescimento. Neste processo a temperatura pode ter um efeito importante na dominância apical, podendo interferir com o número de caules aéreos formados. De um modo geral, quanto mais elevada a temperatura, menor a dominância apical (44).

A propagação da batata faz-se vegetativamente por tubérculos, vulgarmente chamados "batata-semente", a qual deverá ser isenta de doenças, pertencer à variedade escolhida e possuir reservas indispensáveis à formação de plantas robustas e produtivas, isto é, deverá ser "certificada". A quebra de dormência dos tubérculos-semente constitui um problema, dado que numa situação normal, a batata colhida no fim do Verão, princípios do Outono, apenas abrolha em Fevereiro – Março, pelo que geralmente se faz a sementeira nesta época. A indução dos gomos dos tubérculos faz-se, em épocas normais, pela colocação da batata em locais aquecidos e convenientemente iluminados (74).

1.10 – A BATATEIRA, A SALINIDADE E A SECURA

As batateiras apresentam tolerância baixa ou moderada à salinidade, dependendo esta da ontogenia e do período de crescimento da planta (117, 140). A altura em que a batateira se manifesta menos tolerante ou mais sensível à salinidade corresponde ao período de iniciação dos tubérculos. A tolerância à salinidade é a capacidade inerente da planta aguentar os efeitos de elevadas concentrações de sais nas raízes ou nas folhas sem apresentar sintomatologia devida à acção de um factor adverso (177). Pelo facto de ter sido observado que as raízes são menos sensíveis ao sal foi sugerido que a tolerância da batateira poderá ser função da capacidade de adaptação deste órgão à salinidade (140).

Em estudos feitos em campo foi possível verificar que a salinidade retardou a emergência das plantas e acelerou a senescência. No que respeita a produção de tubérculos verificou-se que o crescimento e o número destes foi reduzido (117). Quando as batateiras são sujeitas a condições de salinidade verifica-se ocorrer uma redução drástica do peso fresco, assim como

da taxa de crescimento, resultando em folhas mais pequenas e, por vezes, em número reduzido. Esta sintomatologia é devida ao stresse osmótico imposto pela salinidade. Este stresse osmótico também pode provocar alterações da cor das folhas e a diminuição do teor de amido nos tubérculos (177).

A redução da taxa de crescimento observada nestas condições pode ser justificada pelo facto de, quando as plantas crescem em condições adversas de secura ou salinidade, um dos processos a ficar limitado ser a absorção radicular de azoto, o que conduz em último caso à redução da actividade fotossintética e à diminuição da eficiência reprodutora (83).

As halobactérias são os únicos organismos que são tolerantes à salinidade a nível molecular. Todos os outros organismos evitam a necessidade da tolerância ao sal para a maioria das suas macromoléculas mantendo as condições do citoplasma bem definidas e conservadas. Estas condições podem ser mantidas em situações de stresse salino pela acumulação de osmólitos metabolicamente neutros que também podem desempenhar papel protector, para além de osmorregulador (208). De facto, existe um número grande de plantas que consegue manter o crescimento durante períodos curtos de falta de água ou de salinidade acumulando substâncias osmoticamente activas, como os hidratos de carbono e os aminoácidos. Este fenómeno é designado osmorregulação ou ajustamento osmótico. Um membro deste grupo de substâncias é o aminoácido prolina. Trata-se de um aminoácido pouco presente nas plantas não sujeitas a situações de stresse (osmótico e/ou hídrico) mas que se acumula a níveis consideráveis durante a adaptação a estes tipos de stresse (28). Para além das funções referidas, pensa-se que a prolina poderá estar envolvida no armazenamento de energia, de azoto ou de poder redutor (201).

Verificou-se que o teor de prolina oscila nos ciclos de luminosidade/obscuridade em folhas de *Arabidopsis*. Os seus níveis aumentam durante o período de luz e diminuem durante a obscuridade. Quando as plantas estão sujeitas a estes dois tipos de stresse verifica-se que a amplitude desta oscilação é maior do que nas plantas controlo. O aumento do teor em prolina nestas situações de stresse é devido à sua síntese *de novo* e à repressão do seu catabolismo (167, 201). Durante a recuperação da situação de stresse esta prolina é rapidamente degradada (201).

As batateiras acumulam prolina em resposta a condições de secura e de salinidade. Esta acumulação de prolina é função do período de crescimento da planta e está relacionada com a duração do ciclo de vida da planta. Foi possível verificar que os cultivares mais tolerantes à secura acumulavam prolina mais rapidamente que os cultivares menos tolerantes. Contudo, os cultivares menos tolerantes acabavam por acumular níveis mais elevados deste aminoácido que os tolerantes, sugerindo haver uma relação inversa entre o teor de prolina acumulada e a

tolerância do cultivar ao stresse (199). Este aminoácido é acumulado a níveis muito superiores às necessidades da síntese proteica da planta. A prolina funciona como protector ou estabilizador de proteínas ou de estruturas membranares, que são sensíveis à desidratação ou à danificação iónica, aprisionando radicais hidroxilo ou outras espécies químicas reactivas que poderão inibir os processos de transferência de electrões (95).

Foram crescidas batateiras em culturas hidropónicas durante um certo período de tempo após o qual simulou-se uma situação de stresse hídrico prolongado pela adição de polietilenoglicol (PEG 6000). Após a sujeição ao stresse, foi possível registar crescimento das plantas, apesar de este ser inferior ao do registado na situação controlo. Após o tratamento, as plantas tratadas possuíam dois tipos diferentes de folhas: as folhas mais jovens, formadas após a adição de PEG, eram mais pequenas que as das plantas controlo e apresentavam-se curvadas, apesar de aparentemente estarem túrgidas; as folhas mais velhas, formadas antes da imposição do stresse hídrico, apresentavam zonas necróticas e tinham um aspecto murcho. O teor clorofilino das folhas jovens não diferiu significativamente do valor obtido na situação controlo, o mesmo ocorrendo com o teor proteico; nas folhas mais velhas assistiu-se ao decréscimo de ambos (27, 28). Como resposta inicial a este tratamento, verificou-se um aumento da quantidade de hexoses. Durante o tempo restante de tratamento ocorreu um aumento do teor de aminoácidos, principalmente devido ao aumento do teor de prolina. Para além desta variação quantitativa, também ocorreu uma variação qualitativa devida à preferência de acumulação de glutamina e asparagina em detrimento do glutamato e do aspartato. Nas plantas tratadas verificou-se haver uma maior percentagem de aminoácidos (e em especial de prolina) no estroma dos cloroplastos do que nas plantas controlo. Com base nestes resultados, os autores propuseram que o ajustamento osmótico ocorreu ao longo do tempo do seguinte modo: após a imposição do stresse ocorreu imediatamente acumulação de hexoses no vacúolo, fazendo com que a água presente no cloroplasto e no citosol entrasse para este organelo. Este movimento de água foi contrariado pela subsequente acumulação de aminoácidos no interior das células e pela indução da síntese de prolina, conduzindo à acumulação destes no citosol e no cloroplasto (28).

Paralelamente a estes acontecimentos foi possível verificar diferenças nas actividades enzimáticas nos dois tipos de folhas: nas folhas mais velhas ocorreu uma diminuição generalizada nas actividades das enzimas localizadas nos cloroplastos, o que se reflectiu na fotossíntese, enquanto que nas folhas mais jovens não ocorreu uma variação significativa destas actividades quando comparadas com a situação controlo. Segundo os autores, as folhas mais velhas terão iniciado a degradação dos seus constituintes cloroplastidiais, de modo a disponibili-

zar nutrientes para a formação de tecidos novos. Face à totalidade de resultados apresentados, os autores sugeriram que, como resposta ao stresse hídrico imposto pelo PEG 6000, as batateiras desenvolveram uma estratégia conducente à formação de tipos celulares diferentes (células das folhas velhas *versus* células das folhas jovens) contribuindo para o aumento da capacidade de se adaptarem a uma nova situação ambiental e aclimataram-se ao stresse hídrico (27).

A estrutura complexa de uma planta torna difícil a separação entre os mecanismos de tolerância à salinidade sistémicos dos celulares (83). Quando se tentou comparar a sensibilidade à salinidade de vários cultivares de batateira e das respectivas culturas de células em suspensão foi possível verificar que o comportamento e a resposta dos dois sistemas diferiam significativamente, pelo que os autores concluíram que o sistema de culturas de tecidos não deverá ser utilizado na avaliação da tolerância dos cultivares à salinidade, e que especial atenção deverá ser dada à interpretação dos resultados antes de extrapolados deste sistema para a planta intacta (140).

Como referido, a salinidade e a secura são condições ambientais que promovem o stresse oxidativo. Tendo em consideração este conhecimento foi proposta uma relação entre o sistemas de defesa anti-oxidante e a tolerância à salinidade nos diferentes cultivares de batateira (10). Estes autores verificaram uma diminuição do teor clorofilino quando as plantas eram crescidas sob condições de salinidade e que os cultivares que apresentavam maior tolerância apresentavam maior actividade das enzimas do sistema anti-oxidante, nomeadamente das enzimas superóxido dismutase e peroxidase. Este estudo indica que a aquisição de tolerância à salinidade poderá ser consequência de um aperfeiçoamento da resistência ao stresse oxidativo através do aumento dos sistemas antioxidantes solúveis e enzimáticos. Estes resultados são apoiados pelo facto de se ter observado que plantas transgénicas de tabaco que sobreexpressam a enzima superóxido dismutase Cu/Zn cloroplastidial de ervilheira terem mantido os níveis de fotossíntese mais elevados do que as plantas não transformadas, indicando que os efeitos das espécies de oxigénio activas não eram tão prejudiciais para a planta, mesmo quando estas eram expostas a situações promotoras da fotorrespiração (78).

1.11 – A GS E A BATATEIRA

Os estudos da GS na batateira iniciaram-se pela sua caracterização e localização em órgãos verdes e órgãos não verdes (154-156).

Órgãos verdes

Através de "Western blotting" foi possível reconhecer as duas classes de polipeptídeos da GS quer em folhas, quer em tecido caloso, de batateira. Uma dessas classes, de 45 kDa de massa molecular, era predominante nas folhas, a outra, de 42 kDa, era predominante no tecido caloso. A análise de extractos de cloroplastos isolados demonstrou a existência de apenas uma banda, de 45 kDa, o que permitiu concluir que o polipeptídeo de maior massa correspondia à subunidade da GS2. Nas nervuras e nos pecíolos também foi possível detectar os dois tipos de polipeptídeos, sendo o de 42 kDa o mais abundante (154, 155).

As actividades correspondentes às isoenzimas GS1 e GS2 da folha foram separadas por meio de cromatografia de troca aniónica. Obtiveram-se duas áreas de actividade: o primeiro pico foi eluído a aproximadamente 100 mM e o segundo a aproximadamente 200 mM de NaCl. O primeiro pico foi considerado a GS1 e o segundo a GS2: a GS2 apresentava 86,4 % da actividade total e a GS1 13,6 %. A análise por SDS-PAGE da fracção da maior actividade revelou que esta continha apenas uma banda, de 45 kDa, que co-migrava com o polipeptídeo dos cloroplastos isolados, pelo que se confirmou que o pico de maior actividade correspondia à GS2 (154).

A detecção da GS nativa de extractos foliares em gel não desnaturante permitiu visualizar, na maioria das condições testadas, uma banda, cuja massa molecular aparente era compatível com as massas moleculares descritas para as formas octaméricas da GS de outras espécies. Contudo, em alguns casos, ocorreram aspectos que sugeriam a existência de bandas duplas, relativas à GS2 e à GS1. A focagem isoeléctrica vertical destes mesmos extractos permitiu detectar três bandas, sendo uma mais forte, de pI aproximado de 5,9 e aparentemente correspondente à GS2 da folha (154).

A impressão de tecidos em nitrocelulose, acoplada à detecção com anticorpos ("Western tissue printing") permitiu localizar a GS em folhas, pecíolos e caules aéreos. A marcação surgiu dispersa pela lâmina foliar, sendo mais intensa e localizada na zona correspondente ao floema adaxial da nervura central da folha e do pecíolo. Em impressões de secções transversais de caule a zona vascular era facilmente identificada pelo facto da marcação estar presente, em manchas muito intensas, na zona correspondente ao floema interno (154).

A localização da GS por imunocitoquímica ultraestrutural permitiu verificar que ambas as isoformas da GS estavam presentes em folhas de batateira, mas em diferentes tipos de células: nas células de mesófilo a GS2 aparecia com uma marcação intensa apenas no estroma dos cloroplastos; a GS1 surgia nas células de floema, ocorrendo a marcação quase exclusivamente no citoplasma das células de companhia. No tecido caloso a maior densidade de marcação era

observada dispersa pelo citoplasma, apesar de ter sido possível observar alguma nos plastídios (154, 155).

A GS foi caracterizada em plantas estioladas e em plantas em reverdecimento. Nas plantas estioladas foi detectada GS nos estioladas das células de mesófilo. Após exposição à luz, a marcação nos plastídios aumentou marcadamente, paralelamente ao desenvolvimento dos estioplastos e a sua interconversão em cloroplastos. Nas células vasculares da nervura central era possível observar uma imunomarcação muito escassa. Contudo, após quatro horas de iluminação, a marcação já era abundante no citosol das células de companhia do floema e ao fim de sete dias de iluminação, para além de uma marcação mais intensa das células de companhia do floema, também foi possível observar marcação nos plastídios das mesmas. As células do parênquima xilémico apresentavam GS2 vinte e quatro horas após iluminação. Os estudo de imunolocalização também foram efectuados na epiderme das plantas em reverdecimento e foi possível verificar que as células de guarda apresentavam marcação quatro horas após iluminação. Ao fim de 24 horas já foi possível detectar marcação quer no citoplasma, quer nos plastídios. No entanto, ao fim de sete dias, a marcação era mais circunscrita aos cloroplastos (154).

A influência da carência de azoto na actividade e padrão das isoformas da GS foi avaliada em folhas de batateira em comparação com plantas controlo. Para tal, colheram-se amostras das segundas, quintas e sétimas folhas a contar do ápice. Verificou-se que a actividade global da GS no lote submetido a carência de azoto era inferior ao controlo nas folhas maduras, anulando-se esta diferença nas folhas jovens. Quer nas plantas controlo, quer nas plantas tratadas, a actividade global da GS aumentava das folhas jovens para as folhas maduras. Os "Western blottings" revelaram que a carência em azoto teve um efeito diferencial nas duas isoformas. Ocorria uma predominância da GS2 nas folhas jovens em ambos os lotes de plantas, mas este padrão invertia-se nas folhas mais antigas. Esta inversão foi mais rápida no lote sujeito a carência. No entanto, a GS1 não parece ter sofrido influência, mantendo-se os seus níveis constantes com o avançar da idade da folha. Os estudos de imunocitoquímica revelaram um padrão de distribuição da GS semelhante nas plantas de ambos os lotes (154).

Por hibridação *in situ* a nível ultraestrutural provou-se a acumulação de mRNA da GS em células de companhia de floema em folhas de batateira (154).

Órgãos não verdes

O estudo de alguns órgãos não verdes da batateira, nomeadamente de raízes, brolhos e tubérculos, por "Western blotting", permitiu detectar uma única banda, de cerca de 42 kDa, correspondente à GS1 (154, 156).

Os tubérculos em abrolhamento apresentavam uma elevada actividade da GS. Após a sua plantação, verificou-se que a actividade da GS era ainda elevada ao fim de uma semana, diminuindo acentuadamente a longo de 4 semanas. Por "Western blotting" foi possível observar um paralelismo entre a actividade observada e a intensidade de polipeptídeos da GS1 (154).

A impressão de tubérculos e de brolhos em nitrocelulose e posterior detecção da GS com anticorpos permitiu observar a localização da GS nestes órgãos. Nos tubérculos jovens em desenvolvimento a marcação foi observada na zona vascular próxima do hilo e na periferia do tubérculo. Nos tubérculos maduros, a marcação revelou uma localização precisa e bem definida circunscrita a grupos de células dispersos na zona perimedular, interna ao anel vascular, correspondente à localização do floema interno. Também foi observada marcação nos "olhos" e no floema interno e nos ápices dos brolhos. Nos tubérculos sem brolhos (dormentes) a marcação era pouco intensa, localizando-se próximo do anel vascular. Nos tubérculos em abrolhamento a marcação era muito intensa e abundante no floema interno (154).

A localização da GS nas células dos tecidos vasculares de tubérculos por imunocitoquímica ultraestrutural permitiu detectar uma marcação abundante no citoplasma de células de parênquima floémico, que possivelmente seriam células de companhia. Em microtubérculos produzidos *in vitro* a GS foi essencialmente detectada no citoplasma de algumas células; também foi observada alguma marcação, se bem que reduzida, em plastídios pequenos (154).

Estes resultados contribuíram para a caracterização funcional do floema, e particularmente, das células de companhia, como local de síntese *in situ* de aminoácidos, nomeadamente da glutamina, e permitiram atribuir ao floema interno, presente em algumas famílias de dicotiledóneas como as *SOLANACEAE*, um papel importante de translocação de compostos azotados na planta (154).

Com o objectivo de abordar a caracterização da família de genes da GS da batateira foi construída uma biblioteca de cDNA de folhas de batateira em fago Lambda gt11 *Sfi-Not*. Do rastreio desta biblioteca com uma sonda conservada foi possível isolar um clone de cDNA designado **14A1.2**, o qual foi completamente sequenciado, revelando possuir 1199 nucleótidos que codificam um polipeptídeo de 303 resíduos de aminoácidos e que incluem, após o códão STOP, uma porção de 268 nucleótidos na região não codificante a 3', mais uma cauda

poli-A, a partir do nucleótido 1180. Neste cDNA não foram encontrados presumíveis locais de poliadenilação. A comparação da sequência completa de nucleótidos deste cDNA com sequências de bases de dados revelou uma homologia elevada com cDNAs que codificam subunidades plastidiais da GS, nomeadamente com a sequência NSGS2AA que representa um mRNA da GS2 de *Nicotiana sylvestris*. Pelo alinhamento destas duas sequências verificou-se que a homologia iniciava-se no nucleótido 454 da sequência NSGS2AA, permitindo concluir que o cDNA 14A1.2 se encontra truncado a 5', não possuindo a sequência não traduzida a 5' e parte da região que codifica a extremidade N-terminal do polipeptídeo. A análise da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleótidos permitiu identificar os principais segmentos conservados em todas as sequências de aminoácidos da GS das plantas (regiões I, II, III e IV) e ainda uma extensão de 16 aminoácidos na extensão C-terminal, característica das subunidades plastidiais da GS (figura I.4). Estes resultados permitiram concluir que o clone de cDNA isolado codifica um polipeptídeo correspondente à GS plastidial (GS2) (154, 190). A análise de mRNA da GS por "Northern blotting", utilizando uma sonda conservada, permitiu inferir no tamanho dos transcritos em folhas e tubérculos de batateira. Em folhas, foi possível detectar um transcrito abundante correspondendo, possivelmente, ao mRNA da GS2, com cerca de 1,5 kb (± 100 bp). Em tubérculo foi detectado um transcrito de menor tamanho, com cerca de 1,3 kb (±100), codificando, possivelmente, a subunidade citosólica da GS1 (154). A análise por "Southern blot-ting" do DNA genómico de batateira, utilizando um fragmento conservado como sonda, permitiu sugerir a possibilidade da existência de uma família de genes a codificar a GS, constituída por um gene a codificar a GS2 e pelo menos um gene a codificar a GS1 (154, 190).

Uma biblioteca de cDNA, construída no vector Lambda ZAPII a partir de mRNAs isolados de tubérculos de batateira em crescimento, foi rastreada com uma sonda heteróloga correspondente ao cDNA que codifica a subunidade citosólica Gln-γ de feijoeiro (12). Isolaram-se dois clones de cDNA, designados por **T5F8.1A** e **T31A11.3A**, os quais foram amplificados por PCR para inferir o seu tamanho.

Verificou-se que os cDNAs T5F8.1A e T31A11.3A apresentavam um tamanho aproximado de 1,2 kb e 1,4 kb, respectivamente. A sequenciação das extremidades 5' e 3' do cDNA T31A11.3A permitiu obter uma leitura de 58 nucleótidos que codificam 19 resíduos de aminoácidos, nos quais foi possível identificar a região conservada II. Da região 3' obteve-se uma leitura de 119 nucleótidos, mais uma cauda poli-A. Após sequenciação da extremidade 5' do cDNA T5F8.1A foi possível obter uma leitura correspondente a 295 nucleótidos que codificam 98 resíduos de aminoácidos, no quais foi possível identificar a região conservada I e uma

das cisteínas conservadas e comuns às subunidades da GS. Ambos os cDNAs revelaram-se incompletos a 5'. A comparação destas sequências nucleotídicas com as já existentes em bases de dados permitiu verificar que as homologias mais elevadas eram relativas a mRNAs que codificam subunidades da GS. No caso do cDNA T5F8.1A as homologias mais elevadas eram relativas a mRNAs que codificam subunidades da GS1. Não foi possível apurar com qual dos tipos de subunidades o cDNA T31.A11.3A estaria relacionado devido à reduzida informação nucleotídica disponível (190).

OBJECTIVOS

Nas plantas não leguminosas a assimilação do azoto inicia-se pela absorção de azoto inorgânico do solo sob as formas de nitrato e amónia. O nitrato tem de ser subsequentemente reduzido a amónia antes de ser assimilado numa forma orgânica como o glutamato e a glutamina. Estes dois aminoácidos são os dadores de azoto para a biossíntese dos outros aminoácidos e de outros compostos azotados presentes nas plantas. As enzimas responsáveis pela sua biossíntese são a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT), as quais compõem o ciclo GS-GOGAT. A glutamina é a enzima-chave neste processo, ocupando uma posição no metabolismo de azoto que é comparável à posição ocupada pela RuBisCo no metabolismo do carbono. Além disso, esta enzima intervém na (re)assimilação de amónia proveniente de outras vias metabólicas, sendo por isso deveras importante explorar o seu papel no metabolismo do azoto em diferentes fases de desenvolvimento da planta, assim como em resposta a condições fisiológicas específicas, tais como a transição fonte-recebedor, a secura e a salinidade. O conhecimento da regulação das enzimas envolvidas no metabolismo do azoto, e em particular da GS, permitirá clarificar que mecanismos estarão envolvidos na sua regulação, contribuindo para o aumento da qualidade e da produtividade das plantas.

Este trabalho teve por finalidade a continuação da caracterização da expressão da família de genes que codificam a GS em vários órgãos de batateira, alguns dos quais em várias fases de desenvolvimento, através de técnicas de análise de proteínas e de biologia molecular.

Foi feito novo rastreio de uma biblioteca de cDNAs construída a partir de mRNAs de folha, com uma sonda citosólica homóloga, com o objectivo de isolar mais cDNAs que codificam a GS1 nesta espécie. Os cDNAs obtidos nos trabalhos desenvolvidos anteriormente foram completamente sequenciados e as suas sequências submetidas a uma base de dados.

Actualmente sabe-se que a GS existe sob diferentes isoformas nas plantas e que a família de genes que a codifica apresenta uma expressão diferencial. O significado fisiológico desta expressão diferencial ainda não está bem estabelecido, mas aparentemente há uma regulação da expressão génica em resposta a condições ambientais, ou relacionada com o grau de desenvolvimento do órgão. Foi objectivo deste trabalho investigar o padrão de expressão de cada gene conhecido da GS em diferentes órgãos da batateira (raiz, tubérculo, brolho, caule, folha), alguns dos quais durante várias fases de desenvolvimento (folha jovem a senescente; tubérculo em crescimento e tubérculo em abrolhamento). Este trabalho englobou a análise do teor de proteínas solúveis por SDS-PAGE, dos polipeptídeos da GS (por uma e duas dimensões) e dos respectivos mRNAs ("Northern" e "Dot blotting").

Foi ainda avaliada a expressão da família multigénica da GS em resposta a situações de stresse (secura e salinidade) recorrendo à análise da acumulação relativa de polipeptídeos e de mRNAs. Em paralelo com a resposta da planta a diferentes situações de salinidade, foram feitos estudos em tecido caloso sujeito a concentrações crescentes de salinidade. Para alem das técnicas referidas no parágrafo anterior, ainda foram determinados outros parâmetros bioquímicos, tais como, o teor clorofilino e de prolina, no sentido de averiguar a sua variação na resposta à situação adversa.

Foi dada prioridade à optimização de técnicas de hibridação de ácidos nucleicos marcados não isotopicamente com digoxigenina, assim como ao desenvolvimento de técnicas de biologia molecular que visam a obtenção de extremidades 5' de cDNAs.

O conhecimento do padrão de expressão dos genes da GS na planta saudável e a sua resposta em situações de stresse torna possível verificar como estas condições afectam o metabolismo de azoto na planta, e em particular, a produção de glutamina, um dos principais aminoácidos utilizados pela planta para o transporte de azoto.

Os cDNAs isolados poderão ser utilizados futuramente, não só como sondas em trabalhos de caracterização da expressão, mas também para obter os respectivos promotores e futura identificação das sequências reguladoras, para delinear trabalhos de estudo de sobreexpressão ou repressão da expressão dos genes da GS.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTURA

Material vegetal

Os tubérculos de *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée foram mantidos a 4 °C na obscuridade até à sua utilização. Antes de serem usados foram colocados na obscuridade à temperatura ambiente a pré-abrolhar. O tecido caloso foi obtido a partir de uma cultura de tecido caloso derivado de explantes foliares (61).

Para o estudo da GS em plantas não submetidas a situações de stresse, as plantas de *S. tuberosum* L. cv. Désirée foram crescidas a partir de tubérculos em vasos com uma mistura de terra ou terra e vermiculite, ao ar livre ou em estufa com fotoperíodo de 12 a 16 horas de luz e regadas com uma solução diluída de adubo comercial (Substral) ou água. Cinco semanas após a emergência foram colhidas amostras de pelo menos 3 plantas dos seguintes órgãos: raízes, brolhos, tubérculos em crescimento, caules e folhas. Foram colhidas amostras foliares da segunda, quarta, sexta e nona folhas a contar do ápice caulinar.

Para o estudo da GS em plantas submetidas a secura e a 250 mM de NaCl, os tubérculos de *S. tuberosum* L. cv. Désirée em abrolhamento foram colocados em semeadeiras de barro com uma mistura de terra de jardim. Permitiu-se o crescimento em estufa durante 3 semanas com um regime de 12 a 16 horas de luz diárias. Durante este período de tempo regou-se com água destilada. No início da terceira semana suprimiu-se a rega ao lote de plantas sujeitas a secura e iniciou-se a rega do lote destinado ao stresse salino com uma solução de NaCl 250 mM, intercalando a primeira rega com água destilada. O lote de plantas controlo foi regado sempre com água destilada. No final de 2 semanas de tratamento foram colhidas amostras de pelo menos 3 plantas de cada lote dos seguintes órgãos: quarta folha, raízes e tubérculos em crescimento.

Para o estudo da GS em plantas sujeitas a concentrações diferentes de NaCl (100 e 200 mM), os tubérculos de *S. tuberosum* L. cv. Désirée em abrolhamento foram colocados em semeadeiras de barro com uma mistura de terra de jardim, numa estufa de vidro. As regas com as soluções salinizadas iniciaram-se 3 dias após emergência e cessaram 3 semanas depois desta data. O lote de plantas controlo foi regado sempre com água destilada. No final do tratamento procedeu-se à colheita de amostras de pelo menos 3 plantas de cada lote dos seguintes órgãos: quarta folha e tubérculos em crescimento.

Em todos os estudos realizados, as amostras foram congeladas em azoto líquido no acto da colheita e conservadas a –80 °C até serem processadas. O processamento inicial destas amostras foi comum para qualquer método a ser descrito neste capítulo e consistiu na homo-

geneização do total de amostras colhidas a pó com o auxílio de azoto líquido. Sem descongelar, o pó foi guardado em tubos cónicos de 15 mL e conservado a –80 °C. Sempre que necessário, o tubo foi colocado num recipiente com azoto líquido e, com o auxílio de uma espátula previamente flamejada e arrefecida em azoto líquido, retirou-se a quantidade de pó necessária ao procedimento experimental a executar. Deste modo assegurou-se a presença de, pelo menos, 3 amostras no ensaio executado.

Estirpes bacterianas

Foram utilizadas as seguintes estirpes bacterianas de *Escherichia coli*: LE392; Y1090; XL1-Blue, JM109, DH5α e SOLR cujas características são descritas no apêndice.

Vectores

Utilizaram-se os seguintes vectores: pBluescriptSK(+), pGEMZ11f(+), λgt11 e λZAPII. As características de cada vector e os locais de restrição estão descritos no apêndice.

DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DA BIBLIOTECA FÁGICA DE cDNA

Preparou-se um riscado de *E. coli* da estirpe apropriada numa caixa de L-agar e incubou-se durante a noite a 37 °C. Inocularam-se 10 mL de LB, suplementado com maltose 0,2% (p/v) e $MgSO_4$ 100 mM, com uma colónia isolada a partir do riscado e permitiu-se o crescimento bacteriano durante a noite a 37 °C com agitação constante.

Foram utilizados 100 µL desta cultura para inocular 10 mL de LB suplementado nas mesmas condições e deixou-se crescer a nova cultura a 37 °C com agitação até a $DO_{600\ nm}$ atingir valores 0,5 – 0,7. Fizeram-se diluições seriadas das bibliotecas (10^{-2} a 10^{-6}) em tampão de fago.

Em tubos cónicos de 15 mL estéreis adicionaram-se 200 µL de cultura bacteriana a 50 µL de cada diluição da biblioteca; incubou-se a 37 °C com agitação durante 20 minutos para promover a infecção das bactérias. Findo este tempo adicionaram-se 3 mL de Top-agarose pré-aquecida a 48 °C à suspensão de células, misturou-se no vortex e verteu-se sobre uma caixa de L-agar, pré-aquecida a 37 °C, de forma a ficar uma camada uniforme. Passados 10 minutos à temperatura ambiente procedeu-se à incubação das caixas invertidas a 37 °C até as placas fágicas atingirem um diâmetro aproximado de 0,25 mm.

O título das bibliotecas de cDNA (em Unidades Formadoras de Placas/mL – pfu/mL) foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{pfu/mL} = \frac{\text{número de placas X diluição}}{0{,}05 \text{ mL}}$$

PREPARAÇÃO DE SONDAS DE DNA MARCADAS COM ^{32}P-dCTP

Marcação

Foram utilizados "kits" para marcar as sondas com ^{32}P-dCTP. Um dos "kits" utilizado foi o "Multiprime DNA Labelling System" (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Para tal, dissolveu-se o DNA a ser marcado para uma concentração final de 2 a 25 µg/mL em água destilada estéril, num volume final de 31 µL. Ferveu-se durante 3 minutos e colocou-se imediatamente em gelo. Adicionaram-se 10 µL de tampão de marcação, 5 µL de oligonucleótido iniciador/BSA, 2 µL de ^{32}P-dCTP (10 µCi/mL) e 2 µL de enzima Klenow (1 U/mL). Misturou-se suavemente, centrifugou-se durante alguns segundos e incubou-se a 37 °C durante 1 hora dentro de um recipiente de chumbo. Para fazer a marcação do DNA em gel derreteu-se a agarose num banho a 65 °C durante 10 minutos e diluiu-se em água estéril de modo a obter aproximadamente 100 ng de DNA num volume final de 31 µL. Procedeu-se como descrito anteriormente. No final da reacção ferveu-se durante 3 minutos e procedeu-se à filtração da sonda.

A marcação da sonda com o "*redi*prime DNA labelling System" (Amersham Pharmacia Biotech, UK) foi realizada da seguinte forma: preparou-se o DNA a ser marcado para uma concentração final de 2,5 a 20 ng em 25 µL de água esterilizada; desnaturou-se por fervura durante 5 minutos e adicionou-se à mistura de marcação; adicionaram-se 5 µL de ^{32}P-dCTP (10 µCi/mL) e 3 µL de água estéril. Incubou-se a 37 °C durante 10 minutos dentro de um recipiente de chumbo. No final da reacção adicionaram-se 5 µL de EDTA 0,2M para parar a reacção. Procedeu-se à filtração da sonda.

Filtração

A filtração da sonda teve por objectivo eliminar nucleótidos radioactivos não incorporados durante a reacção de marcação. Este procedimento foi feito numa seringa de 1 mL, adaptada a um tubo cónico de 50 mL através de um furo na tampa, cheia de Sephadex G-50, previamente lavada com TNE/SDS 0,1% (p/v). À seringa adicionou-se a sonda fervida (50 µL), 50

μL de TE com azul de bromofenol e 100 μL de TNE. Centrifugou-se a 1800 rpm numa centrífuga "SIGMA 302" durante 3 minutos. A sonda foi recolhida para um tubo de 1,5 mL estéril durante a centrifugação (173).

PLAQUEAMENTO E RATREIO DA BIBLIOTECA COM SONDA DE DNA MARCADA COM ^{32}P-dCTP

O plaqueamento da biblioteca construída no vector λgt11 foi feito de um modo semelhante à determinação do título (figura II.1).

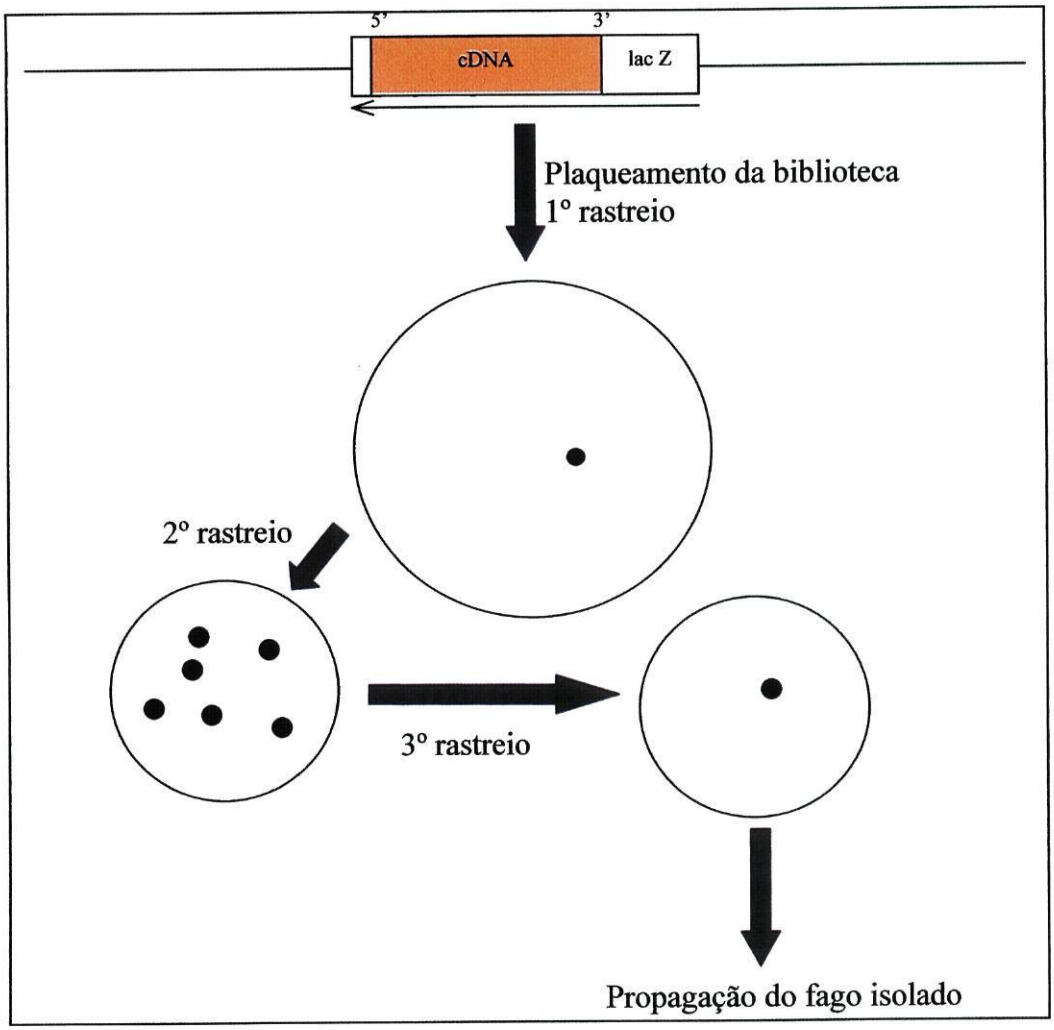


Figura II.1: Diagrama esquemático ilustrativo do rastreio das bibliotecas de cDNA.

Primeiro rastreio:

A 800 µL de cultura bacteriana ($DO_{600\,nm}$ = 0,5 a 0,7) adicionaram-se 100 µL de tampão de fago contendo 10^5 pfu. Misturou-se esta mistura a 37 °C com agitação constante. Após 20 minutos de incubação adicionaram-se 7,5 mL de Top-agarose pré-aquecida a 48 °C, misturou-se com um vortex e verteu-se de modo a formar uma camada uniforme sobre uma caixa de L-agar de 135 mm previamente aquecida a 37 °C. Passados 10 minutos à temperatura ambiente as caixas foram a incubar numa estufa a 37 °C invertidas até observação de lise. As caixas foram então colocadas a 4 °C pelo menos durante 30 minutos antes de serem utilizadas na transferência das placas fágicas para uma membrana de nylon ("QUIABRANE" – QUIAGEN, Alemanha). Para tal, e sem aprisionar bolhas de ar, colocou-se a membrana sobre a superfície da Top-agarose; para cada caixa do primeiro rastreio utilizaram-se duas membranas, tendo o cuidado de prolongar a permanência da segunda para assegurar a passagem das placas fágicas para a membrana. Marcou-se a caixa e as membranas em vários pontos assimétricos para uma futura localização das placas fágicas positivas. Removeu-se a membrana e deixou-se secar durante 10 minutos sobre papel Whatman 3 MM com o lado com as placas voltado para cima. De seguida procedeu-se à desnaturação do DNA presente nas membranas por incubação destas sobre um papel Whatman 3 MM embebido em solução de desnaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) durante 5 minutos. A neutralização foi feita colocando a membrana, duas vezes durante 5 minutos, em papel Whatman 3 MM embebido em solução de neutralização (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH=8,0). No final lavou-se brevemente a membrana em SSC 3x e fixou-se o DNA à membrana a 80 °C durante 2 horas.

A pré-hibridação foi feita durante 30 minutos a uma noite numa solução de pré-hibridação contendo 7% (p/v) de SDS; EDTA 1 mM e $NaHPO_4$ 0,5 M pH = 7,2; a solução "stock" de $NaHPO_4$ 1 M pH = 7,2 contem 134 g de $Na_2HPO_4.7H_2O$ e 4 mL de H_3PO_4, por litro (36). Fez-se a marcação da sonda com ^{32}P-dCTP e esta, depois de filtrada e desnaturada por fervura, foi adicionada à solução de pré-hibridação. A hibridação foi feita durante a noite a 42 °C. As membranas foram lavadas brevemente numa solução de lavagem 1 (SSC 1x, SDS 0,05% (p/v)), que foi imediatamente desprezada e substituída, e posteriormente numa solução de lavagem 2 (SSC 2x, SDS 0,01% (p/v)). Os tempos e as temperaturas de lavagem dependeram da intensidade do sinal detectado nas membranas. Depois de escorridas, as membranas foram envolvidas, ainda húmidas, em película aderente e expostas a filme de autorradiografia (raios-X) (AGFA) a –70 °C durante 3 a 5 dias.

Segundo e terceiro rastreios:

Após identificação das placas positivas, removeu-se uma porção de agar com uma área suficiente para as abranger, com uma ponta de plástico cortada na extremidade estéril. Os fagos foram eluídos colocando a porção de agar contendo as placas fágicas em 500 µl de tampão de fago durante 2 a 4 horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C e foram plaqueados de novo em densidades menores (3000 pfu – segundo rastreio; 200 a 500 pfu – terceiro rastreio) em caixas de petri com L-agar de 82 mm. O restante procedimento foi idêntico ao primeiro rastreio com a excepção de não terem sido utilizadas duas membranas por caixa.

O fago purificado no terceiro rastreio foi retirado e eluído em 500 µL de tampão de fago, contendo uma gota de clorofórmio, durante a noite a 4 °C. Posteriormente fez-se a determinação do título.

PREPARAÇÃO DE LISADOS DE FAGO

Num tubo cónico de 15 mL inocularam-se 200 µL de uma cultura bacteriana de *E. coli* da estirpe apropriada crescida durante a noite com 50 µL de eluato de fago. Depois de uma incubação de 20 minutos a 37 °C com agitação, adicionou-se Top-agarose aquecida a 48 °C e misturou-se no vortex. Esta suspensão foi depois vertida homogeneamente numa caixa de L-agar previamente aquecida a 37 °C. Depois de 10 minutos à temperatura ambiente, as caixas foram a incubar invertidas numa estufa a 37 °C até observação de confluência das placas fágicas.

Com uma lâmina de bisturi nova e estéril retirou-se a Top-agarose para um tubo cónico de 15 mL, também estéril, ao qual se adicionou 5 mL de tampão de fago e 100 µL de clorofórmio. Agitou-se o tubo a 37 °C durante 30 minutos e centrifugou-se numa centrífuga SIGMA 302 durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado por filtros 0,45 µm e guardado a 4°C. Posteriormente fez-se a determinação do título.

EXTRACÇÃO DO DNA DE FAGO LAMBDA

As extracções e purificações do DNA de fago lambda isolado foram efectuadas com o "Wizard Lambda Preps DNA Purification System" (Promega, EUA). Para remover os ácidos

nucleicos provenientes das bactérias lisadas, transferiram-se 10 mL de lisado de fago para um tubo de vidro corex esterilizado, adicionaram-se 40 µL da mistura de nucleases e incubou-se a 37 °C durante 15 minutos. Adicionaram-se 4 mL da solução de precipitação de fagos e incubou-se em gelo durante 30 minutos. Centrifugou-se a 10000 xg durante 10 minutos e desprezou-se o sobrenadante; o sobrenadante que ficou retido na boca do tubo foi removido com o auxílio de papel absorvente. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL de tampão de fago. Adicionou-se proteinase K para uma concentração final de 0,5 mg/mL e incubou-se a 37 °C durante 5 minutos. A solução foi transferida para um tubo de 1,5 mL estéril e centrifugada a 12000 xg durante 10 segundos para remover partículas insolúveis. O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril ao qual se adicionou 1 mL de resina de purificação. A purificação do DNA foi feita em colunas do "kit". Pipetou-se a mistura lisado/resina para uma seringa estéril adaptada à coluna. Fez-se passar a mistura pela coluna, pipetaram-se 2 mL de isopropanol 80% para a seringa e desta para a coluna. A coluna foi depois adaptada a um tubo estéril e centrifugada a 12000 xg para secar a resina. Transferiu-se a coluna para um novo tubo estéril, aplicaram-se 100 µL de água estéril aquecida a 80 °C à coluna e centrifugou-se a 12000 xg para eluir o DNA; este foi quantificado e conservado a –20 °C.

EXCISÃO DO FRAGMENTO DE INSERÇÃO DO GENOMA DE FAGO

A excisão do cDNA presente no genoma do fago isolado após o rastreio da biblioteca construída no vector λgt11 foi feita por duas restrições consecutivas de 1 hora com as enzimas *Sfi*I e *Not*I (Life Technologies, EUA) de acordo com a seguinte tabela:

Restrição 1	*µL*	*Restrição 2*	*µL*
DNA	= 2 µg	NaCl 5M	0,5
Tampão 2 (10x)	2	Tampão 2 (10x)	0,5
*Sfi*I (10 U/µL)	0,5	*Not*I (10 U/µL)	0,5
H_2O	Até 20 µL	H_2O	3,8

No final da restrição incubou-se a 65 °C durante 15 minutos para inactivar a enzima *Not*I (a enzima *Sfi*I é resistente à inactivação pelo calor) e para separar as extremidades coesivas do DNA; aplicou-se o volume de restrição por completo num gel de 50 mL de agarose (Life Technologies) 1% (p/v) contendo 0,5 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL), em tampão TAE

1x. A corrida durou 2 a 3 horas a 60 V no mesmo tampão. Foi utilizado o "Sigma T-6281 Gel Tray 7,5 x 10 cm" (Sigma, EUA) para efectuar a separação electroforética dos produtos de restrição. No final da corrida o gel foi visualizado com radiação ultravioleta e a banda correspondente ao fragmento de restrição foi cortada do gel com uma lâmina de bisturi nova e colocada num tubo de 1,5 mL estéril para posterior purificação do DNA.

EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DO GEL

Para extrair o DNA das bandas cortadas do gel foi utilizado o "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN - Alemanha). Depois de determinado o peso das bandas, acrescentaram-se 3 volumes de tampão QX1 (100 mg = 100 µL) ao tubo para 1 volume de gel. Adicionou-se QIAEX II de acordo com a quantidade de DNA visualizada no gel e as instruções do fabricante. Para dissolver o gel incubou-se a 50 °C durante 10 minutos com inversões periódicas do tubo. No final deste tempo centrifugou-se à velocidade máxima durante 30 segundos numa centrifuga "eppendorf *centrifuge* 5411". Desprezou-se o sobrenadante e adicionaram-se 500 µL de tampão QX1 para eliminar restos de agarose. O sedimento foi ressuspenso com o auxílio do vortex e repetiu-se a centrifugação. Depois de eliminado por completo o sobrenadante repetiu-se o procedimento duas vezes com tampão PE. Centrifugou-se novamente e secou-se o sedimento que depois foi ressuspenso em 20 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH = 8,0; EDTA 1 mM) estéril com o auxílio do vortex. Centrifugou-se durante 30 segundos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril. Quantificou-se o DNA e guardou-se a -20 °C.

AMPLIFICAÇÃO DOS cDNAs POR PCR

Os clones foram amplificados por PCR com iniciadores específicos para os vectores fágicos usados. Deste modo, para o vector λgt11 usou-se como iniciador 5' um oligonucleótido com a sequência: 5'-GGT GGC GAC GAC TCC TGG AGC C-3' e para o iniciador 3' a sequência: 5'-GAC ACC AGA CCA CTG GTA ATG-3'. O lisado de fago foi congelado e descongelado três vezes para desnaturar o invólucro fágico. A amplificação foi feita num volume final de 50 µL constituído por: 2 µL de lisado, 5 µL de 10x tampão de PCR (Life Technologies, EUA), 0,1 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP e dCTP) (Amersham Pharmacia Biotech, EUA), 0,1 µM de cada iniciador, 0,25 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/µL) (Life Technologies, EUA) sendo o volume completado com água destilada e desionizada estéril. As condi-

ções de reacção foram as seguintes: desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, emparelhamento a 60 °C durante 30 segundos e polimerização a 72 °C durante 2 minutos. Estes passos repetiram-se por um total de 35 ciclos e foram seguidos por um passo final a 72 °C durante 5 minutos. As amplificações foram feitas num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA".

Para o vector λZAPII usou-se como iniciador 5' um oligonucleótido com a sequência: 5'-CGC CAA GCT CGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3' e como iniciador 3' um oligonucleótido com a sequência 5'-CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC T-3'. A amplificação foi feita num volume final de 50 µL composto por: 2 µL de lisado de fago, 5 µL de 10x tampão para PCR (Life Technologies, EUA), dNTPs (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) na concentração final de 0,1 µM, 0,1 µM de cada iniciador, 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL) (Life Technologies, EUA) e água destilada e desionizada estéril até completar o volume. A amplificação iniciou-se com um passo de desnaturação a 94 °C durante 3 minutos, após o qual foi adicionada a enzima, seguiram-se 35 ciclos de: desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, emparelhamento e polimerização a 68 °C durante 3 minutos. No final prolongou-se o último passo por mais 3 minutos. As amplificações foram feitas num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA".

Os produtos de PCR foram analisados num gel de 50 mL de agarose (Life Technologies, EUA) a 0,8% (p/v) contendo 1 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL), em tampão TAE 1x. A corrida durou 1 a 2 horas a 60 V no mesmo tampão. Foi utilizado o equipamento da "Sigma T-6281 Gel Tray 7,5 x 10 cm" (Sigma - EUA).

EXCISÃO *in vivo* DO FAGUEMÍDIO PSK CONTENDO O cDNA DE INTERESSE DO VECTOR FÁGICO λZAPII

Foi utilizado o sistema "ExAssist/SOLR" (Stratagene, EUA). Este sistema foi desenhado para permitir uma excisão eficiente do faguemídio circular do vector fágico λZAPII, eliminando problemas com a co-infecção pelo fago auxiliar. Este fago auxiliar contém uma mutação que evita a replicação do seu genoma numa estirpe de *E. coli* não supressora. Isto permite que apenas o faguemídio excisado replique no hospedeiro, eliminando a possibilidade de ocorrer co-infecção por parte do fago auxiliar.

A partir de culturas de riscado das estirpes de *E. coli* XL1 MRF' e SOLR utilizou-se uma colónia isolada para inocular 10 mL de LB. Permitiu-se o crescimento bacteriano de ambas as culturas durante a noite a 30 °C com agitação.

No dia seguinte diluíram-se as culturas bacterianas 1:100 num volume final de 50 mL de meio LB. Permitiu-se o crescimento bacteriano até a densidade óptica a 600 nm ($DO_{600\ nm}$) atingir valores de 0,2 a 0,5. A cultura de XL1 foi centrifugada a 1500 xg durante 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspendido para uma $DO_{600\ nm} = 1,0$; a cultura bacteriana da estirpe SOLR continuou a crescer até ser obtida uma DO de 0,5 a 1,0. Após ter sido atingido o valor aproximado de 1,0 manteve-se o crescimento à temperatura ambiente.

Enquanto a estirpe bacteriana SOLR incubava, num tubo cónico de 50 mL misturou-se: 200 µL de cultura XL1 (DO = 1,0); 250 µL de lisado de fago (com mais de 1×10^5 partículas fágicas) e 1 µL do fago auxiliar ExAssist (contendo mais de 1×10^6 partículas fágicas). Esta mistura foi incubada a 37 °C durante 15 minutos, após os quais foram adicionados 3 mL de LB, seguindo-se uma incubação de 2 horas a uma noite a 37 °C com agitação constante.

As células foram centrifugadas durante 15 minutos a 2000 xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e aquecido a 70 °C durante 15 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 4000 xg durante 15 minutos. O sobrenadante obtido foi decantado para um tubo estéril e mantido a 4 °C até necessário. Este sobrenadante funcionou como "stock" de fagos.

Para dois tubos de 1,5 mL pipetaram-se 200 µL da cultura da estirpe SOLR a $DO_{600} = 1,0$. A um tubo foram pipetados 100 µL e ao outro pipetaram-se 10 µL do "stock" de fagos. Após incubação a 37 °C durante 15 minutos, plaquearam-se 10 a 50 µL de cada mistura em caixas de L-agar com ampicilina pré-aquecidas a 37 °C. Depois do líquido ter sido absorvido pelo meio de cultura, as caixas foram incubadas a 37 °C durante a noite em posição invertida.

Para manter o faguemídio resultante deste procedimento, inocularam-se 10 mL de meio LB com ampicilina com uma colónia resultante e permitiu-se o crescimento bacteriano durante a noite a 37 °C com agitação. A uma alíquota desta cultura foi adicionado glicerol para uma concentração final de 10 a 15%. Esta alíquota foi guardada a –70 °C e o restante da cultura foi utilizada para fazer a extracção do DNA plasmídico (mini-prep).

SUBCLONAGEM DO cDNA EXCISADO DO VECTOR λgt11 EM FAGUEMÍDIO pGEMZ11f (+)

Para a clonagem do fragmento isolado com as enzimas *Sfi*I e *Not*I procedeu-se à digestão de 3 µL deste vector (1 µg/µL) como descrito anteriormente para o DNA fágico. Determinaram-se as concentrações de vector e fragmento de DNA a utilizar de modo a que a razão molar do vector para o fragmento fosse de 1:3, num volume final de 10 a 20 µL:

$$\frac{\text{Quantidade do vector (µg)}}{\text{tamanho do vector (kb)}} = \frac{3 \text{ x quantidade de DNA (µg)}}{\text{tamanho do DNA (kb)}}$$

Num tubo misturaram-se x µL de DNA a ser ligado, y µL de vector cortado com as mesma enzimas que o fragmento de inserção, 1/5 do volume final de reacção de tampão de ligase 5x (Life Technologies - EUA), 2,5 U de T4 DNA ligase e água destilada estéril até completar o volume.

A reacção de ligação foi realizada à temperatura de 14 a 16 °C durante a noite. No final da reacção foi feita uma desnaturação da enzima a 65 °C durante 15 minutos e guardou-se a mistura de ligação a 4 °C (ou em gelo) até ser feita a transformação das células competentes JM109.

PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES XLI-Blue/DH5α

A preparação das células competentes iniciou-se com um riscado de *E. coli* em caixa de L-agar simples durante a noite a 37 °C. Desse riscado retirou-se uma colónia isolada para inocular 10 mL de meio líquido LB. Permitiu-se o crescimento durante a noite a 37 °C com agitação. No dia seguinte inocularam-se 400 mL de LB e incubou-se a 37 °C com agitação até a $DO_{600\ nm}$ da cultura atingir o valor 0,6. Colocou-se a cultura em gelo, dividiu-se em alíquotas e centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 minutos numa centrífuga SIGMA 302. Os sedimentos foram ressuspensos em 100 mL de uma solução fria composta por: KC_3COO 30 mM, $MnCl_2$ 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM, KCl 100 mM e 15% glicerol, preparada de fresco e esterilizada por filtração. A suspensão foi centrifugada durante 8 minutos a 4000 rpm e as bactérias foram ressuspensas em 20 mL de solução fria composta por: NaMops 10 mM, pH=7,0, $CaCl_2$ 75 mM,

KCl 10 mM e 15% glicerol, preparada de fresco e esterilizada por filtração, e congeladas e mantidas a -70 °C em alíquotas de 500 µL.

PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES JM109

Para seleccionar a presença do episssoma F', necessário para a produção de cor, fez-se um riscado de *E. coli* JM109 (Promega - EUA) numa placa de meio M9 suplementado com Tiamina-HCl e incubou-se durante a noite a 37 °C. No dia seguinte inocularam-se 25 mL de meio LB com uma colónia individualizada e incubou-se a 30 °C durante a noite com agitação. Utilizaram-se 5 mL desta cultura para iniciar uma cultura de 500 mL de LB incubada a 30 °C até a $DO_{600\ nm}$ da cultura atingir valores compreendidos entre 0,45 a 0,55. A cultura foi arrefecida em gelo durante 2 horas e repartida por alíquotas para ser centrifugada a 2500 xg durante 15 a 20 minutos. As células foram inicialmente ressuspensas em 10 a 20 mL de tampão de trituração, previamente arrefecido ($CaCl_2$ 100 mM, $MgCl_2$ 70 mM e acetato de sódio 40 mM, pH=5,5), preparado antes do uso e esterilizado por filtração, e depois diluídas em 500 mL da mesma solução. Depois de 45 minutos de incubação em gelo, procedeu-se a uma centrifugação a 1800 xg durante 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 50 mL de tampão de trituração pré-arrefecido. À suspensão de células adicionou-se, gota a gota, glicerol esterilizado para uma concentração final de 15%. Dividiram-se os 50 mL da suspensão em alíquotas de 500 µL e congelaram-se e guardaram-se a -70 °C.

TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES

Descongelaram-se as células competentes em gelo e alíquotas de 100 µL destas células foram preparadas em tubos de 1,5 mL estéreis e mantidas em gelo. Adicionaram-se 1,7 µL de β-mercaptoetanol (diluído 1:10) e mantiveram-se as células em gelo durante 2 minutos; adicionando-se, depois, 10 µL da reacção de ligação. Após um período de 30 minutos em gelo, deu-se um choque térmico a 42 °C durante 45 segundos às células para permitir a entrada do faguemídio. Colocou-se de novo as células em gelo por mais 2 minutos. Adicionaram-se 900 µL de meio LB e incubou-se a 37 °C durante 1 hora com agitação. Espalharam-se amostras de 100 a 200 µL em caixas de L-agar (com ampicilina, IPTG e X-gal - apêndice) e incubou-se

durante a noite a 37 °C. Guardaram-se as placas a 4 °C até ser feito o isolamento e crescimento de recombinantes em meio de cultura líquido.

ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DOS RECOMBINANTES

Removeram-se colónias recombinantes isoladas e colocaram-se em 10 mL de meio LB com ampicilina (apêndice). Incubou-se durante a noite a 37 °C com agitação. Retirou-se uma alíquota de 1 mL, adicionou-se glicerol esterilizado para uma concentração final de 10 a 15% e congelou-se a -70 °C. Os restante 9 mL foram utilizados para extrair DNA plasmídico (mini-prep).

ISOLAMENTO (mini-preps) DE DNA PLASMÍDICO

Utilizou-se um método modificado de (48). A partir de uma colónia individualizada em caixas de L-agar com ampicilina, foram inoculados 3 a 10 mL de meio LB com ampicilina. A cultura cresceu durante a noite a 37 °C com agitação. À chama, transferiram-se 1,5 mL de cultura para um tubo de 1,5 mL; centrifugou-se a 14000 rpm numa centrífuga "eppendorf *centrifuge* 5411" durante 20 segundos e ressuspendeu-se o sedimento em 200 µL de tampão STET (apêndice). Adicionaram-se 4 µL de lisozima (50 µg/µL) e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. Ferveu-se durante 45 segundos e centrifugou-se à velocidade máxima durante 10 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 200 µL de isopropanol e centrifugou-se durante 10 minutos, lavou-se o sedimento com etanol 70%, centrifugou-se novamente e secou-se o sedimento. Este foi ressuspenso em 40 µL de água destilada e desionizada estéril e o DNA quantificado em gel.

ISOLAMENTO (midi-preps) DE DNA PLASMÍDICO

A partir de uma colónia individualizada de um riscado feito em caixa de L-agar com ampicilina, originado a partir das células transformadas e congeladas a -70 °C, foram inoculados 100 mL de meio LB com ampicilina, e incubados a 37 °C com agitação durante a noite. A cultura foi centrifugada a 4000 rpm numa centrífuga "SIGMA 302".

Para extrair o DNA plasmídico utilizou-se o "kit" da QIAGEN (Alemanha) "Plasmid Midi Kit". Para tal, o sedimento foi ressuspenso em 4 mL de tampão P2 seguido de uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi submetida a uma centrifugação de 30000 xg durante 30 minutos a 4 °C. Enquanto decorria a centrifugação, equilibrou-se uma coluna com 4 mL de tampão QBT. Finda a centrifugação aplicou-se de imediato o sobrenadante à coluna e deixou-se eluir. Após terminada a eluição, lavou-se a coluna duas vezes com 10 mL de tampão QC. O DNA foi eluído com 5 mL de tampão QF e precipitado com 0,7 volumes de isopropanol. Centrifugou-se a 15000 xg durante 30 minutos a 4 °C e o sedimento (DNA) foi lavado com etanol 70% pré-arrefecido. Depois de seco, ressuspendeu-se em 50 µL de água e quantificou-se.

DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DO FRAGMENTO DE INSERÇÃO APÓS SUBCLONAGEM EM FAGUEMÍDIO/EXCISÃO *IN VIVO*

3 µg do DNA extraído por mini-prep ou por midi-prep foram submetidos à análise de restrição de acordo com a seguinte tabela:

Nome do clone	Proveniência	Clonado em	Vector	Excisado com
14A1.2 *	lambda gt11	*Sfi*I - *Not*I	pGEMZ11f(+)	*Sfi*I – *Not*I ou *Eco*RI - *Not*I
C1A1A	lambda gt11	*Sfi*I - *Not*I	pGEMZ11f(+)	*Sfi*I – *Not*I ou *Eco*RI - *Not*I
T5F8.1A	lambda ZAPII	*Eco*RI - *Xho*I	PSK	*Eco*RI – *Kpn*I **

* - plasmídio obtido em trabalhos anteriores (154, 190)

** - ou outras enzimas a flanquear os locais *Eco*RI e *Xho*I

As restrições decorreram durante pelo menos uma hora a 37 °C. No final da incubação inactivaram-se as enzimas por incubação a 65 °C durante 15 minutos e os tubos foram guardados em gelo ou a –20 °C até serem processados.

Os produtos de restrição foram analisados num gel de 25 mL de agarose (Life Technologies, EUA) a 0,8% (p/v) contendo 0,5 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL), em tampão TAE 1x. A corrida durou 1 a 2 horas a 70 - 80 V em tampão TAE 1x. Foi utilizado o equipamento "Horizon® 58 – Horizontal Gel Electrophoresis System" (Life Technologies - EUA).

SEQUENCIAÇÃO DE DNA EM CADEIA DUPLA

Os DNAs plasmídicos que apresentaram o fragmento de inserção foram utilizados para a sequenciação. A sequenciação de DNA foi feita pelo método de Sanger no qual a terminação de cadeias é mediada pela incorporação de dideoxinucleótidos. Para determinar as sequências dos diferentes cDNAs da GS recorreu-se a várias metodologias:

I - Sequenciação com o "kit" "T7 Sequencing Kit" (Amersham Pharmacia Biotech - EUA)

Foram abordadas as técnicas seguintes:

a) *neutralização com acetato de sódio*: para a desnaturação do DNA prepararam-se 2 a 3 µg de DNA plasmídico em 32 µL de água destilada estéril. A esse volume adicionaram-se 8 µL de NaOH 2 M e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Adicionaram-se 7 µL de acetato de sódio 3 M, pH=5,2 e 4 µL de água destilada estéril. Acrescentaram-se 12 µL de etanol absoluto e deixou-se a -70 °C durante 15 minutos. Centrifugou-se à velocidade máxima durante 15 minutos e lavou-se o sedimento com etanol 70%. Centrifugou-se de novo durante 10 minutos e ressuspendeu-se em 10 µL de água destilada estéril. O emparelhamento foi feito com uma concentração de iniciadores na ordem dos 2,5 a 5 mM. Utilizou-se o oligonucleótido iniciador "universal" (M13) com a sequência 5'-d[GTA AAC GAC GGC CAG T]-3' e o iniciador "reverso" (M13) com a sequência 5'-d[AAC AGC TAT GAC CAT G]-3'.

Adicionou-se o iniciador e 2 µL do tampão de emparelhamento e incubou-se a 65 °C durante 5 minutos e depois a 37 °C durante 10 minutos. Passou-se para a temperatura ambiente por mais 5 minutos e procedeu-se à marcação.

Ao tubo com a mistura de emparelhamento adicionou-se 3 µL de mistura de marcação, 0,5 µL de ^{35}S-dATP (10 µCi/mL) (Amersham Pharmacia Biotech - EUA) e 2 µL de T7 DNA Polimerase diluída para 1,5 U/µL em tampão de diluição. Esta mistura foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. 4,5 µL desta mistura foram transferidos para tubos com 2,5 µL de cada solução "mix-short" para cada ddNTP. Incubou-se a 37 °C durante 5 minutos e adicionou-se 5 µL da solução "Stop". Aqueceu-se a 75-80 °C durante 2 minutos e colocaram-se as amostras em gelo até carregar o gel.

b) *desnaturação e emparelhamento por "quick annealing"*: A 8 µL de água destilada estéril com 1 a 2 µg de DNA adicionaram-se o iniciador e 1,5 µL de NaOH 1 M. Esta mistura foi incubada a 65 °C durante 5 minutos. Passou-se para 37 °C e adicionou-se 1,5 µL de HCl 1 M e 2 µl de tampão de emparelhamento; incubou-se 10 minutos a esta tempera-

tura e mais 5 minutos à temperatura ambiente. Passou-se à marcação como descrito anteriormente.

c) *neutralização com TMDN*: Num tubo estéril juntaram-se 7 µL de DNA (com 1 a 2 µg de DNA), o iniciador e 1 µL de NaOH 1 M. Esta mistura foi a incubar durante 10 minutos a 68 °C. Em gelo adicionou-se 4 µL de TMDN (Tes-ácido livre 0,28 M, HCl 1,2 M, DTT 0,05 M, $MgCl_2$ 0,08 M e NaCl 0,2 M) e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. Passou-se à marcação como descrito anteriormente.

Para a corrida de sequenciação foram utilizados geles de sequenciação de 0,4 mm de espessura, preparados no laboratório numa solução esterilizada por filtração composta por 25,2 g de ureia, 7,2 mL de TBE 10x, 6 mL de acrilamida "Long Ranger Gel Solution" (AT Biochem - EUA), água destilada até 60 mL, 400 µL de APS 10% (p/v) e 40 µL de TEMED. Os geles foram montados de acordo com (45) ou da seguinte forma: depois de limpos os dois vidros com álcool e silanizado o vidro mais pequeno, alinharam-se os dois vidros e os espaçadores; este conjunto foi colocado numa posição horizontal com o vidro pequeno por cima e virado com a face silanizada voltada para o gel. Com o auxílio de uma bisnaga ou seringa aplicou-se a solução do gel pela parte superior do vidro pequeno, tendo o cuidado de fazer constantemente movimentos horizontais de modo que a solução do gel se deslocasse entre os vidros numa frente mais ou menos uniforme. Esta solução desloca-se por capilaridade até à extremidade oposta dos vidros. Depois de ter começado a sair solução pelo outro lado do conjunto, aplicaram-se as molas, os pentes na posição invertida (para criar uma superfície plana na altura de carregar o gel com as amostras) e taparam-se as extremidades com película aderente. Depois de polimerizado o gel foi guardado em câmara fria para ser usado no dia seguinte ou foi usado de imediato. Carregaram-se 3,5 µL de reacção de sequenciação por poço. Aplicou-se uma potência constante de 60 W em tampão TBE 0,6x. Utilizou-se a unidade "Sequencing Gel Electrophoresis System" modelo S2 da BRL (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc., EUA). Depois da corrida aderiu-se o gel a uma folha de papel 3MM, cobriu-se com película aderente e secou-se o gel no vácuo no "DrygelSr. - Slab Gel Dryer - Model SE 1160" (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, EUA) ou a 80 °C e expôs-se à temperatura ambiente durante 1 a 5 dias sem o uso de ecrãs intensificadores.

Também foi usado o sistema "CastAway Precast Sequencing System" (Stratagene, EUA) em que os geles de sequenciação já se apresentam prontos a utilizar. Carregaram-se 3,5 µL da reacção de sequenciação em cada poço e a corrida foi feita à potência constante de 40 W em tampão TBE 1x. Depois de terminada a corrida, o gel foi fixado em solução de fixação (metanol 5%, ácido acético 5% (p/v)) durante 10 minutos, lavado em água destilada durante

10 minutos, seco no secador de geles fornecido com o sistema e exposto durante 1 a 5 dias à temperatura ambiente.

II - Sequenciação com o "kit" "PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Perkin Elmer Cetus, EUA)

Usaram-se os mesmos iniciadores usados para PCR. Num tubo estéril adicionaram-se 4 µL de reacção terminadora, x µL com 30 a 180 ng de DNA amplificado por PCR e purificado do gel, y µL contendo 3,2 pmole de iniciador e água para um volume final de reacção de 20 µL.

No aparelho de PCR "SANYO DNA Amplifier MIR-D30" correu-se o seguinte programa: 96 °C / 30 segundos; 50 °C / 15 segundos e 60 °C / 4 minutos, em 25 ciclos. Depois de terminada amplificação, os produtos de PCR foram precipitados pela adição de 35 µL de etanol 95% e incubação em gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se à velocidade máxima durante 15 a 30 minutos e secou-se o sedimento.

A sequenciação foi automática feita pelo "ABI 373A DNA Automated Sequencer System" (Perkin Elmer Cetus, EUA).

III - Sequenciação com o "kit" "DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit" (Amersham Pharmacia Biotech, EUA)

Usaram-se os iniciadores T3 e T7. Num tubo de 200 µL estéril adicionaram-se 8 µL da mistura "sequencing reagent premix", x µL com 500 ng de DNA, y µL contendo 5 pmole de um dos iniciadores e água destilada e desionizada estéril para um volume final de 20 µL. As reacções foram feitas no equipamento "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA" com o seguinte programa: 95 °C, 20 segundos, 50 °C, 15 segundos e 60 °C, 1 minuto; 25 a 30 ciclos. No final da reacção transferiu-se o volume total da reacção para um tubo estéril de 1,5 mL e adicionaram-se 2 µL de tampão acetato de sódio/EDTA ("kit"). Adicionaram-se 80 µL de etanol 95% arrefecido, misturou-se com o auxílio do vortex e colocou-se em gelo durante pelo menos 15 minutos para precipitar o DNA. Centrifugou-se durante 15 a 30 minutos à velocidade máxima numa centrífuga "eppendorf centrifuge 5411" e desprezou-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado com 250 a 500 µL de etanol 70% e a centrifugação repetiu-se por 10 a 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ligeiramente seco ao ar. As sequências foram determinadas no "Center for genomics research", Karolinska Institute (Suécia).

EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO

A extracção do DNA genómico foi executada com base no método descrito em (50), com algumas alterações.

Num tubo cónico de 15 mL estéril, aqueceram-se 5 a 7,5 mL de tampão de extracção CTAB (CTAB 3% (p/v); NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM, pH=8,0; β-mercaptoetanol 0,2% (p/v)) a 60 °C. Enquanto o tampão aquecia, moeram-se 0,5 a 1 g de tecido foliar jovem, num almofariz pré-arrefecido, com azoto líquido até se obter um pó fino. Com o auxílio de uma espátula, flamejada e arrefecida em azoto líquido, transferiu-se o pó para o tampão pré-aquecido. Incubou-se a 60 °C durante 30 minutos com inversões suaves e ocasionais.

Após o extracto ter arrefecido para a temperatura ambiente extraiu-se uma vez com uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), por agitação leve, durante um período de tempo prolongado (uma hora ou mais). A fase aquosa foi separada da orgânica por centrifugação a 3000 xg durante 3 minutos. Removeu-se a fase aquosa para um novo tubo cónico estéril e, de acordo com a apresentação do sobrenadante, procedeu-se a nova extracção com a mesma mistura, ou adicionou-se isopropanol até perfazer a capacidade do tubo para precipitar os ácidos nucleicos. O tubo foi invertido suavemente para misturar as soluções e foi colocado em repouso até se formar um novelo de ácidos nucleicos. Este novelo foi transferido para um novo tubo cónico de 15 mL estéril contendo 15 mL de tampão de lavagem (etanol 70%; acetato de amónia 10 mM) com auxílio de uma ponta de pipeta automática com a extremidade cortada ou de uma extremidade de uma pipeta de Pasteur moldada na forma de anzol, previamente flamejada e arrefecida no tampão de lavagem. Os ácidos nucleicos foram submetidos a uma lavagem neste tampão, durante a noite e à temperatura ambiente com agitação muito suave. No dia seguinte eliminou-se a maior parte do tampão de lavagem e adicionou-se novo tampão; lavou-se durante mais 30 a 60 minutos. Recorrendo a uma ponta de extremidade cortada ou a uma extremidade de uma pipeta de Pasteur moldada na forma de anzol, previamente flamejada e arrefecida no tampão de lavagem, removeu-se o novelo para um tubo de 1,5 mL estéril e aplicou-se uma centrifugação suave; o excesso de tampão foi aspirado com o auxílio de uma pipeta tendo o cuidado de não perturbar o sedimento. Depois de seco ao ar ressuspendeu-se o sedimento num volume apropriado de água estéril. O DNA foi quantificado em gel de agarose ou espectrofotometricamente e conservado a 4 °C até futura utilização.

EXTRACÇÃO DE RNA DOS VÁRIOS ORGÃOS DE BATATEIRA

A extracção de RNA total foi feita pelo método Fenol/SDS como descrito em (4), com algumas alterações, ou através do uso de "kits".

A extracção do RNA pelo método Fenol/SDS consistiu numa moagem do tecido, em almofariz estéril previamente arrefecido, com o auxílio de azoto líquido, até ser obtido um pó fino, tendo sempre o cuidado de nunca deixar o tecido descongelar. O pó foi transferido, ainda congelado, para um tubo cónico estéril de 50 mL com o auxílio de uma espátula flamejada e arrefecida em azoto líquido. Deixou-se evaporar o azoto líquido e estimou-se o volume ocupado pelo pó, adicionando-se então dois volumes equivalentes de tampão de extracção (TLE + SDS - apêndice) e dois volumes de fenol (pH=8,0 – (173)). A mistura foi homogeneizada violentamente com o auxílio de um vortex e foi a incubar durante 20 minutos num banho-maria a 50 °C com agitação moderada. Centrifugou-se à velocidade máxima durante 20 minutos numa centrífuga SIGMA 302 e transferiu-se o máximo possível da fase superior para um tubo cónico de 15 mL estéril e mergulhado em gelo. Estimou-se o volume de fase aquosa recuperada e aplicou-se igual volume de fenol (pH=8,0), recorrendo-se ao vortex para misturar as fases. Centrifugou-se durante 10 minutos nas mesmas condições e aproveitou-se a fase aquosa para um novo tubo cónico de 15 mL estéril e mergulhado em gelo. Após estimativa do volume transferido adicionou-se igual volume de clorofórmio para remover vestígios de fenol, que poderiam interferir com os passos seguintes de precipitação dos ácidos nucleicos, e misturou-se no vortex. Após centrifugação nas mesmas condições, a fase aquosa foi transferida para tubos corex estéreis e mergulhados em gelo. Recorrendo a uma pipeta de vidro estéril, determinou-se o volume de sobrenadante recolhido e adicionou-se 1/3 desse volume de Acetato de Sódio 3 M, pH=5,2, e um volume igual de etanol absoluto frio (–20 °C). Esta mistura foi incubada durante a noite a –20 °C ou durante 1 hora a –80 °C. Os ácidos nucleicos foram precipitados por centrifugação a 31000 xg durante 30 minutos a 4 °C. O sedimento obtido foi lavado com etanol 70% arrefecido (–20 °C) e a centrifugação repetida nas mesmas condições durante 15 minutos. Sem deixar secar ressuspendeu-se o sedimento em 250 a 500 µL de água destilada e desionizada estéril e transferiu-se para um tubo de 1,5 mL estéril mergulhado em gelo. Para precipitar o RNA adicionou-se 1/3 do volume de ressuspensão de LiCl 8 M para uma concentração final de 2 M e incubou-se durante a noite a 4 °C (preferencialmente) ou em gelo a –20 °C durante 3 horas e centrifugou-se durante 30 minutos à velocidade máxima a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspenso em água (até 150 µL máximo) e adicionou-se 1/10 do volume de NaCl 5 M e dois volumes de etanol absoluto frio (–20 °C). Incubou-se durante a

noite a –20 °C ou a –80 °C durante 1 hora. O RNA foi precipitado por centrifugação à velocidade máxima a 4 °C durante 30 minutos. O sedimento obtido foi lavado com etanol 70% arrefecido (–20 °C) com agitações suaves do tubo e a centrifugação repetida nas mesmas condições durante 15 minutos. O etanol foi eliminado por decantação e os tubos foram centrifugados brevemente para recolher no fundo o etanol não eliminado, sendo eliminado agora por aspiração com uma pipeta. Os tubos foram colocados destapados em gelo durante uns instantes para secar o sedimento, o qual foi ressuspenso num volume inicial de 50 µL de água destilada e desionizada estéril com o auxílio do vortex. Foram adicionados incrementos de 10 µL de água até ter sido obtida a completa dissolução do sedimento. Fizeram-se diluições de 1:250 em água e determinou-se a concentração do RNA. O RNA foi guardado a –80 °C até à sua utilização.

Foram utilizados "kits" para extrair o RNA total dos diferentes órgãos de batateira. Para extrair o RNA total com o "kit" "RNeasy Plant Mini kit" (QIAGEN – Alemanha) transferiram-se até 100 mg de tecido em pó para um tubo de 1,5 mL estéril pré-arrefecido em azoto líquido e adicionaram-se 450 µL de tampão RLT (contendo 10 µL de β-mercaptoetanol por mL e adicionado na altura de utilização) e misturou-se com o auxílio do vortex. O lisado foi aplicado a uma coluna QIAshreder, por sua vez colocada num tubo colector, e centrifugou-se durante 2 minutos à velocidade máxima. O filtrado foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL estéril tendo o cuidado de não perturbar o sedimento formado no fundo do tubo colector. Adicionou-se 1/2 volume de etanol absoluto e misturou-se por pipetagem. Esta solução foi transferida para uma coluna RNeasy colocada num tubo colector novo. Centrifugou-se durante 15 segundos a mais de 8000 xg; eliminou-se o filtrado e readaptou-se a coluna ao tubo colector. Pipetaram-se 700 µL de tampão RW1 e repetiu-se a centrifugação, eliminando-se o tubo colector e o filtrado. A coluna RNeasy foi transferida para um novo tubo colector e pipetaram-se 500 µL de tampão RPE; repetiu-se a centrifugação e eliminou-se o filtrado. Fez-se nova lavagem com tampão RPE e centrifugou-se novamente durante 2 minutos à velocidade máxima. Após ter sido eliminado o filtrado, e para secar a membrana, repetiu-se a centrifugação durante 1 minuto e eliminou-se o tubo colector com o filtrado. Colocou-se a coluna RNeasy num tubo de 1,5 mL e pipetaram-se 50 µL de água destilada e desionizada estéril directamente sobre a membrana da coluna. Incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugou-se durante 1 minuto a, pelo menos, 8000 xg. Colocou-se o conjunto (tubo e coluna) em gelo e adicionaram-se 50 µL de água destilada e desionizada estéril directamente sobre a membrana da coluna. Repetiu-se a centrifugação e eliminou-se a coluna. Adicionou-se 1/10 do volume de NaCl 5 M e dois volumes de etanol absoluto frio (–20 °C) e incubou-se durante

a noite a –20 °C ou a –80 °C durante 1 hora. O RNA foi precipitado por centrifugação à velocidade máxima a 4 °C durante 30 minutos. O sedimento obtido foi lavado com etanol 70% arrefecido (–20 °C) com agitações suaves do tubo e a centrifugação repetida nas mesmas condições durante 15 minutos. O etanol foi eliminado por decantação e os tubos foram centrifugados brevemente para recolher no fundo o etanol não eliminado, sendo eliminado então por aspiração com uma pipeta. Os tubos foram colocados destapados em gelo durante uns instantes para secar o sedimento, o qual foi ressuspenso num volume inicial de 20 µL com o auxílio de um vortex. Quando necessário foi adicionada água destilada e desionizada estéril em incrementos de 5 µL até obter completa dissolução. Procedeu-se a uma diluição 1:250 para quantificar o RNA e guardou-se o tubo com o RNA total a –80 °C até à sua utilização.

Para extrair o RNA total dos diferentes órgãos de batateira com o "kit" "Invisorb Plant-RNA Mini Kit" (Invitek – Alemanha) transferiram-se 100 mg de tecido vegetal congelado e em pó para um tubo de 1,5 mL estéril pré-arrefecido em azoto líquido e adicionaram-se 450 µL de tampão de lise RP (previamente invertido várias vezes para eliminar possíveis precipitados presentes no frasco) e misturou-se com o auxílio do vortex durante 1 minuto. O lisado foi incubado à temperatura ambiente durante 2 minutos e posteriormente aplicado a uma coluna "DNA-binding", por sua vez colocada num tubo colector, e incubou-se durante 1 minuto, centrifugando-se depois durante 2 minutos a 10000 rpm numa centrífuga "eppendorf centrifuge 5411". O filtrado foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL estéril tendo o cuidado de não perturbar o sedimento formado no fundo do tubo colector. Adicionou-se 1/2 volume de etanol absoluto, misturou-se por pipetagem e incubou-se à temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. Esta solução foi transferida para uma coluna "RNA-binding" colocada num tubo colector novo. Incubou-se durante 1 minuto e centrifugou-se durante 30 segundos a 10000 rpm; eliminou-se o filtrado e readaptou-se a coluna ao tubo colector. Pipetaram-se 600 µL de tampão R1 para lavar a coluna; repetiu-se a centrifugação e eliminou-se o filtrado. Repetiu-se a lavagem pipetando 500 µL de tampão R2 e centrifugou-se novamente. Repetiu-se este passo. Após ter sido eliminado o filtrado da última lavagem centrifugou-se durante 2 minutos a pelo menos 12000 rpm e eliminou-se o tubo colector com o filtrado. Colocou-se a coluna "RNA-binding" num tubo de eluição e pipetaram-se 60 µL de tampão de eluição R directamente sobre a membrana da coluna. Incubou-se à temperatura ambiente durante 2 minutos e centrifugou-se durante 1 minuto a 10000 rpm. Colocou-se o conjunto (tubo e coluna) em gelo, adicionaram-se 60 µL de tampão de eluição R directamente sobre a membrana da coluna e repetiu-se a centrifugação. Eliminou-se a coluna e adicionou-se 1/10 do volume de NaCl 5 M e dois volumes de etanol absoluto frio (–20 °C) e incubou-se durante a noite a –20 °C ou a –80 °C

durante 1 hora. O RNA foi precipitado por centrifugação à velocidade máxima a 4 °C durante 30 minutos. O sedimento obtido foi lavado com etanol 70% arrefecido (–20 °C) com agitações suaves do tubo e a centrifugação repetida nas mesmas condições durante 15 minutos. O etanol foi eliminado por decantação e os tubos foram centrifugados brevemente para recolher no fundo o etanol não eliminado, sendo eliminado então por aspiração com uma pipeta. Os tubos foram colocados destapados em gelo durante uns instantes para secar o sedimento, o qual foi ressuspenso num volume inicial de 20 µL com o auxílio de uma vortex. Quando necessário foi adicionada água destilada e desionizada estéril em incrementos de 5 µL até obter completa dissolução. Procedeu-se a uma diluição 1:250 para quantificar o RNA e guardou-se o tubo com o RNA total a –80 °C até à sua utilização.

O isolamento de mRNA foi feito com o "kit" "PolyATtract mRNA isolation system IV", utilizando como material de partida o RNA total isolado. Num tubo de 1,5 mL estéril adicionou-se 0,1 a 1 mg de RNA total num volume final de 500 µL e incubou-se a 65 °C durante 10 minutos. Adicionaram-se 3 µL de sonda oligo-dT biotinilada e 13 µL de SSC 20x. Misturou-se suavemente e incubou-se à temperatura ambiente até a mistura arrefecer. Ressuspenderam-se as partículas paramagnéticas com estreptavidina até dispersão completa e procedeu-se à sua captura com um suporte magnético. Quando as partículas se encontravam todas de um lado do tubo eliminou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Lavou-se 3 vezes com 300 µL de SSC 0,5x, capturando-as com o suporte magnético entre as lavagens. No final foram ressuspensas em 100 µL de SSC 0,5x. O conteúdo da reacção do mRNA com a sonda biotinilada foi aplicado por completo às partículas e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. As partículas magnéticas foram capturadas com o suporte magnético e o sobrenadante removido. As partículas foram lavadas 4 vezes com 300 µL de SSC 0,1x. No final da última lavagem removeu-se o máximo possível de sobrenadante e ressuspendeu-se em 100 µL de água destilada e desionizada estéril. As partículas magnéticas foram capturadas com o suporte e a solução com mRNA transferida para um tubo de 1,5 mL estéril e conservada em gelo. Repetiu-se a eluição com 150 µL de água. Centrifugou-se o volume final a 10000 xg durante 5 minutos a 4 °C para eliminar possíveis contaminações com partículas magnéticas e o RNA foi transferido para um novo tubo. Procedeu-se à sua quantificação espectrofotométrica.

QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Foram utilizados duas abordagens para determinar a quantidade de um determinado ácido nucleico presente numa preparação. Um desses métodos baseou-se determinação espectrofotométrica da quantidade de radiação ultravioleta absorvida pelos ácidos nucleicos existentes numa solução. Para tal fizeram-se leituras nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A leitura a 260 nm permitiu calcular a concentração do ácido nucleico na amostra devido ao facto de ser sabido que o valor 1,0 de densidade óptica corresponde a 50 µg/mL de DNA de cadeia dupla e a 40 µg/mL de RNA (de cadeia simples). A razão entre as leituras a 260 nm e a 280 nm fornece uma estimativa da pureza da amostra. As preparações puras de DNA apresentam uma razão perto do valor 1,8 e as de RNA perto de 2,0. Se houver contaminações por proteínas ou fenol, o valor obtido para esta razão será significativamente menor.

Quando é esperado possuir uma elevada contaminação da amostra torna-se pouco fiável o valor obtido por espectrofotometria, sendo preferível fazer a determinação da quantidade de ácido nucleico por estimativa da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo. Devido ao facto de haver uma proporção entre a quantidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo, induzida pela luz ultravioleta, e a massa total do DNA, torna-se possível determinar o rendimento da amostra comparando a sua fluorescência com a fluorescência emitida por padrões conhecidos (173).

Para determinar o rendimento das preparações de DNA e de RNA através da espectrofotometria procedeu-se à execução de uma ou mais diluições (1:50 a 1:500) num volume final de 1 mL, em água destilada e desionizada estéril. Utilizando a mesma água como branco, procedeu-se à leitura das diluições a 260 nm e a 280 nm e estimou-se a concentração do ácido nucleico em µg/µL. A determinação da concentração de amostras de DNA através da fluorescência emitida pelo brometo de etídeo por acção da luz ultravioleta foi feita em mini-gel de agarose a 0,8% (p/v), contendo 1µg de brometo de etídeo por mL de gel. Aplicou-se um volume conhecido da amostra num poço; nos poços adjacentes aplicaram-se volumes conhecidos de padrões de tamanho molecular cuja concentração também era conhecida e submeteu-se a separação electroforética, utilizando TAE 1x como tampão de corrida. Após separação das diferentes bandas, analisou-se o gel à luz ultravioleta e compararam-se as intensidades das bandas da amostra com as de cada padrão. Estimou-se a massa de DNA presente na banda do padrão cuja fluorescência era mais próxima da amostra e atribuiu-se à banda da amostra essa massa. Estimou-se a concentração do DNA em µg/µL.

Após a quantificação do RNA total, as diluições foram ainda utilizadas para testar a integridade do RNA. Carregaram-se 200 ng de RNA total, utilizando no tampão de amostra xilenocianol como corante em vez de azul de bromofenol (ver apêndice), num mini-gel (8 x 10 cm) de agarose 0,8% (p/v) e aplicou-se uma voltagem constante de 90 V até a frente do azul ter migrado cerca de 1 cm dos poços. A corrida foi feita numa unidade Horizon® 58 (Life Technologies, EUA), utilizando TAE 1x como tampão de corrida. O gel foi visualizado com luz ultravioleta e a imagem capturada e analisada com a aplicação "Kodak Digital Science 1D".

DIGESTÃO DE DNA GENÓMICO PARA "SOUTHERN BLOTTING"

Foram executados vários ensaios de digestão de DNA genómico utilizando várias enzimas. Em cada ensaio digeriu-se 5 a 20 µg de DNA, os quais foram submetidos a digestão simples com as enzimas de interesse. Para tal, num tubo de 1,5 mL estéril adicionou-se o DNA, o tampão correspondente à enzima e água para um volume final de 30 µL, tendo em consideração o volume de enzima de restrição a pipetar. O volume a pipetar de enzima foi dividido em três partes, aplicando-se a segunda parte 15 minutos após o início da digestão; a terceira parte foi aplicada 1 a 2 horas após a segunda aplicação. As digestões ocorreram durante a noite em banho-maria à temperatura recomendada para a enzima utilizada. A estratégia de aplicação por partes da enzima de restrição e o aumento do volume final de reacção para 30 µL tiveram por objectivo assegurar uma dispersão homogénea do DNA a ser digerido.

CORRIDA DOS PRODUTOS RESULTANTES DA DIGESTÃO DE DNA GENÓMICO PARA "SOUTHERN BLOTTING"

A eficiência da restrição enzimática foi testada correndo uma alíquota de 1 a 2 µL dos produtos de digestão num mini-gel de agarose 0,8% (p/v) (8 x 10 cm) (Horizon® 58 Life Technologies, EUA) a 50 V, usando como tampão de corrida TAE 1x e contendo 1 µg de brometo de etídeo por mL de gel. Se as restrições não estavam completas adicionava-se mais enzima de restrição e incubava-se à temperatura recomendada durante mais 1 hora. No final das restrições as enzimas de restrição foram inactivadas de acordo com as instruções do fabricante e os tubos colocados em gelo.

Os produtos de restrição foram separados por electroforese em suporte de agarose (0,8%) com 11 x 14 cm de dimensões, contendo ou não 1 μg de brometo de etídeo por mL de gel. As amostras foram carregadas lentamente no gel para evitar que os fragmentos de maior tamanho sofressem danos. A corrida foi feita durante a noite entre 27 a 30 V ou durante o dia entre 45 a 55 V até a frente da corrida ter migrado 2/3 do comprimento do gel. Após a sua terminação a qualidade da separação foi visualizada num transiluminador de luz ultravioleta e a imagem do gel foi adquirida com uma câmara digital "Kodak Digital Science 1 D". Foi decalcado um esboço do gel numa folha de plástico transparente, tendo especial cuidado de marcar as diferentes bandas correspondentes aos padrões de tamanho molecular usados na corrida, para futura identificação das bandas resultantes do reconhecimento da sonda utilizada. Procedeu-se à transferência dos ácidos nucleicos para um suporte de nylon.

TRANSFERÊNCIA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS SEPARADOS POR "SOUTHERN BLOTTING"

Incubou-se o gel em tampão de transferência alcalino (NaCl 1,5 M; NaOH 0,25 M) durante 30 minutos com agitação suave. Este passo permitiu desnaturar o DNA. Cortou-se uma membrana de nylon carregada positivamente (Hybond N^+ - Amersham Pharmacia Biotech, EUA; Nylon membranes positively charged – ROCHE – Alemanha) com as mesmas dimensões do gel e incubou-se no mesmo tampão durante 10 minutos. Preparou-se a transferência como indicado na figura II.2, consistindo num reservatório onde foi colocado o tampão de transferência alcalino e onde mergulhavam duas folhas de papel 3MM, que funcionaram como ponte, permitindo o fluxo do tampão de transferência até ao gel. Sobre estas folhas foi colocado o gel, numa posição invertida (poços virados para baixo) e de modo a não haver aprisionamento de bolhas de ar entre este e a ponte. Sobre o gel colocou-se uma membrana de nylon, 3 folhas de papel 3 MM e uma pilha de papeis de filtro cortados às dimensões aproximadas do gel. Sobre os papeis colocou-se um vidro e um peso com aproximadamente 250 a 500 g. Permitiu-se que a transferência ocorresse durante a noite à temperatura ambiente. No final da transferência removeram-se os papeis de cima da membrana e, com cuidado, marcaram-se as posições dos poços na membrana com lápis. A membrana foi neutralizada em tampão de neutralização (Tris-HCl 0,5 M, pH=7,5; NaCl 1,5M e EDTA 10 mM) durante 30 minutos e os ácidos nucleicos foram fixados à membrana de acordo com as instruções do fabri-

cante. A pré-hibridação e a hibridação feita com sondas marcadas isotopicamente foi executada como descrito no rastreio da biblioteca de cDNA.

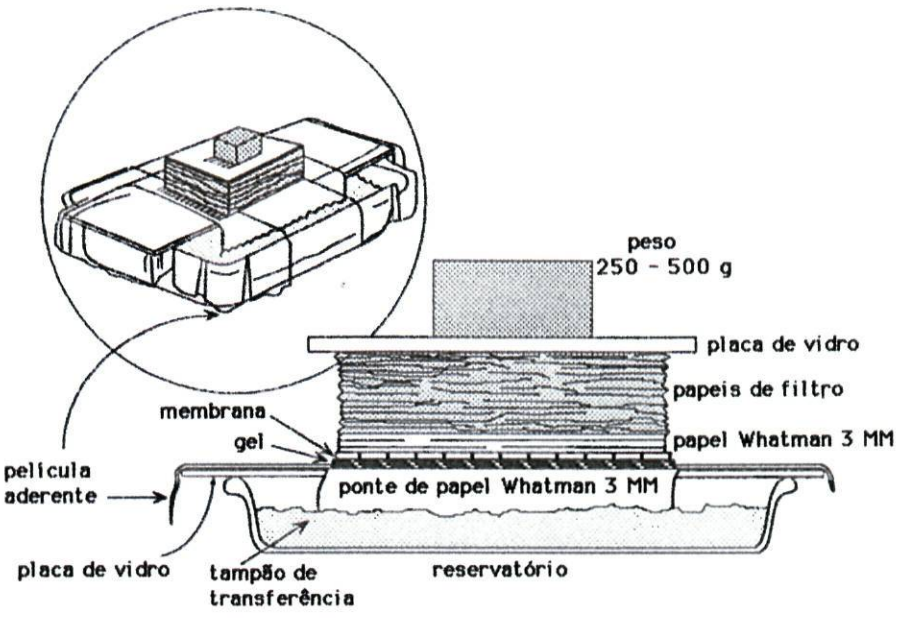


Figura II.2: Ilustração esquemática da montagem da transferência capilar de ácidos nucleicos separados por electroforese em gel de agarose. (Adaptado de (21)).

"NORTHERN BLOTTING"

A técnica de "Northern blotting" permite a determinação do tamanho e da abundância relativa de moléculas de RNA específicas presentes em preparações de RNA total ou de mRNA (poli-A). O RNA é separado através de electroforese em gel de agarose em condições desnaturantes, transferido para uma membrana de nylon e hibridado com uma sonda marcada. Podem ser usados vários agentes desnaturantes, tais como o glioxal e dimetilsulfóxido ou o formaldeído (173). Neste trabalho optou-se pelo uso de formaldeído como agente desnaturante pelo facto da separação em geles contendo glioxal e dimetilsulfóxido ter que ser lenta e necessitar de circulação do tampão de electroforese para evitar a formação de um gradiente de protões durante a electroforese, enquanto que estes cuidados não são necessários tomar nos geles contendo formaldeído (173).

O material de electroforese utilizado foi tratado com uma solução contendo H_2O_2 3% ou com NaOH 0,4 M durante 10 minutos para eliminar a actividade das RNases existentes.

Para preparar o gel dissolveu-se 1 g de agarose em 72,5 mL de água estéril por aquecimento e arrefeceu-se em banho-maria a 55 – 65 °C. Após atingida esta temperatura adicionou-se 10x MOPS (apêndice) e 17,5 mL de formaldeído 37% (p/p). A mistura foi vertida no

suporte e deixou-se o gel na hote, em local resguardado de correntes de ar, até polimerizar. Colocou-se o gel na tina e cobriu-se com tampão de electroforese MOPS 1x para permitir a difusão do formaldeído para o tampão. Procedeu-se à preparação das amostras a separar por electroforese.

Foram preparadas amostras contendo 10 a 15 μg de RNA num volume final de 6 μL em tubos de 1,5 mL colocados em gelo, adicionou-se 12,5 μL de formamida, 4 μL de formaldeído e 2,5 μL de MOPS 10x. A mistura foi misturada com o auxílio do vortex e centrifugada brevemente para recolher o conteúdo no fundo do tubo. Incubou-se durante 15 minutos a 55 – 65 °C para desnaturar o RNA; durante esta incubação fez-se a pré-corrida do gel a 60 V. Os tubos foram novamente colocados em gelo e adicionou-se 1/10 do volume de tampão de amostra de RNA (apêndice). Misturou-se com o auxílio do vortex e centrifugou-se brevemente para recolher o conteúdo no fundo do tubo. Colocou-se em gelo até ser feita a aplicação das amostras no gel.

A separação electroforética foi feita na hote num gel de 10 x 10 cm (Stratagene, Reino Unido). Aplicou-se uma voltagem de 60 V até o azul do tampão ter migrado cerca de 1 cm dos poços, permitindo deste modo, a completa entrada da amostra no gel; aumentando-se depois para 85 V. Permitiu-se que a separação decorresse até o azul ter atingido 50 a 75% do comprimento do gel. Procedeu-se ao tratamento do gel para transferência dos ácidos nucleicos para membrana.

O RNA foi transferido para membrana de nylon carregada positivamente (Hybond N^+ - Amersham Pharmacia Biotech, EUA; Nylon membranes positively charged – ROCHE – Alemanha). Foram utilizadas duas metodologias para fazer a transferência do RNA:

Transferência alcalina do RNA no sentido descendente

Enquanto ocorria o fraccionamento electroforético, procedeu-se à pré-embebição da membrana de nylon carregada positivamente (Hybond N^+ - Amersham Pharmacia Biotech, EUA; Nylon membranes positively charged – ROCHE – Alemanha) e de 4 folhas de papel Whatman 3MM cortadas às dimensões do gel e de 2 folhas mais longas do mesmo papel em tampão de transferência alcalino (NaCl 3 M, NaOH 8 mM, Laurilsarcosinato de sódio 2 mM (pH=12); ou NaOH 50 mM) preparado em água destilada e desionizada estéril. Preparou-se uma pilha de folhas de papel de filtro com cerca de 5 cm de altura com uma área ligeiramente

superior à do gel e cortaram-se mais 4 folhas de papel Whatman 3 MM com as mesmas dimensões do gel.

Após ter terminado a electroforese, cortou-se o gel pelos poços para evitar que durante a transferência esta zona não funcionasse como atalho de passagem para o tampão. Incubou-se o gel em tampão de transferência alcalino durante 10 minutos. A transferência foi montada tendo sempre o cuidado de evitar o aprisionamento de bolhas de ar entre as várias camadas que a compunham (figura II.3). Colocaram-se os 5 cm de folhas de papel de filtro secas e sobre estas as 4 folhas de papel 3 MM secas, seguindo-se 1 folha de papel 3 MM embebida em tampão. Por cima desta folha foi colocada a membrana embebida, seguindo-se o gel e as restantes 3 folhas de papel 3 MM. De seguida, colocaram-se as 2 folhas mais longas sobe as folhas de papel 3 MM, tendo o cuidado de alinhar uma das extremidades com a pilha de papel existente sobre o gel e de mergulhar a outra extremidade num recipiente contendo tampão de transferência alcalino; estas folhas funcionaram como ponte de transferência. Este recipiente foi colocado numa altura superior à do gel. Sobre as 2 folhas que funcionaram como ponte colocou-se uma placa de vidro, para aumentar o contacto entre as várias camadas que compõem a transferência devido ao seu peso, e uma folha de película aderente para evitar a evaporação do tampão(93, 138).

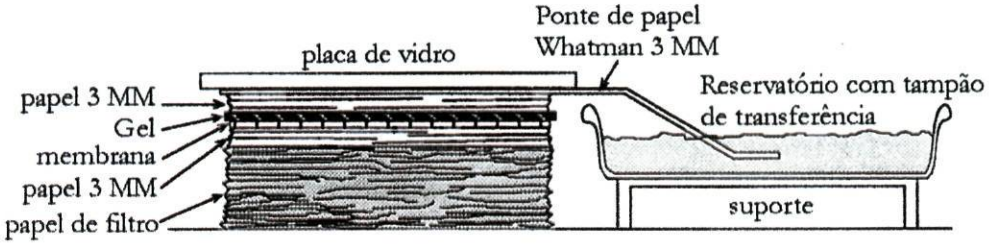


Figura II.3 – Ilustração esquemática da transferência alcalina de ácidos nucleicos no sentido descendente. (Adaptado de (21)).

A transferência decorreu durante 2,5 horas à temperatura ambiente. Devido às condições alcalinas da transferência ocorre fixação do RNA às membranas de nylon carregadas positivamente, tornando fixações adicionais desnecessárias. No final da transferência e com cuidado, marcaram-se as posições dos poços na membrana com lápis. Para remover possíveis fragmentos de agarose e para a neutralizar a membrana incubou-se durante 1 a 2 minutos em água destilada e desionizada estéril. Procedeu-se à pré-hibridação ou secou-se a membrana em local resguardado de correntes de ar até à sua utilização.

Transferência do RNA no sentido ascendente

Enquanto decorria a electroforese cortou-se a membrana de nylon carregada positivamente (Hybond N^+ - Amersham Pharmacia Biotech, EUA; Nylon membranes positively charged – ROCHE – Alemanha), 3 folhas de papel Whatman 3 MM e uma pilha de papeis de filtro com cerca de 5 cm de altura com as dimensões do gel. Cortaram-se duas folhas de papel Whatman 3 MM com uma largura maior que as dimensões do gel e mais compridas.

Terminada a electroforese incubou-se o gel em várias passagens, de aproximadamente 10 minutos cada, em água destilada e desionizada estéril para eliminar o excesso de formaldeído. Incubou-se duas vezes em SSC 20x durante 15 minutos. Estes passos foram executados sob agitação suave.

Durante os tratamentos do gel preparou-se a transferência de acordo com a figura II.2. Num recipiente colocou-se o tampão de transferência (SSC 20x). Sobre o recipiente colocou-se um vidro e as duas folhas de papel Whatman 3 MM compridas com as extremidades mergulhadas no tampão (ponte); permitiu-se a embebição da ponte por capilaridade. Depois da última passagem em SSC 20x, colocou-se o gel em posição invertida sobre a ponte tendo o cuidado de não aprisionar bolhas de ar entre este e a ponte. Colocou-se uma folha de película aderente sobre o gel e, com uma lâmina estéril, cortou-se a porção da película aderente correspondente ao gel, eliminando-a; deste modo provocou-se a transferência do tampão obrigatoriamente pelo gel. Sobre o gel colocou-se a membrana sem aprisionar bolhas de ar e sobre esta as 3 folhas de papel Whatman 3 MM. Por fim colocou-se a pilha de papel de filtro, um vidro e um peso compreendido entre 250 a 500 g. A transferência ocorreu durante a noite à temperatura ambiente. No final da transferência e com cuidado, marcaram-se as posições dos poços na membrana com lápis. Procedeu-se à fixação dos ácidos nucleicos à membrana de acordo com as instruções do fabricante. Para remover possíveis fragmentos de agarose incubou-se durante 1 a 2 minutos em água destilada e desionizada. Procedeu-se à pré-hibridação ou secou-se a membrana em local resguardado de correntes de ar até à sua utilização.

DOT- BLOT DE RNA

Pré-embebeu-se a membrana de nylon carregada positivamente ("Hybond N^+ - Amersham Pharmacia Biotech, EUA; Nylon membranes positively charged" – ROCHE – Alemanha) em água e incubou-se em SSC 20x durante 1 hora à temperatura ambiente; na mesma

solução embeberam-se duas folhas de papel Whatman 3 MM. Durante este tempo tratou-se o equipamento a utilizar com uma solução de NaOH 0,4 M e lavou-se bem com água destilada e desionizada estéril.

Montou-se o equipamento (SRC 96 D Minifold I Dot Blotter, Schleicher & Schuell, Alemanha) e colocaram-se as folhas de papel 3 MM e sobre estas a membrana evitando aprisionar bolhas de ar. Colocou-se a estrutura superior e fechou-se bem.

Aplicaram-se 1000 µL de SSC 10x em cada ranhura e aplicou-se sucção suave até que toda a solução passasse pela membrana. Desligou-se o vácuo e encheram-se de novo as ranhuras com SSC 10x. O RNA total (5 a 10 µg) foi dissolvido num volume final de 10 µL num tubo de 1,5 mL estéril e adicionou-se 20 µL de formamida, 7 µL de formaldeído 37% e 2 µL de SSC 20x (formamida 50%, formaldeído 7% e SSC 1x). A mistura foi incubada a 68 °C durante 15 minutos e conservada em gelo. Adicionaram-se 2 volumes de SSC 20x e centrifugou-se brevemente para recolher a solução; conservou-se em gelo até aplicação das amostras.

Aplicou-se sucção suave até que a solução de SSC 10x das ranhuras passasse completamente pela membrana, desligando-se de seguida. Aplicaram-se as amostras nas ranhuras e repetiu-se a sucção; depois das amostras terem passado pela membrana lavou-se a ranhura duas vezes com 0,5 mL de SSC 10x. Após a segunda lavagem prolongou-se a sucção durante 5 minutos para secar a membrana. Procedeu-se à fixação dos ácidos nucleicos de acordo com as instruções do fabricante e à detecção dos mRNAs com sonda marcada.

MARCAÇÃO DE SONDAS NÃO ISOTÓPICAS PELA INCORPORAÇÃO DE NUCLEÓTIDOS MARCADOS COM DIGOXIGENINA

Os protocolos de marcação de ácidos nucleicos com digoxigenina e a sua subsequente detecção são baseados em métodos bem estabelecidos. A marcação das sondas a usar é feita de acordo com os métodos enzimáticos utilizados na marcação de sondas radioactivas. De modo semelhante, a hibridação com as sondas marcadas com digoxigenina também é feita com base nas técnicas mais correntemente utilizadas, com a excepção de ser necessário utilizar um reagente de bloqueio para diminuir o ruído de fundo. O sinal resultante da hibridação da sonda com os ácidos nucleicos é detectado de um modo semelhante aos procedimentos utilizados nos "Western blottings". Para tal é utilizado um anticorpo conjugado à fosfatase alcalina que reconhece a digoxigenina e consequentemente a sonda que se ligou aos ácidos nucleicos a serem detectados. O sinal é visualizado utilizando substratos colorimétricos ou qui-

mioluminiscentes da fosfatase alcalina; se for utilizado um substrato colorimétrico o sinal é directamente detectado na membrana; o uso de um substrato quimioluminiscente (como o CSPD®) permite produzir um sinal de luz o qual pode ser detectado num filme de raios-X (13).

A) Preparação do DNA a ser usado como molde na reacção de marcação

Foi necessário proceder à preparação de DNA a ser usado como molde para a síntese das sondas marcadas com DIG-11-dUTP. Esta preparação consistiu numa amplificação dos cDNAs clonados nos vectores fágicos utilizando um oligonucleótido iniciador do vector fágico que emparelha a 3' do cDNA. O iniciador a utilizar a 5' dependeu do objectivo pretendido para as sondas: no caso da marcação das sondas de DNA de cadeia dupla (usadas como sondas homólogas e conservadas) utilizou-se o iniciador do vector fágico que emparelha a 5' do cDNA; no caso das sondas de DNA de cadeia simples e de cadeia dupla, que foram utilizadas como sondas homólogas específicas, utilizou-se um oligonucleótido iniciador que emparelha um pouco antes da região conservada IV (designado GSF6 – 5'-CTG GAA AGC ACG AAA CAG C-3') e que, nos clones citosólicos (T5F8.1A e C1A1A), permite obter um amplificado de ± 500 bp, sendo este tamanho aproximado de 550 bp no caso do clone plastidial (14A1.2). Estas reacções foram feitas num volume final de 50 µL, em tubos de 200 µL, de acordo com a seguinte tabela:

Reagente	**Volume (µL)**	**Concentração final**
H_2O	38,25	--
Tampão 10x *	5	1x
$MgCl_2$ 50 mM	1,5	1,5 mM
dNTPs 10 mM **	1	0,2 mM
λ5' ou GSF6 (20 µM)	1	0,4 µM
λ3' (20 µM)	1	0,4 µM
DNA (lisado de fago)	2	--
Taq DNA polimerase *	0,25	1,5 U/reacção

* - GibcoBRL Life Technologies, EUA; ** - Amersham Pharmacia Biotech, EUA

A adição da enzima foi feita de acordo com a descrição do método "Hot-start", tendo sido adicionada depois do primeiro passo de desnaturação, após ter ocorrido pausa no programa à temperatura de 80 °C. As reacções decorreram num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA", segundo os seguintes programas: quando usado(s) o(s) iniciador(es) específico(s) do vector fágico λgt11 desnaturou-se o DNA durante

3' a 94°C, seguidos de 35 ciclos de: desnaturação – 94 °C, 30 segundos, emparelhamento – 60 °C, 1 minuto, extensão – 72 °C, 2 minutos; a extensão final foi feita a 72 °C durante 5 minutos; nas reacções feitas com o(s) iniciador(es) específico(s) do vector fágico λZAPII desnaturou-se o DNA durante 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de: desnaturação – 94 °C, 30 segundos, emparelhamento e extensão – 68 °C, 3 minutos, a extensão final durou 3 minutos a 68 °C; os tubos foram conservados a 4 °C até processados.

Carregou-se o volume total da reacção num gel de agarose 0,8% (p/v), contendo 0,5 μL de brometo de etídeo (10 mg/mL) em 25 mL de gel, e procedeu-se à separação electroforética numa unidade submarina Horizon® 58 (Life Technologies, EUA) a 70 V e em TAE 1x até que a frente (corante azul) migrasse 2/3 do comprimento do gel. No final da corrida visualizou-se o gel à luz ultravioleta e excisou-se a banda de interesse com uma lâmina de bisturi estéril para um tubo de 1,5 mL para posterior isolamento e purificação do DNA, como descrito anteriormente.

O DNA purificado foi quantificado em gel de agarose ou espectrofotometricamente e procedeu-se à sua diluição para originar uma solução contendo 4 ng/μL de DNA molde.

B) Marcação de sondas de DNA de cadeia dupla por incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR

A digoxigenina-11-dUTP (DIG-11-dUTP) pode ser incorporada pela Taq DNA polimerase durante as reacções de polimerase em cadeia (PCR), conduzindo à produção de sondas sensíveis e altamente marcadas.

Foi utilizado o "kit" "PCR DIG Probe Synthesis Kit" (ROCHE, Alemanha), o qual possui uma mistura de nucleótidos na qual existe uma relação 1:2 de DIG-11-dUTP:dTTP. Esta razão pode ser utilizada para produzir sondas com elevada incorporação de DIG-11-dUTP e com taxas de incorporação errada de nucleótidos muito reduzidas. As sondas originadas podem ser usadas numa variedade de procedimentos laboratoriais de detecção de ácidos nucleicos imobilizados em filtros. O "kit" permite a síntese de sondas eficientemente marcadas pela incorporação de DIG-11-dUTP resultante da actividade da mistura de enzimas "Expand™ High Fidelity" a qual permite um rendimento e uma exactidão máximos.

A marcação de sondas de DNA em cadeia dupla foi feita com os oligonucleótidos iniciadores indicados na secção anterior. Aparte dos oligonucleótidos iniciadores, da água e do DNA molde, todos os restantes reagentes foram providenciados pelo "kit". As reacções de-

senrolaram-se num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA". Os volumes utilizados de cada reagente (para um volume final de 50 µL) estão descritos na seguinte tabela:

Reagentes	**Volume (µL)**	**Concentração final**
H_2O	29,25	--
Tampão 10x conc.	5	1x
PCR DIG mix.	5	200 µM dNTP
Iniciador λ5' ou GSF6 (20 µM)	2,5	0,5 µM
Iniciador λ3' (20 µM)	2,5	0,5 µM
Enzima	0,75	2,6 U/reacção
DNA molde (4 ng/µL)	5	0,4 ng/µL

O programa de PCR utilizado dependeu dos vectores onde os cDNAs estavam clonados e das diferenças das temperaturas de emparelhamento dos iniciadores específicos. Os programas utilizados são os descritos em A), com a excepção de se ter executado 45 ciclos em vez de 35.

No final da reacção foram analisados 5 µL em mini-gel de agarose 0,8% (p/v) contendo 0,5 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL) num volume final de 25 mL. A separação electroforética foi feita a 80 V em tampão TAE 1x durante aproximadamente uma hora. Os geles foram analisados à luz ultravioleta e a imagem capturada com o sistema "Kodak Digital Science 1D". A eficiência da marcação foi averiguada comparando a migração dos fragmentos resultantes da reacção da marcação com a migração de fragmentos resultantes do mesmo tipo de reacção sem a presença de DIG-11-dUTP, a migração dos fragmentos marcados é mais lenta devido à presença destes nucleótidos, cuja massa é maior do que a dos nucleótidos não alterados.

As reacções onde ocorreu marcação foram utilizadas para fazer a purificação dos produtos de PCR com LiCl: adicionou-se 1/10 do volume da reacção de LiCl 4 M e 2,5 a 3 volumes de etanol arrefecido (–20 °C). Misturou-se bem e incubou-se a –70 °C durante 30 minutos ou a –20 °C durante a noite. Centrifugou-se a 13000 xg durante 15 minutos e eliminou-se o etanol. O sedimento foi lavado com etanol a 70%; repetiu-se a centrifugação durante 5 minutos e eliminou-se o etanol. Depois de seco, o sedimento foi ressuspendido em 50 µL de água destilada e desionizada estéril e quantificado em gel da agarose como descrito anteriormente. Não foram determinadas as concentrações por espectrofotometria porque a presença de digoxigenina interfere com as leituras a 260 nm.

C) Marcação de sondas de DNA de cadeia simples por incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR assimétrico

A geração de sondas que correspondem a regiões de baixa homologia nucleotídica, sem haver dependência de locais de restrição, pode ser levada a cabo pelo uso de oligonucleótidos iniciadores que flanqueiam estas regiões, seguido de PCR unidireccional para sintetizar sondas de DNA de cadeia simples marcadas com digoxigenina na orientação "sense" e "anti-sense" (75).

Tendo por base esta observação procedeu-se à preparação do DNA molde fazendo uma reacção de PCR bidireccional de modo a gerar moléculas molde de elevada pureza correspondentes a sequências únicas dos cDNAs em estudo, utilizando o iniciador GSF6, como referido em A). A abordagem utilizada permitiu elaborar sondas específicas para cada clone pelo facto de se utilizar como DNA molde na reacção de marcação a porção relativa à extremidade 3' não traduzida, na qual a homologia entre os diferentes cDNAs em estudo revelou ser mais baixa. Nas reacções de PCR unidireccional utilizou-se apenas o oligonucleótido iniciador λ3' (específico para o fago onde os cDNAs se encontravam clonados de origem) por se saber que a cadeia resultante da extensão deste iniciador é a complementar à cadeia codificante, funcionando como sonda "anti-sense".

Foi utilizado o "kit" "PCR DIG Probe Synthesis Kit" (ROCHE, Alemanha). Aparte dos oligonucleótidos iniciadores, da água e do DNA molde, todos os restantes reagentes foram providenciados pelo "kit". As reacções desenrolaram-se num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA". Os volumes utilizados de cada reagente (para um volume final de 50 µL) estão descritos na seguinte tabela:

Reagentes	**Volume (µL)**	**Concentração final**
H_2O	31,75	--
Tampão 10x conc.	5	1x
PCR DIG mix.	5	200 µM dNTP
Iniciador λ3' (20 µM)	2,5	0,5 µM
Enzima	0,75	2,6 U/reacção
DNA molde (4 ng/µL)	5	0,4 ng/µL

O programa de PCR utilizado dependeu dos vectores onde os cDNAs estavam clonados face às diferenças das temperaturas de emparelhamento dos iniciadores específicos. Os programas utilizados são os mesmos como descrito em A), com a excepção de se ter executado 45 ciclos, ao invés de 35.

No final da reacção foram analisados 5 µL em mini-gel de agarose 0,8% (p/v) contendo 0,5 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL) num volume final de 25 mL (Horizon® 58 – Life Technologies, EUA). A separação electroforética foi feita a 80 V em tampão TAE 1x durante aproximadamente uma hora. Os geles foram analisados à luz ultravioleta e a imagem capturada com o sistema "Kodak Digital Science 1D". A eficiência da marcação foi averiguada comparando a migração dos fragmentos resultantes da reacção da marcação com a migração de fragmentos resultantes do mesmo tipo de reacção sem a presença de DIG-11-dUTP; a migração dos fragmentos marcados é mais lenta devido à presença destes nucleótidos, cuja massa é maior do que a dos nucleótidos não alterados.

As reacções onde ocorreu marcação foram utilizadas para fazer a purificação dos produtos de PCR com LiCl: adicionou-se 1/10 do volume da reacção de LiCl 4 M e 2,5 a 3 volumes de etanol arrefecido (–20 °C). Misturou-se bem e incubou-se a –70 °C durante 30 minutos ou a –20 °C durante a noite. Centrifugou-se a 13000 xg durante 15 minutos e eliminou-se o etanol. O sedimento foi lavado com etanol a 70%; repetiu-se a centrifugação durante 5 minutos e eliminou-se o etanol. Depois de seco, o sedimento foi ressuspendido em 50 µL de água destilada e desionizada estéril e quantificado em gel da agarose como descrito anteriormente. Não foram determinadas as concentrações por espectrofotometria porque a presença de digoxigenina interfere com as leituras a 260 nm.

HIBRIDAÇÃO DAS MEMBRANAS RESULTANTES DO "NORTHERN-BLOTTING" COM SONDAS MARCADAS COM ^{32}P-dCTP

Incubou-se a membrana em SSC 5x e colocou-se numa caixa de plástico com tampa. Adicionou-se tampão de hibridação (formamida 50%, SSC 5x, Denhart's 5x, fosfato de sódio 50 mM pH=6,5) tendo o cuidado de utilizar 40 mL por 100 cm^2 de membrana. Adicionou-se DNA de esperma de salmão desnaturado por fervura para uma concentração final de 50 µg/mL de tampão. Colocou-se num banho-maria ou num forno de hibridação (Stuart Scientific – hybridisation oven SI20H, Reino Unido) à temperatura de 42 °C e pré-hibridou-se durante pelo menos 4 horas com agitação constante. Para preparar 100 mL da solução de Denhart's 50x fizeram-se 3 soluções de 30 mL: uma com 1 g de Ficol, outra com 1 g de PVP (P5288) e outra com 1 g de BSA (fracção V); as duas primeiras soluções foram autoclavadas e a terceira esterilizada por filtração (filtros 0,2 µm); depois de arrefecidas juntaram-se as 3 soluções e completou-se o volume para 100 mL com água destilada e desionizada estéril. A

solução final foi aliquotada e conservada a –20 °C. Para preparar o DNA de esperma de salmão dissolveram-se 100 mg em 7 a 8 mL de água destilada e desionizada com o auxílio de uma barra magnética; adicionou-se NaCl para uma concentração final de 100 mM e completou-se o volume para 10 mL. A solução foi autoclavada tendo ocorrido fragmentação do DNA durante este processo.

A hibridação foi feita em 20 mL (por 100 cm^2 de membrana) pré-aquecidos a 42 °C contendo 50% de formamida e 6 mL da solução de sulfato de dextrano (SSC 5x; Denhart's 2,5x; fosfato de sódio 50 mM pH=6,5 e sulfato de dextrano 10% (p/v)). Adicionou-se DNA de esperma de salmão desnaturado por fervura para a concentração final de 50 µg/mL e a sonda igualmente desnaturada.

Hibridou-se durante a noite a 42 °C com agitação constante. Para fazer 40 mL da solução de sulfato de dextrano pesaram-se 13,33 g de sulfato de dextrano para um matraz de 50 mL estéril, adicionaram-se 33,33 mL de SSC 20x e 2,66 mL de fosfato de sódio 1 M pH=6,5. Aqueceu-se no microondas agitando-se de 10 em 10 segundos até o pó ficar bem dissolvido (surgem bolhas de ar aprisionadas na solução); adicionou-se 1,4 mL de Denhart's 50x e misturou-se bem; a solução resultante foi conservada a 4 °C.

No final da hibridação guardou-se a solução contendo a sonda a –20 °C e procedeu-se às lavagens com o objectivo de remover sonda não hibridada. Fez-se uma primeira lavagem breve em SSC 2x; SDS 0,1% (p/v) para eliminar o excesso de solução de hibridação que ficou em contacto com a membrana; repetiu-se a lavagem na mesma solução durante 30 minutos a 65 °C; substituiu-se por uma solução de restringência maior (SSC 0,5x; SDS 0,1% (p/v)) e repetiu-se a incubação.

No final da segunda lavagem monitorou-se a emissão de radioactividade com um contador (Series 900 mini-monitor, Reino Unido); dependendo do sinal lido fez-se uma terceira lavagem em SSC 0,1x; SDS 0,1% (p/v), com monitorizações frequentes. No final das lavagens escorreu-se o excesso de solução e colocou-se a membrana entre duas folhas de película aderente e impressionou-se um filme de raios-X (Agfa) a –70 °C durante 1 a 2 semanas.

HIBRIDAÇÃO DAS MEMBRANAS RESULTANTES DAS TRANSFERÊNCIAS DOS ÁCIDOS NUCLEICOS COM SONDAS MARCADAS COM DIG-11-dUTP

Antes de proceder à hibridação foi necessário optimizar a quantidade de sonda que deveria ser usada de modo a obter uma boa relação sinal detectado / ruído de fundo, como re-

comendado pelo fabricante. Esta optimização, designada de "mock hybridization" foi feita incubando tiras de membrana (com ou sem DNA associado) com concentrações diferentes de sonda na solução de hibridação e subsequente detecção. A maior concentração que originou um ruído de fundo aceitável foi a utilizada na hibridação (13). No entanto, na maioria das vezes em que a técnica foi executada, foi obtido muito ruído de fundo, por mais baixa que fosse a concentração de sonda utilizada. Por esta razão procedeu-se à optimização do procedimento, recorrendo a vários protocolos descritos por outros autores que utilizaram o mesmo tipo de sondas. Foram introduzidas algumas alterações ao procedimento inicial, tais como: o uso de leite em pó magro em vez do reagente de bloqueio recomendado e o prolongamento do tempo de pré-hibridação para uma noite (151); eliminação da fixação dos ácidos nucleicos às membranas utilizadas por incubação a elevadas temperaturas, recorrendo apenas à fixação alcalina ou pela radiação ultravioleta e utilizando soluções de hibridação pré-aquecidas à temperatura de hibridação utilizada, pré-embebendo a membrana em SSC com a mesma força iónica que a presente na solução de hibridação e utilizando pelo menos 125 µL de solução de hibridação por cada cm^2 de membrana (131).

Dependendo do tipo de sonda (conservada ou específica) foram utilizadas diferentes temperaturas de hibridação, descriminadas posteriormente na secção dos resultados. A solução de hibridação utilizada em todas as detecções foi a recomendada pelo fabricante, designada por "High SDS buffer/Church buffer", e apresentava a seguinte composição: SDS 7% (p/v), formamida 50%, SSC 5x, reagente de bloqueio 2% (p/v) (ou leite em pó magro 2% (p/v)), fosfato de sódio 50 mM, pH=7,0 e laurilsarcosinato de sódio 0,01% (p/v). Para preparar esta solução (500 mL) adicionaram-se os reagentes na seguinte ordem: pesaram-se 35 g de SDS para um recipiente estéril; adicionaram 250 mL de formamida, 83 mL de SSC 30x, 25 mL de fosfato de sódio 1 M pH=7,0, 100 mL de reagente de bloqueio (Roche, USA) (ou 10 g de leite em pó magro) e 5 mL de laurilsarcosinato de sódio 10% (p/v). Aqueceu-se a solução até 60 °C e dissolveu-se o pó por agitação; completou-se o volume com água destilada e desionizada estéril. A solução foi conservada à temperatura ambiente. Para preparar a solução de reagente de bloqueio adicionaram-se 10 g de reagente de bloqueio a 100 mL de tampão de ácido maleico estéril (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH=7,5) e dissolveu-se no microondas com impulsos de calor de 5 a 10 segundos, tendo o cuidado de nunca permitir que ocorresse fervura da solução para que o reagente de bloqueio não coagulasse; autoclavou-se e guardou-se em alíquotas a 4 °C até ser usado.

A pré-hibridação decorreu numa caixa de plástico limpa durante a noite num forno de hibridação (Stuart Scientific – hybridisation oven SI20H, Reino Unido) com agitação. No dia

seguinte adicionou-se o volume de sonda desnaturada por fervura, apurado pela "mock hybridization", ou substituiu-se a solução por solução de hibridação já usada e desnaturada por incubação a 68 °C em banho-maria durante 10 minutos. Incubou-se durante a noite nas mesmas condições que a pré-hibridação. No final lavou-se a membrana duas vezes em SSC 2x, 0,1% (p/v) durante 5 minutos para remover sonda não hibridada; lavou-se duas vezes em SSC 0,5x, 0,1% (p/v) durante 15 minutos a uma temperatura igual ou superior a 65 °C; a última lavagem foi executada durante 15 minutos em SSC 0,1x, 0,1% (p/v) a uma temperatura igual ou superior a 65 °C. Procedeu-se à detecção dos ácidos nucleicos marcados com digoxigenina.

DETECÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS MARCADOS COM DIGOXIGENINA

Depois das lavagens após a hibridação incubou-se a membrana em tampão de lavagem (tampão de ácido maleico com Tween 20 a 0,03% (13) ou Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH=7,5 com Tween 20 a 0,3% (75)) durante 1 minuto. A membrana foi bloqueada em solução de bloqueio (reagente de bloqueio a 1% (p/v) em tampão de ácido maleico ou leite em pó magro 1 a 2% (p/v) em tampão de lavagem) durante, no mínimo, 30 minutos com agitação suave e à temperatura ambiente; diluiu-se 1:10000 o anticorpo Anti-Digoxigenina-AP em solução de bloqueio e substituiu-se a solução anterior por esta, incubando-se no máximo, durante 30 minutos nas mesmas condições. Antes de diluir o anticorpo, este foi centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos numa centrífuga "eppendorf centrifuge 5411". Desprezou-se a solução de anticorpo e lavou-se a membrana duas vezes em tampão de lavagem durante 15 minutos com agitação suave. A solução da última lavagem foi substituída por tampão de detecção (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, pH=9,5) e incubou-se a membrana durante 2 a 5 minutos. No final deste tempo removeu-se a membrana e escorreu-se brevemente o excesso de tampão; colocou-se a membrana entre duas folhas de plástico transparentes lisas (tipo capa protectora de arquivo) e aplicaram-se 500 µL de substrato quimioluminiscente (CSPD) por cada 100 cm^2 de membrana, tendo o cuidado de espalhar as gotas por toda a superfície da membrana. Sem aprisionar bolhas de ar baixou-se o plástico sobre a membrana e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente. A membrana foi vedada com um vedador térmico e colocada numa cassete de autorradiografia. Colocou-se um filme de raios-X (Agfa) e incubou-se a 37 °C durante 15 a 30 minutos. Transferiu-se para a temperatura ambiente e revelou-se passados 15 minutos a uma noite, dependendo da qualidade da imagem, do sinal e do ruído de fundo. Nas

exposições mais prolongadas fizeram-se vários tempos de exposição (15, 30 minutos e 1 hora) antes de se deixar a expor durante a noite à temperatura ambiente.

TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) ACOPLADA A PCR

Esta técnica foi utilizada para averiguar, de forma qualitativa, a presença ou ausência de transcritos relacionados com os cDNAs em estudo nos vários órgãos da batateira.

Foram utilizados oligonucleótidos específicos a 3' para cada cDNA clonado, designados T5FP1 (5'-TCA AGG GTT CCA CAG GAG GGT AGT CTC C-3'), C1AP1 (5'-TGT GCA AAC CAG AAA CAA GCG CAT CCC-3') e 14AP1 (5' TGG GCA AGA GCT TCA GCC TCA AGG-3') como iniciadores para a reacção de transcrição reversa, na qual se adicionou, num tubo de 200 µL estéril, 1 µg de RNA total, o oligonucleótido iniciador específico (2 pmole), completando-se o volume com água destilada e desionizada estéril para 15,5 µL. Aqueceu-se a mistura a 70 °C durante 10 minutos num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA" permitindo-se que a temperatura baixasse para 48 °C. Com o programa em pausa, e à temperatura de 48 °C, adicionou-se tampão de síntese da primeira cadeia (5x) para uma concentração final de 1x, DTT para uma concentração final 10 mM e dNTPs para uma concentração final de 400 µM, um volume final de 25 µL. Incubou-se nesta temperatura durante 2 minutos e adicionou-se a enzima "SuperScript II" para uma concentração final de 10 U. Removeu-se a pausa do programa e continuou-se a incubação durante 1 hora à mesma temperatura. No final deste tempo a enzima foi desnaturada por incubação a 70 °C durante 15 minutos. Os produtos resultantes da reacção foram conservados a 4 °C ou congelados a –20 °C. À excepção da água e do RNA, foram utilizados reagentes da Life Technologies (EUA).

Partindo de 2 a 3 µL de cada reacção de RT procedeu-se a uma reacção de PCR utilizando iniciadores específicos a 3' para cada cDNA com o iniciador a 5' cuja temperatura de emparelhamento melhor correspondia ao iniciador a 3' a usar. Deste modo os pares de iniciadores utilizados foram os seguintes:

cDNA	Iniciadores usados
T5F	GSF5 (5'-CCT GGA GGA GCA CAG TGA AGT GAT CC-3')
(60 °C)	T5FP2 (5'- CCC TCC CTC ATT CCT CAT GGA CTT GG-3')
C1A	GSF6 (5'- CTG GAA AGC ACG AAA CAG C-3')
(65 °C)	C1AP2 (5'- ACG ATG GTG GTT TCT GCG ATC ATG G-3')
14A	GSF1 (5'- GAA TTC TCC TGC TGG CGA GCC-3')
(65 °C)	14AP2 (5'- CAC TTA TAT GTC CCT TGT GGC GCA GGG-3')

Num tubo de 200 µL adicionou-se água destilada e desionizada estéril para um volume final de 50 µL, tendo em consideração os volumes dos outros reagentes a pipetar. A composição final da reacção de PCR foi tampão de PCR 1x, $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTPs 0,2 µM; iniciadores 0,4 µM cada; DNA (reacção RT) 2 a 3 µL e Taq DNA polimerase 1,25 U. Procedeu-se ao "Hot-start". Foram utilizados dois programas de PCR, num equipamento "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA", diferindo na temperatura de emparelhamento adequada para os pares de iniciadores utilizados e que está descrita entre parêntesis na tabela anterior. O programa utilizado foi: 94 °C – 1 minuto; 35 ciclos de 94 °C – 30 segundos, temperatura de emparelhamento – 1 minuto, 72 °C – 2 minutos; a extensão final decorreu a 72 °C durante 5 minutos. As reacções foram conservadas a 4 °C até serem processadas.

Aplicaram-se 10 a 15 µL de cada reacção num mini-gel de agarose ("Horizon" 58 – Horizontal Gel Electrophoresis System") (Life Technologies – EUA) contendo brometo de etídeo, como descrito anteriormente, e aplicou-se uma diferença de potencial de 80 V. A separação electroforética terminou quando a frente migrou até 1/3 do final do gel. A imagem foi capturada pela aplicação "Kodak Digital Science 1D" com radiação ultravioleta.

5' RACE – "Rapid Amplification of cDNA Ends"

"Rapid Amplification of cDNA Ends" é um procedimento que permite a amplificação de sequências de ácidos nucleicos a partir de uma molécula de mRNA molde que se localizam entre um local interno definido e sequências desconhecidas a 5'ou a 3' (69). O 5' RACE é uma técnica que facilita o isolamento e a caracterização de extremidades 5' de mRNAs.

Foram utilizados dois "kits" com abordagens ligeiramente diferentes: "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0" (Life Technologies, EUA) e "Marathon cDNA Amplification Kit" (Clontech, EUA).

A) – "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0"

O "kit" baseia-se na seguinte estratégia: a síntese da primeira cadeia de cDNA é feita utilizando um oligonucleótido iniciador específico com a orientação "anti-sense" (GSP1) o que permite a conversão de um mRNA específico em cDNA. Após a sua síntese há purificação do produto de iniciadores e dNTPs não incorporados e é utilizada a enzima Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT) para adicionar caudas homopoliméricas (poli-C) à extremidade 3' do cDNA. Este cDNA é usado em duas reacções de PCR com uma mistura de 3 iniciadores: um específico e mais interno (GSP2) (localizado a 3' do iniciador GSP1), e uma combinação de um iniciador que possui um homopolímero complementar à cauda homopolimérica e uma sequência a 5' que codifica uma região de ancoragem ("Abridged Anchor Primer – AAP) e o iniciador adaptador correspondente (Abridged Universal Amplification Primer – AUAP) o qual permite a amplificação a partir da cauda homopolimérica e consequentemente a amplificação das sequências desconhecidas entre o iniciador GSP2 e a extremidade 5' do mRNA. O iniciador AAP possui resíduos de deoxinosina na porção poli-G, diminuindo as probabilidades de emparelhamento incorrecto deste com sequências internas porque este resíduo, apesar de ser capaz de emparelhar com as 4 bases, tem maior afinidade com a citosina (C) o que permite aumentar a temperatura de emparelhamento na reacção de PCR.

A reacção de síntese da primeira cadeia de cDNA foi feita num tubo de 0,2 mL estéril no qual se misturou o iniciador GSP1 (T5FP1; C1AP1 ou 14AP1), 1 μg de RNA total e água destilada e desionizada estéril até 15,5 μL. Desnaturou-se a 70 °C durante 10 minutos e permitiu-se que o equipamento "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA" baixasse a temperatura para 48 °C. Adicionou-se tampão de PCR 10x (2,5 μL), $MgCl_2$ 25 mM (2,5 μL), dNTPs 10 mM (1 μL) e DTT 0,1 M (2,5 μL) e incubou-se a 48 °C durante 1 minuto, adicionou-se depois 1 μL de SuperScript II RT e incubou-se a esta temperatura durante 1 hora. Para inactivar a enzima incubou-se a 70 °C durante 15 minutos e baixou-se a temperatura para 37 °C no mesmo aparelho. Adicionou-se 1 μL de "RNase mix" e incubou-se nas mesmas condições durante 30 minutos para eliminar a cadeia de mRNA molde e ficar

com uma cadeia simples de cDNA. Colocou-se em gelo ou guardou-se a –20 °C até se proceder à purificação do cDNA.

A purificação do DNA foi feita utilizando um componente do "kit" ("GlassMax DNA Isolation Spin cartridge Purification of cDNA"). Colocou-se a equilibrar a 65 °C ≈ 100 µL de água destilada e desionizada estéril a ser usada nos passos finais do procedimento. Adicionaram-se 120 µL de solução de ligação (NaI 6 M), equilibrada à temperatura ambiente, à reacção de síntese da primeira cadeia. A mistura foi transferida para uma coluna "GlassMax Spin cartridge" e centrifugou-se durante 20 segundos a 13000 xg. Adicionou-se 0,4 volumes de tampão de lavagem 1x pré-arrefecido a 4 °C e repetiu-se a centrifugação, eliminando-se o filtrado após a centrifugação. Este passo de lavagem foi repetido 3 vezes. Lavou-se a coluna duas vezes com etanol 70% pré-arrefecido a 4 °C nas mesmas condições e, para remover o excesso de etanol, centrifugou-se a 13000 xg durante 1 minuto. Transferiu-se a coluna para um tubo colector novo e adicionou-se 50 µL de água destilada e desionizada estéril pré-aquecida a 65 °C à coluna. Centrifugou-se a 13000 xg durante 20 minutos para eluir o cDNA. Colocou-se em gelo ou guardou-se a –20 °C até se proceder à introdução da cauda homopolimérica no cDNA.

Num tubo de 1,5 mL misturaram-se água destilada e desionizada estéril (6,5 µL), tampão de reacção 5x (5 µL), dCTP 2 mM (2,5 µL) e cDNA purificado (do passo anterior) (10 µL); incubou-se a 94 °C durante 2 a 3 minutos e colocou-se em gelo; adicionou-se 1 µL da enzima TdT e incubou-se durante 10 a 20 minutos a 37 °C num banho-maria. A enzima foi inactivada no final da reacção por incubação a 65 °C durante 10 minutos. Colocou-se em gelo ou guardou-se a –20 °C até se proceder à primeira reacção de PCR.

Num tubo de 0,2 mL estéril misturaram-se água destilada e desionizada estéril (31,5 µL), tampão de PCR 10x (5 µL), $MgCl_2$ 25 mM (3 µL) dNTPs 10 mM (1 µL), iniciador GSP2 10 µM (2 µL), AAP 10 µM (2µL) e cDNA com cauda poli-C (5 µL). Colocou-se num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA" e procedeu-se à desnaturação a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C – 30 segundos, 55 °C – 1 minuto, 72 °C – 2 minutos; a extensão final decorreu ao longo de 5 minutos a 72 °C. Fez-se o "Hot-Strat". As amostras foram conservadas a 4 °C ou congeladas a –20 °C até analisadas em gel de agarose. de 25 mL de agarose (Life Technologies, EUA) a 0,8% (p/v) contendo 0,5 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL), em tampão TAE 1x. A corrida durou 1 a 2 horas a 70 - 80 V em tampão TAE 1x. Foi utilizado o equipamento "Horizon® 58 – Horizontal Gel Electrophoresis System" (Life Technologies - EUA).

Para fazer a segunda reacção de PCR procedeu-se à diluição 1:100 em TE (apêndice) da primeira reacção. Num tubo de 0,2 mL estéril misturaram-se água destilada e desionizada estéril (33,5 µL), tampão de PCR 10x (5 µL), $MgCl_2$ 25 mM (3 µL) dNTPs 10 mM (1 µL), iniciador GSP3 10 µM (2 µL), AUAP (ou UAP) 10 µM (2µL) e diluição da primeira reacção (5 µL). Colocou-se num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA" e procedeu-se à desnaturação a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C – 30 segundos, 55 °C – 1 minuto, 72 °C – 2 minutos; a extensão final decorreu ao longo de 5 minutos a 72 °C. Fez-se o "Hot-start". As amostras foram conservadas a 4 °C ou congeladas a –20 °C até analisadas em gel de agarose. de 25 mL de agarose (Life Technologies, EUA) a 0,8% (p/v) contendo 0,5 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL), em tampão TAE 1x. A corrida durou 1 a 2 horas a 70 – 80 V em tampão TAE 1x. Foi utilizado o equipamento "Horizon® 58 – Horizontal Gel Electrophoresis System" (Life Technologies - EUA). À excepção da água, do RNA e dos iniciadores, todos os reagentes foram providenciados pelo "kit".

As reacções onde ocorreu amplificação foram utilizadas para nova amplificação do DNA e separadas na totalidade em gel de agarose como acabado de descrever. As bandas foram excisadas do gel sobre observação com luz ultravioleta e o DNA purificado e quantificado. Procedeu-se à clonagem dos produtos de PCR em faguemídio PSK linearizado com *Sma*I ou com *Eco*RV e à sua caracterização.

B) – "Marathon cDNA Amplification Kit" (Clontech, EUA)

O "kit" (Clontech, EUA) inicia-se pela síntese de cDNA a partir de mRNA isolado, ao contrário do "kit" anterior que inicia-se pela síntese de cDNA a partir de RNA total, o que diminuindo assim as probabilidades de obter ruído de fundo elevado. A síntese da segunda cadeia de cDNA é feita utilizando uma mistura de enzimas contendo DNA polimerase I de *E. coli*, RNase H e DNA ligase de *E. coli*. Ocorre depois formação de extremidades não coesivas com a acção da enzima T4 DNA polimerase e a ligação do cDNA a um adaptador, o qual é fosforilado a 5' para facilitar a sua ligação a ambas as extremidades do cDNA com esta enzima. Após diluição recorre-se às reacções de PCR com o "kit" "Advantage cDNA polymerase kit" (Clontech, EUA), apoiando-se no facto de o oligonucleótido iniciador que emparelha com o adaptador só o fazer após a síntese da cadeia resultante da extensão do iniciador específico (GSP2). Os iniciadores específicos utilizados foram os mesmos escritos no procedimento de RT-PCR e caracterizam-se por possuírem um número de nucleótidos compreendido entre 23 e

28, com um T_m superior a 65 °C (70 °C ou superior). O "kit" usado para estas reacções baseia-se na reacção de PCR de longa distância permitindo a amplificação de cadeias de DNA mais compridas com baixa taxa de incorporação errada.

Num tubo de 0,5 mL, e num volume máximo de 6 µL, misturou-se 1 µg de mRNA e 1 µL de iniciador GSP1 10 µM; incubou-se a 70 °C durante 2 minutos e colocou-se em gelo durante 2 minutos. Adicionou-se tampão de síntese da primeira cadeia 5x (2 µL), dNTPs 10 mM (1 µL), Transcritase reversa AMV 20 U/µL (1 µL) e após misturar bem seguida de centrifugação breve, incubou-se a 48 °C durante 90 minutos e colocou-se em gelo. Para sintetizar a segunda cadeia de cDNA misturaram-se 48,8 µL de água destilada e desionizada estéril, 16 µL de tampão de síntese da segunda cadeia (5x), 1,6 µL de dNTPs 10 mM e 4 µL da mistura de enzimas de síntese da segunda cadeia. Misturou-se e centrifugou-se brevemente para recolher a solução no fundo do tubo; incubou-se durante 1,5 horas a 16 °C. Adicionaram-se 2 µL de T4 DNA polimerase e continuou-se a incubação por mais 45 minutos. Para terminar a síntese da segunda cadeia de cDNA adicionaram-se 4 µL de EDTA/glicogénio e 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) preparado de fresco; misturou-se com o auxílio de um vortex e centrifugou-se a 14000 rpm durante 10 minutos numa centrífuga "eppendorf centrifuge 5411". Transferiu-se a camada aquosa para um tubo estéril de 0,5 mL e adicionaram-se 100 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) preparado de fresco; misturou-se bem com um vortex e repetiu-se a centrifugação. Aproveitou-se a fase aquosa para um novo tubo estéril de 0,5 mL e adicionou-se 1/2 volume de acetato de amónio 4 M e 2,5 volumes de etanol 95%, misturando-se com um vortex. Repetiu-se a centrifugação durante 20 minutos e eliminou-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado com etanol 80% e a centrifugação repetida por 10 minutos. Depois de eliminado o sobrenadante secou-se o sedimento e ressuspendeu-se em 10 µL de água. Conservou-se em gelo ou guardou-se a –20 °C até a sua utilização.

Para fazer a reacção de ligação do adaptador pipetou-se para um tubo de 0,5 mL estéril 5 µL de cDNA, 2 µL do adaptador (10 mM), 5 µL de tampão de ligação 5x e 1 µL de T4 DNA ligase e incubou-se durante a noite a 16 °C. Para inactivar a ligase incubou-se durante 5 minutos a 70 °C. Retirou-se 1 µL desta reacção e diluiu-se em 50 µL ou em 250 µL de tampão tricina-EDTA e procedeu-se à desnaturação do DNA presente em ambas as diluições por incubação a 94 °C durante 2 minutos e rápido arrefecimento em gelo. A reacção de marcação e as respectivas diluições foram conservadas a –20 °C.

A reacção de PCR foi feita num volume final de 50 µL, com o procedimento "Hot-start" contendo os seguintes reagentes: 36 µL de água destilada e desionizada estéril, 5 µL de tampão de reacção de PCR (10x), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de iniciador AP1 (10 µM), 1 µL

de iniciador GSP2 (10 µM), 5 µL de cada diluição da reacção de marcação e 1 µL de mistura de polimerases 50x "Advantage". A reacção "touchdown" decorreu num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA" com o seguinte programa: 94 °C 30 segundos, seguido de 5 ciclos de 94 °C 5 segundos e 72 °C 4 minutos, 5 ciclos de 94 °C 5 segundos e 70 °C e 25 ciclos de 94 °C 5 segundos e 68 °C 4 minutos. No final da reacção analisaram-se 5 µL em gel de agarose. À excepção da água, do mRNA e dos iniciadores, todos os reagentes foram providenciados pelo "kit".

C) – 5' RACE por ligação directa dos híbridos cDNA-mRNA a um faguemídio

Este procedimento foi baseado na técnica descrita por (165), com algumas alterações. Basicamente consistiu numa reacção de transcrição reversa, seguida de um tratamento com RNase A para eliminar regiões não emparelhadas de RNA dos híbridos DNA:RNA, conduzindo à criação de extremidades não coesivas; purificação com fenol:clorofórmio e precipitação dos híbridos; ligação destas moléculas a um vector digerido com as enzimas *Eco*RV ou *Sma*I, (sem extremidades coesivas) e transformação de células competentes.

A reacção de transcrição reversa foi feita em tubo de 0,2 mL estéril, no qual se adicionou, para um volume final de 30 µL um iniciador específico (GSP1) para uma concentração final de 0,4 µM e RNA total para uma concentração final de 0,12 µg/µL. Desnaturou-se o RNA por incubação a 70 °C durante 10 minutos num aparelho "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, EUA"; permitiu-se que a temperatura baixasse para 48 °C e fez-se pausa no programa. Adicionou-se tampão de transcrição reversa 5x para uma concentração final de 1x, dNTPs para uma concentração final de 0,8 mM e DTT para uma concentração final de 10 mM. Depois de misturar todos os reagentes adicionaram-se 2 µL de SuperScriptII (Life Technologies, EUA) e continuou-se com o programa. Permitiu-se que a enzima actuasse durante 1 a 1,5 horas. No final da reacção desnaturou-se a enzima por incubação a 70 °C durante 10 minutos e colocou-se a 4 °C até futuro processamento.

Transferiu-se a reacção para um tubo de 1,5 mL estéril e completou-se o volume com água destilada e desionizada estéril para 100 µL. Adicionou-se RNase A para uma concentração final de 10 µg/mL e incubou-se a 37 °C durante 1 hora. Para inactivar as enzimas adicionou-se igual volume de fenol:clorofórmio (50:50) e misturou-se com o vortex. Centrifugou-se a 16000 xg durante 10 minutos e aproveitou-se a fase superior para um novo tubo. Adicionou-se igual volume de clorofórmio para eliminar o fenol ainda existente, o qual poderia interferir

com a precipitação dos ácidos nucleicos, repetiu-se a centrifugação e aproveitou-se o sobrenadante para outro tubo, determinando o seu volume. Adicionou-se 1/10 de volume de acetato de sódio 2 M e 1 volume de etanol absoluto e repetiu-se a centrifugou-se a 13000 rpm numa centrífuga "Biofuge Fresco – Heraeus Instruments" a 4 °C durante 20 minutos. Depois de eliminado o sobrenadante lavou-se o sedimento com etanol a 70% e repetiu-se a centrifugação por 5 minutos. Depois de seco ressuspendeu-se o sedimento em 6,5 µL de água destilada e desionizada estéril e procedeu-se à reacção de ligação.

Foram utilizados reagentes da "Life Technologies, EUA". Ao sedimento ressuspenso adicionou-se tampão de ligação 5x (4 µL), PSK (Stratagene, EUA) linearizado (10 ng), T4 DNA ligase (1 µL) *Eco*RV ou *Sma*I (de acordo com a enzima utilizada na linearização do PSK) (1 µL) e água até 20 µL. A reacção decorreu durante a noite a 16 °C e foi inactivada por incubação a 65 °C durante 15 minutos. Procedeu-se à transformação de células competentes de *E. coli* ou congelou-se a –20 °C.

As colónias obtidas foram utilizadas na extracção de DNA plasmídico (mini-prep) e a presença de fragmento de inserção foi averiguada por restrição com enzimas cujos locais de restrição flanqueiam o local de clonagem múltipla do vector.

Para verificar se os fragmentos de inserção correspondiam a cDNAs relacionados com a GS procedeu-se à realização de reacções de PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos da GS.

ANÁLISE DA ACUMULAÇÃO DOS POLIPEPTÍDEOS POR SDS-PAGE

Há semelhança dos ácidos nucleicos, as proteínas carregadas presentes numa solução migram quando sujeitas a um campo eléctrico. As proteínas são compostos anfotéricos, isto é, possuem resíduos de aminoácidos básicos e acídicos, sendo a sua carga total determinada pelo pH do meio onde se encontram. Nas preparações de SDS a separação das moléculas é feita com base na sua massa e não na sua carga. O SDS é um detergente aniónico que desnatura as proteínas e confere carga negativa aos polipeptídeos a qual é proporcional ao seu tamanho. Depois de tratados com este composto os polipeptídeos ficam com igual densidade de carga por unidade de comprimento, permitindo apurar a massa molecular dos polipeptídeos, quando a migração electroforética destes é comparada com padrões de massa conhecida. A electroforese usada neste trabalho baseia-se no sistema de electroforeses descontínuo descrito por (109), em que os polipeptídeos tratados são concentrados num gel concentrador antes de en-

trarem no gel separador conduzindo assim ao aumento de resolução da separação electroforética.

a) extracção de proteínas solúveis

A preparação de amostras para SDS-PAGE consistiu em homogeneizar o tecido congelado moído em tampão de homogeneização (Tris-HCl 25 mM pH=8,0; $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, glicerol 10%, Triton X-100 0,05%, Polivinilpolipirrolidona 5 a 10% (p/v)), na relação de 2 mL de tampão para 1 g de tecido; quando se usou tecido fresco utilizou-se 0,5 g de areia de quartzo por grama de tecido. O homogeneizado foi centrifugado a 750 xg durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi aproveitado para um novo tubo; centrifugou-se novamente, desta vez a 20000 xg durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi aproveitado e conservado em gelo até processado.

b) determinação do teor de proteínas solúveis presentes no extracto

Para determinar a concentração das proteínas solúveis extraídas procedeu-se à reacção de 100 µL de uma diluição do sobrenadante (1:50 a 1:100) com 1 mL de reagente de Bradford (18) cuja absorvância a 595 nm foi determinada após 15 minutos de reacção. O valor obtido foi introduzido numa recta padrão elaborada com concentrações conhecidas de BSA. Para preparar a solução concentrada de reagente de Bradford dissolveram-se 350 mg de Azul Brilhante de Coomassie G-250 em 100 mL de etanol e misturou-se 207,05 mL de ácido fosfórico 85% (p/p). A solução de trabalho deste reagente foi feita misturando 15 mL desta solução com 212 mL de água destilada e desionizada, 7,5 mL de etanol e 15,5 mL de ácido fosfórico 85% (p/p). A solução de trabalho foi filtrada e guardada na obscuridade.

c) preparação das amostras para a corrida em SDS-PAGE

A X volume de sobrenadante foi adicionado 1/5 do volume de tampão de amostra e β-mercaptoetanol para uma concentração final de 0,5%. Depois de desnaturação por fervura (2 minutos), a amostra processada foi centrifugada durante 2 minutos à velocidade máxima

numa centrífuga "eppendorf centrifuge 5411" e mantida à temperatura ambiente se aplicada no gel de imediato ou guardada a –20 °C até ser utilizada. O tampão de amostra (5x concentrado) era constituído por Tris 0,3345 M pH=6,8, glicerol 50%, SDS 5% (p/v) e azul de bromofenol 0,2% (p/v).

d) separação electroforética em gel descontínuo de SDS-PAGE

A separação electroforética foi feita em gel vertical de poliacrilamida com malha de 12,5% em unidades de electroforese SE250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). Utilizou-se um "stock" de acrilamida/bis-acrilamida comercial (30% Acrylamide/Bis Solution, BioRad) para preparar o gel de acordo com (173). Para preparar o gel separador misturou-se a quantidade de "stock" de acrilamida/bis-acrilamida necessária para obter a percentagem pretendida no gel, com Tris-HCl pH=8,8, na concentração final de 0,375 M e com SDS, para uma concentração final de 0,1% (p/v). Para iniciar a polimerização usou-se persulfato de amónio a 10% (p/v), preparado de fresco, para uma concentração final de 0,05% (p/v) e para catalisar a reacção de polimerização utilizou-se TEMED para uma concentração final de 0,025%. O gel concentrador foi preparado misturando a quantidade necessária de acrilamida/bis-acrilamida para obter um gel de malha 5% com Tris-HCl pH=6,8, na concentração final de 0,125 M e SDS na concentração final de 0,1% (p/v). Para iniciar a polimerização usou-se persulfato de amónio a 10% (p/v), preparado na altura, para uma concentração final de 0,05% (p/v) e para catalisar a reacção de polimerização utilizou-se TEMED para uma concentração final de 0,025%.

Aplicou-se igual quantidade de proteína (10 a 20 μg) por poço e procedeu-se à separação electroforética sob voltagem constante e não limitante (400 V) e a 15 mA por gel concentrador, passando a 20 mM por gel separador até a frente da migração (azul) sair completamente do gel. O tampão de electrólito utilizado era resultado da diluição de uma solução concentrada 10x composta por 20 g de Tris, 96 g de glicina e 10 g de SDS por 1000 mL de solução.

COLORAÇÃO DO GEL SDS-PAGE COM NITRATO DE PRATA

Todos os processamentos desta técnica foram executados na obscuridade e com agitação suave.

Após a electroforese o gel foi incubado três vezes durante 30 minutos numa solução contendo 30% etanol e 10% de ácido acético, ou uma vez durante a noite. Este passo teve por objectivo fixar as proteínas na sua posição final após electroforese. Seguiu-se uma lavagem em etanol 20% durante 10 minutos e uma lavagem em água destilada e desionizada durante 10 minutos. A sensibilização foi feita em tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) durante 1 minuto. Esta solução foi eliminada e o excesso de solução removido com água destilada e desionizada em duas lavagens de 20 segundos. Incubou-se o gel em nitrato de prata 0,2% (p/v) durante 30 minutos. Removeu-se o excesso de solução lavando 3 vezes com água destilada e desionizada durante 15 segundos. A revelação foi feita incubando o gel numa solução contendo formaldeído 0,0259%, carbonato de sódio 3% (p/v) e tiosulfato de sódio 0,001% (p/v) até obter a intensidade de bandas desejada. Rapidamente eliminou-se a solução de revelação e incubou-se numa solução contendo Tris 5% (p/v) e ácido acético a 2,5% durante 1 minuto para parar a revelação. Guardou-se o gel em água e na obscuridade até a aquisição da sua imagem.

COLORAÇÃO DO GEL SDS-PAGE COM AZUL DE COOMASSIE R-250

Depois de terminada a electroforese incubou-se o gel em solução de coloração (Azul brilhante de Coomassie R-250 0,125% (p/v), metanol 50% e ácido acético 10%), com agitação suave, até coloração homogénea deste. Substituiu-se esta solução por solução de descoloração (ácido acético 7% e metanol 5%) e incubou-se durante a noite com agitação suave na presença de uma esponja. A introdução da esponja na descoloração teve por objectivo capturar o corante entretanto libertado do gel durante este processo, conduzindo à diminuição das substituições de solução de descoloração. O gel foi guardado em água destilada e desionizada até ser capturada a imagem (quando necessário).

TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS DE GEL DESNATURANTE SDS-PAGE PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE

Quando uma proteína é transferida para uma membrana, ligando-se a esta, fica mais acessível aos métodos de identificação específicos, permitindo uma identificação mais fácil, rápida e sensível do que ocorreria em gel. Utilizou-se a electrotransferência como técnica de transferência por ser rápida e muito eficiente e por se basear no facto das proteínas eluírem

devido à passagem de corrente eléctrica gerada por um campo magnético uniforme sobre a superfície do gel. O pH do tampão de transferência utilizado é elevado o que permite que a maioria dos polipeptídeos fique carregada negativamente, condição essencial para que se possa executar a electroeluição. A utilização do metanol como aditivo promove a ligação dos polipeptídeos à membrana de nitrocelulose, tendo como contrapartida o facto de diminuir a eficiência de eluição destes do gel. A nitrocelulose é o suporte mais comum usado na transferência de proteínas. A ligação destas à membrana deve-se a interacções hidrofóbicas que se estabelecem quando o pH é superior a 8. Este tipo de membrana é o ideal para utilizar a maioria dos corantes de proteínas uma vez que não se ligam aos corantes aniónicos. Foram executados vários procedimentos para electrotransferir os polipeptídeos do gel para a membrana:

a) transferência líquida utilizando a unidade de transferência TE22 (Hoefer Scientific Instruments, EUA)

Durante a electroforese cortaram-se 2 pedaços de papel Whatman 3 MM com uma área ligeiramente superior à área do gel separador e membrana de nitrocelulose (0,45 μm) com a mesma área que a do gel separador e embebeu-se em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM). Finda a electroforese, destacou-se o gel concentrador e marcou-se um canto (geralmente o canto direito superior) para futuro reconhecimento da orientação do gel. Procedeu-se rapidamente à montagem da transferência, colocando sobre uma esponja embebida em tampão uma das folhas de papel 3 MM, seguindo-se a membrana (com a mesma marca e orientação que o gel), o gel e a outra folha de papel 3 MM, tendo sempre o cuidado de nunca aprisionar bolhas de ar entre as várias camadas que compunham a transferência. O conjunto foi mergulhado em tampão de transferência de modo que a membrana estivesse orientada para o polo positivo; aplicou-se uma corrente constante de 20 mA durante a noite a 14 °C, ao que se seguiu 1 hora de transferência a 200 mA nas mesmas condições. No final da transferência procedeu-se à coloração do gel com azul de Coomassie e à detecção dos polipeptídeos da GS na membrana.

b) transferência líquida utilizando a unidade de transferência Hoefer MiniVe (Hoefer Scientific Instruments, EUA)

Durante o decorrer da electroforese preparou-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%) e colocou-se a 4 °C. Prepararam-se 2 pedaços de papel Whatman 3 MM com uma área ligeiramente superior e membrana de nitrocelulose (0,45 μm) com a mesma área que a do gel separador e embebeu-se em tampão de transferência durante 5 minutos. Finda a electroforese destacou-se o gel concentrador, marcou-se a sua orientação e incubou-se em tampão de transferência durante 5 a 10 minutos para que pudessem ocorrer alterações das suas dimensões devidas ao contacto com o tampão de transferência. A montagem da transferência foi semelhante à anteriormente descrita, com a excepção de que esta é feita directamente no suporte de transferência. Depois de montada, fechou-se o suporte, encheu-se com tampão de transferência e aplicaram-se pancadas secas para libertar possíveis bolhas de ar aprisionadas nas esponjas. Colocou-se o suporte dentro da tina a qual foi cheia de água destilada e desionizada arrefecida para funcionar como acumulador do calor gerado durante a transferência. A migração das proteínas decorreu durante 2 horas a 25 V e a uma corrente não superior a 400 mA. No final da transferência procedeu-se à coloração do gel com azul de Coomassie e à detecção dos polipeptídeos da GS na membrana.

c) transferência "semi-seca"

Durante a corrida prepararam-se 6 (3 + 3) folhas de papel 3 MM e uma membrana com uma área igual à do gel as quais foram colocadas a embeber por capilaridade em tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037% (p/v), metanol 20%). Depois de terminar a electroforese destacou-se o gel concentrador e fez-se uma marca para futura orientação. A transferência foi montada sobre a placa correspondente ao ânodo, iniciando-se com 3 folhas de papel 3 MM e por cima destas a membrana (com a mesma marca e orientação que o gel), depois colocou-se o gel e por cima deste as restantes folhas de papel 3 MM, teve-se o cuidado de eliminar as bolhas de ar aprisionadas entre as várias camadas com o auxílio de uma pipeta de vidro. Colocou-se a placa correspondente ao cátodo e deu-se início à transferência que decorreu a uma voltagem inferior ou igual a 25 V e a uma corrente de 5,5 mA/cm^2 de membrana durante 1 a 2 horas num equipamento "Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell"

(BioRad). No final da transferência procedeu-se à coloração do gel com azul de Coomassie e à detecção dos polipeptídeos da GS na membrana.

IMUNODETECÇÃO DA GS EM MEMBRANAS DE NITROCELULOSE

Devido ao facto de haver ligação inespecífica das proteínas que são usadas na detecção (IgGs) à membrana, o que pode conduzir posteriormente à obtenção de sinais falsos e de elevado ruído de fundo, procedeu-se ao bloqueio da membrana, após a transferência, numa solução contendo leite em pó magro 5% (p/v) (ou BSA 3% (p/v)) à temperatura ambiente durante 1 hora ou durante a noite a 4 °C. Substituiu-se esta solução por uma igual contendo anticorpos primários anti-GS diluídos (1:1000) (43). A membrana incubou nesta solução durante 3 a 4 horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C. Lavou-se 3 vezes 10 minutos com TPBS e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C numa solução com leite em pó 0,5% (p/v) (ou BSA 0,5% (p/v)) em TPBS contendo o anticorpo secundário anti-IgG de coelho feito em cabra e conjugado com peroxidase (Vector, Reino Unido) diluído 1:1000. Lavou-se 2 vezes 10 minutos em TPBS, seguido de 2 vezes 10 minutos em PBS (apêndice). A revelação foi feita com uma solução contendo 1 mL de uma solução de 4-cloro-1-naftol 5% (p/v), em etanol absoluto, adicionada a 99 mL de PBS e à qual se adicionaram 20 µL de H_2O_2 30% imediatamente antes do uso. Alternativamente procedeu-se à revelação com uma solução contendo 50 mg de DAB (diaminobenzidina) em 100 mL de PBS à qual se adicionaram 33 µL de H_2O_2 30% imediatamente antes do uso. A revelação foi terminada substituindo a solução de revelação por água destilada e desionizada. A membrana foi conservada em água destilada e desionizada na obscuridade até ser capturada a imagem.

ANÁLISE BIDIMENSIONAL DA ACUMULAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS

A focagem isoeléctrica é uma técnica que separa as proteínas de acordo com a sua carga total ou ponto isoeléctrico. As proteínas são separadas num gradiente de pH, gerado por um campo eléctrico, de acordo com o ponto isoeléctrico, isto é, o valor de pH no qual a sua carga é nula não possuindo mobilidade electroforética.

A focagem isoeléctrica ocorre em duas etapas: a primeira consiste na formação de um gradiente de pH gerado por um campo eléctrico, num gel de baixa resistência à mobilidade

das proteínas, no qual existem compostos anfotéricos de elevada mobilidade designados anfólitos. Para gerar este gradiente os anfólitos distribuem-se no gel de acordo com os seus pontos isoeléctricos, movimentando-se para mais próximo do ânodo os mais acídicos e os mais básicos para o cátodo. Na segunda etapa ocorre a migração das proteínas de acordo com a sua carga; quando estas atingirem o seu ponto isoeléctrico no gradiente de pH, deixam de estar carregadas e termina a sua migração (94).

Para obter uma boa resolução na separação electroforética é necessário aplicar uma elevada voltagem ao longo do gradiente de pH estabelecido no gel. A manutenção de uma certa reprodutibilidade entre as várias focagens isoeléctricas pode ser conseguida tratando os extractos proteicos com um tampão de amostra contendo ureia e consequente separação das proteínas em condições desnaturantes devido à presença deste composto. A adição da separação das proteínas em gel de SDS-PAGE, após a focagem isoeléctrica, revelou ser uma técnica poderosa porque veio permitir a separação das proteínas, já separadas pelo seu ponto isoeléctrico, também pela sua massa, contribuindo para um estudo mais aprofundado dos complexos proteicos (145).

A) Primeira dimensão

Para preparar o gel da primeira dimensão misturaram-se os seguintes reagentes:

Reagentes	Quantidade
Água	2,925 mL
Acrilamida/bis-acrilamida	1,08 mL
Anfólitos (pH 3-10)	162,5 µL
Ureia	3,25 g
APS 10% (p/v)	13,54 µL
Temed	10,8 µL

A solução concentrada de Acrilamida/bis-acrilamida era constituída por 30% (p/v) de acrilamida e 1% (p/v) de bis-acrilamida.

A separação electroforética foi feita em gel vertical de 0,75 mm de espessura (SE250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments).

Para preparar o gel dissolveu-se por agitação suave e com ligeiro aquecimento a acrilamida, a água e a ureia. Depois de a ureia ter dissolvido continuou-se a agitação da solução até esta ter atingido a temperatura ambiente, tendo sido então adicionados os anfólitos (Pharmalyte, Sigma). Após adição do APS e do Temed verteu-se a mistura para o suporte e colo-

cou-se o pente bem fundo para evitar trocas gasosas com a atmosfera, de modo a ter poços com a capacidade máxima de volume. Depois de polimerizado o gel, lavou-se a região dos poços com água destilada e desionizada para remover resíduos de acrilamida e de bis-acrilamida não polimerizados e desenhou-se o perfil destes no vidro. Colocou-se geleia de petróleo na unidade de electroforese e na placa de cerâmica nas zonas de contacto para impedir o contacto entre os electrólitos durante a electroforese. Colocou-se o gel na unidade e adicionou-se a solução de católito (NaOH 20 mM, preparada de fresco) no tanque superior; aguardou-se uns minutos, para verificar se a unidade apresentava-se estanque, e adicionou-se a solução de anólito (H_3PO_4 10 mM, preparado de fresco) no tanque inferior.

As amostras foram extraídas no dia da electroforese como descrito anteriormente. Misturaram-se iguais quantidades de extracto e de tampão de amostra IEF 2x (apêndice), sonicou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente num banho (Ultrasonic bath XB6, Grant, Reino Unido) e centrifugou-se durante 1 minuto a menos de 10000 xg. As amostras (=50 µg) foram aplicadas em poços alternados, tendo sido feito um registo esquemático das aplicações. Após a aplicação das amostras aplicaram-se 150 V durante 30 minutos para fazer a pré-focagem, seguido-se 2 horas e 30 minutos a 200 V. Durante a separação monitorou-se o comportamento da migração da frente (azul) para posterior selecção das pistas a usar na segunda dimensão. No final da corrida retirou-se o vidro e os espaçadores, tendo o cuidado de fazer com que o gel ficasse preso à placa. Fez-se uma marca no gel para futura identificação e orientação e procedeu-se à sua incubação em solução de equilíbrio (β-mercaptoetanol 5%, Tris-HCl 62,5 mM pH=6,8, SDS 2,3% (p/v) e glicerol 10%) durante 15 a 30 minutos com agitação suave; eliminou-se a solução e guardou-se o gel a –80 °C até ao seu processamento.

B) <u>Segunda dimensão</u>

A segunda dimensão foi feita em gel de SDS-PAGE. Utilizou-se um pente com dois poços para carregar a pista de interesse proveniente da primeira dimensão.

Depois de o gel ter polimerizado, lavaram-se os poços com água destilada e desionizada e desenharam-se os contornos do poço maior para futura orientação da aplicação da amostra; aplicou-se o tampão de electroforese em ambos os tanques.

Retirou-se a placa contendo o gel da primeira dimensão de –80 °C e seleccionou-se a pista com a melhor migração. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi cortou-se a pista de interesse a meio dos poços adjacentes a ela, evitando que as superfícies de corte ficassem irre-

gulares. Com o auxílio de uma espátula fina, molhada em tampão de electroforese, aproximou-se a pista de interesse para perto da extremidade da placa do gel da primeira dimensão e aplicou-se a pista, na horizontal, no poço apropriado do gel da segunda dimensão.

No outro poço aplicou-se padrão de massa molecular e procedeu-se à separação electroforética como descrito anteriormente. No final da electroforese procedeu-se à transferência dos polipeptídeos e à detecção da GS em membrana de nitrocelulose.

EXTRACÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS

Pesou-se 0,15 a 0,2 g de material congelado e reduzido a pó (–80 °C) para um tubo cónico de 15 mL e adicionaram-se 7 mL de acetona 80%. Misturou-se com o auxílio de um vortex e centrifugou-se a 4500 rpm numa centrífuga SIGMA 302 durante 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo cónico novo e procedeu-se a uma diluição 1:10 em acetona 80%. Mantiveram-se os tubos sempre na obscuridade.

As diluições foram utilizadas para determinar a concentração de clorofilas a+b com base na absorvância destes pigmentos nos comprimentos de onda 645 nm e 663 nm, segundo a seguinte fórmula:

$$[\text{Clorofilas a+b}] = 8{,}02 \times Abs_{663} + 20{,}21 \times Abs_{645} \text{ (mg/L)}$$

Os valores obtidos foram processados para se expressar os resultados em mg clorofila a+b por grama de peso fresco.

EXTRACÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROLINA

Pesou-se cerca de 0,2 g de tecido homogeneizado e congelado a –80 °C para um tubo de centrífuga e adicionaram-se 2 mL de ácido 5-sulfosalicílico 3% (p/v) e misturou-se com um vortex. O homogeneizado foi centrifugado a 1600 rpm numa centrífuga SIGMA 302 durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio de tampa esmerilada e adicionaram-se 2 mL de ácido acético glacial e 2 mL de ninidrina ácida. Fez-se reagir a mistura durante 1 hora a 100 °C. Para preparar 50 mL de ninidrina ácida dissolveu-se 1,25 g de nini-

drina em 30 mL de ácido acético aquecido e adicionaram-se 20 mL de H_3PO_4 6 M; depois de preparada protegeu-se da luz e conservou-se a 4 °C até 3 dias após a sua preparação.

Depois de terminada a reacção no calor arrefeceu-se em banho de gelo e adicionaram-se 4 mL de tolueno. Promoveu-se uma agitação vigorosa com o auxílio de um vortex para aumentar a área de contacto entre o tolueno e a fase aquosa, permitindo uma passagem eficiente dos aminoácidos para a fase orgânica. Depois de separadas as duas fases transferiu-se a fase orgânica para um novo tubo e permitiu-se que a temperatura desta igualasse a temperatura ambiente. Procedeu-se à leitura no espectrofotómetro a 520 nm utilizando cuvettes de vidro.

A concentração de prolina foi intrapolada de uma recta padrão elaborada com a mesma solução de ninidrina, utilizando 2 mL de concentrações conhecidas de prolina, de acordo com o mesmo procedimento laboratorial.

3 – RESULTADOS

ISOLAMENTO DO CLONE DE cDNA POR RASTREIO DA BIBLIOTECA

Para o rastreio da biblioteca de cDNA, construída no vector λgt11 a partir da população de mRNA de folha, foi utilizada uma sonda de cDNA homóloga (T5F8.1A), que codifica uma subunidade da GS citosólica em batateira, e que foi isolada em trabalhos anteriores (190).

De uma biblioteca com o título de 5,9 x 10^{11} pfu/mL rastrearam-se 1 800 000 fagos e isolou-se um, o qual foi designado por C1A1A (figura III.1).

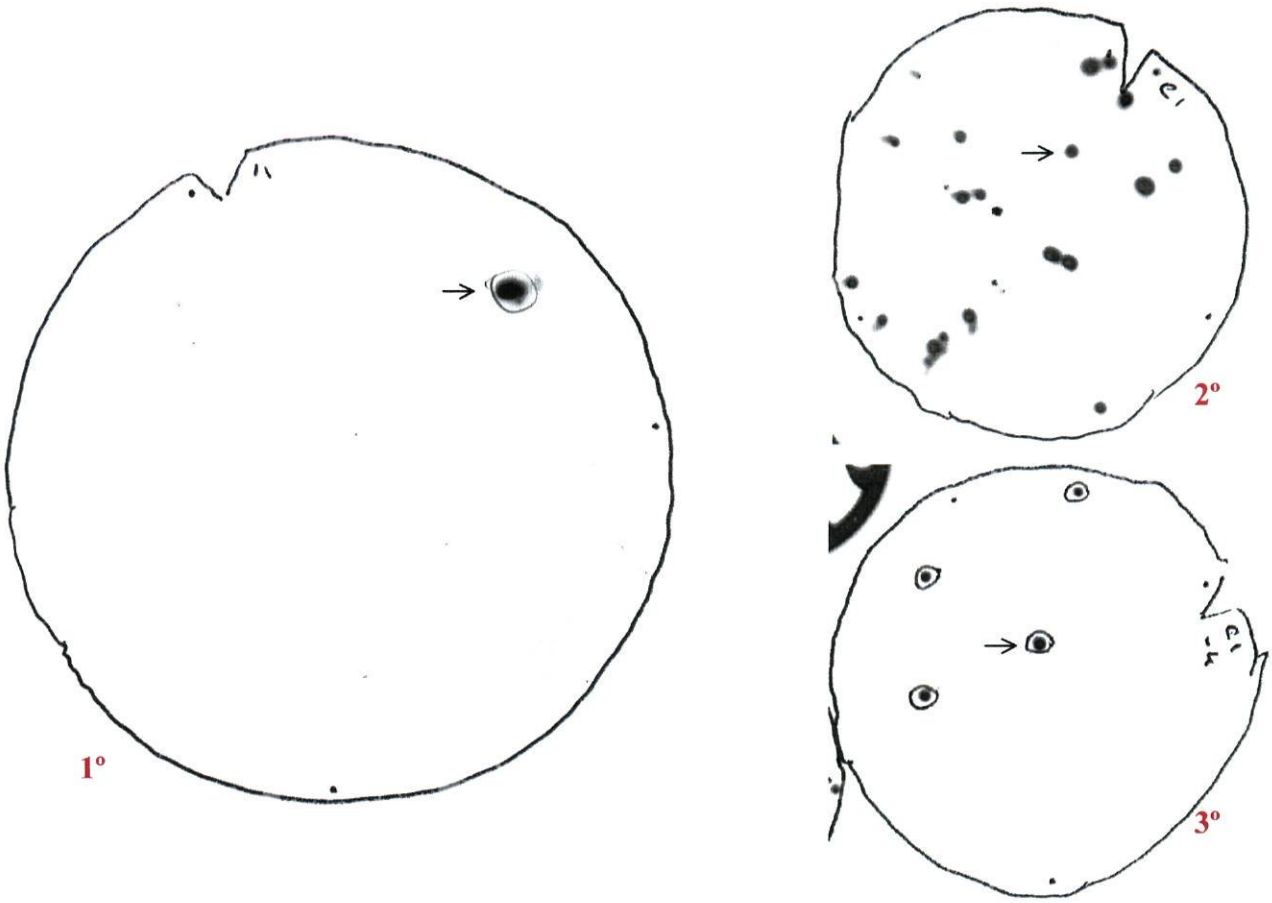


Figura III.1: Autorradiografias obtidas dos rastreios da biblioteca de cDNA λgt11 (reduzidas a 2/3 do tamanho original) no isolamento do clone de cDNA designado por C1A1A, com uma sonda homóloga (T5F8.1A) marcada com ^{32}P-dCTP. 1° - primeiro rastreio; 2° - segundo rastreio; 3° - terceiro rastreio. As setas indicam os locais de hibridação das placas fágicas seleccionadas durante o procedimento.

SUBCLONAGEM DO cDNA

O DNA fágico do clone C1A1A foi isolado e submetido a restrição dupla com as enzimas *Sfi*I e *Not*I. Após separação electroforética em gel de agarose cortou-se a banda de interesse e purificou-se o DNA nela contido. Procedeu-se à subclonagem do cDNA excisado em faguemídio pGEM11Zf(+), também submetido a restrição dupla com as mesmas enzimas. Da transformação de células competentes de *E. coli* (estirpe JM109) e plaqueamento destas, foram obtidas várias colónias recombinantes. Após extracção do faguemídio por mini-prep procedeu-se à restrição dupla deste com as mesmas enzimas de restrição e procedeu-se à análise electroforética em gel de agarose. Foi possível inferir que o cDNA isolado possuía um tamanho aproximado de 500 bp (figura III.2).

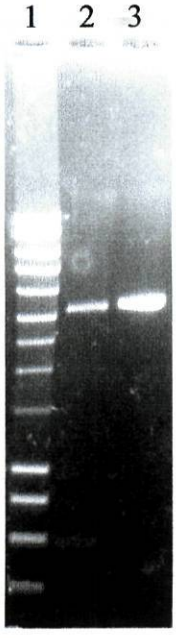


Figura III.2 – Separação electroforética dos produtos resultantes da digestão de um mini-prep do clone de cDNA C1A1A em gel de agarose 0,9% (p/v), usando TAE 1x como tampão de electroforese. Pistas: 1 – 2,5 µL de marcador de tamanho molecular ("Hyperladder", Bioline – Reino Unido); 2 – restrição do mini-prep com as enzimas *Sfi*I e *Not*I; 3 – faguemídio pGEM11Zf(+) linearizado.

EXCISÃO *in vivo* DO FAGUEMÍDIO PSK CONTENDO O cDNA T5F8.1A

Os faguemídios das colónias resultantes deste procedimento foram extraídos pela técnica de mini-prep e submetidos à análise de restrição dupla com as enzimas *Eco*RI e *Kpn*I para verificar a presença do cDNA. Após análise electroforética em gel de agarose foi possível observar que todas as colónias testadas continham o cDNA de interesse (figura III.3), apresentando este um tamanho aproximado de 1200 bp.

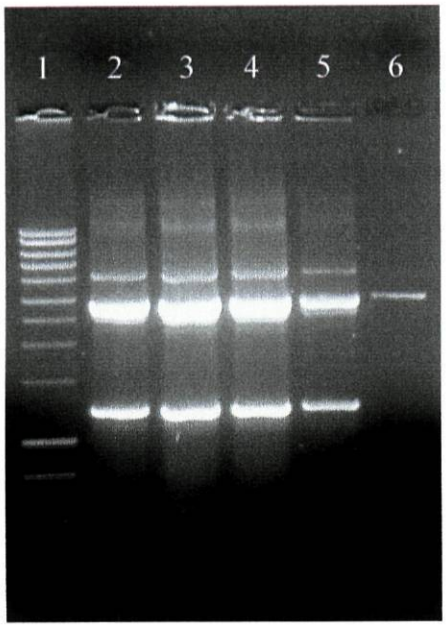


Figura III.3 – Separação electroforética dos produtos resultantes da digestão de mini-preps do clone de cDNA T5F8.1A em gel de agarose 0,8% (p/v), usando TAE 1x como tampão de electroforese. Pistas: 1 – 2,5 µL de marcador de tamanho molecular ("Hyperladder", Bioline – Reino Unido); 2 a 5– restrições dos mini-preps com as enzimas *Eco*RI e *Kpn*I; 6 – faguemídio PSK linearizado.

SEQUENCIAÇÃO DOS cDNAS

Depois de verificada a presença dos cDNAs de interesse nas colónias recombinantes isoladas procedeu-se à determinação da sua sequência nucleotídica. Para além dos oligonucleótidos iniciadores referidos na secção de Material e Métodos, os cDNAs também foram sequenciados com o auxílio dos oligonucleótidos iniciadores apresentados no quadro seguinte:

Nome	Sequência (5'∏3')	cDNA
GSF1	gaa ttc tcc tgc tgg cga gcc	T5F8.1A
GSF2	aat tga ggg tga ctg gaa cgg tgc	T5F8.1A
GSF4	atg atg gtt cta gca cag gtc aag c	T5F8.1A
GSF5	cct gga gga gca cag tga agt gat cc	T5F8.1A
GSF6	ctg gaa agc acg aaa cag c	C1A1A / T5F8.1A
GSR1	gaa ttc tgt gag cac ctg cac c	T5F8.1A
GSR2	ttg gat cga gtg aga gga caa ctc c	T5F8.1A
GSR4	tcc tgg cat aac ctc tcc g	T5F8.1A
GSR6	aac acg gac aga tgc acc acg	C1A1A / T5F8.1A

As sequências de nucleótidos obtidas para os cDNAs T5F8.1A e C1A1A estão representadas nas figuras III.4 e III.5.

```
    Ser Gly Pro Val Asp Asp Pro Ser Lys Leu Pro Lys Trp Asn Tyr Asp Gly     17
  1 TCT GGT CCT GTT GAT GAT CCT TCA AAG CTT CCC AAA TGG AAT TAT GAT GGT
    Ser Ser Thr Gly Gln Ala Pro Gly Glu Asp Ser Glu Val Ile Leu Tyr Pro     34
 52 TCT AGC ACA GGT CAA GCT CCT GGA GAA GAC AGT GAA GTG ATC CTA TAT CCT
    Gln Ala Ile Phe Lys Asp Pro Phe Arg Arg Gly Asn Asn Ile Leu Val Ile     51
103 CAA GCA ATT TTC AAG GAT CCA TTC AGG AGG GGC AAC AAT ATC CTG GTC ATC
    Cys Asp Cys Tyr Thr Pro Ala Gly Glu Pro Ile Pro Thr Asn Lys Met Cys     68
154 TGT GAT TGT TAC ACC CCA GCT GGT GAA CCA ATT CCA ACA AAC AAG ATG TGT
    His Asn Ala Ala Lys Ile Phe Ser Asn Pro Asp Val Val Val Glu Glu Pro     85
205 CAC AAT GCT GCT AAA ATA TTT AGT AAC CCT GAT GTT GTT GTT GAG GAA CCA
    Trp Tyr Gly Leu Glu Ala Glu Tyr Thr Leu Leu Gln Arg Arg Asn Tyr Trp    102
256 TGG TAT GGT CTT GAA GCA GAA TAC ACC TTG CTA CAA AGA AGG AAT TAC TGG
    Pro Leu Gly Trp Pro Ile Gly Gly Phe Pro Gly Leu Gln Gly Pro Tyr Tyr    119
307 CCT CTT GGA TGG CCT ATT GGT GGT TTT CCT GGA TTA CAG GGA CCA TAC TAC
    Cys Gly Ile Gly Ser Gly Lys Ala Phe Gly Arg Asp Ile Val Asp Ala His    136
358 TGT GGA ATT GGA TCT GGA AAG GCT TTT GGA CGC GAT ATT GTT GAT GCT CAT
    Tyr Lys Ala Tyr Ile Tyr Ala Gly Ile Asn Ile Ser Gly Ile Asn Gly Glu    153
409 TAC AAG GCA TAT ATC TAT GCC GGG ATT AAC ATT AGT GGT ATC AAC GGA GAA
    Val Met Pro Gly Gln Trp Glu Phe Gln Val Gly Leu Gln Val Gly Ile Ala    170
460 GTG ATG CCT GGA CAG TGG GAA TTT CAA GTT GGT CTT CAA GTT GGC ATT GCA
    Ser Gly Asp Glu Val Trp Ala Ala Arg Tyr Ile Leu Glu Arg Ile Thr Glu    187
511 TCA GGT GAC GAA GTG TGG GCA GCT CGT TAC ATT CTC GAG AGG ATT ACA GAG
    Ile Ala Gly Val Val Val Ser Phe Asp Pro Lys Pro Ile Pro Gly Asp Trp    204
562 ATT GCT GGA GTT GTC GTG TCA TTC GAC CCC AAA CCT ATT CCG GGC GAC TGG
    Asn Gly Ala Gly Ala His Thr Asn Tyr Ser Thr Lys Ser Met Arg Asn Glu    221
613 AAT GGT GCA GGA GCG CAT ACA AAT TAC AGT ACC AAG TCC ATG AGG AAT GAG
    Gly Gly Tyr Glu Val Ile Lys Lys Ala Ile Glu Lys Leu Gly Leu Arg His    238
664 GGA GGG TAT GAA GTT ATC AAG AAG GCT ATT GAG AAG CTT GGA CTT AGG CAC
    Lys Glu His Ile Ala Ala Tyr Gly Glu Gly Asn Glu Arg Arg Leu Thr Gly    255
715 AAG GAG CAC ATT GCA GCA TAT GGT GAA GGC AAT GAA CGT CGT CTC ACT GGA
    Lys His Glu Thr Ala Asp Ile Asn Thr Phe Lys Trp Gly Val Ala Asn Arg    272
766 AAG CAC GAA ACA GCT GAC ATC AAC ACG TTC AAA TGG GGT GTT GCA AAT CGT
    Gly Ala Ser Ile Arg Val Gly Arg Asp Thr Glu Lys Glu Gly Lys Gly Tyr    289
817 GGT GCA TCC ATT CGT GTG GGA AGA GAC ACG GAG AAG GAA GGC AAG GGA TAC
    Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ala Ser Asn Met Asp Pro Tyr Ile Val Thr Ser    306
868 TTT GAG GAC AGG AGG CCT GCA TCG AAC ATG GAT CCA TAC ATC GTG ACC TCT
    Met Tyr Ala Glu Thr Thr Leu Leu Trp Asn Pro Stop                       317
919 ATG TAC GCG GAG ACT ACC CTC CTG TGG AAC CCT TGA ACGCGTATGGGATGAATAT
974 TCTCGGGGGTGCAAACATATGAGGAAAGAATTGAATTTCTTAACAGGCCCTTTCCTCACATGTCCTT
1041 AAGAGAGTTATGTAGCTAGTAATTTTGATATATTATGTTGTTTTCTAAGTTTCAATTTGTATTGTAC
1108 TCAGCAAGCCTGAGTTCATTGGCCAAAATCGATTTGGCAATGTTGTTAAAAATAAGAGTTTTAATCT
1175 TATTAATAACAATATGGAAGGGTTTAACTTAAAAAAAAAA
```

Figura III.4: Sequência nucleotídica do cDNA T5F8.1A, relativa a uma subunidade citosólica da GS, e sua tradução. Rectângulos – regiões aminoacídicas conservadas das GS: rosa – região I; azul – região II; verde – região III e cor de laranja – região IV. Letras coloridas – aminoácidos conservados nas GS e seu códão respectivo: vermelho – cisteínas conservadas; amarelo – histidina conservada. A sublinhado estão assinalados os possíveis sinais de poliadenilação. A numeração lateral direita é relativa ao último resíduo de aminoácido da respectiva linha; a numeração lateral esquerda é relativa à primeira base azotada da respectiva linha.

Na figura III.4 está representada a sequência nucleotídica do cDNA T5F8.1A. Os 1215 nucleótidos codificam um polipeptídeo da GS com 317 resíduos de aminoácidos. Após o códão STOP (posição 955) surgem 250 nucleótidos na região 3' não traduzida, seguidos de uma cauda poli-A. É possível observar as quatro regiões aminoacídicas conservadas entre as subunidades da GS, as quais se apresentam delineadas por rectângulos. Para além destas regiões, é ainda possível identificar dois dos três resíduos de cisteína conservados nas subunidades da GS de várias espécies (vermelho) e o resíduo conservado da histidina (em fundo amarelo), que se crê ser de extrema importância na ligação do glutamato ao centro activo da enzima, localizado no segmento III.

Os mRNAs de GS normalmente não possuem como sinal de poliadenilação a sequência AAUAAA, localizada a 10-30 bases a montante do local de poliadenilação em quase todos os mRNAs de eucarióticos; mas podem possuir variantes desta sequência, sendo as mais comuns as sequências AAUAAU/C (66). A sequência AAUAU também foi referida como sinal de poliadenilação por (121), surgindo no mRNA da GS2 de feijoeiro. Existem dois motivos que poderão ser hipotéticos sinais de poliadenilação no clone T5F8.1A (a sublinhado na figura): um inicia-se na posição 970 (AATAT) e o outro na posição 1180 (AATAAC). A 5' da região conservada I não é identificado o códão de iniciação ATG, indicativo de que o cDNA é incompleto nesta extremidade.

```
    Leu Gly Leu Lys His Lys Glu His Ile Ala Ala Tyr Gly Glu Gly Asn Glu     17
  1 CTT GGC CTG AAG CAC AAA GAA CAC ATT GCT GCA TAT GGT GAA GGC AAT GAG
    Arg Arg Leu Thr Gly Lys His Glu Thr Ala Asn Ile Asn Thr Phe Lys Trp     34
 52 CGT CGT CTC ACT GGA AAG CAC GAG ACA GCC AAC ATC AAC ACC TTC AAA TGG
    Gly Phe Ala Asn Arg Gly Ala Ser Val Arg Val Gly Arg Asp Thr Glu Lys     51
103 GGG TTT GCA AAC CGT GGT GCA TCT GTC CGT GTT GGA AGA GAC ACA GAG AAG
    Ala Gly Lys Gly Tyr Phe Glu Asp Arg Pro Ala Ser Asn Met Asp Pro Tyr     68
154 GCA GGC AAG GGA TAC TTT GAG GAC AGG CCA GCC TCA AAT ATG GAC CCA TAC
    Val Val Thr Ser Met Ile Ala Glu Thr Thr Ile Val Gly Stop               81
205 GTC GTT ACC TCC ATG ATC GCA GAA ACC ACC ATC GTC GGT TAA CCTTGAAGACA
258 TTTTACTATGGATGGCTCGGGGGATCGCTTGTTTCTGGTTTGCACAATTTGGGATAGGAGAAAAGAT
325 TGAATTGTGGAACGACCCTTTCGACTTCACCTGTGTTAATTTTTAGTTATAGGGGTAGATTGTCTCT
392 TGTTATTTTTCTGTTTATTTGCCAGTTGAATTGTATTTTCATACAGCAAGGCCTTATACATTGTCAT
459 TGATTTGGCAATGCTGTGTTACAAAACAATGTTATTCTTATTAATAACAAAGATAATGAAAGGGTTT
526 GATTCTATTGCTCAAAAAAAAAAAA
```

Figura III.5: Sequência nucleotídica do cDNA C1A1A, relativa a uma subunidade citosólica da GS e sua tradução. Rectângulo cor de laranja – região aminoacídica conservada IV das GS. A sublinhado está assinalado o possível sinal de poliadenilação. A numeração lateral direita é relativa ao último resíduo de aminoácido da respectiva linha; a numeração lateral esquerda é relativa à primeira base da respectiva linha.

Na figura III.5 representa-se a sequência nucleotídica do cDNA C1A1A. Os 553 nucleótidos codificam um polipeptídeo da GS com 81 resíduos de aminoácidos. Não obstante o seu tamanho reduzido, é possível identificar a região conservada IV (delimitada por um rectângulo). Após o códão STOP (posição 247) surgem 305 nucleótidos na região 3' não traduzida, seguidos de uma cauda poli-A. É possível identificar um motivo AATAAC na posição 502 que poderá corresponder a um possível sinal de poliadenilação (sublinhado na figura). Este cDNA não possui um códão de iniciação a 5', indicando que este é incompleto nesta extremidade.

Em ambos os cDNAs não existe a região de 16 resíduos de aminoácidos localizados na extremidade C-terminal, característicos das subunidades plastidiais de GS, indicativo de se tratarem de cDNAs relacionados com subunidades citosólicas desta enzima.

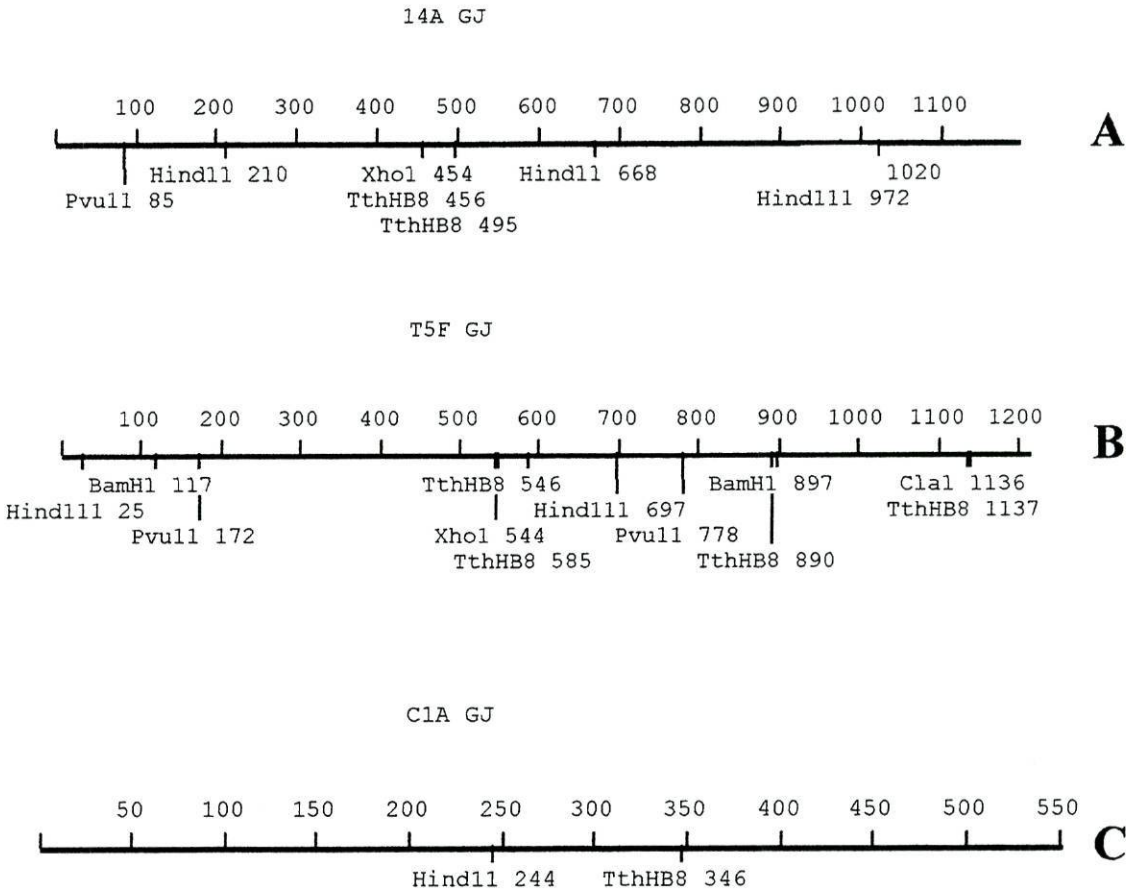


Figura III.6: Mapas de restrição dos cDNAs 14A1.2 (A), T5F8.1A (B) e C1A1A (C), baseados na sequência nucleotídica. A barra horizontal representa o cDNA. Os números localizados na parte superior da barra representam pares de bases (bp).

Da análise dos mapas de restrição dos cDNAs em estudo (figura III.6) é possível observar que estes são diferentes, não só devido aos locais de reconhecimento de algumas enzimas que diferem na sua posição (*Hind*II; *Hind*III, *Tth*HB8, *Xho*I), como também devido ao facto de alguns locais de restrição apenas aparecerem num dos cDNAs e nos outros não (*Bam*HI, *Cla*I, *Pvu*I, *Pvu*II). Estas observações sugerem que os cDNAs em estudo são únicos e provenientes de mRNAs diferentes.

ANÁLISE DE HOMOLOGIAS

As sequências nucleotídicas e aminoacídicas destes clones foram analisadas comparativamente com sequências de subunidades da GS de outros organismos utilizando o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Tool) o qual foi desenvolvido para encontrar alinhamentos óptimos, locais, entre pares de sequências (3). Este algoritmo permite comparar

óptimos, locais, entre pares de sequências (3). Este algoritmo permite comparar uma sequência de aminoácidos ou de nucleótidos fornecida pelo utilizador ("query") com sequências de aminoácidos ou de nucleótidos presentes em bases de dados. A aplicação encontra-se disponível no endereço: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, da Internet.

Os 20 resultados máximos obtidos encontram-se representados nas tabelas seguintes.

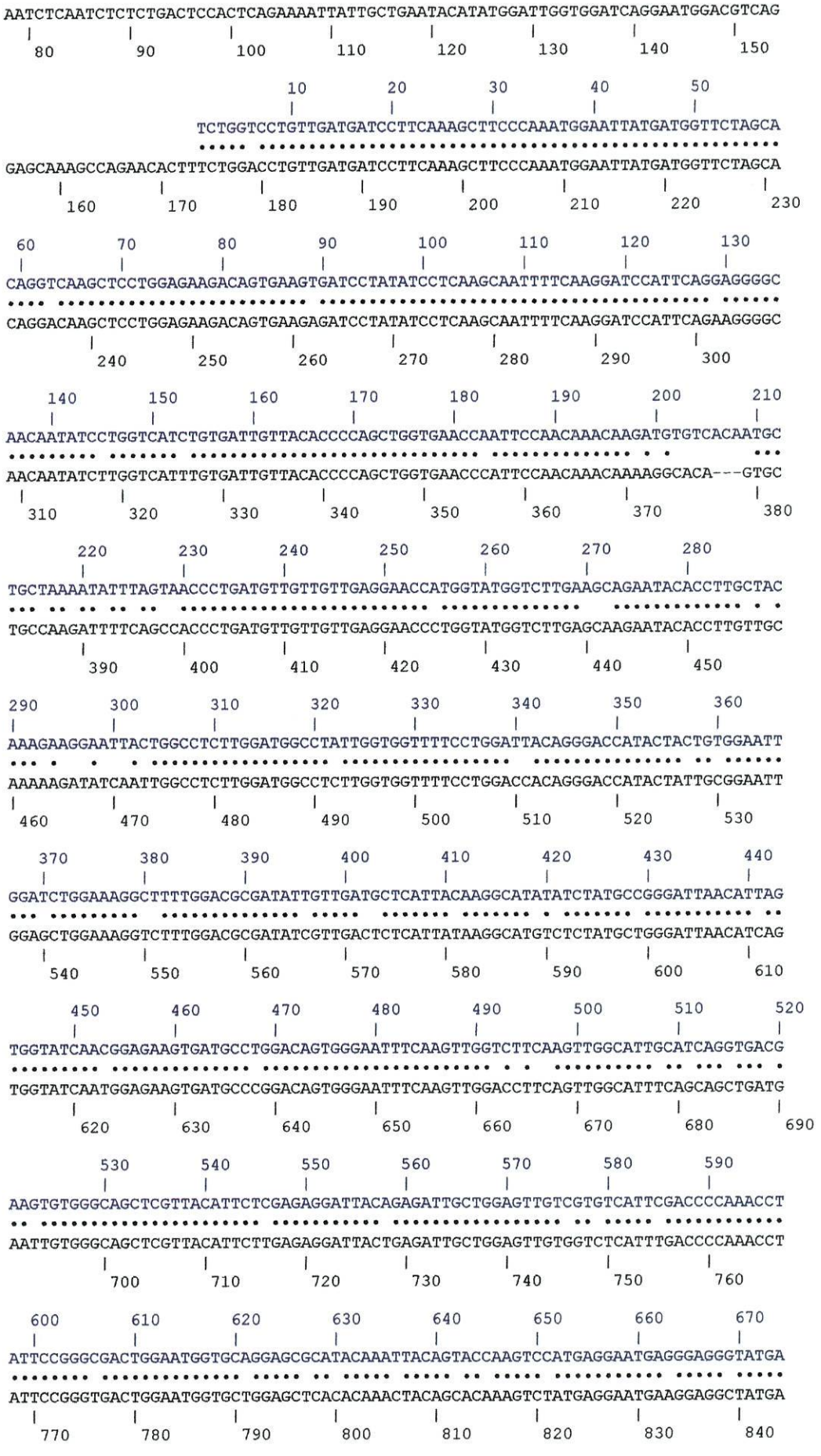
Tabela III.1: Resultados da comparação nucleotídica do cDNA do clone T5F8.1A

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
emb|X95932|NTGLN15GN N.tabacum mRNA for glutamine synthetas...	1027	0.0
gb|M19055|TOBCPGS N.plumbaginifolia chloroplast glutamine s...	622	e-176
emb|X95933|NTGLN13GN N.tabacum mRNA for glutamine synthetas...	581	e-163
gb|U14754|LEU14754 Lycopersicon esculentum glutamine synthe...	430	e-118
emb|X04002|PVGSR2 Phaseolus vulgaris mRNA (pR-2) for glutam...	329	1e-87
emb|X60092|LSGLUSYN L.sativa mRNA for glutamine synthetase	315	2e-83
emb|Y12459.1|BNGSR12 Brassica napus mRNA for cytosolic glut...	301	3e-79
emb|X94299.1|LJCYTGLSY L.japonica mRNA for cytosolic glutam...	301	3e-79
dbj|D25325|RADGS1BB Raphanus sativus mRNA for glutamine syn...	272	2e-70
emb|X94321|VVGS2 V.vinifera mRNA for cytosolic glutamine sy...	272	2e-70
emb|X04001|PVGSR1 Phaseolus vulgaris mRNA (pR-1) for glutam...	266	1e-68
emb|X94320|VVGS1 V.vinifera mRNA for cytosolic glutamine sy...	262	2e-67
gb|AF003197|AF003197 Hevea brasiliensis glutamine synthetas...	254	5e-65
gb|U15591|MSU15591 Medicago sativa cytosolic glutamine synt...	252	2e-64
gb|S46513|S46513 cytosolic glutamine synthetase [Glycine ma...	252	2e-64
emb|Y08681|AGGLN1 A.glutinosa mRNA for glutamine synthetase	242	2e-61
gb|AF019559|AF019559 Daucus carota clone CGS102 cytosolic g...	240	8e-61
emb|X76736.1|BNGLUTS B.napus mRNA for cytosolic glutamine s...	240	8e-61
gb|AF005032.1|AF005032 Helianthus annuus cytosolic glutamin...	230	8e-58
gb|AF145481.1|AF145481 Mesembryanthemum crystallinum cytoso...	228	3e-57

Tabela III.2: Resultados da comparação aminoacídica do clone T5F8.1A

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
sp|P14656|GLN3_ORYSA GLUTAMINE SYNTHETASE SHOOT ISOZYME (GL...	597	e-171
sp|P51119|GLN2_VITVI GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME...	596	e-170
sp|P51118|GLN1_VITVI GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME...	595	e-170
sp|P32289|GLNA_VIGAC GLUTAMINE SYNTHETASE NODULE ISOZYME (G...	595	e-170
sp|P04771|GLN2_PHAVU GLUTAMINE SYNTHETASE PR-2 (ISOZYME ALP...	593	e-169
sp|P12424|GLNA_NICPL GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	592	e-169
sp|P38561|GLN3_MAIZE GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME 3 (G...	592	e-169
sp|P04770|GLN1_PHAVU GLUTAMINE SYNTHETASE PR-1 (ISOZYME BET...	591	e-169
sp|P00965|GLN3_PHAVU GLUTAMINE SYNTHETASE N-1 (ISOZYME GAMM...	591	e-169
sp|P07694|GLN1_PEA GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME (GLUTA...	587	e-168
sp|Q43066|GLN4_PEA GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME B (GLU...	586	e-167
sp|P23712|GLNA_LACSA GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	586	e-167
sp|O04867|GLN1_ALNGL GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	585	e-167
sp|P38562|GLN4_MAIZE GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME 4 (G...	584	e-167
sp|P52782|GLNA_LUPLU GLUTAMINE SYNTHETASE NODULE ISOZYME (G...	583	e-166
sp|P04078|GLNA_MEDSA GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	583	e-166
sp|P14654|GLN1_ORYSA GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME (GLU...	582	e-166
sp|P24099|GLN1_SOYBN GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME...	576	e-164
sp|P38559|GLN1_MAIZE GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME 1 (G...	573	e-163
sp|P38563|GLN5_MAIZE GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME 5 (G...	572	e-163
sp|Q06378|GLN3_HORVU GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	571	e-163

A comparação das sequências de nucleótidos e de aminoácidos do cDNA T5F8.1A com sequências da base de dados revelou uma homologia elevada com cDNAs que codificam subunidades citosólicas da GS de plantas. A nível nucleotídico verifica-se que os 4 primeiros resultados recaem sobre espécies da família *SOLANACEAE*.



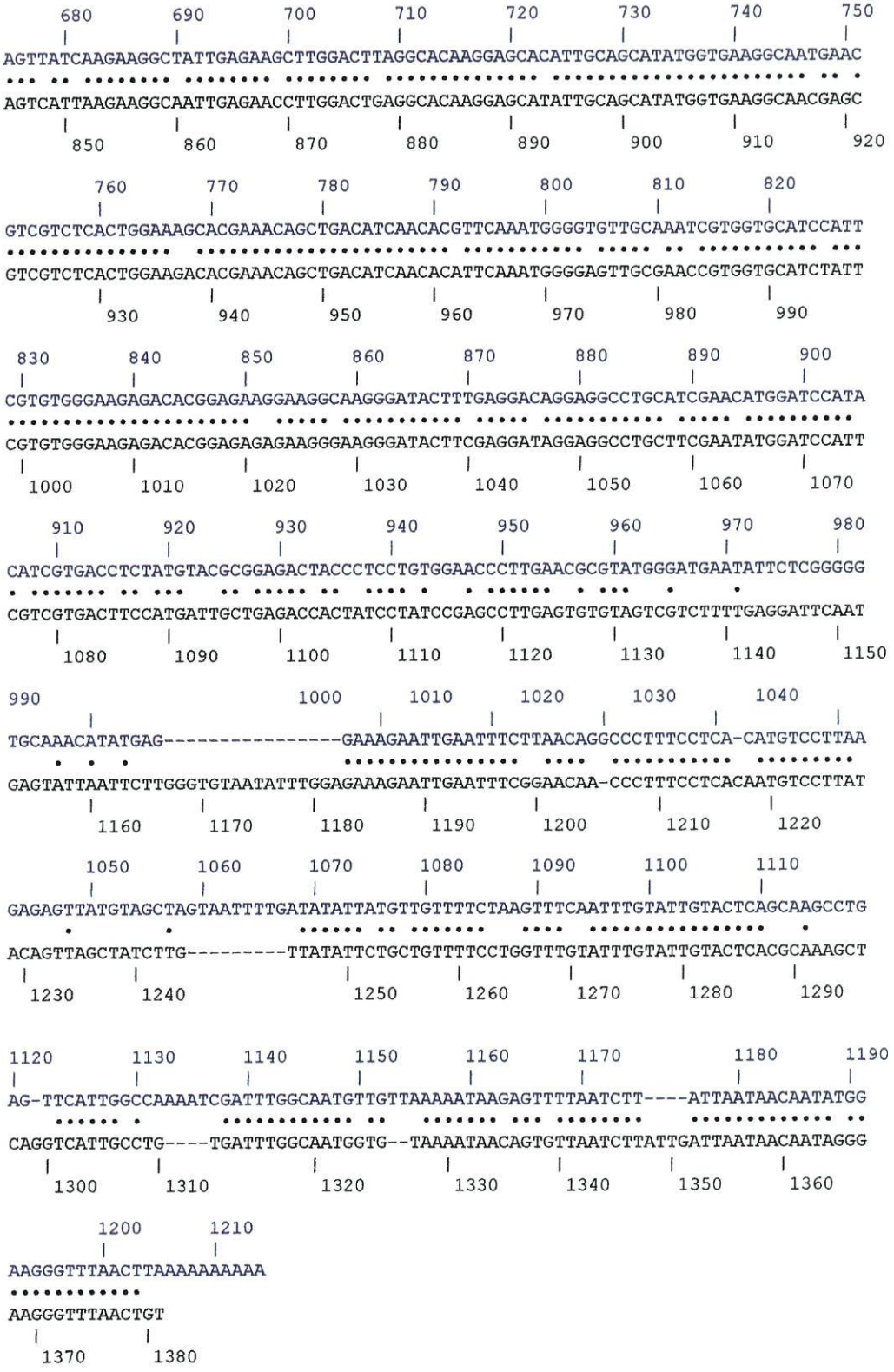


Figura III.7 – Alinhamento optimizado das sequências de cDNA T5F8.1.A (sequência de cima e a azul) e NTGLN15GN (sequência de baixo) que codifica uma subunidade da GS1 (*gln1-5*) em *Nicotiana tabacum*. Os pontos (•) indicam conservação de nucleótidos entre as duas sequências. Os números representam as posições dos nucleótidos em cada uma das sequências.

Pelo alinhamento das sequências cDNA T5F8.1A e NTGLN15GN (51) (figura III.7) é possível verificar que a homologia inicia-se ao nível do nucleótido 174 da sequência de *N. tabacum*.

Estes resultados sugerem que o cDNA T5F8.1A codifica parte de uma subunidade citosólica da GS em batateira, encontrando-se truncado a 5' e não possuindo a sequência não traduzida a 5', nem a região que codifica a porção N-terminal. Por comparação com esta sequência estima-se que o clone de cDNA isolado corresponda a 88,98% deste clone.

```
sp|P14656|GLN3_ORYSA GLUTAMINE SYNTHETASE SHOOT ISOZYME (GLUTAMATE--AMMONIA LIGASE)
         (CLONE LAMBDA-GS28)
         Length = 356

 Score =  597 bits (1523), Expect = e-171
 Identities = 273/317 (86%), Positives = 296/317 (93%), Gaps = 1/317 (0%)

Query: 1   SGPVDDPSKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVICDCYTPAGE 60
           SGPV DPSKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFR+GNNILV+CDCYTPAGE
Sbjct: 41  SGPVTDPSKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRKGNNILVMCDCYTPAGE 100

Query: 61  PIPTNKMCHNAAKIFSNPDVVVEEPWYGLEAEYTLLQRRNYWPLGWPIGGFPGLQGPYYC 120
           PIPTNK  HNAAKIFS+P+V  EEPWYG+E EYTLLQ+   WPLGWP+GGFPG QGPYYC
Sbjct: 101 PIPTNKR-HNAAKIFSSPEVASEEPWYGIEQEYTLLQKDINWPLGWPVGGFPGPQGPYYC 159

Query: 121 GIGSGKAFGRDIVDAHYKAYIYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGLQVGIASGDEVWAARY 180
           GIG+ K+FGRDIVD+HYKA +YAGINISGINGEVMPGQWEFQVG  VGI++GD+VW ARY
Sbjct: 160 GIGADKSFGRDIVDSHYKACLYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSVGISAGDQVWVARY 219

Query: 181 ILERITEIAGVVVSFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTKSMRNEGGYEVIKKAIEKLGLRHKE 240
           ILERITEIAGVVVSFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTKSMRN+GGYE+IK AIEKL LRHKE
Sbjct: 220 ILERITEIAGVVVSFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTKSMRNDGGYEIIKSAIEKLKLRHKE 279

Query: 241 HIAAYGEGNERRLTGKHETADINTFKWGVANRGASIRVGRDTEKEGKGYFEDRRPASNMD 300
           HI+AYGEGNERRLTG+HETADINTF WGVANRGAS+RVGR+TE+ GKGYFEDRRPASNMD
Sbjct: 280 HISAYGEGNERRLTGRHETADINTFSWGVANRGASVRVGRETEQNGKGYFEDRRPASNMD 339

Query: 301 PYIVTSMYAETTLLWNP 317
           PYIVTSM AETT++W P
Sbjct: 340 PYIVTSMIAETTIIWKP 356


sp|P51119|GLN2_VITVI GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME 2 (GLUTAMATE--AMMONIA
         LIGASE)
         Length = 356

 Score =  596 bits (1520), Expect = e-170
 Identities = 275/317 (86%), Positives = 295/317 (92%), Gaps = 1/317 (0%)

Query: 1   SGPVDDPSKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVICDCYTPAGE 60
           SGPV DP KLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILV+CD YTPAGE
Sbjct: 41  SGPVSDPHKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVMCDTYTPAGE 100

Query: 61  PIPTNKMCHNAAKIFSNPDVVVEEPWYGLEAEYTLLQRRNYWPLGWPIGGFPGLQGPYYC 120
           PIPTNK  HNAAKIFS+P+V+ EE WYG+E EYTLLQ    WP+GWP+GG+PG QGPYYC
Sbjct: 101 PIPTNKR-HNAAKIFSHPEVLAEETWYGIEQEYTLLQNSVKWPIGWPVGGYPGPQGPYYC 159

Query: 121 GIGSGKAFGRDIVDAHYKAYIYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGLQVGIASGDEVWAARY 180
           GIG+ KAFGRDIVD+HYKA +YAGINISGINGEVMPGQWEFQVG  VGI++GDE+W ARY
Sbjct: 160 GIGADKAFGRDIVDSHYKACLYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPAVGISAGDELWVARY 219

Query: 181 ILERITEIAGVVVSFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTKSMRNEGGYEVIKKAIEKLGLRHKE 240
           ILERITEIAGVVVSFDPKPI GDWNGAGAHTNYSTKSMRN+GGYE+IKKAIEKLGLRHKE
Sbjct: 220 ILERITEIAGVVVSFDPKPIQGDWNGAGAHTNYSTKSMRNDGGYEIIKKAIEKLGLRHKE 279

Query: 241 HIAAYGEGNERRLTGKHETADINTFKWGVANRGASIRVGRDTEKEGKGYFEDRRPASNMD 300
           HIAAYGEGNERRLTG+HETADINTF WGVANRGASIRVGRDTEKEGKGYFEDRRPASNMD
Sbjct: 280 HIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFLWGVANRGASIRVGRDTEKEGKGYFEDRRPASNMD 339
```

```
Query: 301 PYIVTSMYAETTLLWNP 317
          PY+VTSM AE+T+LW P
Sbjct: 340 PYVVTSMIAESTILWKP 356
```

sp|P51118|GLN1_VITVI GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME 1 (GLUTAMATE--AMMONIA LIGASE)
Length = 356

```
Score =  595 bits (1518), Expect = e-170
Identities = 274/317 (86%), Positives = 295/317 (92%), Gaps = 1/317 (0%)

Query: 1   SGPVDDPSKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVICDCYTPAGE 60
           SGPV DP+KLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILV+CD YTPAGE
Sbjct: 41  SGPVSDPAKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVMCDTYTPAGE 100

Query: 61  PIPTNKMCHNAAKIFSNPDVVVEEPWYGLEAEYTLLQRRNYWPLGWPIGGFPGLQGPYYC 120
           PIPTNK C NAAKIFS+PDV  E PWYG+E EYTLLQ+   WP+GWP+GGFPG QGPYYC
Sbjct: 101 PIPTNKRC-NAAKIFSHPDVAAEVPWYGIEQEYTLLQKEVKWPIGWPVGGFPGPQGPYYC 159

Query: 121 GIGSGKAFGRDIVDAHYKAYIYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGLQVGIASGDEVWAARY 180
           GIG+ KA+GRDIVDAHYKA +YAGINISGINGEVMPGQWE+QVG  VGI++GDE+W +RY
Sbjct: 160 GIGADKAWGRDIVDAHYKACLYAGINISGINGEVMPGQWEYQVGPSVGISAGDELWVSRY 219

Query: 181 ILERITEIAGVVVSFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTKSMRNEGGYEVIKKAIEKLGLRHKE 240
           ILERITEIAGVV+SFDPKPI GDWNGAGAHTNYSTKSMRN+GG+EVIKKAIEKLGLRHKE
Sbjct: 220 ILERITEIAGVVLSFDPKPIQGDWNGAGAHTNYSTKSMRNDGGFEVIKKAIEKLGLRHKE 279

Query: 241 HIAAYGEGNERRLTGKHETADINTFKWGVANRGASIRVGRDTEKEGKGYFEDRRPASNMD 300
           HIAAYGEGNERRLTG+HETADINTF WGVANRGASIRVGRDTEK GKGYFEDRRPASNMD
Sbjct: 280 HIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFLWGVANRGASIRVGRDTEKAGKGYFEDRRPASNMD 339

Query: 301 PYIVTSMYAETTLLWNP 317
           PY+VTSM AETT+LW P
Sbjct: 340 PYVVTSMIAETTILWKP 356
```

sp|P32289|GLNA_VIGAC GLUTAMINE SYNTHETASE NODULE ISOZYME (GLUTAMATE--AMMONIA LIGASE) (GS)
Length = 356

```
Score =  595 bits (1518), Expect = e-170
Identities = 275/316 (87%), Positives = 293/316 (92%), Gaps = 1/316 (0%)

Query: 2   GPVDDPSKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVICDCYTPAGEP 61
           GPV DPSKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVI+YPQAIFKDPFRRGNNILV+CD YTPAGEP
Sbjct: 42  GPVSDPSKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVIIYPQAIFKDPFRRGNNILVMCDAYTPAGEP 101

Query: 62  IPTNKMCHNAAKIFSNPDVVVEEPWYGLEAEYTLLQRRNYWPLGWPIGGFPGLQGPYYCG 121
           IPTNK  HNAAKIFS+PDVV EEPWYG+E EYTLLQ+   WPLGWP+GGFPG QGPYY CG
Sbjct: 102 IPTNKR-HNAAKIFSHPDVVAEEPWYGIEQEYTLLQKDVNWPLGWPVGGFPGPQGPYYCG 160

Query: 122 IGSGKAFGRDIVDAHYKAYIYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGLQVGIASGDEVWAARYI 181
            G+ KAFGRDIVDAHYKA +YAGINISGINGEVMPGQWEFQVG  VGI++GDE+W ARYI
Sbjct: 161 AGADKAFGRDIVDAHYKACLYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPAVGISAGDELWVARYI 220

Query: 182 LERITEIAGVVVSFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTKSMRNEGGYEVIKKAIEKLGLRHKEH 241
           LERITEIAGVV+SFDPKPI GDWNGAGAHTNYSTK+MRN+GGYEVIK AIEKLG RHKEH
Sbjct: 221 LERITEIAGVVLSFDPKPIKGDWNGAGAHTNYSTKTMRNDGGYEVIKSAIEKLGKRHKEH 280

Query: 242 IAAYGEGNERRLTGKHETADINTFKWGVANRGASIRVGRDTEKEGKGYFEDRRPASNMDP 301
           IAAYGEGNERRLTG+HETADINTF WGVANRGASIRVGRDTEK GKGYFEDRRPASNMDP
Sbjct: 281 IAAYGEGNERRLTGRHETADINTFLWGVANRGASIRVGRDTEKAGKGYFEDRRPASNMDP 340

Query: 302 YIVTSMYAETTLLWNP 317
           Y+VTSM A+TT+LW P
Sbjct: 341 YVVTSMIADTTILWKP 356
```

sp|P04771|GLN2_PHAVU GLUTAMINE SYNTHETASE PR-2 (ISOZYME ALPHA) (GLUTAMATE--AMMONIA LIGASE)
Length = 356

```
Score =  593 bits (1513), Expect = e-169
Identities = 271/316 (85%), Positives = 296/316 (92%), Gaps = 1/316 (0%)
```

```
Query: 2   GPVDDPSKLPKWNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVICDCYTPAGEP 61
           GPVDDP+KLPKWNYDGSST QAPG+DSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVICD YTPAGEP
Sbjct: 42  GPVDDPAKLPKWNYDGSSTDQAPGDDSEVILYPQAIFKDPFRRGNNILVICDVYTPAGEP 101

Query: 62  IPTNKMCHNAAKIFSNPDVVVEEPWYGLEAEYTLLQRRNYWPLGWPIGGFPGLQGPYYCG 121
           +PTNK  ++AAKIFS+PDVV E PWYG+E EYTLLQ+   WPLGWP+GG+PG QGPYYCG
Sbjct: 102 LPTNKR-YDAAKIFSHPDVVAEVPWYGIEQEYTLLQKDVNWPLGWPLGGYPGPQGPYYCG 160

Query: 122 IGSGKAFGRDIVDAHYKAYIYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGLQVGIASGDEVWAARYI 181
           +G+ KA+GRDIVDAHYKA +YAGINISGINGEVMPGQWEFQVG  VGI++GDEVWAARYI
Sbjct: 161 VGADKAYGRDIVDAHYKACVYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSVGISAGDEVWAARYI 220

Query: 182 LERITEIAGVVVSFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTKSMRNEGGYEVIKKAIEKLGLRHKEH 241
           LERITE+AG VVSFDPKPIPGDWNGAGAH+NYSTKSMR EGGYEVIKKAIEKLGLRHKEH
Sbjct: 221 LERITELAGAVVSFDPKPIPGDWNGAGAHSNYSTKSMREEGGYEVIKKAIEKLGLRHKEH 280

Query: 242 IAAYGEGNERRLTGKHETADINTFKWGVANRGASIRVGRDTEKEGKGYFEDRRPASNMDP 301
           IAAYG+GNERRLTG+HETADINTF WGVANRG+S+RVGRDTEK+GKGYFEDRRPASNMDP
Sbjct: 281 IAAYGKGNERRLTGRHETADINTFSWGVANRGSSVRVGRDTEKQGKGYFEDRRPASNMDP 340

Query: 302 YIVTSMYAETTLLWNP 317
           Y+VTSM AETT+LW P
Sbjct: 341 YVVTSMIAETTILWKP 356
```

Figura III.8: Comparação e alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos do cDNA T5F8.1A ("query") com sequências de aminoácidos de polipeptídeos de subunidades da GS de várias plantas superiores. Para o alinhamento utilizaram-se as 5 sequências existentes na base de dados que obtiveram as melhores pontuações na busca de homologias aminoacídicas com o programa BLAST. Os resíduos perfeitamente conservados estão representados pela respectiva letra entre as duas sequências e os resíduos "bem conservados" estão representados por um sinal +. Os resíduos de aminoácidos assinalados a cores correspondem a regiões ou a resíduos conservados entre as subunidades da GS. As sequências representadas correspondem às subunidades citosólicas da GS de: *Oryza sativa* (GLN3_ORYSA); *Vitis vinifera* (GLN2_VITVI e GLN1_VITVI); *Vigna aconitifolia* (GLNA_VIGAC) e *Phaseolus vulgaris* (GLN2_PHAVU).

Pelo alinhamento das sequências de aminoácidos é possível verificar que a homologia da sequência de aminoácidos deduzida do cDNA T5F8.1A (figura III.8) inicia-se no resíduo 41 / 42 das sequências existentes na base de dados, sendo a percentagem de homologia de 92% e variando a de igualdade entre 85 e 87%. Não é possível observar o aminoácido correspondente ao códão de iniciação (metionina), sendo, no entanto, possível reconhecer as 4 sequências conservadas, assim como os aminoácidos conservados entre as subunidades da GS, à excepção de um dos resíduos conservados de cisteína. Não é possível observar os 16 resíduos de aminoácidos, assim como os resíduos de cisteína característicos das subunidades da GS2. Estes resultados vêm reforçar a observação feita do alinhamento das sequências nucleotídicas, permitindo concluir que este cDNA codifica uma subunidade citosólica da GS, encontrando-se truncado a 5'. Por comparação com estas sequências é possível inferir que este cDNA codifica um polipeptídeo que corresponde a cerca de 89 % de um polipeptídeo completo.

Tabela III.3: Resultados da comparação nucleotídica do cDNA do clone C1A1A

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
gb|U14754|LEU14754 Lycopersicon esculentum glutamine synthe...	710	0.0
gb|M19055|TOBCPGS N.plumbaginifolia chloroplast glutamine s...	333	3e-89
emb|X95933|NTGLN13GN N.tabacum mRNA for glutamine synthetas...	258	2e-66
emb|X95932|NTGLN15GN N.tabacum mRNA for glutamine synthetas...	155	2e-35
gb|AF019559|AF019559 Daucus carota clone CGS102 cytosolic g...	151	3e-34
emb|Y08681|AGGLN1 A.glutinosa mRNA for glutamine synthetase	145	2e-32
dbj|AB026248.1|AB026248 Lithospermum erythrorhizon mRNA for...	137	4e-30
emb|X60092|LSGLUSYN L.sativa mRNA for glutamine synthetase	133	6e-29
gb|S46513|S46513 cytosolic glutamine synthetase [Glycine ma...	129	9e-28
emb|X14605|PVGSG1 French bean mRNA for glutamine synthetase...	121	2e-25
gb|M10159|PHVGS3E P.vulgaris L. glutamine synthetase (GS) m...	121	2e-25
emb|X82997.1|BNGLN B.napus mRNA for cytosolic glutamine syn...	119	9e-25
gb|AF005032.1|AF005032 Helianthus annuus cytosolic glutamin...	115	1e-23
emb|X94299.1|LJCYTGLSY L.japonica mRNA for cytosolic glutam...	113	6e-23
emb|Y12460.1|BNGSR22 Brassica napus mRNA for cytosolic glut...	111	2e-22
emb|Y12459.1|BNGSR12 Brassica napus mRNA for cytosolic glut...	111	2e-22
gb|U68220|BNU68220 Brassica napus glutamine synthetase (LSC...	111	2e-22
dbj|D25326|RADGS1GC Raphanus sativus mRNA for glutamine syn...	111	2e-22
emb|X76736.1|BNGLUTS B.napus mRNA for cytosolic glutamine s...	111	2e-22
emb|Y10267|MTY10267 M.truncatula mRNA for glutamine synthet...	107	3e-21

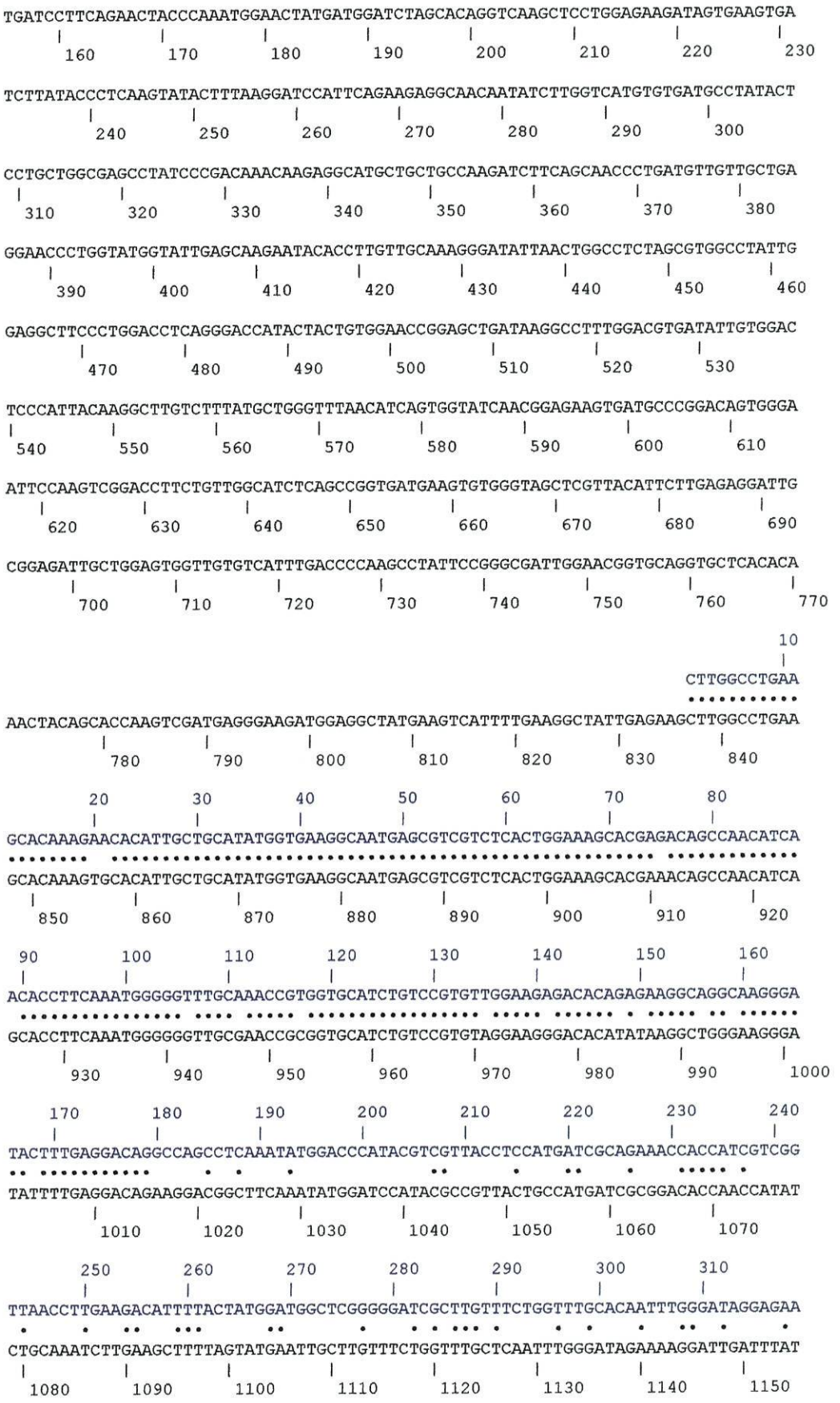
Tabela III.4: Resultados da comparação aminoacídica do clone C1A1A

Score E Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
sp|P12424|GLNA_NICPL GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	159	2e-39
sp|O04867|GLN1_ALNGL GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	155	3e-38
sp|P51118|GLN1_VITVI GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME...	155	3e-38
sp|P24099|GLN1_SOYBN GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME...	153	1e-37
sp|P51119|GLN2_VITVI GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME...	151	4e-37
sp|P04771|GLN2_PHAVU GLUTAMINE SYNTHETASE PR-2 (ISOZYME ALP...	151	4e-37
sp|P04770|GLN1_PHAVU GLUTAMINE SYNTHETASE PR-1 (ISOZYME BET...	151	4e-37
sp|P32289|GLNA_VIGAC GLUTAMINE SYNTHETASE NODULE ISOZYME (G...	151	4e-37
sp|P04078|GLNA_MEDSA GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	151	4e-37
sp|P23712|GLNA_LACSA GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	150	6e-37
sp|Q43066|GLN4_PEA GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME B (GLU...	149	2e-36
sp|P07694|GLN1_PEA GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME (GLUTA...	149	2e-36
sp|P14654|GLN1_ORYSA GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME (GLU...	148	2e-36
sp|P38559|GLN1_MAIZE GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME 1 (G...	148	3e-36
sp|P00965|GLN3_PHAVU GLUTAMINE SYNTHETASE N-1 (ISOZYME GAMM...	148	3e-36
sp|P52783|GLNA_PINSY GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME...	148	3e-36
sp|P38563|GLN5_MAIZE GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME 5 (G...	147	7e-36
sp|P38560|GLN2_MAIZE GLUTAMINE SYNTHETASE ROOT ISOZYME 2 (G...	146	1e-35
sp|P14656|GLN3_ORYSA GLUTAMINE SYNTHETASE SHOOT ISOZYME (GL...	146	1e-35
sp|Q06378|GLN3_HORVU GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMON...	145	2e-35

A comparação das sequências de nucleótidos e de aminoácidos do cDNA C1A1A com sequências da base de dados revelou, à semelhança do clone anterior, uma homologia elevada com cDNAs que codificam subunidades citosólicas da GS. Quer a nível nucleotídico, quer a nível aminoacídico verifica-se que os resultados de homologia mais elevada recaem sobre espécies da família *SOLANACEAE*.

```
TTAAGACTTCTATTTTCATTATGTCTCCGCTTTCAGATCTTATCAGCCTCAATCTCTCTGATTCTACCCAGAAAATC
         |         |         |         |         |         |         |
         10        20        30        40        50        60        70

ATCGCTGAATACATATGGATAGGTGGATCAGGCATGGACTTAAGGAGCAAGGCCAGGACTCTTTCTGGTCCTGTTAC
  |         |         |         |         |         |         |         |
  80        90        100       110       120       130       140       150
```


TGATCCTTCAGAACTACCCAAATGGAACTATGATGGATCTAGCACAGGTCAAGCTCCTGGAGAAGATAGTGAAGTGA
160 170 180 190 200 210 220 230
TCTTATACCCTCAAGTATACTTTAAGGATCCATTCAGAAGAGGCAACAATATCTTGGTCATGTGTGATGCCTATACT
240 250 260 270 280 290 300
CCTGCTGGCGAGCCTATCCCGACAAACAAGAGGCATGCTGCTGCCAAGATCTTCAGCAACCCTGATGTTGTTGCTGA
310 320 330 340 350 360 370 380
GGAACCCTGGTATGGTATTGAGCAAGAATACACCTTGTTGCAAAGGGATATTAACTGGCCTCTAGCGTGGCCTATTG
390 400 410 420 430 440 450 460
GAGGCTTCCCTGGACCTCAGGGACCATACTACTGTGGAACCGGAGCTGATAAGGCCTTTGGACGTGATATTGTGGAC
470 480 490 500 510 520 530
TCCCATTACAAGGCTTGTCTTTATGCTGGGTTTAACATCAGTGGTATCAACGGAGAAGTGATGCCCGGACAGTGGGA
540 550 560 570 580 590 600 610
ATTCCAAGTCGGACCTTCTGTTGGCATCTCAGCCGGTGATGAAGTGTGGGTAGCTCGTTACATTCTTGAGAGGATTG
620 630 640 650 660 670 680 690
CGGAGATTGCTGGAGTGGTTGTGTCATTTGACCCCAAGCCTATTCCGGGCGATTGGAACGGTGCAGGTGCTCACACA
700 710 720 730 740 750 760 770
10
CTTGGCCTGAA
AACTACAGCACCAAGTCGATGAGGGAAGATGGAGGCTATGAAGTCATTTTGAAGGCTATTGAGAAGCTTGGCCTGAA
780 790 800 810 820 830 840
20 30 40 50 60 70 80
GCACAAAGAACACATTGCTGCATATGGTGAAGGCAATGAGCGTCGTCTCACTGGAAAGCACGAGACAGCCAACATCA
GCACAAAGTGCACATTGCTGCATATGGTGAAGGCAATGAGCGTCGTCTCACTGGAAAGCACGAAACAGCCAACATCA
850 860 870 880 890 900 910 920
90 100 110 120 130 140 150 160
ACACCTTCAAATGGGGGGTTTGCAAACCGTGGTGCATCTGTCCGTGTTGGAAGAGACACAGAGAAGGCAGGCAAGGGA
GCACCTTCAAATGGGGGGTTGCGAACCGCGGTGCATCTGTCCGTGTAGGAAGGGACACATATAAGGCTGGGAAGGGA
930 940 950 960 970 980 990 1000
170 180 190 200 210 220 230 240
TACTTTGAGGACAGGCCAGCCTCAAATATGGACCCATACGTCGTTACCTCCATGATCGCAGAAACCACCATCGTCGG
TATTTTGAGGACAGAAGGACGGCTTCAAATATGGATCCATACGCCGTTACTGCCATGATCGCGGACACCAACCATAT
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070
250 260 270 280 290 300 310
TTAACCTTGAAGACATTTTACTATGGATGGCTCGGGGGATCGCTTGTTTCTGGTTTGCACAATTTGGGATAGGAGAA
CTGCAAATCTTGAAGCTTTTAGTATGAATTGCTTGTTTCTGGTTTGCTCAATTTGGGATAGAAAAGGATTGATTTAT
1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150

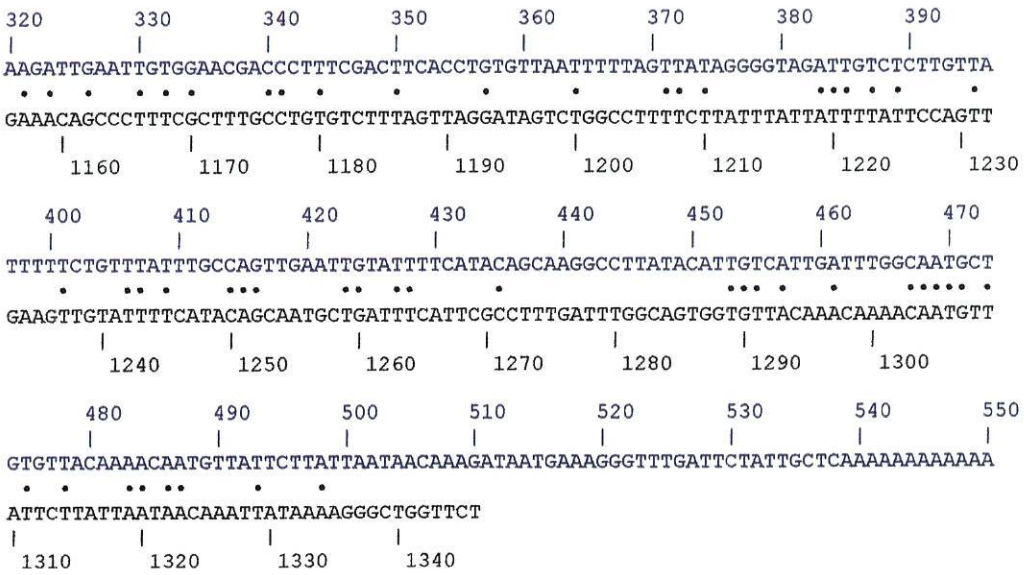


Figura III.9 – Alinhamento optimizado das sequências de cDNA C1A1A (sequência de cima e a azul) e NTGLN13GN (sequência de baixo) que codifica uma subunidade da GS1 (*gln 1-3*) em *Nicotiana tabacum*. Os pontos (•) indicam conservação de nucleótidos entre as duas sequências. Os números representam as posições dos nucleótidos em cada uma das sequências.

Pelo alinhamento destas duas sequências (figura III.9) é possível verificar que a homologia entre elas inicia-se ao nível da posição 237 da sequência NTGLN13GN de *N. tabacum* (51). Por comparação, infere-se que o cDNA do clone C1A1A encontra-se truncado a 5', não possuindo a porção 5' não traduzida, assim como grande parte da região codificante da porção N-terminal. Tendo em consideração a sequência NTGLN13GN estima-se que o cDNA isolado corresponda a 39,97% deste clone.

```
sp|P12424|GLNA_NICPL GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMONIA LIGASE)
           Length = 356

 Score =  159 bits (398), Expect = 2e-39
 Identities = 76/83 (91%), Positives = 81/83 (97%), Gaps = 1/83 (1%)

Query: 1   LGLKHKEHIAAYGEGNERRLTGKHETANINTFKWGFANRGASVRVGRDTEKAGKGYFED- 59
           LGLKHKEHIAAYGEGNERRLTGKHETANI+TFKWG ANRGASVRVGRDTEKAGKGYFED
Sbjct: 273 LGLKHKEHIAAYGEGNERRLTGKHETANISTFKWGVANRGASVRVGRDTEKAGKGYFEDR 332

Query: 60  RPASNMDPYVVTSMIAETTIVGZ 82
           RPASNMDPYVVT+MIA+TTI+G+
Sbjct: 333 RPASNMDPYVVTAMIADTTIIGK 355


sp|O04867|GLN1_ALNGL GLUTAMINE SYNTHETASE (GLUTAMATE--AMMONIA LIGASE) (GS(1))
           Length = 356

 Score =  155 bits (387), Expect = 3e-38
 Identities = 73/84 (86%), Positives = 80/84 (94%), Gaps = 1/84 (1%)

Query: 1   LGLKHKEHIAAYGEGNERRLTGKHETANINTFKWGFANRGASVRVGRDTEKAGKGYFED- 59
           LGL+HKEHIAAYGEGNERRLTG+HETA+INTFKWG ANRGAS+RVGRDTEK GKGYFED
Sbjct: 273 LGLRHKEHIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFKWGVANRGASIRVGRDTEKEGKGYFEDR 332

Query: 60  RPASNMDPYVVTSMIAETTIVGZP 83
           RPASNMDPYVVTSMIAETT++ +P
Sbjct: 333 RPASNMDPYVVTSMIAETTLLWKP 356
```

```
sp|P51118|GLN1_VITVI GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME 1 (GLUTAMATE--AMMONIA
          LIGASE)
          Length = 356

 Score =  155 bits (387), Expect = 3e-38
 Identities = 74/84 (88%), Positives = 80/84 (95%), Gaps = 1/84 (1%)

Query: 1   LGLKHKEHIAAYGEGNERRLTGKHETANINTFKWGFANRGASVRVGRDTEKAGKGYFED- 59
           LGL+HKEHIAAYGEGNERRLTG+HETA+INTF WG ANRGAS+RVGRDTEKAGKGYFED
Sbjct: 273 LGLRHKEHIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFLWGVANRGASIRVGRDTEKAGKGYFEDR 332

Query: 60  RPASNMDPYVVTSMIAETTIVGZP 83
           RPASNMDPYVVTSMIAETTI+ +P
Sbjct: 333 RPASNMDPYVVTSMIAETTILWKP 356


sp|P24099|GLN1_SOYBN GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME (GLUTAMATE--AMMONIA LIGASE)
          Length = 355

 Score =  153 bits (382), Expect = 1e-37
 Identities = 74/84 (88%), Positives = 79/84 (93%), Gaps = 1/84 (1%)

Query: 1   LGLKHKEHIAAYGEGNERRLTGKHETANINTFKWGFANRGASVRVGRDTEKAGKGYFED- 59
           LG KHKEHIAAYGEGNERRLTG+HETA+INTF WG ANRGASVRVGRDTEKAGKGYFED
Sbjct: 272 LGKKHKEHIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFLWGVANRGASVRVGRDTEKAGKGYFEDR 331


Query: 60  RPASNMDPYVVTSMIAETTIVGZP 83
           RPASNMDPYVVTSMIA+TTI+ +P
Sbjct: 332 RPASNMDPYVVTSMIADTTILWKP 355


sp|P51119|GLN2_VITVI GLUTAMINE SYNTHETASE CYTOSOLIC ISOZYME 2 (GLUTAMATE--AMMONIA
          LIGASE)
          Length = 356

 Score =  151 bits (378), Expect = 4e-37
 Identities = 72/84 (85%), Positives = 79/84 (93%), Gaps = 1/84 (1%)

Query: 1   LGLKHKEHIAAYGEGNERRLTGKHETANINTFKWGFANRGASVRVGRDTEKAGKGYFED- 59
           LGL+HKEHIAAYGEGNERRLTG+HETA+INTF WG ANRGAS+RVGRDTEK GKGYFED
Sbjct: 273 LGLRHKEHIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFLWGVANRGASIRVGRDTEKEGKGYFEDR 332

Query: 60  RPASNMDPYVVTSMIAETTIVGZP 83
           RPASNMDPYVVTSMIAE+TI+ +P
Sbjct: 333 RPASNMDPYVVTSMIAESTILWKP 356
```

Figura III.10: Comparação e alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida do cDNA C1A1A ("query") com sequências de aminoácidos de polipeptídeos da GS de várias plantas superiores. Para o alinhamento utilizaram-se as 5 sequências existentes na base de dados que obtiveram as melhores pontuações na busca de homologias aminoacídicas com o programa BLAST. Os resíduos perfeitamente conservados estão representados pela respectiva letra entre as duas sequências e os resíduos "bem conservados" estão representados por um sinal +. Os resíduos de aminoácidos assinalados a amarelo correspondem à região IV das subunidades da GS. As sequências representadas correspondem às subunidades citosólicas da GS de: *Nicotiana plumbaginifolia* (GLNA_NICPL); *Alnus glutinosa* (GLN1_ALNGL); *Vitis vinifera* (GLN1_VITVI; GLN2_VITVI) e *Glycine max* (GLN1_SOYBN).

Pelo alinhamento das sequências de aminoácidos (figura III.10) é possível verificar que a homologia do clone C1A1A inicia-se no resíduo 272 / 273 das sequências existentes nas bases de dados, sendo a percentagem de homologia compreendida entre 93 e 97% e a de igualdade entre 85 e 91%. Não é possível observar o aminoácido correspondente ao códão de iniciação, assim como não se detectam os três primeiros segmentos conservados entre as subunidades da GS. Também não se observam os 16 resíduos de aminoácidos, assim como os resí-

duos de cisteína, característicos das subunidades da GS2. Estes resultados apoiam o observado no alinhamento das sequências nucleotídicas, permitindo concluir que este cDNA codifica uma subunidade citosólica da GS, encontrando-se bastante truncado a 5'. Por comparação com estas sequências, é possível inferir que este cDNA codifica um polipeptídeo que corresponde a cerca de 23% de um polipeptídeo completo da GS1.

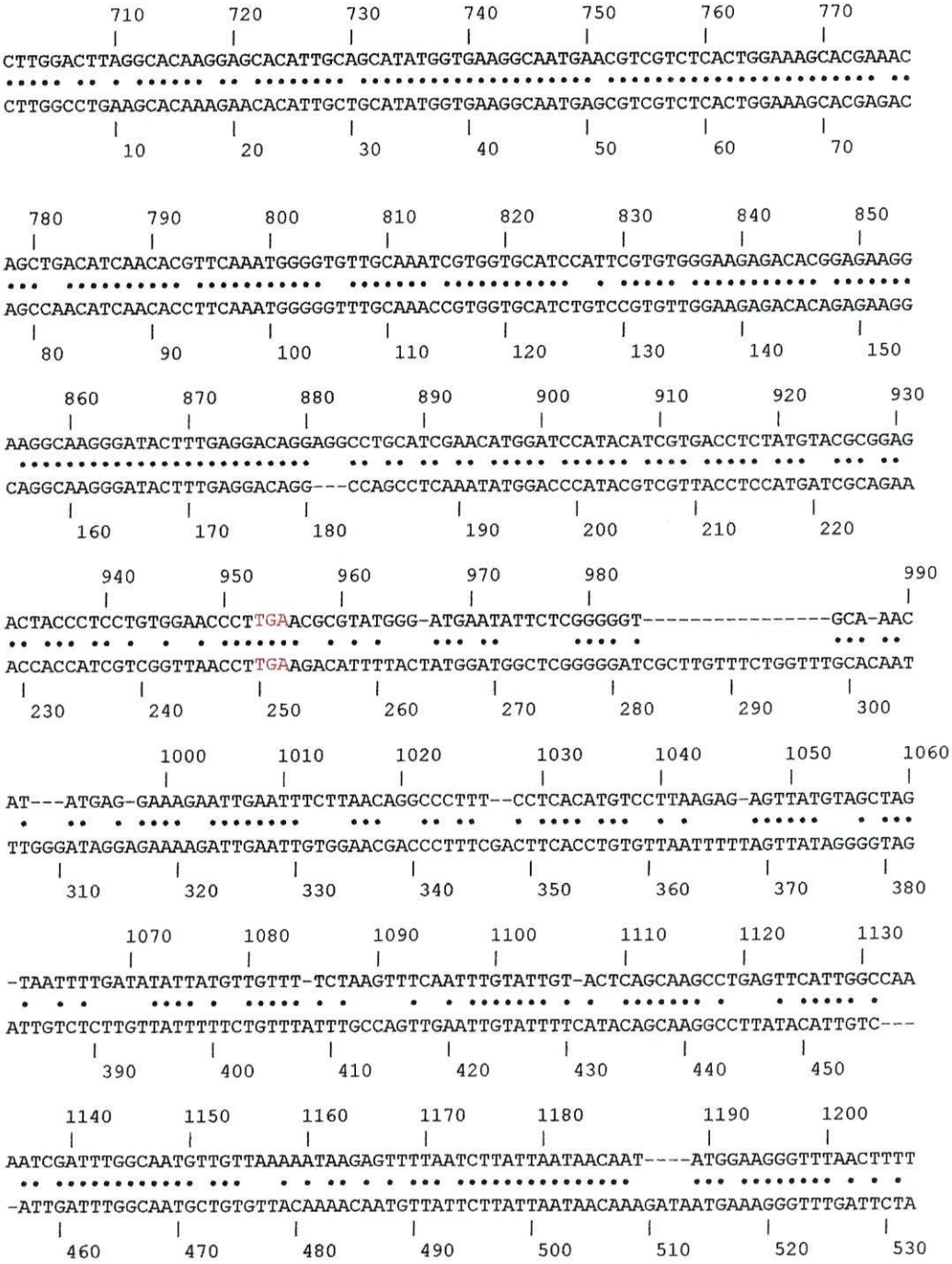


Figura III.11: Comparação e alinhamento das sequências de cDNA T5F8.1A (cima) e C1A1A (baixo). Os códões STOP estão assinalados a vermelho. A homologia de bases azotadas entre as duas sequências encontra-se representada por •.

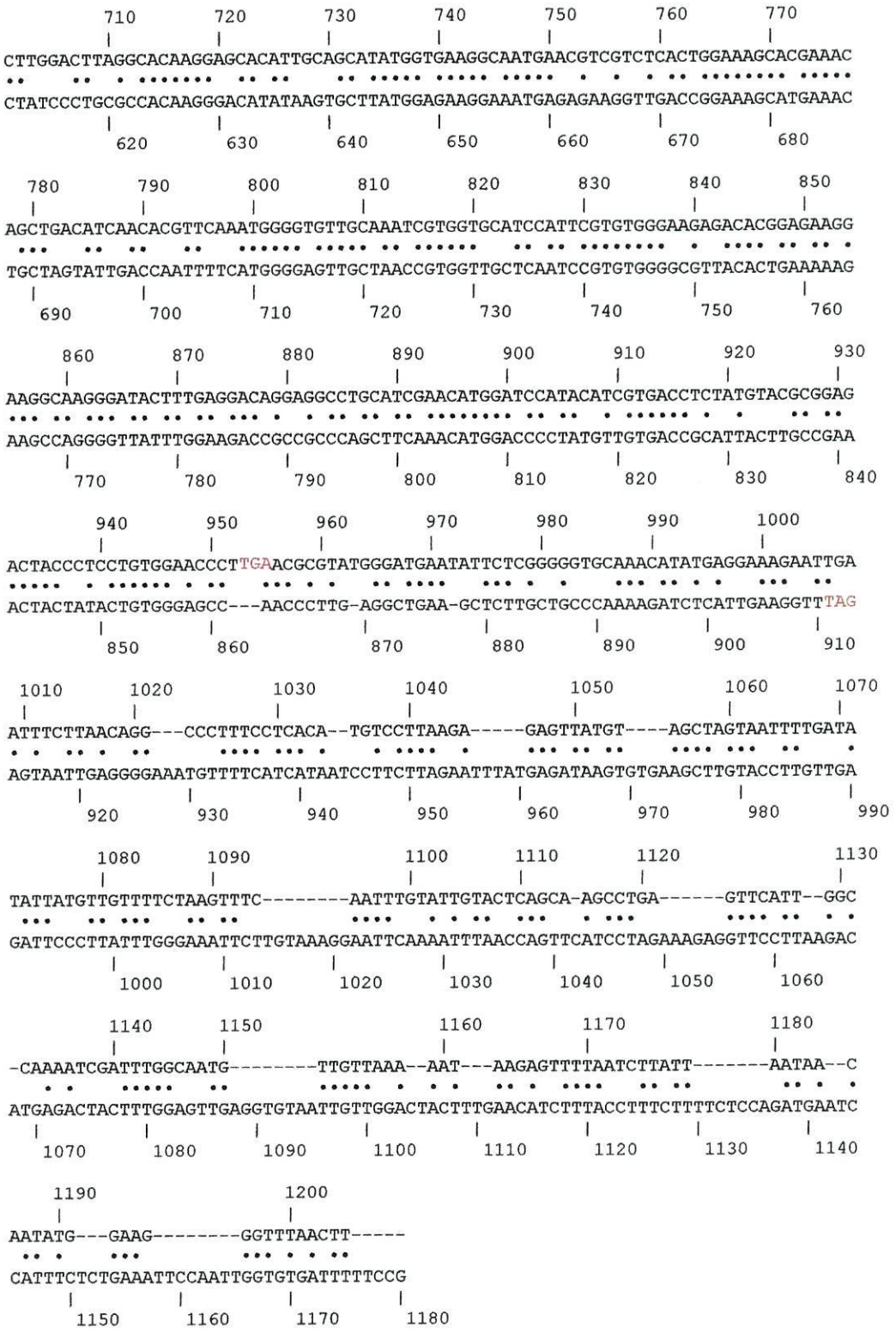


Figura III.12: Comparação e alinhamento das sequências de cDNA T5F8.1A (cima) e 14A1.2 (baixo). Os códões STOP estão assinalados a vermelho. A homologia de bases azotadas entre as duas sequências encontra-se representada por •.

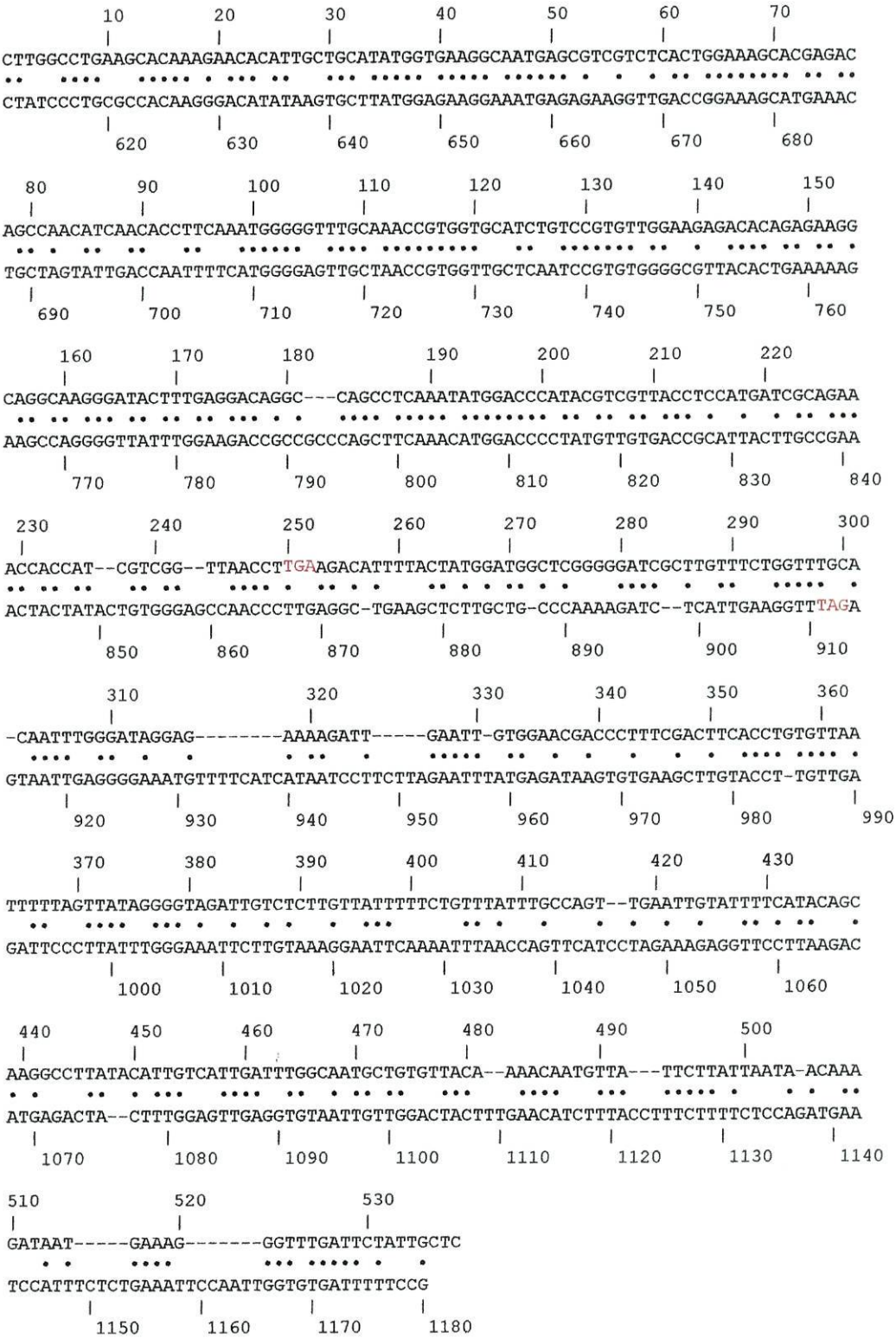


Figura III.13: Comparação e alinhamento das sequências de cDNA C1A1A (cima) e 14A1.2 (baixo). Os códões STOP estão assinalados a vermelho. A homologia de bases azotadas entre as duas sequências encontra-se representada por •.

Da análise dos alinhamentos das sequências nucleotídicas dos cDNAs que codificam as subunidades da GS de batateira (figuras III.11 a 13) é possível verificar, de um modo geral, a existência de uma elevada homologia entre todos os cDNAs na porção codificante até ao có-

dão STOP. No entanto, na região 3' não traduzida essa homologia deixa de ser tão elevada, sendo a diferença entre os cDNAs mais evidente quando se compara o clone 14A1.2 com os clones que codificam subunidades da GS1 (T5F8.1A e C1A1A). Esta característica permitirá a elaboração de sondas específicas para cada cDNA utilizando apenas a região 3' não traduzida.

Da comparação entre os cDNAs T5F8.1A e C1A1A, relacionados com subunidades citosólicas da GS, é possível ainda verificar que a porção 3' não traduzida do cDNA C1A1A apresenta aproximadamente mais 20 nucleótidos que o cDNA T5F8.1A. Esta diferença no tamanho na região 3' não traduzida poderá ter influência na eficiência da tradução e/ou na estabilidade dos mRNAs.

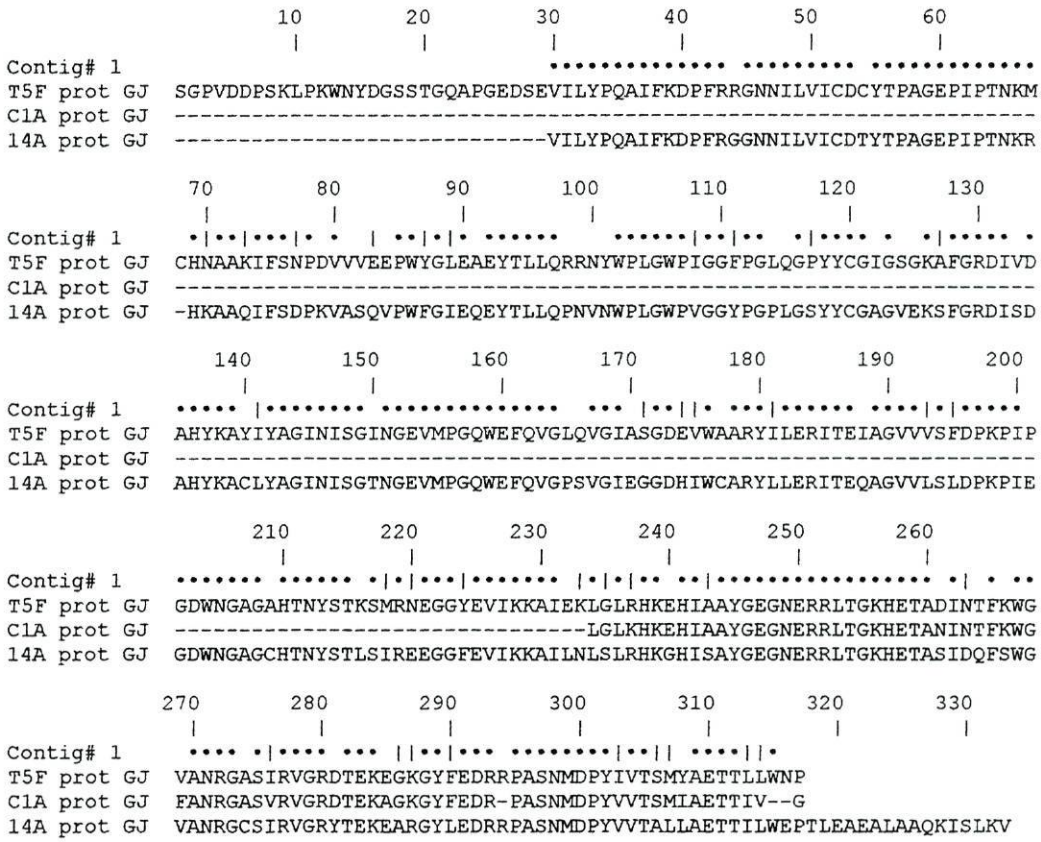


Figura III.14: Comparação e alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos dos cDNAs T5F8.1A (T5F prot GJ); C1A1A (C1A prot GJ) e 14A1.2 (14A prot GJ). A numeração representa a posição dos resíduos de aminoácidos em relação à sequência aminoacídica deduzida do cDNA T5F8.1A. Os aminoácidos perfeitamente conservados encontram-se representados por •; os aminoácidos "bem conservados" estão representados por |.

Na figura III.14 é possível observar a existência de uma elevada homologia entre as três sequências aminoacídicas deduzidas dos cDNAs em estudo. É de salientar que esta homologia é mais elevada quando comparadas as sequências relativas às subunidades citosólicas (T5F8.1A e C1A1A) do que quando estas são comparadas com a sequência deduzida do

cDNA 14A1.2. Nesta última é possível verificar a presença dos 16 resíduos de aminoácidos característicos das subunidades plastidiais da GS, os quais estão ausentes nas outras duas sequências. Por haver dessemelhanças entre as três sequências deduzidas de aminoácidos é possível concluir que os polipeptídeos resultantes da tradução dos mRNAs relativos aos clones de cDNA em estudo são diferentes entre eles, sugerindo a possível ocorrência de pelo menos três polipeptídeos distintos da GS em *Solanum tuberosum* L., sendo dois relacionados com subunidades citosólicas e o terceiro relacionado com a subunidade plastidial da GS. Estas sequências foram submetidas à base de dados "GenBank" e podem ser acedidas utilizando os números de acesso indicados na tabela no seguinte endereço da Internet: www.ncbi.nlm.nih.gov

cDNA	número de acesso
14A1.2	AF302113
C1A1A	AF302114
T5F8.1A	AF302115

RACE 5'

Na tentativa de isolar as porções correspondentes às extremidades 5' dos cDNAs realizaram-se várias abordagens tendo por base a técnica de RACE 5'. Os resultados obtidos com o "kit" "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0" (Life Technologies), relativos ao primeiro PCR, podem ser visualizados na figura que se segue:

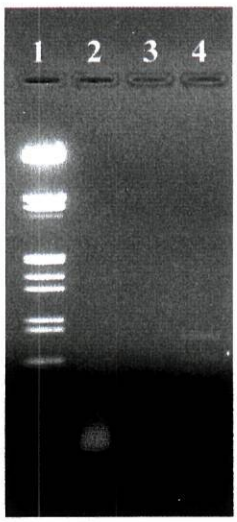


Figura III.15: Separação electroforética em gel de agarose 0,8% (p/v) de 20 µL das primeiras reacções de PCR da técnica RACE utilizada de acordo com o procedimento referido no texto. 1 – DNA de fago lambda digerido com *Eco*RI e *Hind*III (250 ng); 2 – C1A1A; 3 – 14A1.2 e 4 – T5F8.1A.

Os tamanhos mínimos esperados para os amplificados resultantes da reacção de PCR com os oligonucleótidos iniciadores AAP e "GSP2" seriam: C1A1A – 1080 bp, 14A1.2 – 1090 e T5F8.1A – 800 bp. Segundo os autores, o não aparecimento de bandas nesta fase da técnica é muito frequente, mas no entanto foi possível verificar na quarta pista surgiram ban-

das as quais poderão ser reflexo da amplificação de fragmentos de DNA relacionados com o clone de cDNA T5F8.1A na figura III.15. Analisando os tamanhos obtidos com os esperados verifica-se que apenas a banda de maior tamanho presente na pista 4 corresponde àquela de potencial interesse para a técnica em questão.

Após diluição dos produtos da primeira reacção e da execução da segunda reacção de PCR procedeu-se à análise de 15 μL dos produtos desta reacção e que se pode observar na figura III.16.

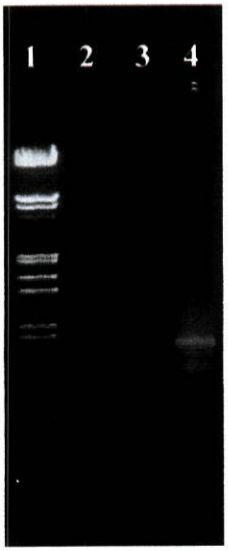


Figura III.16: Separação electroforética em gel de agarose 0,8% (p/v) de 15 μL das segundas reacções de PCR da técnica RACE utilizada de acordo com o procedimento referido no texto. 1 – DNA de fago lambda digerido com *Eco*RI e *Hind*III (250 ng); 2 – C1A1A; 3 – 14A1.2 e 4 – T5F8.1A.

Os tamanhos esperados mínimos para as bandas a obter após a análise electroforética para os diferentes clones de cDNA seriam: C1A1A – 1070 bp, 14A1.2 – 834 bp e T5F8.1A – 600 bp. Analisando a figura III.16 é possível observar que o padrão de bandas obtido é sobreponível ao obtido para a primeira reacção de PCR, não surgindo, portanto, bandas nas pistas relativas aos clones C1A1A e 14A1.2 e surgindo bandas com os mesmos tamanhos aproximados dos obtidos na primeira reacção para o clone T5F8.1A.

O volume remanescente de ambas as reacções do clone T5F8.1A foi aplicado na sua totalidade para posterior excisão das bandas do gel de agarose e clonagem do DNA delas isolado.

As reacções de RT e as reacções com a enzima TdT foram repetidas fazendo variar as condições de funcionamento das enzimas e os tempos de incubação de acordo com as instruções do fabricante. Sobre cada variante repetiram-se as reacções de PCR, diminuindo ou aumentando a temperatura de emparelhamento, assim como o volume aplicado no gel. Os resultados obtidos não variaram significativamente dos representados nas figura III.15 e III.16 pelo que não são representados. Os resultados obtidos recorrendo ao "kit" "Marathon cDNA Am-

plification Kit" (Clontech) podem ser visualizados na figura III.17. Os tamanhos esperados para estes amplificados correspondem aos mesmos descritos para a figura III.15.

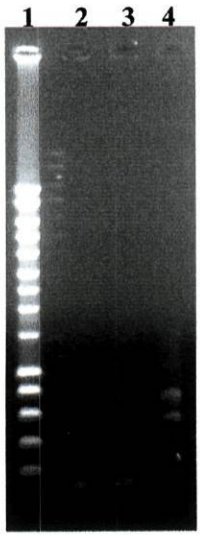


Figura III.17: Separação electroforética em gel de agarose 0,8% (p/v) de 15 µL da reacção de PCR da técnica RACE utilizada de acordo com o procedimento referido no texto. 1 – 2,5 µL de "Hyperladder" (BioLine – Reino Unido); 2 – C1A1A; 3 – 14A1.2 e 4 – T5F8.1A.

A análise da figura anterior permite verificar a ocorrência de amplificação na reacção relativa ao clone T5F8.1A, na qual surgiram 2 bandas, uma com 600 e outra com 800 bp, sendo esta última do tamanho mínimo esperado quando tomado com referência o cDNA de *Nicotiana plumbaginifolia* (195). O volume remanescente da reacção do clone T5F8.1A foi aplicado na sua totalidade para posterior isolamento das bandas do gel de agarose e clonagem do DNA nelas contido num vector apropriado.

A técnica de RACE 5' por ligação directa dos híbridos cDNA-mRNA resultantes das reacções de RT a faguemídios permitiu, após o rastreio de inúmeras colónias, isolar 4 clones portadoras de fragmentos de inserção através da análise de restrição dupla com enzimas que flanqueiam os locais de restrição *Sma*I ou *Eco*RV do vector PSK das minipreparações de DNA plasmídico realizadas. As figuras que se seguem são relativas às separações dos produtos de restrição das minipreparações de DNA referidas.

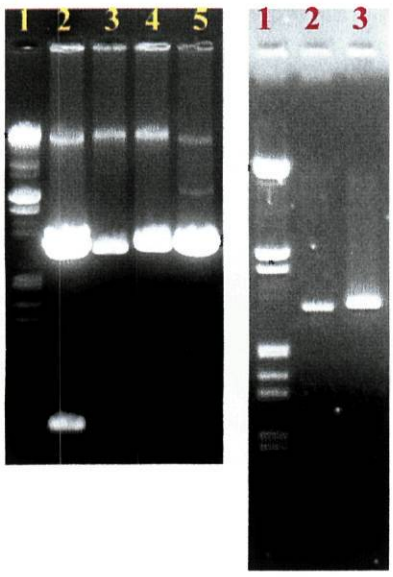


Figura III.18: Análise dos produtos de digestão dupla de 3 µL das preparações de DNA plasmídico obtidas a partir das colónias "positivas" resultantes da técnica de RACE descrita no texto. Após restrição com as enzimas *Sac*I e *Hind*III os produtos de restrição foram separados em gel de agarose 1% (p/v) utilizando TAE 1x como tampão de separação e visualizados com luz ultravioleta. **A** – obtenção do clone designado C1A6 (pista 2); pistas: 1 – DNA de fago lambda digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III (250 ng); 2, 3 e 4 – minipreparações de DNA plasmídico das colónias 6, 7 e 8, respectivamente; 5 – PSK linearizado. **B** – obtenção do clone designado C1A11; pistas: 1 – DNA de fago lambda digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III (250 ng); 2 – PSK linearizado e 3 – minipreparação de DNA plasmídico da colónia 11.

Da análise da figura III.18 foi possível verificar que o fragmento contido no clone C1A6 apresenta um tamanho de cerca de 450 bp e que o contido no clone C1A11 é inferior ao primeiro, apresentando cerca de 100 a 125 bp de tamanho. Ambos os clones obtidos apresentam fragmentos de inserção cujo tamanho é inferior ao mínimo esperado para um fragmento a obter pela técnica de RACE 5' para o cDNA C1A1A (1100 bp).

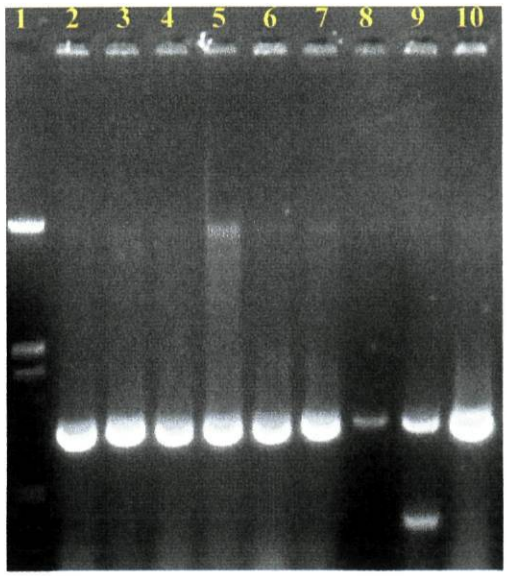


Figura III.19: Análise dos produtos de digestão dupla de 2 µL das preparações de DNA plasmídico obtidas a partir das colónias "positivas" resultantes da técnica de RACE descrita no texto para o cDNA 14A1.2. Após restrição com as enzimas *Sac*I e *Cla*I os produtos de restrição foram separados em gel de agarose 0,8% (p/v), utilizando TAE 1x como tampão de separação, e visualizados com luz ultravioleta. Pistas: 1 – DNA de fago lambda digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III (150 ng); 2 a 8 – minipreparações de DNA plasmídico das colónias 2 a 8, respectivamente; 9 – obtenção do clone designado 14A9; 10 – PSK linearizado.

Da análise da figura III.19 pode observar-se o isolamento de um clone de cDNA com cerca de 1,6 kb, ou seja, com tamanho superior ao tamanho esperado mínimo para o clone 14A1.2 (1300 bp).

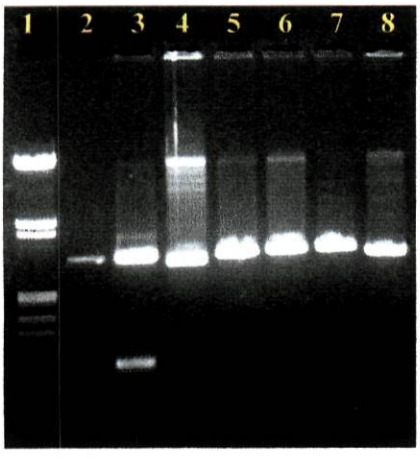


Figura III.20: Análise dos produtos de digestão dupla de 3 µL das preparações de DNA plasmídico obtidas a partir das colónias "positivas" resultantes da técnica de RACE descrita no texto para o cDNA T5F8.1A. Após restrição com as enzimas *Sac*I e *Hind*III os produtos de restrição foram separados em gel de agarose 0,8% (p/v), utilizando TAE 1x como tampão de electroforese, e visualizados com luz ultravioleta. Pistas: 1 – DNA de fago lambda digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III (250 ng); 2 – PSK linearizado; 3 – obtenção do clone designado T5F1; 4 a 8 – minipreparações de DNA plasmídico das colónias 2 a 6, respectivamente.

Da análise da figura III.20 é possível verificar que o fragmento de inserção presente no clone T5F1 possui um tamanho aproximado de 1000 bp, inferior ao tamanho mínimo esperado para os fragmentos de DNA resultantes quando esta técnica é efectuada para o cDNA T5F8.1A (1100 bp).

Para verificar se os clones isolados eram ou não portadores de fragmentos de inserção relacionados com os clones que codificam a GS em batateira procedeu-se à execução de reacções de PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos da GS. Os resultados esperados podem ser visualizados na figura III.21.

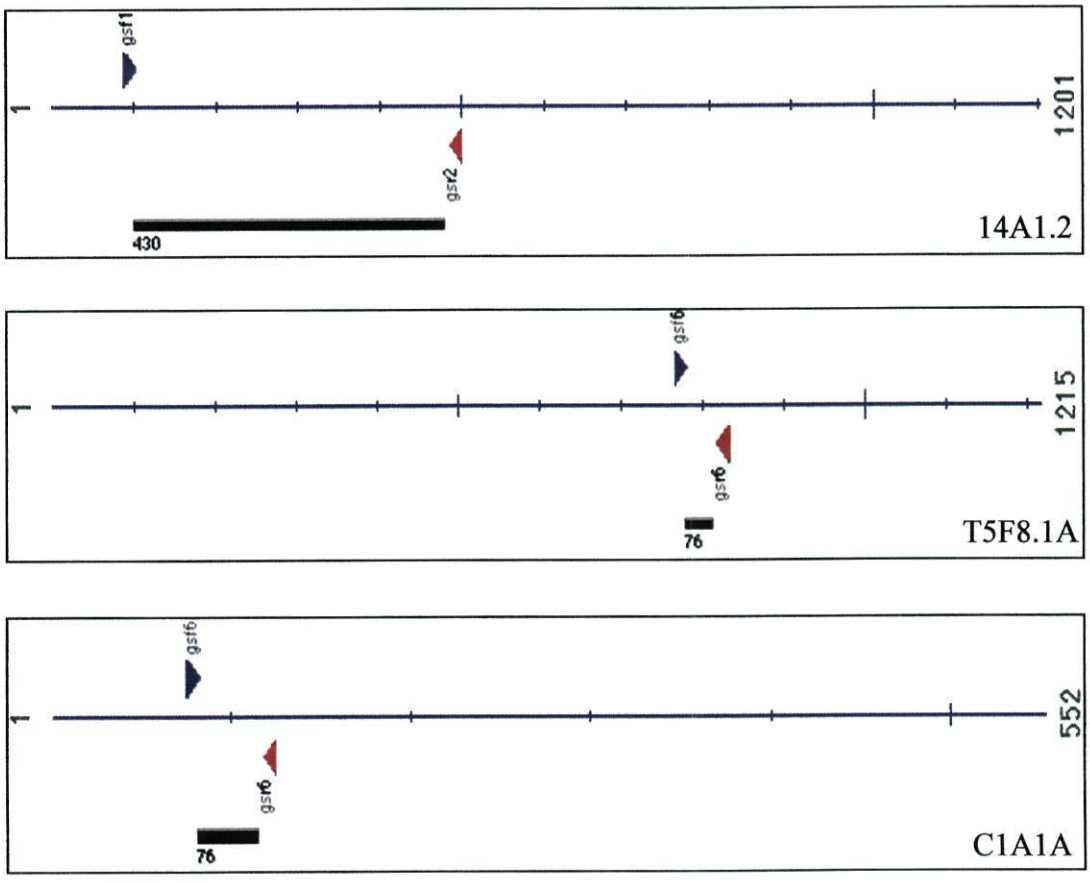


Figura III.21: Representação esquemática dos locais de emparelhamento dos oligonucleótidos iniciadores utilizados nas reacções de PCR descritas no texto. A azul representa-se o iniciador a 5' e a vermelho o iniciador a 3' das extremidades dos fragmentos que se pretende amplificar. A barra preta representa o produto amplificado e o seu tamanho. A barra azul representa o cDNA molde e a verde representa-se o tamanho do DNA molde em pares de base (bp).

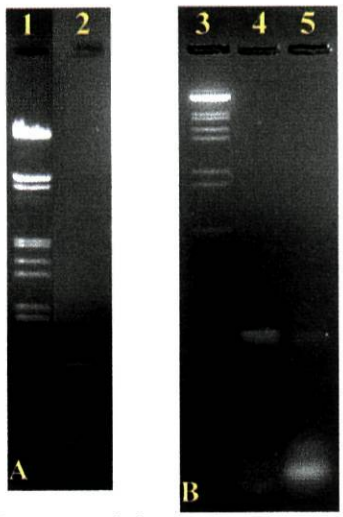


Figura III.22: Separação electroforética em gel de agarose de 15 µL das reacções de PCR descritas no texto. **A** – clone 14A9, iniciadores GSF1 e GSR2, malha 0,8% (p/v); **B** – clones T5F1 e C1A6, iniciadores GSF6 e GSR6, malha 1,2% (p/v). Pistas: 1 e 3 – DNA de fago lambda digerido com *Eco*RI e *Hind*III (250 ng); 2 – reacção de PCR do clone 14A; 4 – reacção de PCR do clone T5F1 e 5 – reacção de PCR do clone C1A6. Não se procedeu à análise com o clone C1A11 por este ser muito pequeno.

Na figura III.22 é possível verificar a ocorrência de bandas em todos as pistas, indicação de ter ocorrido amplificação de DNA nas reacções de PCR executadas. Os oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos de DNA observados em A, em relação ao clone 14A9, originaram uma banda de aproximadamente 430 bp, a qual está de acordo com o esperado para esta combinação de iniciadores. Nas pistas 4 e 5 (em B) surge uma banda de aproximadamente 80 bp cujo tamanho também está de acordo com o esperado para esta situação. Com base nestas observações conclui-se que os clones isolados por este método são portadores de cDNAs relacionados com mRNAs da GS em batateira.

CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA DE GENES DA GS

"SOUTHERN BLOTTING"

Para averiguar o número possível de cópias de genes a codificar a GS na batateira procedeu-se à análise do genoma desta planta por "Southern blotting".

Antes de proceder à restrição do DNA genómico avaliou-se a integridade do DNA genómico extraído por aplicação de uma alíquota da preparação em mini-gel de agarose. Como é possível observar na figura III.23, o DNA genómico extraído surge como uma banda única, de elevado tamanho molecular, sem arrastamento para os tamanhos moleculares mais baixos,

indicando que este DNA genómico se encontra não degradado, íntegro e utilizável para a técnica em questão.

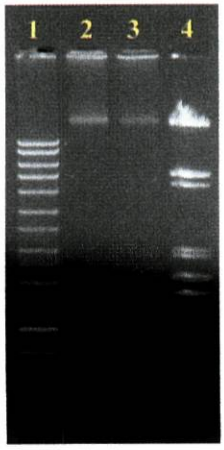


Figura III.23: Separação electroforética, em gel de agarose 0,8% (p/v), de 2 µL de uma diluição 1:100 de duas preparações de DNA genómico de batateira, usando TAE 1x como tampão de electroforese. Pistas: 1 – 2,5 µL de marcador de tamanho molecular ("Hyperladder", Bioline – Reino Unido); 2 e 3- DNA genómico; 4 – 250 ng de DNA de fago λ digerido com *Eco*RI e *Hind*III.

No final da restrição procedeu-se à determinação da eficiência da restrição enzimática procedendo à separação electroforética de uma alíquota das reacções de restrição. Na figura III.24 é possível verificar que nas pistas 3 a 5 surge DNA ao longo de toda a pista, devido ao facto de surgirem fragmentos de todos os tamanhos, formando uma espécie de arrastamento desde o poço até aos tamanhos moleculares mais baixos. Em algumas regiões é possível observar algumas bandas mais fortes, resultantes da sobreposição de fragmentos com tamanho molecular aproximado. Com base nestas observações foi possível verificar que a digestão do DNA genómico tinha sido completa, continuando-se com o procedimento.

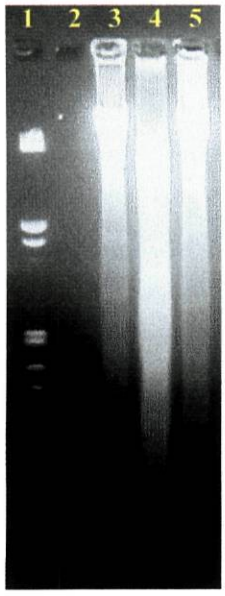


Figura III.24: Separação electroforética, em gel de agarose 0,8 % (p/v), de 1 µL da restrição enzimática de DNA genómico de batateira, usando TAE 1x como tampão de electroforese. Pistas: 1 – 100 ng de DNA de fago λ digerido com *Eco*RI e *Hind*III; 2 – pista vazia; 3 – DNA genómico digerido com *Eco*RI; 4 – DNA genómico digerido com *Eco*RV; 5 – DNA genómico digerido com *Xba*I.

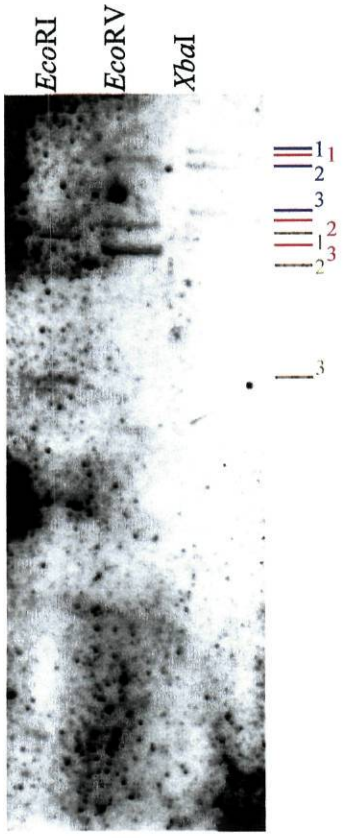


Figura III.25: Análise por Southern blotting do DNA genómico isolado de folhas jovens de batateira. Foram digeridos 5 µg de DNA genómico com as enzimas de restrição *Eco*RI, *Eco*RV e *Xba*I e hibridados com uma sonda homóloga conservada (T5F8.1A), marcada com digoxigenina durante uma reacção de PCR. As barras laterais numeradas indicam a posição das bandas resultantes da hibridação da sonda com os fragmentos de DNA resultantes das restrições executadas. Cores: verde – restrição com *Eco*RI; vermelho – restrição com *Eco*RV e azul – restrição com *Xba*I. O filme de autorradiografia foi revelado ao fim de 20 minutos de exposição. A imagem corresponde a cerca de 90% do tamanho original.

Da análise da figura III.25 é possível observar que a sonda utilizada permitiu detectar várias sequências relacionadas com os genes que codificam a GS nos 5 µg de DNA genómico de batateira digeridos, o que se traduziu no aparecimento de bandas nas diferentes pistas. Neste ensaio foram utilizadas enzimas que se sabe não existirem locais de restrição no cDNA utilizado como sonda. Na pista relativa à restrição efectuada com a enzima *Eco*RI (barras verdes) são visualizadas 3 bandas, com tamanhos aproximados de 7,5 kb, 6,7 kb e 4,7 kb. Também foi possível visualizar 3 bandas nas pistas relativas às duas restrições restantes: na pista da restrição com a enzima *Eco*RV (barras vermelhas) as bandas surgiram com tamanhos aproximados de 9,6 kb, 7,4 kb e 7,0 kb; na restrição com *Xba*I (barras azuis) as três bandas surgiram com os tamanhos aproximados de 10,1 kb, 9,6 kb e 7,6 kb.

Foi possível verificar a ocorrência de três bandas em todas as pistas utilizando uma sonda conservada que não é passível de ser digerida pelas enzimas de restrição utilizadas, o que sugere que as bandas detectadas correspondam a fragmentos de DNA pertencentes a genes distintos e que codificam a GS nesta espécie vegetal. Assumindo verdadeira esta observação, é possível a existência de três genes distintos constituintes da família multigénica que codifica a GS na batateira. No entanto, não deve ser descurada a hipótese de haver sobreposição de dois ou mais fragmentos de restrição do DNA genómico, sendo por isso, mais correcto afir-

mar que a família de genes que codificam a GS em *S. tuberosum* L. é constituída por, pelo menos, 3 genes distintos.

"RT-PCR"

Esta técnica foi utilizada para estudar qualitativamente a acumulação de transcritos relacionados com os cDNAs em estudo em vários órgãos da batateira, alguns dos quais em vários estados fisiológicos distintos (caso da folha e do tubérculo).

Antes de executar esta técnica aplicaram-se 200 ng de cada RNA extraído em mini-gel de agarose para testar as suas qualidade e integridade (figura III.26).

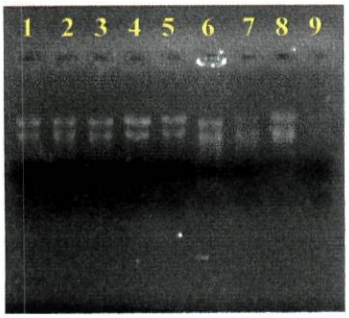


Figura III.26: Separação electroforética, em gel de agarose 0,8 % (p/v), de 200 ng de RNA total de batateira, usando TAE 1x como tampão de electroforese. Pistas: 1 – raiz; 2 – tubérculo em abrolhamento; 3 – tubérculo em crescimento; 4 – brolho; 5 – caule; 6 – folha senescente; 7 – folha velha; 8 – folha expandida; 9 – folha jovem.

Na figura anterior é possível observar duas bandas fortes em cada pista. Estas bandas são relativas aos RNA ribossomais (rRNA) e correspondem a 4700 nucleótidos (28S) e 1900 nucleótidos (18S). Não é observável qualquer sinal de degradação destes RNAs, a qual se manifestaria pela presença de uma mancha nos baixos tamanhos moleculares; nem qualquer contaminação por DNA genómico, o qual surgiria como uma banda de elevado tamanho molecular, como descrito anteriormente. A excepção a esta última observação ocorre na pista 6, relativa ao RNA extraído de folha senescente, e onde é observável algum DNA genómico perto do poço. Este resultado deve-se ao facto de se tratar de um órgão cujo estado fisiológico, apesar de ser catabolicamente activo, não possuir uma síntese proteica elevada, sendo a proporção de RNA:DNA inferior do que em qualquer um dos outras situações em estudo. Por esta razão, por se carregar 200 ng de RNA no gel, forçosamente carregou-se mais DNA genómico do que nas outras amostras, sendo este visível por isso.

Tendo em consideração a boa qualidade dos RNAs extraídos procedeu-se às reacções enzimáticas que compõem a técnica de RT-PCR. Os resultados obtidos estão apresentados na figura III.27.

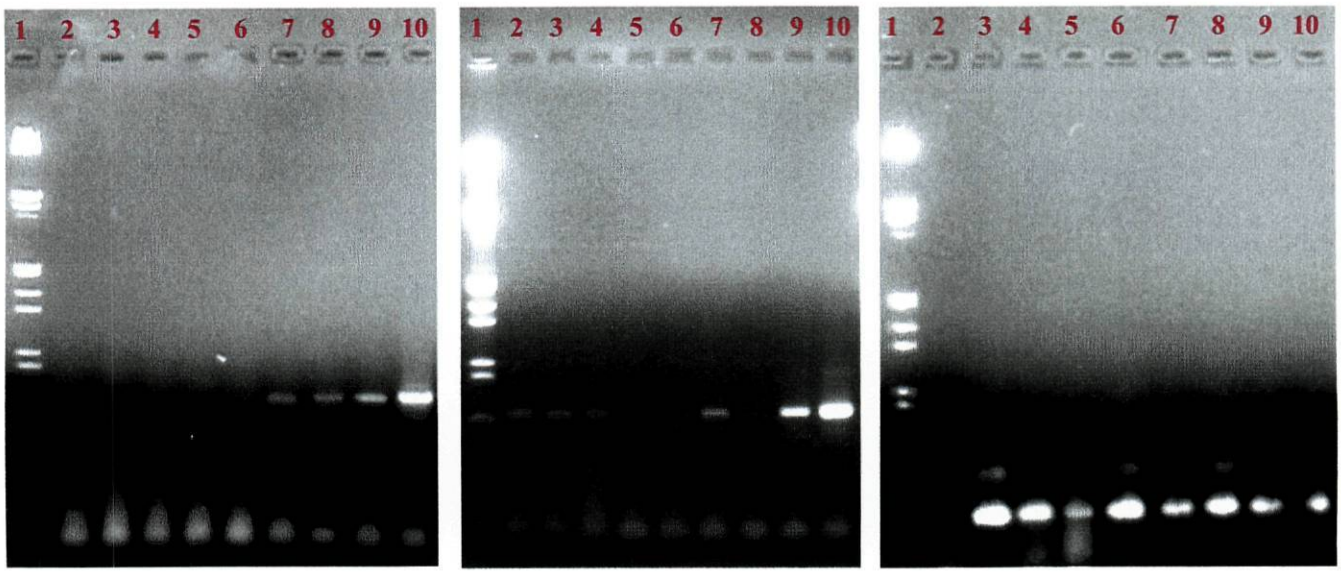


Figura III.27: Separação electroforética, em gel de agarose 0,8 % (p/v), de 15 µL da reacção de PCR seguida à reacção de RT. Pistas: 1 – 250 ng de DNA de fago λ digerido com *Eco*RI e *Hind*III; 2 – raiz, 3 – tubérculo em abrolhamento, 4 – tubérculo em crescimento, 5 – brolho, 6 – caule, 7 – folha senescente, 8 – folha velha, 9 – folha expandida, 10 – folha jovem. A – reacção de RT-PCR específica para o cDNA 14A1.2; B – reacção de RT-PCR específica para o cDNA T5F8.1A e C – reacção de RT-PCR específica para o cDNA C1A1A.

Da figura anterior é possível observar a presença de amplificados do cDNA 14A1.2 (A) nos órgãos aéreos (caule, folhas – todos os estados de desenvolvimento estudados) indicativos da presença do mRNA que codifica a subunidade da GS2. Em contraste com esta observação, foi possível detectar amplificados relacionados com o clone T5F8.1A em todas as pistas, indicando uma presença constitutiva deste mRNA em todos os órgãos e situações analisados. À semelhança do cDNA T5F8.1A que codifica uma subunidade citosólica da GS, é possível observar amplificados relacionados com o cDNA C1A1A em todas as pistas, à excepção da pista 2 (raiz). Estes resultados sugerem que este mRNA está presente em todas as situações analisadas, não surgindo, porém, nas raízes.

Devido ao facto de não terem sido detectados transcritos relacionados com o clone plastidial e um dos clones citosólicos em alguns órgãos, torna-se viável a possibilidade de ocorrência de expressão diferencial dos diferentes genes que codificam as subunidades da GS.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM A GS COM UMA SONDA CONSERVADA

A análise da expressão dos genes da GS em batateira foi feita por "Northern blotting" recorrendo inicialmente a uma sonda de DNA homóloga (T5F8.1A) marcada com ^{32}P-dCTP,

como descrito na secção Material e Métodos. Os resultados da hibridação desta sonda, sob condições de média restringência, estão representados na figura III.28.

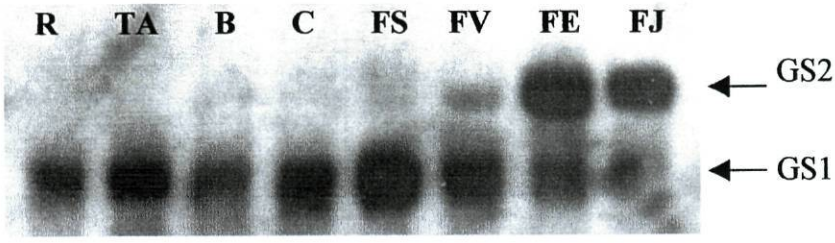


Figura III.28: "Northern blotting" de 10 µg de RNA total de batateira fragmentado em gel desnaturante de formaldeído de 1,2% (p/v) de malha. R – raiz; TA – tubérculo em abrolhamento; B – brolho; C – caule; FS – folha senescente; FV – folha velha; FE – folha expandida e FJ – folha jovem. Os transcritos da GS detectados estão assinalados com setas.

Da análise por "Northern blotting", com a sonda conservada utilizada na hibridação, foi possível detectar transcritos de tamanhos diferentes relacionados com a GS: um com aproximadamente 1,5 kb (± 100 bases) e outro com aproximadamente 1,3 kb (± 100 bases).

Os transcritos com 1,5 kb foram detectados exclusivamente nos diferentes estados de folha, tendo a sua abundância relativa aumentado do estado de "folha jovem" para "folha expandida" atingindo o seu máximo de acumulação neste. Na "folha velha" já se verificou um decréscimo acentuado na sua acumulação, sendo praticamente não detectável na pista relativa à "folha senescente". Pelo facto de esta banda ser a de maior tamanho e de surgir nos diferentes estados de desenvolvimento das folhas, parece estar relacionada com as subunidades da GS plastidial ou GS2.

Os transcritos de menor tamanho, com 1,3 kb, foram detectados em todos os órgãos e estados de desenvolvimento estudados, sendo os únicos detectados nos órgãos não fotossintéticos. Um aspecto interessante reside no facto de a intensidade relativa das bandas aumentar gradualmente ao longo dos diferentes estados de desenvolvimento das folhas, sendo o seu máximo de intensidade observado no estado de "folha senescente". Por comparação com os resultados obtidos das reacções de RT-PCR, e com base no tamanho, estes transcritos parecem estar relacionados com subunidades citosólicas da GS ou GS1.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM A GS COM SONDAS ESPECÍFICAS

Foram utilizadas sondas de cadeia simples de DNA marcadas com digoxigenina por PCR a partir de DNA molde, também criado por PCR, como descrito na secção Material e Métodos.

Foram testados 5 µL de cada reacção de PCR conducente à preparação de DNA molde a ser utilizado na obtenção de sondas marcadas com digoxigenina. Nesta reacção utilizou-se como oligonucleótidos iniciadores um designado GSF6, que emparelha a 5' do cDNA, perto da região conservada IV e a estende para 3'; a 3' do cDNA utilizaram-se iniciadores específicos que emparelham no genoma do fago, flanqueando o local de clonagem e cuja extensão progride para 5' do cDNA. O resultado obtido pode ser observado na figura III.29.

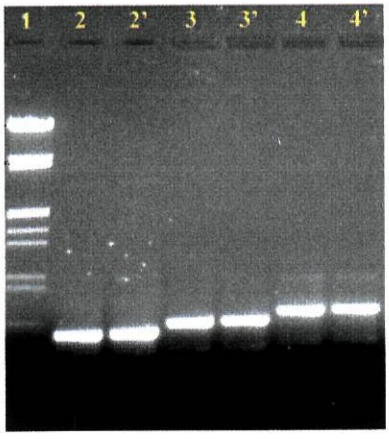


Figura III.29: Separação electroforética de 5 µL da reacção de PCR efectuada para obter os moldes de DNA a serem utilizados na obtenção de sondas marcadas com digoxigenina. em gel de agarose 1,0 % (p/v), usando TAE 1x como tampão de electroforese. Pistas: 1 – DNA de fago lambda digerido com *Eco*RI e *Hind*III (200 ng); 2 e 2' – T5F8.1A; 3 e 3' – C1A1A e 4 e 4' – 14A1.2.

Foi possível obter amplificação da porção 3' dos cDNAs utilizando a combinação de iniciadores indicada. Os produtos obtidos apresentam tamanhos aproximados de 480 bp (T5F8.1A), 500 bp (C1A1A) e 550 bp (14A1.2), estando de acordo com os tamanhos teóricos esperados. Procedeu-se à reacção de PCR unidireccional utilizando-se apenas o oligonucleótido iniciador que emparelha a 3' do cDNA. No final da reacção de marcação procedeu-se à análise da eficiência de incorporação dos nucleótidos com digoxigenina em gel de agarose. As reacções com bom rendimento foram utilizadas num passo de purificação com acetato de lítio para remover nucleótidos marcados não incorporados.

Da figura III.30 é possível observar a eficiência da marcação das sondas de ssDNA com digoxigenina por PCR unidireccional. Quando comparada a posição destas bandas com as da figura anterior é possível observar que o "tamanho" destas moléculas de DNA, apesar de serem de cadeia simples, é superior ao das moléculas que serviram de molde à sua síntese. Este fenómeno deve-se ao facto de ter ocorrido incorporação de nucleótidos com digoxigenina du-

rante as reacções de PCR que retardam a migração das moléculas marcadas no gel. Esta propriedade permite concluir que efectivamente houve marcação dos ácidos nucleicos com esta molécula. Em cada pista surgem mais do que uma banda, resultantes da incorporação de mais (bandas mais pesadas) ou menos (banda mais leve) digoxigenina que na banda intermédia e mais forte.

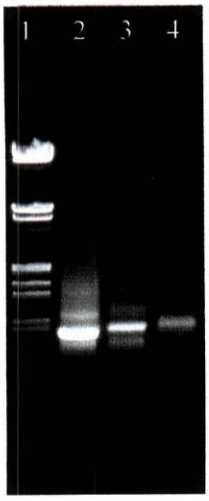


Figura III.30: Separação electroforética em gel de agarose 0,8 % (p/v) de 2 µL dos produtos purificados com acetato de lítio resultantes da reacção de marcação de sondas de ssDNA com digoxigenina por PCR. Pistas: 1 – DNA de fago lambda digerido com *Eco*RI e *Hind*III (250 ng); 2 – T5F8.1A; 3 – C1A1A e 4 – 14A1.2.

A utilização das regiões 3' não traduzidas dos cDNAs em estudo como sondas relacionadas com as subunidades citosólicas da GS permitiu avaliar o padrão de acumulação de cada mRNA nos diferentes órgãos e estados de desenvolvimento da planta analisados.

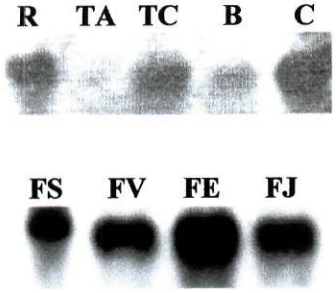


Figura III.31: "Northern blottings" de 10 µg de RNA total de batateira fragmentado em gel desnaturante de formaldeído de 1,2% (p/v) de malha, utilizando como sonda ssDNA específica a região 3' não traduzida do cDNA T5F8.1A, obtido após 25 minutos de exposição. Pistas: R – raiz; TA – tubérculo em abrolhamento; TC – tubérculo em crescimento; B – brolho; C – caule; FS – folha senescente; FV – folha velha; FE – folha expandida e FJ – folha jovem.

Na figura III.31 é possível observar o padrão de acumulação de mRNAs relacionados com o cDNA T5F8.1A. Da análise desta figura verifica-se que estes mRNAs são acumulados em todos as situações analisadas neste estudo. Ao nível dos tubérculos verifica-se que a acumulação destes mRNAs é maior quando estes estão em crescimento do que quando estão em abrolhamento. Relativamente aos diferentes estados fisiológicos das folhas é ainda possível observar que a acumulação relativa destes mRNAs aumenta da fase "folha jovem" para "folha expandida". Este padrão de acumulação altera-se nas outras fases, diminuindo na "folha velha" e na "folha senescente".

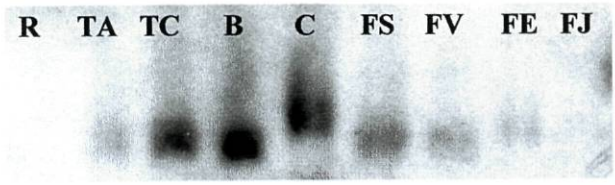


Figura III.32: "Northern blotting" de 10 µg de RNA total de batateira fragmentado em gel desnaturante de formaldeído de 1,2% (p/v) de malha, utilizando como sonda ssDNA específica a região 3' não traduzida do cDNA C1A1A, obtido após 25 minutos de exposição. Pistas: R – raiz; TA – tubérculo em abrolhamento; TC – tubérculo em crescimento; B – brolho; C – caule; FS – folha senescente; FV – folha velha; FE – folha expandida e FJ – folha jovem.

Na figura III.32 é possível observar o padrão de acumulação de mRNAs relacionados com o cDNA C1A1A. Verifica-se que estes mRNAs são acumulados em todos as situações analisadas neste estudo, à excepção das raízes. Relativamente aos diferentes estados fisiológicos das folhas é ainda possível observar que a acumulação relativa destes mRNAs aumenta progressivamente com a idade das folhas. Ao nível dos tubérculos verifica-se que a acumulação destes mRNAs é maior quando estes estão em crescimento do que quando estão em abrolhamento.

Ambos os mRNAs que codificam subunidades da GS1 estão presentes na maioria das situações analisadas e apresentam padrões de acumulação relativa semelhantes. No entanto, quando analisado o padrão de acumulação destes mRNAs nas folhas, é possível verificar que a sua acumulação é diferente. Os mRNAs relacionados com o cDNA T5F8.1A acumulam-se progressivamente até à fase de "folha expandida", diminuindo a partir desta fase até à fase de "folha senescente", enquanto que os mRNAs relacionados com o cDNA C1A1A apresentam um aumento progressivo de acumulação desde a "folha jovem" a "senescente". Salienta-se o facto de ambos os transcritos apresentarem um padrão de acumulação semelhante entre as duas primeiras fases de desenvolvimento foliar e entre as duas fases estudadas de tubérculo. Nas raízes parece ocorrer apenas acumulação de transcritos relacionados com o clone T5F8.1A.

Quando comparados os padrões de acumulação dos transcritos relacionados com o cDNA T5F8.1A e a subunidade da GS2 (figura III.28 – "Northern blotting" com sonda conservada) observa-se a ocorrência de paralelismo entre eles, ambos aumentando nas fases mais jovens do desenvolvimento foliar e reduzindo a sua acumulação a partir da fase de "folha velha". Comparando o padrão de acumulação dos transcritos do cDNA C1A1A com a acumulação de mRNAs da GS1 da figura III.28, nas situações relativas às folhas, é possível verificar uma sobreposição de padrões, visto em ambos os ensaios ter ocorrido um aumento progressivo da acumulação da GS1. Este dado sugere que apesar de ocorrer um decréscimo na acumu-

lação de mRNAs do clone T5F8.1A, este decréscimo não se reflecte na quantidade de transcritos da GS1 detectada com a sonda conservada, sugerindo que a proporção relativa de mRNAs relacionados com o clone T5F8.1A seja inferior à dos mRNAs relacionados com o cDNA C1A1A e que a participação relativa dos dois tipos de mRNAs para a população da GS1 seja diferente.

ANÁLISE DA ACUMULAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS DA GS

As proteínas solúveis de extractos proteicos das situações em estudo foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose com subsequente detecção dos polipeptídeos da GS com anticorpos anti-GS. Nestes ensaios utilizou-se a mesma quantidade de proteína para cada amostra.

Figura III.33: "Western blotting" de 20 μg de proteínas de batateira separadas por SDS-PAGE 12,5% e transferidas para suporte de nitrocelulose com subsequente detecção dos polipeptídeos de GS com anticorpos anti-GS. Pistas: R – raiz; TA – tubérculo em abrolhamento; TC – tubérculo em crescimento; B – brolho; C – caule; FS – folha senescente; FV – folha velha; FE – folha expandida e FJ – folha jovem. As setas indicam os tipos de polipeptídeos detectados.

A análise por "Western blotting" do padrão de acumulação das subunidades da GS revelou a presença da GS em todas as situações analisadas (figura III.33). Os dois tipos de subunidades podem ser encontrados em simultâneo nas folhas e no caule, apresentando uma massa aproximada de 45 kDa (GS2) e de 42 kDa (GS1). Ao nível do desenvolvimento das folhas é possível observar um comportamento semelhante ao padrão de acumulação de transcritos quando detectados com uma sonda conservada: verifica-se um aumento de acumulação relativa dos polipeptídeos da GS2 da "folha jovem" para "expandida" e a sua diminuição progressiva desta situação para as situações de folhas "velha" e "senescente"; em paralelo, assiste-se a um aumento progressivo da acumulação de polipeptídeos da GS1 nestas mesmas situações.

Nos órgãos subterrâneos surge apenas a GS1. Uma diferença detectada é a alteração da acumulação relativa da GS1 nas situações de tubérculo em abrolhamento e em crescimento, maior na primeira situação que na segunda, surgindo invertidas em relação à análise por "Northern blotting".

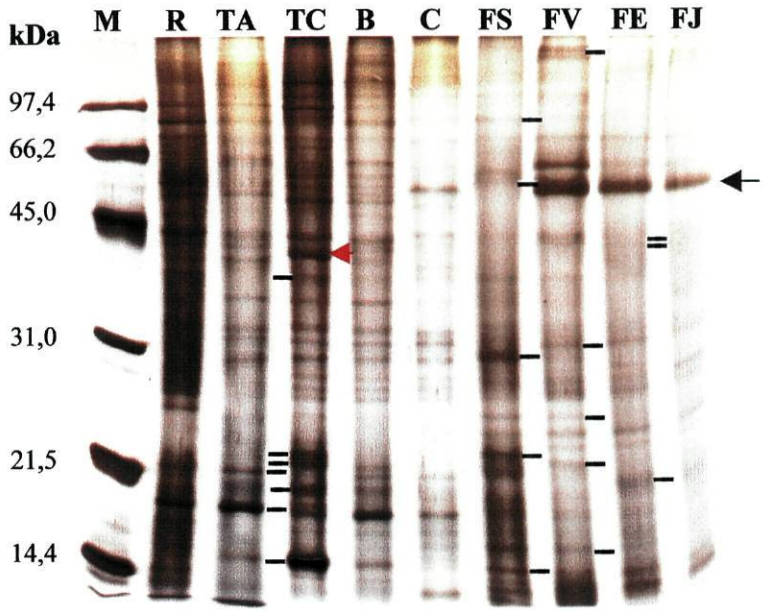


Figura III.34: SDS-PAGE 12,5% de extractos totais de proteínas solúveis de diferentes órgãos e estados de desenvolvimento da batateira correspondentes a 10 μg de proteínas. Os polipeptídeos no gel foram visualizadas com nitrato de prata. Pistas: M – marcador de massa molecular; R – raiz; TA – tubérculo em abrolhamento; TC – tubérculo em crescimento; B – brolho; C – caule; FS – folha senescente; FV – folha velha; FE – folha expandida e FJ – folha jovem. Traços – polipeptídeos cuja acumulação variou; setas: preta – posição da subunidade maior da RuBisCo; vermelha – posição da patatina.

A análise do perfil electroforético dos polipeptídeos relativos às proteínas solúveis de extractos totais das diferentes situações estudadas (figura III.34) permite verificar a ocorrência da alteração da acumulação de alguns polipeptídeos entre os diferentes estados de desenvolvimento das folhas e dos tubérculos analisados (ver traços), indicando que os órgãos utilizados se encontravam em situações fisiológicas distintas na altura da colheita. Uma particularidade reside no facto de surgir uma banda mais intensa na situação "folha velha" na posição possível da subunidade maior da RuBisCo (seta), apesar de na altura da colheita as folhas desta situação apresentarem uma coloração verde menos intensa que as folhas mais jovens. A observação da intensidade da pigmentação é corroborada com os valores obtidos na determinação do teor clorofilino presentes no gráfico seguinte.

No caso dos tubérculo verifica-se um aumento da intensidade da banda de aproximadamente 40 kDa, a qual deverá corresponder à patatina, a principal proteína de reserva deste órgão (152).

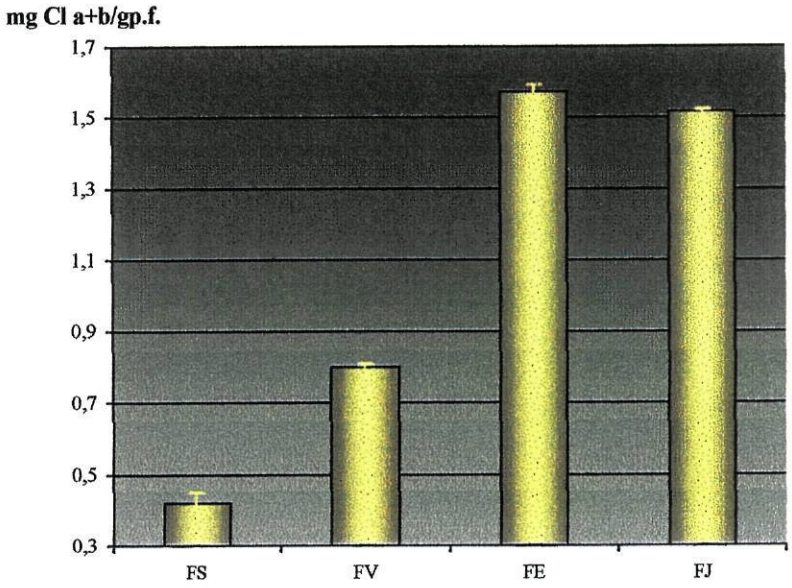


Gráfico III.1: Representação gráfica do teor clorofilino dos estados fisiológicos estudados de folha, expresso em mg clorofila a + b por grama de tecido fresco. FS – folha senescente; FV – folha velha; FE – folha expandida e FJ – folha jovem. As colunas representam a média ± o desvio padrão. As diferenças dos diferentes valores em relação à situação "folha expandida" são significativas a $P<0,05$.

O teor de clorofilas a+b mais elevado foi obtido no estado de "folha expandida" (100%), seguido do estado de "folha jovem" (96,36%), tendo diminuído nos estados de "folha velha" (50,91%) e "folha senescente" (26,85%). Estes dados vêm corroborar as observações feitas da análise do padrão electroforético dos polipeptídeos solúveis e a observação macroscópica, indicando que as situações fisiológicas das folhas utilizadas neste estudo eram distintas.

A acumulação dos diferentes polipeptídeos da GS foi ainda estudada recorrendo à separação destes em duas dimensões, seguida de "Western blotting". É possível observar 3 pontos isoeléctricos diferentes relativos a polipeptídeos da GS nas folhas e no caule e apenas 2 nos órgãos subterrâneos, à excepção das raízes onde surge apenas 1 (figura III.35).

Nas folhas, o ponto isoeléctrico com maior massa apresenta um valor aproximado de 4,7 e corresponde a uma subunidade da GS2; os de menor massa molecular apresentam pI aproximado de 5,0 e 4,8 (esquerda e direita, respectivamente) e correspondem a subunidades da GS1. O polipeptídeo com pI=5,0 apresenta uma abundância relativa superior à do polipeptídeo com pI=4,8 em todos os estados fisiológicos de folha estudados; a sua acumulação relativa também aumenta com a idade fisiológica da folha. O polipeptídeo com pI=4,8, mesmo sendo o menos abundante nas folhas, sofre um aumento de acumulação relativa do estado "folha jovem" para "folha expandida", sofrendo uma diminuição progressiva de acumulação com o aumento da idade fisiológica das folhas, sendo praticamente não detectado na situação

"folha velha". Não foi possível fazer este procedimento para a situação de "folha senescente" por não ter sido obtida quantidade de proteína suficientemente concentrada para fazer a separação na primeira dimensão.

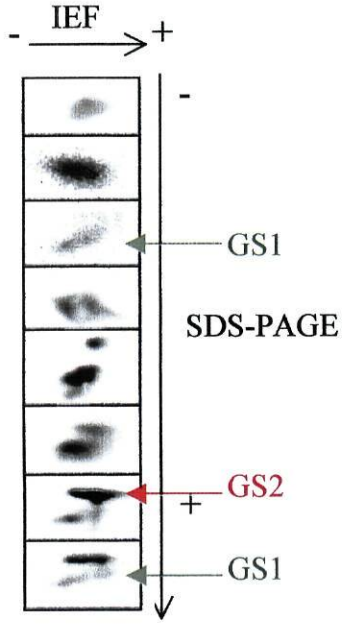


Figura III.35: Análise bidimensional de polipeptídeos de GS separados em geles de poliacrilamida. As proteínas (50 μg) foram separadas por focagem isoeléctrica (IEF, pH 3-10) e depois por SDS-PAGE 12,5%. Após transferência para nitrocelulose, os polipeptídeos de GS foram detectados com anticorpos anti-GS. As setas indicam a posição dos polipeptídeos que compõem as GS dos órgãos estudados. R – raiz, TA – tubérculo em abrolhamento, TC – tubérculo em crescimento, B – brolho, C – caule, FV – "folha velha", FE – "folha expandida" e FJ – "folha jovem".

Nos órgãos não verdes, excluindo as raízes, surgem os dois polipeptídeos relacionados com a GS1 em proporções semelhantes, independentemente do órgão ou estado fisiológico estudado.

Nas raízes só está presente o polipeptídeo com pI=4,8. Na figura III.35 surge um ponto bastante intenso devido a uma revelação prolongada na tentativa de evidenciar um segundo ponto isoeléctrico, o qual nunca surgiu nos vários ensaios efectuados.

Tendo em consideração os padrões de acumulação de transcritos obtidos com as sondas específicas e com as reacções de RT-PCR e comparando os mesmos com o padrão de acumulação bidimensional dos polipeptídeos de GS é possível estabelecer um paralelismo hipotético entre um cDNA e o polipeptídeo correspondente: se houver uma relação directa entre a acumulação de transcritos e dos respectivos polipeptídeos, então o cDNA T5F8.1A, o único que reconhece os transcritos da GS1 nas raízes, poderá corresponder aos polipeptídeos de GS1 de pI=4,8. De facto, ao comparar o padrão de acumulação de transcritos relacionados com este cDNA com o padrão de polipeptídeos com pI=4,8 obtido nos diferentes estados fisiológicos de folha estudados é possível verificar a ocorrência de sobreposição entre eles. Esta sobreposição sobressai não só na abundância relativa de polipeptídeos e/ou mRNAs nos diferentes estados estudados, como também na variação da sua acumulação relativa, ambos aumentando a sua acumulação de "folha jovem" para "expandida", diminuindo depois com o aumento da idade da folha.

O mesmo raciocínio pode ser aplicado relativamente ao cDNA C1A1A e os polipeptídeos de pI=5,0, cujos padrões de acumulação também são sobreponíveis, como por exemplo, ambos não surgem nas raízes e a sua acumulação relativa aumenta com a idade das folhas.

ESTUDO DO EFEITO DA SECURA E DA ELEVADA SALINIDADE (NaCl 250 mM) NA ACUMULAÇÃO DA GS NA PLANTA

No final deste ensaio foi observada a diminuição do tamanho das plantas e das respectivas folhas nas duas condições de stresse analisadas. Na salinidade ainda se verificou clorose nas folhas em relação às folhas das plantas crescidas nas outras situações. Ao fim de duas semanas de tratamento foi possível verificar uma diminuição acentuada do número de tubérculos em formação na situação de secura quando comparado com a situação controlo. Na salinidade não houve formação de tubérculos ao fim deste período.

Os valores do teor de prolina obtidos para os vários órgãos em estudo estão representados no gráfico III.2. Estes valores são significativos quando analisados de acordo com o teste *t de Student*, para uma probabilidade $P<0,05$, em relação à situação controlo.

É possível observar que houve um aumento da acumulação de prolina em todos os órgãos estudados em relação à situação controlo; este aumento foi mais notório nas raízes e nos tubérculos do que nas folhas. Quando tomados em consideração os teores de prolina nas folhas, verifica-se que o seu teor aumentou 1,56 vezes na situação de secura e 1,73 vezes na situação de salinidade. Nas raízes é possível verificar que este aumento é mais elevado na situação de stresse salino (3,43 vezes) do que em secura (2,69 vezes). No entanto, o teor deste aminoácido nos tubérculos em crescimento aumentou cerca de 1,86 vezes na situação de secura.

A quantificação do teor de clorofilas a + b conduziu a diferenças estatísticas significativas segundo o teste *t de Student*, executado nas condições descritas anteriormente. Da análise do gráfico III.3 é possível verificar que as situações de stresse conduziram a acumulações diferentes de clorofilas a+b. Na situação de secura verificou-se um aumento do teor clorofilino em 5,6%; enquanto que na situação de salinidade o teor clorofilino diminuiu 20,37% em relação à situação controlo.

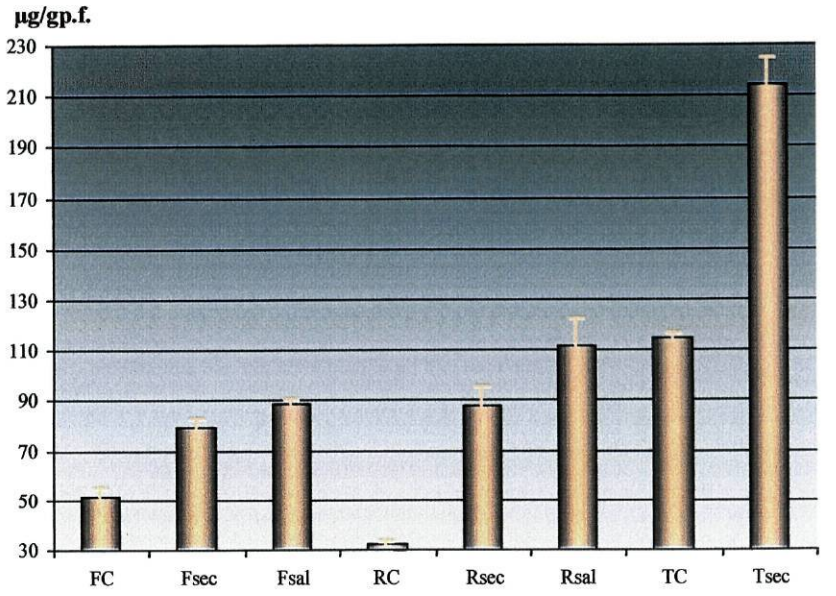


Gráfico III.2: Representação gráfica do teor de prolina em µg por grama de tecido fresco (g p.f.). C – controlo; sec – secura e sal – NaCl 250 mM. F – 4ª folha; R – raízes e T – tubérculos em formação. As colunas representam a média ± o desvio padrão. As diferenças dos diferentes valores em relação à situação controlo são significativas a $P<0,05$.

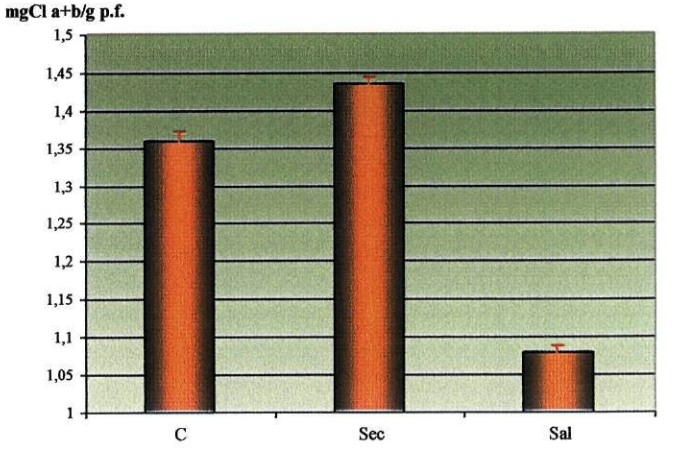


Gráfico III.3: Representação gráfica do teor de clorofilas a + b em mg por grama de tecido fresco (g p.f.) na quarta folha a contar do ápice. C – controlo; sec – secura e sal – NaCl 250 mM. As colunas representam a média ± o desvio padrão. As diferenças dos diferentes valores em relação à situação controlo são significativas a $P<0,05$.

Quando analisados os teores de proteínas solúveis (gráfico III.4) verifica-se que ambas as situações de stresse conduziram a diferenças estatísticas significativas quando comparados com a respectiva situação controlo. Ao nível da 4ª folha a contar do ápice ocorreu uma diminuição da acumulação de proteínas em cerca de 4,51% no caso da secura e em cerca de 10,4% no caso da salinidade. Nas raízes e nos tubérculos ocorreu um aumento do teor proteico solúvel. Nas raízes das plantas crescidas em condições de secura ocorreu um aumento de cerca de 96,2%, tendo sido este aumento aproximado de 106% no caso da salinidade. O aumento veri-

ficado no teor proteico solúvel nos tubérculos em crescimento na situação de secura foi aproximado de 24,71%.

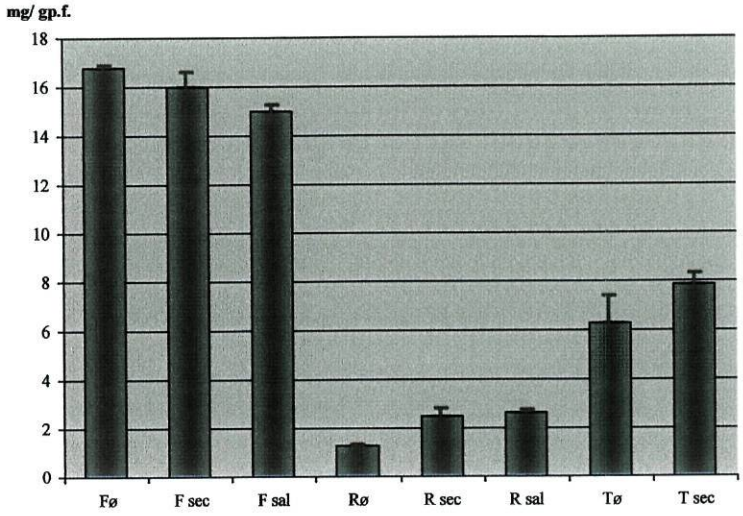


Gráfico III.4: Representação gráfica do teor de proteínas solúveis em mg por grama de tecido fresco (g p.f.). C – controlo; sec – secura e sal – NaCl 250 mM. F – 4ª folha; R – raízes e T – tubérculos em formação. As colunas representam a média ± o desvio padrão. As diferenças dos diferentes valores em relação à situação controlo são significativas a $P<0,05$.

O perfil electroforético das proteínas solúveis foi analisado por SDS-PAGE e o resultado obtido está representado na figura III.36. Os traços azuis indicam diferenças observadas nos diferentes tratamentos e estão localizados à direita das pistas das respectivas situações controlo. É possível observar que o metabolismo proteico das folhas foi alterado nas situações de stresse em estudo uma vez que foram observadas alterações dos perfis electroforéticos dos polipeptídeos solúveis.

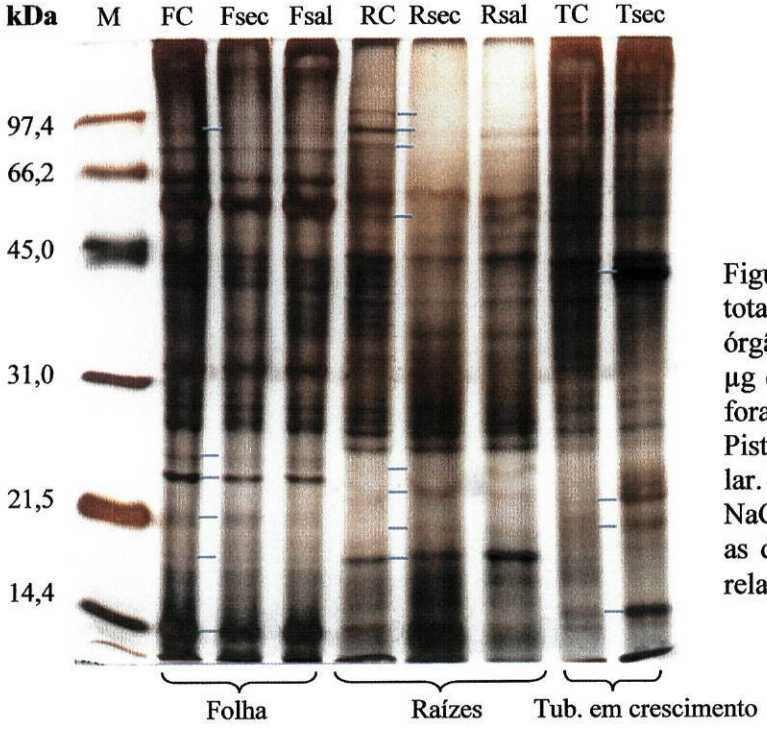


Figura III.36: SDS-PAGE de extractos totais de proteínas solúveis de diferentes órgãos da batateira correspondentes a 10 µg de proteínas. Os polipeptídeos no gel foram visualizadas com nitrato de prata. Pistas: M – marcador de massa molecular. C – controlo; sec – secura e sal – NaCl 250 mM. Os traços azuis indicam as diferenças observadas na acumulação relativa dos polipeptídeos solúveis.

Na situação de secura ocorreu diminuição da acumulação de polipeptídeos de massa aproximada de 95, de 25 e de 14 kDa. Estes polipeptídeos parecem ter sofrido um aumento da sua acumulação na situação de salinidade. Na situação de secura também ocorreu o desaparecimento de polipeptídeos de elevada massa (entre 70 e 98 kDa, aproximadamente), tendo havido um aumento da acumulação de polipeptídeos de massa compreendida entre 15 e 22 kDa. As diferenças encontradas nas raízes das plantas crescidas sob stresse parecem ser mais notórias do que as encontradas nas folhas. Nas plantas crescidas em salinidade também ocorreu uma diminuição dos polipeptídeos de elevada massa e um forte aumento da acumulação nos polipeptídeos de massa menor. A situação de secura conduziu a uma alteração do padrão de acumulação de polipeptídeos nos tubérculos em crescimento, ocorrendo um aumento muito forte destes ao nível dos 40, 21 e 18 kDa.

Face a estes resultados é possível verificar que as condições de stresse em estudo exerceram a sua influência na fisiologia das plantas. Em termos de amplitude das diferenças obtidas nestas situações de stresse, é possível verificar que esta amplitude é menor nas folhas do que nos outros órgãos estudados nos três parâmetros analisados (prolina, clorofilas e proteínas solúveis). As raízes correspondem ao órgão onde as diferenças mais acentuadas foram verificadas, possivelmente devido ao facto de corresponderem ao órgão que primeiro entra em contacto com as condições de stresse utilizadas neste estudo.

Pelo facto de se ter verificado a ocorrência de diferenças significativas nos parâmetros acabados de analisar procedeu-se ao estudo do comportamento de acumulação de polipeptídeos da GS por "Western blotting", para averiguar de que forma a acumulação dos polipeptídeos da GS, e indirectamente, o metabolismo do azoto, poderiam ser afectados pelas situações de stresse estudadas. O resultado obtido por "Western blotting" está representado na figura III.37.

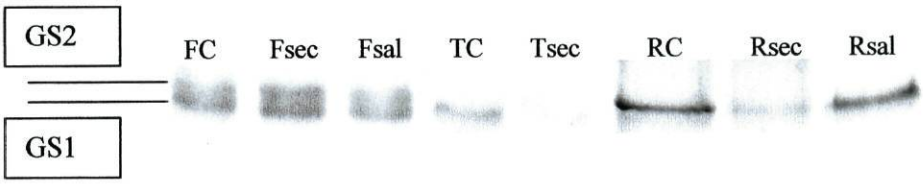


Figura III.37: "Western blotting" de 20 µg de proteínas de batateira separadas por SDS-PAGE e transferidas para suporte de nitrocelulose com subsequente detecção dos polipeptídeos de GS com anticorpos anti-GS. Pistas: FC – folha controlo; Fsec – folha secura; Fsal – folha salinidade; TC – tubérculo em crescimento controlo; Tsec – tubérculo em crescimento secura; RC – raiz controlo; Rsec – raiz secura e Rsal – raiz salinidade. As caixas indicam os polipeptídeos detectados.

As situações de stresse utilizadas conduziram a alterações da acumulação relativa dos polipeptídeos da GS nos órgãos estudados. Analisando os resultados obtidos para a 4ª folha a

contar do ápice é possível verificar que em relação à situação controlo, a situação de secura não conduziu a uma alteração significativa da acumulação de ambos polipeptídeos da GS (GS1 e GS2), enquanto que nas plantas sujeitas a salinidade ocorreu uma diminuição, embora reduzida, da acumulação dos polipeptídeos da GS2. A secura provocou uma diminuição da acumulação dos polipeptídeos da GS1 em tubérculos em crescimento e nas raízes, tendo ocorrido um ligeiro aumento da acumulação de polipeptídeos da GS1 nas raízes provenientes de plantas crescidas sob salinidade.

A acumulação dos transcritos específicos para cada clone foi avaliada por "Dot" e "Northern blotting" utilizando sondas ssDNA marcadas com digoxigenina por PCR unidireccional. O RNA total de cada situação foi extraído e quantificado. A qualidade deste foi avaliada em gel de agarose (figura III.38).

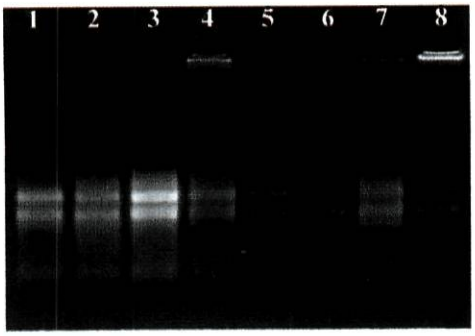


Figura III.38: Separação electroforética em gel de agarose 0,8% de 200 ng de RNA total de batateira extraídos de folhas, raízes e tubérculos em crescimento de plantas sujeitas a condições de secura e salinidade. 1 – 4ª folha controlo; 2 – 4ª folha secura; 3 – 4ª folha NaCl 250 mM; 4 – raiz controlo; 5 – raiz secura; 6 – raiz NaCl 250 mM; 7 – tubérculo em crescimento controlo; 8 – tubérculo em crescimento secura.

De acordo com a figura anterior é possível observar que o RNA isolado das diferentes situações em estudo apresentou-se íntegro e com baixa contaminação por DNA genómico. Tendo em consideração a boa qualidade do RNA extraído, procedeu-se à avaliação da acumulação dos transcritos relacionados com o cDNA T5F8.1A por "Northern blotting" (figura III.39).

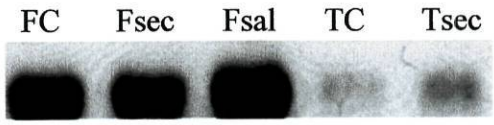


Figura III.39: "Northern blotting" de 10 µg de RNA total de batateira fragmentado em gel desnaturante de formaldeído de 1,2% (p/v), utilizando como sonda ssDNA específica a região 3' não traduzida do cDNA T5F8.1A, obtido após 30 minutos de exposição. Pistas: F – folha; T – tubérculo em crescimento; C – controlo, sec – secura, sal – NaCl 250 mM.

A acumulação relativa de mRNA relacionado com o clone T5F8.1A sofreu variações nas situações de stresse impostas quando comparadas com a situação controlo. Nas folhas ocorreu diminuição da acumulação destes transcritos na situação imposta de secura com a duração de 2 semanas. No entanto, a elevada salinidade imposta durante este período de tempo

conduziu a um aumento da acumulação de mRNA. Nos tubérculos em crescimento colhidos das plantas sujeitas a secura foi possível assistir a um padrão de acumulação diferente do observado nas folhas, ocorrendo um aumento ligeiro da acumulação de mRNAs relacionados com o cDNA utilizado como sonda.

Devido ao facto de a técnica de "Northern blotting" utilizada (via métodos não isotópicos) ser muito difícil de ser obtida com níveis de ruído de fundo reduzidos, e na tentativa de diminuir o tempo despendido na determinação da acumulação relativa dos mRNAs dos diferentes clones, procedeu-se à análise desta por "Dot blotting", evitando deste modo a separação electroforética e a transferência durante a noite (equivalente a 24 horas) e permitindo prosseguir directamente da aplicação das amostras para a hibridação da membrana no mesmo dia. As amostras foram aplicadas de acordo com o esquema representado na figura III.40.

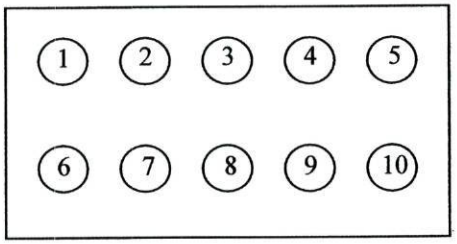


Figura III.40: Diagrama esquemático da aplicação de amostras no "Dot blotting" referido no texto. 1 – controlo positivo (1 µL de uma diluição 1:100 do mini-prep de DNA plasmídico correspondente à sonda utilizada); 2 – controlo negativo (5 µL de uma reacção de PCR efectuada sobre DNA de ratinho (*Mus musculus*) de rastreio de mutantes em citoquinas); 3 – 4ª folha controlo; 4 – 4ª folha secura; 5 – 4ª folha NaCl 250 mM; 6 – raiz controlo; 7 – raiz secura; 8 – raiz NaCl 250 mM; 9 – tubérculo em crescimento controlo e 10 – tubérculo em crescimento secura.

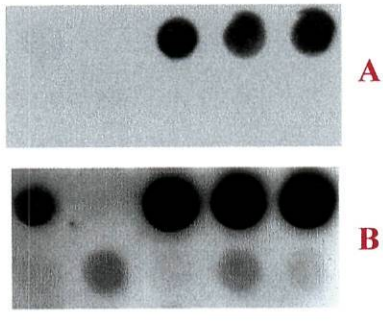


Figura III.41: "Dot blotting" de 10 µg de RNA total extraído de diferentes órgãos de batateiras crescidas sob situações de stresse ambiental distintas resultante da hibridação com o clone 14A1.2. A – 25 minutos de exposição; B – exposição durante a noite.

Da análise da figura III.41, obtida ao fim de 25 minutos de exposição (A), é possível verificar que a sonda utilizada (específica do clone plastidial) reconheceu transcritos apenas nas folhas. Os resultados obtidos revelaram que as situações de stresse estudadas conduziram à diminuição da acumulação relativa de mRNAs do clone 14A1.2 neste órgão. No entanto, após uma noite de exposição (B), foi possível verificar que esta sonda também reconheceu transcritos nos outros órgãos em estudo, ou seja, nas raízes e nos tubérculos em crescimento. Além do mais, em B verifica-se que ocorreu variação da acumulação relativa de mRNAs em função da situação de stresse e do órgão: nas raízes ocorreu um aumento da acumulação de mRNAs na situação de secura, não tendo ocorrido alteração no padrão de acumulação nas raízes pro-

venientes das plantas crescidas em salinidade; nos tubérculos ocorreu diminuição da acumulação relativa destes transcritos na situação de secura.

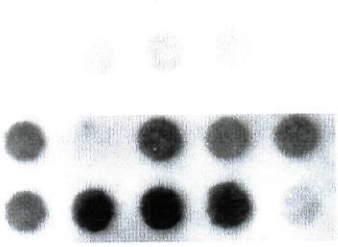


Figura III.42: "Dot blotting" de 10 µg de RNA total extraído de diferentes órgãos de batateiras crescidas sob situações de stresse ambiental distintas resultante da hibridação com o clone C1A1A. A – 25 minutos de exposição; B – exposição durante a noite.

A exposição de 25 minutos da membrana resultante da hibridação com a sonda do clone C1A1A (figura III.42 A) conduziu a impressões muito ténues e não seguras de interpretação, pelo que se retornou a expor durante a noite (B). Da análise da impressão B é possível verificar que a sonda utilizada reconheceu transcritos em todas as situações estudadas. Nas folhas assistiu-se a uma diminuição da acumulação relativa de mRNAs relacionados com este clone de cDNA nas duas situações de stresse analisadas. Ao nível das raízes ocorreu um aumento de acumulação de mRNAs em ambas as situações de stresse, parecendo este aumento ser maior na salinidade. Nos tubérculos em crescimento ocorreu uma diminuição considerável da acumulação relativa de mRNAs relacionados com o clone C1A1A.

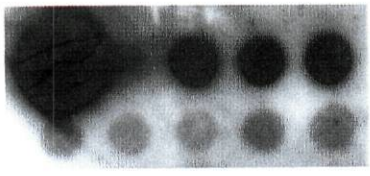


Figura III.43: "Dot blotting" de 10 µg de RNA total extraído de diferentes órgãos de batateiras crescidas sob situações de stresse ambiental distintas resultante da hibridação com o clone T5F8.1A. 25 minutos de exposição.

A exposição da membrana resultante da hibridação com a sonda T5F8.1A durante a noite conduziu a um ruído de fundo muito elevado, o qual impossibilitava a observação de qualquer variação na acumulação de mRNAs, pelo que se optou por não apresentar este resultado. Na figura III.43 é possível observar que todos os órgãos estudados acumularam mRNAs relacionados com este cDNA. Nas folhas verifica-se que ocorreu uma diminuição ligeira na acumulação destes transcritos na situação de secura. Porém, na situação de salinidade verificou-se ocorrer um aumento de acumulação, embora também ligeira. Nas raízes a interpretação dos resultados torna-se mais difícil devido à mancha resultante do controlo positivo, que se sobrepõem parcialmente sobre o local onde a amostra da situação controlo foi aplicada. No entanto, foi observada qualquer alteração da acumulação destes transcritos nas raízes provenientes de

plantas crescidas sobre as duas situações de stresse estudadas. Nos tubérculos ocorreu um ligeiro aumento na acumulação relativa destes transcritos.

Quando comparados os padrões de acumulação de mRNA acabados de descrever com o padrão de acumulação de polipeptídeos da GS obtido neste estudo é possível verificar algumas discrepâncias: enquanto que foi observado uma manutenção do teor relativo de polipeptídeos da GS1 nas duas situações de stresse analisadas ao nível das folhas, tal não foi observado nos níveis de transcritos, verificando-se ter ocorrido um aumento da acumulação de mRNAs relacionados com o cDNA T5F8.1A na situação de salinidade e uma diminuição destes na secura. Relativamente ao clone C1A1A, a acumulação relativa dos seus mRNAs diminuiu nas folhas colhidas em ambas as situações. Apenas o padrão de acumulação dos transcritos relacionados com a GS2 encontrou paralelismo no "Western blotting".

A diminuição do teor proteico de GS1 observada nos tubérculos em crescimento provenientes da situação de secura não apresenta correspondência na acumulação de mRNA observada para o clone T5F8.1A, mas sim com a do clone C1A1A. Nas raízes, a diminuição do teor polipeptídico de GS1 observado na secura pode ser sobreposto ao padrão de acumulação observado para o cDNA T5F8.1A, enquanto que na salinidade isso já ocorre com o clone C1A1A.

De um modo geral, a situação de elevada salinidade parece ter conduzido a uma resposta fisiológica mais marcada do que a secura, o que se reflecte numa maior acumulação de prolina e num decréscimo acentuado dos teores de clorofilas e de proteínas solúveis observados. Ao nível do padrão electroforético das proteínas solúveis também se verificaram mais dissimilaridades qualitativas e quantitativas nos órgãos analisados colhidos das plantas sujeitas a salinidade.

Apesar de não ter sido possível determinar o potencial hídrico dos solos onde as plantas de cada lote cresceram, será possível admitir que o stresse hídrico terá sido menos severo que o salino simplesmente pelo facto de terem sido suprimidas as regas no lote de plantas sujeitas a secura ao mesmo tempo que se iniciaram as regas com a solução salina, o que implica que a disponibilidade de água se tenha mantido por mais algum tempo nestas plantas, tendo como consequência um período inferior a 2 semanas de tratamento para este stresse.

ESTUDO DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE SALINIDADE (NaCl 100 E 200 mM) NA ACUMULAÇÃO DA GS NA PLANTA

Este estudo surgiu como satélite da cooperação com outro trabalho em desenvolvimento no mesmo departamento onde foi realizada esta obra, pelo que os dados aqui apresentados serão relacionados com a parte que estará mais relacionada com a GS. Parte dos resultados obtidos pelo grupo de investigação em relação a este assunto já foram apresentados em congressos de acordo com as seguintes referências (62, 174).

Foi analisada a variação do teor de proteínas solúveis na 4ª folha a contar do ápice nas duas condições de salinidade assim como nos tubérculos retirados de plantas submetidas a 100 mM de NaCl. Os valores obtidos, expressos em mg proteínas por grama de tecido fresco, estão representados no gráfico III.5.

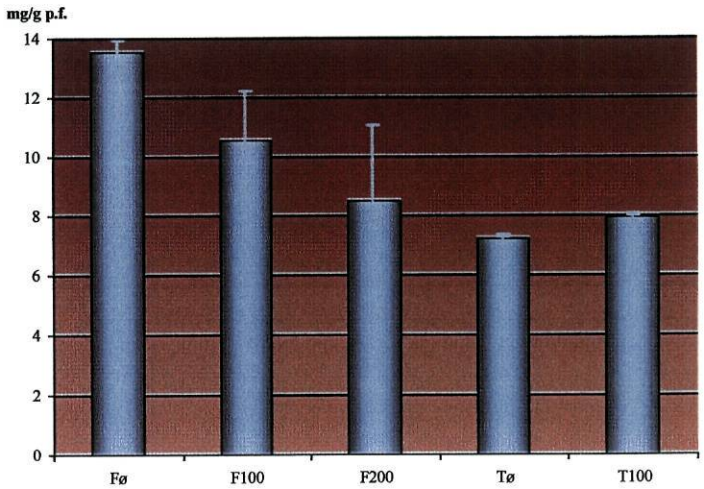


Gráfico III.5: Representação gráfica do teor de proteínas solúveis expresso em mg de proteínas por grama de tecido fresco (g p.f.). F – 4ª folha a contar do ápice; T – tubérculo em crescimento; ø – situação controlo; 100 – situação de NaCl 100 mM e 200 - situação de NaCl 200 mM. As colunas representam a média ± o desvio padrão. As diferenças dos diferentes valores em relação à situação controlo são significativos a $P<0,05$.

Da análise do gráfico anterior é possível verificar que o stresse salino conduziu a uma diminuição do teor de proteínas solúveis ao nível da 4ª folha das plantas analisadas. Esta diminuição correspondeu a 22% na situação de 100 mM e a cerca de 37% na situação de 200 mM. Nos tubérculos em crescimento ocorreu um aumento de cerca de 9,6%.

O stresse salino conduziu à diminuição do teor relativo de água (7% na situação 100 mM e 12% na situação 200mM) e ao aumento do teor em prolina (3,5 vezes e 11 vezes nas situações de 100 e 200 mM) (62). Foi possível verificar que a concentração mais elevada de

NaCl afectou a integridade cloroplastidial, conduzindo à desorganização membranar e à diminuição dos grãos de amido (174).

A variação da acumulação relativa dos polipeptídeos da GS foi analisada por "Western blotting" e os resultados obtidos podem ser visualizados na figura que se segue.

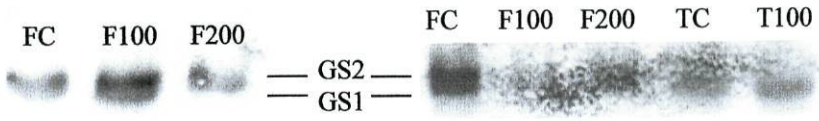


Figura III.44: "Western blotting" de 20 μg de proteínas de batateira separadas por SDS-PAGE e transferidas para suporte de nitrocelulose com subsequente detecção dos polipeptídeos de GS com anticorpos anti-GS. Pistas: FC – folha controlo; F100 – folha 100 mM; F200 – folha 200 mM; TC – tubérculo em crescimento controlo; T100 – tubérculo em crescimento 100 mM.

Nos tubérculos em crescimento das plantas crescidas a 100 mM de NaCl verifica-se ocorrer um aumento de acumulação de GS1 na condição de 100 mM. Não parece ter ocorrido qualquer alteração no padrão de acumulação da GS nas folhas.

Quando visualizado o padrão de acumulação das proteínas solúveis é possível observar diferenças quantitativas nas situações de stresse, quer nas folhas, quer nos tubérculos (figura III.45).

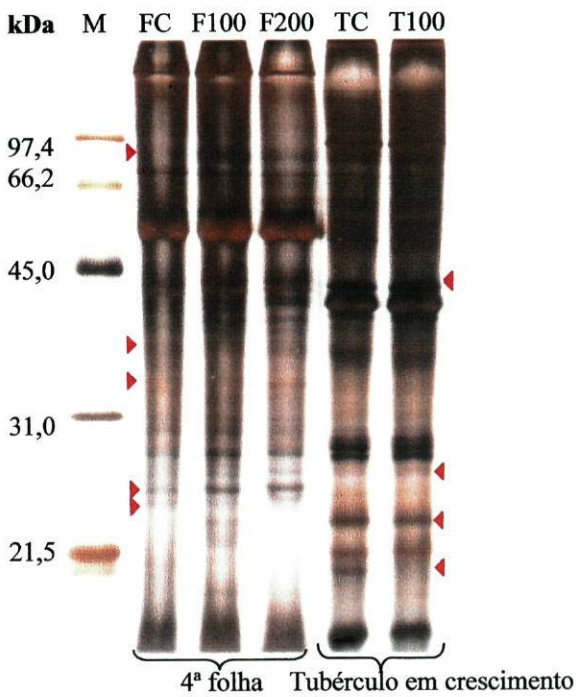


Figura III.45: SDS-PAGE 12,5% de extractos totais de proteínas solúveis de diferentes órgãos da batateira correspondentes a 10 μg de proteínas. Os polipeptídeos no gel foram visualizadas com nitrato de prata. Pistas: M – marcador de massa molecular. C – controlo; 100 – NaCl 100 mM e 200 – NaCl 200 mM. Os triângulos vermelhos indicam as diferenças observadas na acumulação relativa dos polipeptídeos solúveis.

Nos tubérculos em crescimento ocorreu um aumento de acumulação de polipeptídeos de baixa massa molecular, na ordem dos 20 a 30 kDa, havendo um banda que surge mais forte ao nível dos 40 kDa, possivelmente correspondendo à patatina. Nas folhas verificou-se um aumento da acumulação de polipeptídeos com massas situadas entre os 66 e os 97 kDa, entre os 32 e os 36 kDa e entre os 15 e os 22 kDa.

Tendo em consideração os resultados obtidos é possível verificar que as duas situações de salinidade em estudo conduziram a alterações na fisiologia da planta, as quais se manifestaram de modo significativo nos parâmetros bioquímicos estudados, não parecendo ter qualquer efeito marcante na acumulação de polipeptídeos da GS.

Para averiguar se as condições de stresse exerceriam algum efeito ao nível da expressão dos genes que codificam a GS procedeu-se à análise da acumulação de mRNAs através da técnica de "Dot blotting", utilizando sondas ssDNA, correspondentes às porções 3' UTR dos cDNAs em estudo, marcadas com digoxigenina por PCR unidireccional.

Para tal, procedeu-se à extracção e quantificação de RNA total dos órgãos colhidos em cada situação de stresse e avaliou-se a sua integridade em gel de agarose (figura III.46).

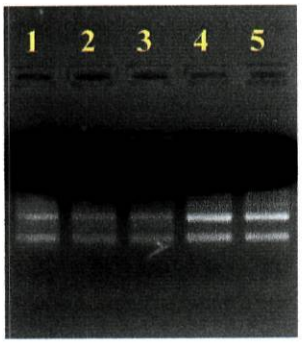


Figura III.46: Separação electroforética em gel de agarose 0,8% (p/v) de 200 ng de RNA total de batateira extraídos de folhas e tubérculos de plantas sujeitas a condições crescentes de salinidade. 1 – 4ª folha controlo; 2 – 4ª folha NaCl 100 mM; 3 – 4ª folha NaCl 200 mM; 4 – tubérculo em crescimento controlo; 5 – tubérculo em crescimento NaCl 100 mM.

De acordo com a figura anterior é possível observar que o RNA isolado das diferentes situações em estudo apresentou-se íntegro e com baixa contaminação por DNA genómico. Tendo em consideração a boa qualidade do RNA extraído, continuou-se com o procedimento de "Dot blotting". A aplicação das amostras seguiu o seguinte esquema (figura III.47).

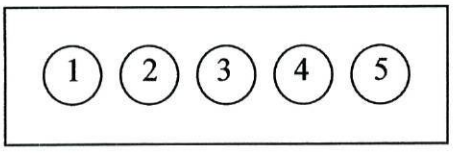


Figura III.47: Diagrama esquemático da aplicação de amostras no "Dot blotting". 1 – 4ª folha controlo; 2 – 4ª folha NaCl 100 mM; 3 – 4ª folha NaCl 200 mM; 4 – tubérculo em crescimento controlo e 5 – tubérculo em crescimento NaCl 100 mM.

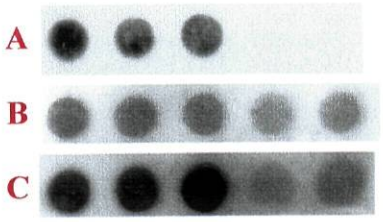


Figura III.48: "Dot blottings" de 10 µg de RNA total extraído de diferentes órgãos de batateiras crescidas sob condições de salinidade distintas resultantes da hibridação com sondas ssDNA marcadas com Digoxigenina: A – o clone 14A1.2; B – o clone C1A1A e C – o clone T5F8.1A. 1 hora de exposição.

Após uma exposição de 1 hora seguida à detecção dos híbridos resultantes da hibridação com as sondas específicas foi possível verificar uma diminuição da acumulação dos transcritos relacionados com o clone plastidial 14A1.2 (figura III.48 A) nas 4ª folhas provenientes das plantas crescidas na salinidade. As condições utilizadas neste ensaio não permitiram a detecção de transcritos relacionados com este clone nos tubérculos à semelhança do estudo anterior.

Em B é possível verificar que as condições de stresse salino utilizadas neste ensaio não conduziram a variações visíveis na acumulação de transcritos relacionados com o cDNA C1A1A nas folhas. No entanto, ocorreu um aumento da acumulação destes, ainda que ligeira, nos tubérculos em crescimento colhidos na situação de 100 mM de sal.

A acumulação de mRNAs relacionados com o cDNA T5F8.1A foi a mais afectada com o stresse salino. Ocorreu um aumento progressivo da acumulação nas folhas, correlacionado com o aumento da salinidade imposta. Nos tubérculos em crescimento também ocorreu um aumento dos transcritos identificados por este cDNA.

Fazendo uma comparação dos padrões de acumulação de mRNAs com os resultados obtidos no "Western blotting" verifica-se ocorrer um paralelismo ao nível dos tubérculos, visto haver aumento da GS1 e de ambos os transcritos com ela relacionados. Nas folhas não ocorre qualquer paralelismo da acumulação da GS (GS1 ou GS2) com os clones T5F8.1A e 14A1.2. No entanto, a não alteração dos níveis de GS1 encontra paralelismo com o clone C1A1A.

ESTUDO DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE SALINIDADE (NaCl 50 E 100 mM) NA ACUMULAÇÃO DA GS EM TECIDO CALOSO

À semelhança do estudo anterior, este trabalho também surgiu como uma abordagem lateral do estudo do efeito da salinidade no tecido caloso de batateira e resultou na apresentação de uma comunicação com a referência (191). O tecido caloso autotrófico foi obtido de explantes de folhas de batateira (cv. Désirée) e subcultivado em meio MS (139) sem NaCl (controlo)

e com 50 e 100 mM de NaCl, tendo sido gentilmente cedido pela Doutora Fernanda Fidalgo (62).

Ao fim de 35 dias de cultura foi possível observar uma redução significativa do teor proteico total (36% com 50 mM e 72% com 100 mM) como pode ser observado no gráfico III.6.

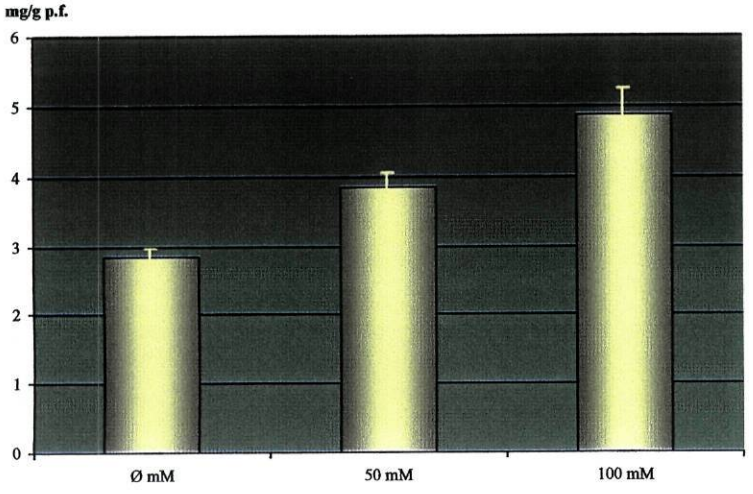


Gráfico III.6: Representação gráfica do teor proteico expresso em mg de proteínas por grama de tecido fresco (g p.f.) em tecido caloso crescido sob diferentes condições de salinidade: Ø – controlo; 50 mM – NaCl 50 mM e 100 mM –NaCl 100 mM. As colunas representam a média ± o desvio padrão. As diferenças dos diferentes valores em relação à situação controlo são significativos a $P<0,05$.

A análise por SDS-PAGE das proteínas solúveis permitiu verificar diferenças quantitativas e qualitativas no padrão electroforético (figura III.49), tendo sido as variações quantitativas mais numerosas que as qualitativas.

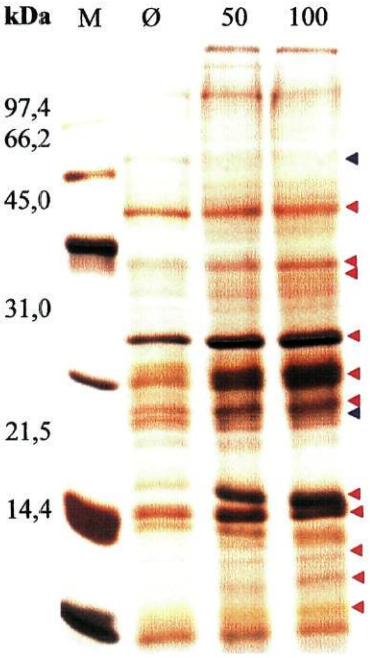


Figura III.49: SDS-PAGE 12,5% de extractos de proteínas solúveis de tecido caloso de batateira, crescido em diferentes condições de salinidade, correspondentes a 10 µg de proteínas. Os polipeptídeos no gel foram visualizadas com nitrato de prata. Pistas: M – marcador de massa molecular. Ø – controlo; 50 – NaCl 50 mM e 100 – NaCl 100 mM. Os triângulos vermelhos indicam as diferenças quantitativas e os azuis as diferenças qualitativas observadas na acumulação relativa dos polipeptídeos solúveis nas situações estudadas.

Da análise da figura é possível observar o desaparecimento de bandas de massa molecular aproximada dos 66 kDa e de 28 kDa. As condições de salinidade usadas nesta estudo conduziram ao aumento de acumulação de polipeptídeos de baixa massa molecular, compreendi-

da entre 15 e 35 kDa aproximadamente, tendo havido uma acumulação mais marcada ao nível dos 22 e dos 30 kDa. A intensidade destas bandas foi mais intensa na situação de 100 mM.

O teor em prolina também foi afectado significativamente, aumentando com o aumento da salinidade 1,7 vezes com 50 mM e 12 vezes com 100 mM de NaCl (gráfico III.7).

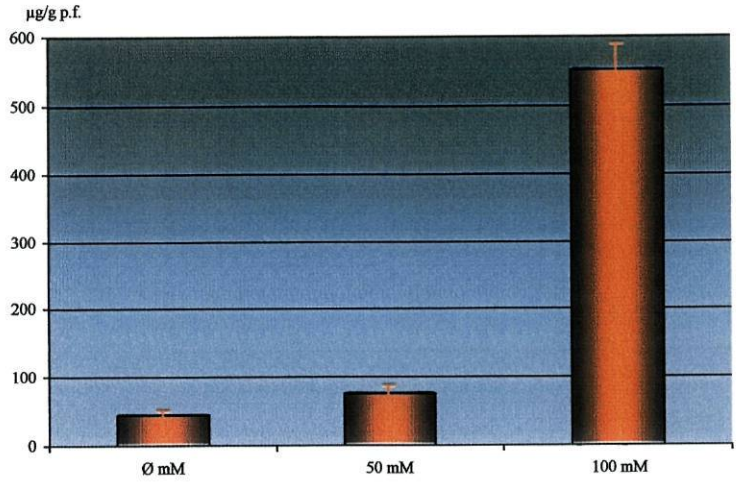


Gráfico III.7: Representação gráfica do teor de prolina em µg por grama de tecido fresco (g p.f.) em tecido caloso crescido sob diferentes condições de salinidade: Ø – controlo; 50 mM – NaCl 50 mM e 100 mM –NaCl 100 mM. As colunas representam a média ± o desvio padrão. As diferenças dos diferentes valores em relação à situação controlo são significativos a $P<0,05$.

A análise por "Western blotting" (figura III.50) permitiu observar uma mudança no padrão de acumulação relativa dos polipeptídeos que compõem a GS neste tecido proveniente das diferentes situações em estudo. Verificou-se um decréscimo na acumulação da GS2 com o aumento da salinidade, o qual foi acompanhado pelo aumento de acumulação da GS1. Na situação de 100 mM de NaCl praticamente não foi detectada a GS2, sendo a principal constituinte da GS a GS1.

Figura III.50: "Western blotting" de 20 µg de proteínas solúveis de tecido caloso de batateira separadas por SDS-PAGE 12,5% e transferidas para suporte de nitrocelulose com subsequente detecção dos polipeptídeos de GS com anticorpos anti-GS. Pistas: Ø –controlo; 50 – NaCl 50 mM; 100 – NaCl 100 mM.

A variação da acumulação dos polipeptídeos da GS foi avaliada pela análise a duas dimensões, seguida de "Western blotting" (figura III.51). De modo semelhante ao que se passa nas folhas também foi possível identificar 3 pontos isoeléctricos diferentes relacionados com a GS. Os polipeptídeos de maior massa, correspondentes à subunidade da GS2, com um pI de

aproximadamente 4,7 e os polipeptídeos de menor massa com pIs de aproximadamente 5,0 e 4,8 (esquerda e direita, respectivamente).

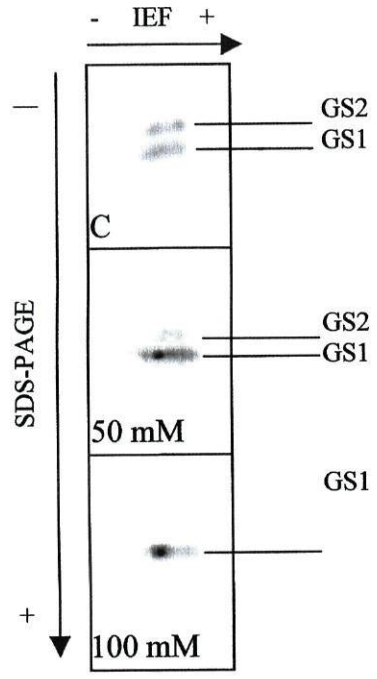


Figura III.51: Análise bidimensional de polipeptídeos de GS separados em geles de poliacrilamida. As proteínas (50 µg) foram separadas por focagem isoeléctrica (IEF, pH 3-10) e depois por SDS-PAGE 12,5%. Após transferência para nitrocelulose os polipeptídeos de GS foram detectados com anticorpos anti-GS. Os traços indicam a posição dos polipeptídeos que compõem as GS do tecido caloso de batateira. C – controlo.

A análise destes resultados reforça os dados obtidos da análise por "Western blotting", uma vez que permitiram verificar a diminuição da acumulação relativa da GS2 com o aumento da salinidade e com o simultâneo aumento da acumulação relativa da GS1.

Relativamente ao ponto de pI=4,8 (direita) não ocorreu alteração da sua acumulação relativa quando comparadas as situações de stresse com a situação controlo. No entanto, o ponto com pI=5,0 sofreu um aumento progressivo de intensidade paralelamente ao aumento da salinidade no meio, indicação do aumento da acumulação de polipeptídeos da GS1 com esse pI. Este aumento de acumulação será responsável pelo aumento de intensidade da banda relativa à GS1 visualizada no "Western blotting" representado na figura III.50.

A variação da acumulação de transcritos foi estudada por "Northern blotting", utilizando como sonda específica um fragmento de ssDNA correspondente à região 3' não traduzida do cDNA T5F8.1A marcada com digoxigenina. A integridade e qualidade do RNA total extraído foi determinada por espectrofotometria e através de electroforese em gel de agarose (figura III.52).

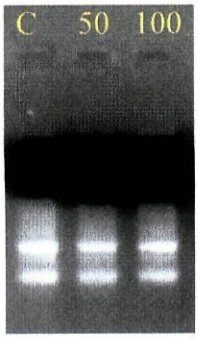


Figura III.52: Separação electroforética, em gel de agarose 0,8 % (p/v), de 200 ng de RNA total de tecido caloso de batateira, usando TAE 1x como tampão de electroforese. Pistas: C – controlo; 50 – NaCl 50 mM; 100 – NaCl 100 mM.

Na figura anterior é possível observar duas bandas fortes em cada pista. Estas bandas são relativas aos RNA ribossomais (rRNA) e correspondem a 4700 nucleótidos (28S) e 1900 nucleótidos (18S). Não é observável qualquer sinal de degradação destes RNAs, a qual se manifestaria pela presença de uma mancha nos baixos tamanhos moleculares. A contaminação por DNA genómico é mínima, surgindo como uma banda muito ténue de elevado tamanho molecular. Com base nestas observações, aliadas às informações obtidas por espectrofotometria, é possível concluir que o RNA total extraído possuía boa qualidade.

Os resultados obtidos por "Northern blotting" podem ser observados na figura III.53.

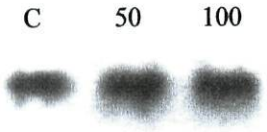


Figura III.53: "Northern blotting" de 10 µg de RNA total de tecido caloso de batateira fragmentado em gel desnaturante de formaldeído de 1,2% (p/v) de malha, utilizando como sonda ssDNA específica a região 3' não traduzida do cDNA T5F8.1A marcada com digoxigenina por PCR unidireccional. A impressão do filme foi obtida 20 minutos após exposição. Pistas: C – controlo; 50 – 50 mM e 100 – 100 mM.

O aumento da intensidade das bandas observadas após revelação do filme sugere ter havido aumento dos níveis de mRNA relacionados com o clone T5F8.1A paralelamente ao aumento da salinidade no meio de cultura.

4 – DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores, Pereira e colaboradores verificaram através de técnicas de imunocitoquímica e por "Western blotting" a presença de dois tipos de polipeptídeos de GS (GS2 e GS1) nas folhas de batateira, verificaram ainda que a GS2 estava presente no estroma dos cloroplastos das células de mesófilo e que a GS1 estava localizada no citosol das células de companhia do floema adaxial. Surgiram bandas com massas moleculares de 45 kDa e 42 kDa, que correspondem às subunidades das duas isoenzimas da GS, a isoforma plastidial (GS2), com 45 kDa, e a isoforma citosólica (GS1), com 42 kDa (155). Com as técnicas de "Western tissue printing" foi possível verificar a associação da GS1 ao floema interno dos tubérculos e dos brolhos de batateira (156). Estes resultados contribuíram para a caracterização funcional do floema, e em particular, das células de companhia, como local de síntese de aminoácidos, e em especial de glutamina, a serem transportados via floema.

A caracterização molecular da GS iniciou-se pelo rastreio de uma biblioteca de cDNA construída a partir da população de mRNAs de folha, que permitiu isolar um clone de cDNA, designado por 14A1.2, e que se verificou codificar uma subunidade plastidial da GS ou GS2 (154, 190). O rastreio de uma biblioteca de cDNA construída a partir de uma população de mRNAs de tubérculos em crescimento permitiu isolar 1 clone de cDNA (T5F8.1A) cujas sequências das extremidades 5' e 3' apresentavam homologias mais elevadas com sequências de cDNA existentes em bancos de dados relacionadas com subunidades citosólicas da GS ou GS1 (190).

Neste trabalho deu-se seguimento ao estudo da GS em plantas de *Solanum tuberosum* L., tendo-se iniciado pela caracterização molecular da família multigénica que codifica a GS nesta espécie. Esta abordagem permitiu a obtenção de conhecimentos fundamentais para a caracterização do padrão de acumulação da GS em vários órgãos e em diferentes estados de desenvolvimento, assim como a obtenção de instrumentos de análise da expressão dos genes com ela relacionados. Seguiu-se a avaliação da expressão génica em resposta a diferentes condições de stresse ambiental, nomeadamente em situações de salinidade e de secura. Esta avaliação não só foi feita no sistema planta intacta como também ao nível do tecido caloso.

Isolamento e caracterização dos clones de cDNA relacionados com a GS1:

Através de um novo rastreio da biblioteca de cDNA construída a partir de mRNAs de folha e pela técnica de excisão "*in vivo*" do clone de cDNA T5F8.1A previamente isolado em

trabalhos anteriores (190) obtiveram-se dois clones de cDNA os quais foram designados C1A1A e T5F8.1A, respectivamente.

A comparação das sequências de nucleótidos dos cDNAs isolados entre elas, e a comparação destas com a sequência do clone plastidial 14A1.2, permitiram verificar que os três clones de cDNA em estudo são relacionados com mRNAs da GS distintos, uma vez que se verificou a existência de uma elevada homologia entre eles na porção codificante desde a extremidade 5' até ao códão STOP; mas a partir deste já foi detectada uma diferença maior entre os três clones. A comparação das sequências deduzidas de aminoácidos destes clones de cDNA permitiu verificar a ocorrência de uma elevada homologia entre os clones isolados neste trabalho e entre estes e o clone plastidial previamente isolado. A ausência dos 16 resíduos de aminoácidos, assim como dos resíduos de cisteína presentes na sequência deduzida para o clone de cDNA que codifica a subunidade plastidial (14A1.2), são indicações de que os clones de cDNA C1A1A e T5F8.1A codificam subunidades distintas de GS1 (66).

A comparação das sequências nucleotídicas, e respectivas sequências aminoacídicas deduzidas, dos clones isolados com as sequências existentes nas bases de dados, revelou uma elevada homologia com sequências relacionadas com a GS1. Estes dados suportam a hipótese dos clones de cDNA isolados codificarem subunidades da GS1 adiantada pela análise comparativa das sequências descrita anteriormente.

A elevada homologia da porção codificante dos clones de cDNA é característica no caso da GS, permanecendo relativamente elevada quando as sequências são comparadas entre mamíferos, bactérias e plantas (66). Esta elevada homologia entre sequências provenientes de espécies distintas permite que os anticorpos criados em determinada espécie vegetal, por exemplo, reconheçam a(s) GS de outras espécies pertencentes a grupos taxonómicos distantes (43).

Comparando as sequências de nucleótidos dos clones isolados da GS1 observou-se uma diferença relativamente ao tamanho da porção 3' não traduzida, a qual é 20 pares de bases maior no clone C1A1A do que no T5F8.1A. A micro-heterogeneidade de tamanho entre versões de clones de cDNA de GS1 já foi descrita anteriormente para a espécie *Vitis vinifera* L. por (122). Estes autores encontraram delecções de 18, 22, 24 e 58 bp imediatamente a montante da cauda poli-A. No entanto, no caso dos dois clones isolados de batateira, esta diferença não é observada imediatamente a montante da cauda poli-A, mas sim praticamente a jusante do códão STOP. Uma explicação para esta diferença poderá residir num fenómeno de poliadenilação alternativa, o que poderá implicar estabilidades diferentes para as moléculas de mRNA a que os cDNAs dizem respeito (66); uma outra explicação poderá residir na possibi-

lidade de existirem várias formas alélicas para a GS, as quais poderão variar na sua região 3' não traduzida também pela mesma razão acabada de descrever.

Verificou-se que os clones de cDNA T5F8.1A e C1A1A são truncados a 5' uma vez que para deduzir as suas traduções não foram encontrados códões de iniciação. Esta observação é também apoiada pelo facto do alinhamento da sequência nucleotídica do cDNA T5F8.1A com a sequência nucleotídica do cDNA de *N. tabacum – gln1-5* – iniciar-se ao nível do nucleótido 174, o que corresponde a aproximadamente 90% do clone de cDNA de tabaco (51). O alinhamento da sequência aminoacídica deduzida deste clone com outras disponíveis em bases de dados corrobora as observações relatadas, visto este iniciar-se ao nível dos resíduos de aminoácidos 41 ou 42 das sequências já publicadas, correspondendo a cerca de 89% de um polipeptídeo da GS1 completo. A não existência dos 16 resíduos de aminoácidos na porção C-terminal, assim como a ausência dos resíduos de cisteína característicos das subunidades da GS2 reforçam os dados obtidos após os alinhamentos, concluindo-se que este clone estará relacionado com a subunidade da GS1 em batateira (66).

No caso do clone C1A1A verificou-se que o alinhamento da sequência nucleotídica com a sequência do cDNA de *N. tabacum – gln1-3* – iniciou-se na posição 237 desta última, correspondendo o cDNA isolado a aproximadamente 40% deste clone de cDNA de tabaco (51). O alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos com as sequências da GS1 existentes em bases de dados iniciou-se ao nível do resíduo 272 ou 273 destas sequências, implicando que o clone isolado comporta informação para a síntese de um polipeptídeo correspondente a cerca de 23% de um polipeptídeo completo da GS1. Há semelhança com o clone anterior, a não existência dos 16 resíduos de aminoácidos na porção C-terminal, assim como a ausência dos resíduos de cisteína característicos das subunidades da GS2 permitem concluir que este clone está relacionado com a subunidade da GS1 na espécie em estudo (66).

A comparação das sequências deduzidas de aminoácidos dos três clones de cDNA em estudo permitiu verificar a existência de uma elevada homologia entre eles, tendo sido ela mais elevada entre os clones que codificam subunidades citosólicas da GS. As sequências aminoacídicas deduzidas revelaram ser distintas umas das outras, apesar de apresentarem uma homologia elevada quando comparadas entre si. Este dado implica a existência de pelo menos 3 polipeptídeos da GS em batateira: dois da GS1 e um da GS2. A baixa homologia observada a montante do códão STOP entre os três clones de cDNA em estudo revelou que a região 3' não traduzida poderá servir como sonda específica nos estudos de expressão e de acumulação dos mRNAs relacionados com estes clones, revelando-se uma ferramenta poderosa porque

permitirá descriminar as diferentes moléculas de mRNA da GS numa determinada população de RNA.

RACE 5'

Devido ao facto de os clones de cDNA isolados não apresentarem a porção 5', contendo pelo menos o códão de iniciação AUG, procedeu-se à execução de vários procedimentos baseados no princípio da técnica RACE (69).

A realização deste procedimento recorrendo ao "kit" "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0" da "Life Technologies" revelou-se infrutífera na medida em que não permitiu o isolamento de fragmentos de DNA para dois dos clones em estudo (C1A1A e 14A1.2) e a banda isolada da segunda reacção de PCR do clone T5F8.1A apresentar dimensões semelhantes às obtidas no primeiro PCR, quando deveria ter sido inferior. Apesar de ter sido efectuada a clonagem desta banda, ainda não foi realizada a sua caracterização, pelo que a sua possível relação com o cDNA em estudo ainda está por apurar.

A abordagem utilizada por este "kit" apoia-se na utilização de RNA total (*), em vez de mRNA, o que aumenta a probabilidade de ocorrência de um ruído de fundo ("background") elevado devido a emparelhamentos inespecíficos entre os oligonucleótidos iniciadores e os ácidos nucleicos presentes nas misturas de reacção (68).

Nesta técnica é frequente o surgimento de problemas devido a contaminações das diferentes reacções enzimáticas executadas pela presença de componentes de reacções anteriores, como por exemplo os oligonucleótidos iniciadores. Para além do mais, cada passo enzimático efectuado tem o potencial de introduzir falhas e de destruir a integridade do cDNA que se pretende estudar (176). Por exemplo, a extensão da primeira cadeia de cDNA pela transcritase reversa pode ser influenciada pela qualidade do RNA utilizado, sendo maximizada quando este é intacto, limpo e livre de contaminantes como o LiCl (68), o qual é utilizado para precipitar selectivamente o RNA numa solução heterogénea de ácidos nucleicos (173).

Há várias razões que permitem explicar a não obtenção de bandas no final deste procedimento para os outros clones de cDNA; entre elas é possível referir a qualidade do RNA utilizado e a inespecificidade de ligação dos oligonucleótidos iniciadores aos ácidos nucleicos (mRNA ou cDNA) molde devido à presença de estruturas secundárias coincidentes com os locais de emparelhamento (80). A adição de demasiado material genético molde na reacção de PCR conduz geralmente à produção de grande quantidade de produtos inespecíficos, resultan-

do num perfil electroforético semelhante a um arrastamento ("smear"), ou a uma amplificação insuficiente por parte da enzima *Taq* DNA polimerase e que se manifesta na ausência de bandas após separação electroforética dos produtos de reacção (68).

O uso da enzima terminal transferase (TdT) (*) acarreta limitações importantes na técnica devido ao facto de ser difícil controlar as condições de reacção (este passo poderia ser feita em gelo ou à temperatura ambiente, com ou sem a adição de DMSO ou formamida), para além desta enzima possuir uma baixa eficiência (53). A adição de uma cauda homopolimérica à extremidade 3' da cadeia simples de cDNA (*) geralmente resulta em amplificações inespecíficas devido ao emparelhamento inespecífico do iniciador complementar (53, 59). A cauda homopolimérica deveria ser formada por resíduos de adenina e não de citosina, o que não foi efectuado neste "kit". O uso de uma cauda poli-A tem como vantagem o facto de a ligação A:T ser mais fraca que a ligação C:G o que implica uma necessidade de adicionar mais resíduos de adenina para que o iniciador adaptador (poli-T) tenha menos probabilidade de emparelhar com outras regiões da molécula de cDNA, e portanto de originar um produto truncado após a reacção de PCR. Uma outra vantagem na adição de uma cauda poli-A à extremidade 3' do cDNA de cadeia simples reside no facto de as sequências codificantes (e as regiões 5' não traduzidas) tenderem em ser ricas em resíduos G/C (pelo menos nos vertebrados), e o uso de uma cauda poli-A iria decrescer a probabilidade de haver formação de produtos truncados (68) ou inespecíficos, como acontece quando é utilizado um iniciador rico em G ou C.

Tendo em consideração os aspectos identificados anteriormente com (*), e para os contornar, procedeu-se à realização da técnica de RACE 5' recorrendo ao "kit" "Marathon cDNA Amplification Kit", uma vez que este se baseia na síntese da primeira cadeia de cDNA a partir de mRNA e não de RNA total, diminuindo-se as probabilidades de ocorrerem amplificações inespecíficas, as quais resultariam num elevado ruído de fundo. Uma outra característica deste "kit" é o facto de não se apoiar na actividade da enzima TdT porque a síntese da segunda cadeia de cDNA é feita utilizando uma mistura de enzimas extraídas de *E. coli*, nomeadamente a DNA polimerase I, a RNase H e a DNA ligase. Só depois de ser feita a segunda cadeia de cDNA é que se liga um adaptador e se realiza a reacção de PCR conducente à amplificação da extremidade pretendida.

De modo semelhante ao "kit" anterior, esta técnica não permitiu isolar fragmentos de DNA das reacções efectuadas sobre os clones de cDNA C1A1A e 14A1.2, tendo surgido produtos amplificados apenas para o clone T5F8.1A. À semelhança com os resultados obtidos com o "kit" anterior, as bandas foram clonadas mas a sua relação com o clone T5F8.1A ainda não foi verificada.

A ausência de bandas no final do procedimento para os clones C1A1A e 14A1.2, e o padrão electroforético obtido relativamente ao clone T5F8.1A são resultados que podem ser explicados pela maioria dos argumentos acabados de referir nos parágrafos anteriores, pelo que não serão novamente focados. No entanto, uma explicação exclusiva a este procedimento reside no facto de a ligação de adaptadores a moléculas de cDNA de cadeia dupla originar cDNAs truncados (53), o que poderá explicar o facto de ter sido obtida uma banda com o tamanho mínimo esperado quando tomada como referência a sequência do cDNA de *Nicotiana plumbaginifolia* (195), a qual corresponderia a um fragmento de maior tamanho se não tivesse ocorrido a ligação deste adaptador.

A terceira abordagem utilizada para obter as extremidades 5' dos cDNAs em estudo originou melhores resultados visto ter conduzido ao isolamento de fragmentos de DNA para todos os clones de cDNA; um outro aspecto positivo nesta técnica reside no facto de ter sido possível o isolamento de fragmentos de DNA com tamanho superior ao esperado no que respeita ao clone plastidial 14A1.2. Contudo, as bandas obtidas para os outros clones não apresentaram o tamanho mínimo esperado quando comparadas com as sequências da GS disponíveis nas bases de dados. As reacções de PCR efectuadas sobre os "mini-preps" dos três clones de maior tamanho, com iniciadores específicos da GS, conduziram à formação de amplificados com os tamanhos esperados, sugerindo que os clones isolados por este procedimento correspondem aos cDNAs em estudo. A análise da restrição enzimática e caracterização das sequências nucleotídicas destes clones encontram-se neste momento em desenvolvimento.

Analisando os produtos clonados resultantes dos três procedimentos utilizados é possível verificar a existência de um ponto comum e que é o facto de os tamanhos destes fragmentos de DNA serem inferiores aos tamanhos mínimos esperados. Uma explicação possível para estes resultados consiste na localização dos oligonucleótidos iniciadores utilizados nas reacções de transcrição reversa, a qual deveria ter sido mais próxima das extremidades 5' dos cDNAs em estudo. Tal não foi feito devido à elevada homologia existente entre estas moléculas de DNA, e que era mais baixa a partir do códão STOP, isto é, bastante perto da extremidade oposta àquela que se pretendia estender. Se os fragmentos de DNA clonados pelas técnicas referidas não cumprirem os objectivos pretendidos, a repetição destes procedimentos deverá ter em consideração a localização dos oligonucleótidos iniciadores utilizados na reacção de transcrição reversa, a qual deverá ser o mais próximo possível da extremidade 5' e de modo a manter quanto possível a restringência máxima no método.

Análise por "Southern blotting"

A análise por "Southern blotting" sugere a existência de apenas três genes a codificar a GS nesta espécie, devido ao facto de serem visualizadas apenas 3 bandas resultantes da hibridação dos fragmentos de restrição de DNA genómico com uma sonda conservada. No entanto, e apesar de terem sido usadas enzimas de restrição que não reconhecem locais de corte na sonda, os resultados obtidos não excluem a possibilidade de ocorrerem diferentes fragmentos de DNA relacionados com a GS na mesma posição, não tendo sido por isso detectados. O uso de sondas específicas, como as porções 3' não traduzidas, permitira no futuro esclarecer esta questão.

Na maioria das espécies estudadas até à data verificou-se haver uma família multigénica a codificar a GS que é composta por, pelo menos, três genes homólogos: um a codificar a GS2 e os restantes a codificar a GS1 (66, 113). Na maioria das espécies estudadas foi reportado apenas um gene a codificar a GS2 (11, 66, 89, 143, 144, 196). Nas *SOLANACEA Lycopersicum esculentum* L. e *Nicotiana sylvestris* L. parece haver apenas um gene a codificar a GS2 (11), o que permite apoiar a hipótese proposta para a batateira no que respeita esta subunidade.

Nas leguminosas ervilheira e feijoeiro foram identificados três genes funcionais a codificar subunidades da GS1 (38, 197), enquanto que na leguminosa *Medicago truncatula* L. apenas dois dos três genes que codificam a GS1 são expressos na planta, sendo o terceiro um pseudogene (182). Na planta do arroz foram isolados dois cDNAs que codificam polipeptídeos da GS1 (171), mas em contrapartida, na também monocotiledónea *Zea mays* L. (milho) foram isolados cinco cDNAs relacionados com a GS1 (119). Estes dados indicam que o número de genes a codificar a GS1 não é constante dentro do mesmo grupo taxonómico, como as monocotiledóneas e as dicotiledóneas.

Na espécie anfidiploide *Brassica napus* L., resultante do cruzamento entre as espécies *B. campestris* e *B. olearacea*, existe um total de quatro genes a codificar a GS1, tendo sido, segundo os autores, herdados dois genes de cada espécie parental (143). O reconhecimento de dois genes a codificar a GS1 foi feito em *Vitis vinifera* L. (122) e na *SOLANACEAE* tabaco (23, 51), enquanto que em *N. plumbaginifolia* (195) e em *Lycopersicum esculentum*, também pertencentes à mesma família da batateira, só foi identificado um gene da GS1 (159), embora tenha sido detectado um segundo polipeptídeo relacionado com a GS1 por análise bidimensional após infecção por *Pseudomonas syringae*, sugerindo a existência de pelo menos dois genes a codificar a GS1 nesta espécie (158). Destas observações conclui-se que o número de

genes a codificar a GS1 é variável até mesmo dentro de uma determinada família, e em especial entre as *SOLANACEAE*. Tendo em consideração os dados acabados de descrever, é possível concluir que a hipótese levantada após a análise do DNA genómico por "Southern blotting" é fundamentada e possível de ser verdadeira. Deste modo existirá um gene a codificar a GS2 e dois a codificar a GS1 na batateira.

Em *Pinus sylvestris* foi possível verificar a ocorrência de apenas dois genes a codificar a GS por "Southern blotting" e até à data só foram isolados dois clones de cDNA da GS (5, 32). A análise bidimensional dos polipeptídeos da GS desta espécie revelou a existência de apenas dois pontos isoeléctricos distintos (6). O surgimento de apenas três pontos isoeléctricos na análise bidimensional dos polipeptídeos da GS (dois de menor massa molecular e um com maior massa), associado aos resultados obtidos pela análise de "Southern blotting" nas condições utilizadas e ao número total de cDNAs isolados, são evidências que permitem apoiar a hipótese formulada acerca da existência de dois genes a codificar a GS1 e um a codificar a GS2 em batateira. Esta hipótese é apoiada pelo facto de não terem sido identificados mais do que dois cDNAs, ao todo, a codificar a GS1 nas espécies da família *SOLANACEAE* estudadas até à data (51, 159, 195).

Caracterização da acumulação da GS

O desenvolvimento e crescimento da batateira pode ser dividido em sete fases principais: germinação e emergência da semente, dormência dos tubérculos, abrolhamento, emergência e expansão do caule, desenvolvimento de tubérculos, senescência e floração. Na Europa o cultivo da batata é feito quase exclusivamente na fase vegetativa da planta. A cultura é plantada na forma de tubérculos de semente (abrolhados ou não, como peças cortadas ou não) (96). Por esta razão, as culturas efectuadas neste trabalho foram iniciadas na forma de tubérculos abrolhados como peças não cortadas.

A caracterização da acumulação da GS foi efectuada por RT-PCR, por "Northern blotting" e por "Western blotting" acoplado à análise uni- e bidireccional em diferentes órgão e fases de desenvolvimento da planta: raízes, tubérculos (em formação ou em abrolhamento, caules e folhas (desde folhas jovens a senescentes).

A técnica de RT-PCR permite converter RNA em DNA pela acção da transcritase reversa e amplificar uma região da molécula de DNA assim formada pela acção de uma DNA polimerase através de PCR (118). Deste modo, e de acordo com as condições utilizadas, tor-

na-se viável a detecção de moléculas de mRNA cuja presença num determinado órgão ou tecido é diminuta e que não seriam detectáveis por outras técnicas.

Os dados obtidos após RT-PCR permitiram verificar que a GS é expressa em todos os órgãos analisados uma vez que foi detectada a presença de pelo menos um tipo de transcrito da GS em todos os órgãos analisados. A detecção de transcritos relacionados com o clone 14A1.2 apenas nos órgãos aéreos (caule e folhas) sugere que a GS2 é unicamente expressa nestes órgãos. De um modo análogo, a detecção da expressão de pelo menos um transcrito relacionado com a GS1 em todos os órgãos analisados permite concluir que esta é expressa em toda a planta. Os dados obtidos permitem ainda concluir que a expressão da GS é diferencial uma vez que há acumulação preferencial de determinados transcritos em determinados órgãos: a GS2 surge nos caules e folhas e no caso do cDNA T5F8.1A, os seus transcritos correspondem aos únicos detectados nas raízes. O gene relacionado com este cDNA deverá apresentar uma expressão generalizada na planta, enquanto que o gene relacionado com o clone de cDNA C1A1A poderá sofrer uma regulação da expressão mais afinada de acordo com as necessidades do órgão num determinado momento.

Através da técnica de "Northern blotting", utilizando uma sonda conservada, foi possível reconhecer dois tipos de transcritos de acordo com o tamanho: um com aproximadamente 1,5 kb e outro com aproximadamente 1,3 kb. Estes tamanhos estão de acordo com o intervalo de tamanhos dos mRNA da GS já estudados na maioria das plantas, sendo geralmente o mRNA relacionado com a isoforma plastidial maior que o do mRNA relacionado com a isoforma citosólica (66).

Na análise por "Western blotting" surgiram dois polipeptídeos com diferentes massas, um maior de 45 kDa e outro de menor massa, com 42 kDa. Padrões de acumulação semelhantes já foram descritos para a batateira (155) e para outras espécies, nomeadamente *Arabidopsis* (160), tabaco e tomateiro (8), milho (170) e em *Vitis vinifera* L. (122).

Os transcritos de maior tamanho surgem apenas nos órgãos aéreos (folhas e caules) de um modo sobreponível ao padrão observado para o clone 14A1.2 no ensaio de RT-PCR. Pelo facto de haver sobreposição destes padrões de acumulação, assim como com o padrão encontrado na análise efectuada por "Western blotting", relativamente à banda de maior massa molecular (45 kDa) conclui-se que estes transcritos e estes polipeptídeos estão relacionados com a subunidade plastidial da GS da batateira.

O teor destes transcritos de 1,5 kb variou com o estado fisiológico da folha: aumentou da fase de folha jovem (2ª folha a contar do ápice) para folha expandida (4ª folha a contar do ápice), baixando consideravelmente ao longo das fases mais velhas de desenvolvimento foliar

(6ª e 9ª folhas a contar do ápice). Esta variação na acumulação relativa de mRNAs foi acompanhada de igual modo pelo nível dos polipeptídeos de 45 kDa. Um aumento do teor de mRNA da GS2 até à fase de máxima expansão foi descrito em folhas não destacadas da planta de arroz (98) e de ervilheira (54). Nesta fase inicial do desenvolvimento, a folha apresenta uma actividade biossintética intensa que perdura até que a capacidade fotossintética máxima seja atingida, implicando a biossíntese de clorofilas e a biogénese de cloroplastos, assim como o aumento da área foliar devido à expansão e divisão celular (25).

Possivelmente, a acumulação de transcritos da GS2 ocorrerá de modo a acompanhar a formação de cloroplastos funcionais, como já foi proposto anteriormente (104). As evidências de que a acumulação de GS2 nas folhas e nos cotilédones é dependente da presença de cloroplastos resultaram de trabalhos em que, na maioria das espécies analisadas, plantas estioladas aumentaram a acumulação de mRNAs e/ou de polipeptídeos da GS2 depois de expostas à luz (40, 154). Este aumento foi ainda mais rápido durante a transição da obscuridade para a luz do que na iluminação de folhas estioladas, uma vez que os cloroplastos já se apresentavam completamente diferenciados (54).

A regulação da GS2 pela luz é mediada em parte pelo fitocromo e, indirectamente, pelo aumento dos níveis de sacarose resultantes da actividade fotossintética (146). O aumento observado na acumulação dos transcritos da GS2 da fase de folha jovem para expandida será resultado do somatório deste conjunto de factores que caracterizam a transição de recebedor metabólico importador de nutrientes (folha jovem) para fonte exportadora de hidratos de carbono e de azoto orgânico (folha expandida).

A diminuição de intensidade da banda de 1,5 kb, relativa aos transcritos relacionados com a isoforma plastidial, observada nas situações folha velha (6ª folha a contar do ápice) e folha senescente (9ª folha a contar do ápice), corresponde a uma diminuição do teor relativo destes transcritos em relação à situação de folha expandida (4ª folha). Paralelamente, também foi observada uma diminuição da intensidade relativa das subunidades da GS2 na análise efectuada por "Western blotting". A diminuição do teor de mRNAs e de polipeptídeos relacionados com a GS2 durante a senescência foliar (natural ou induzida) já foi descrita em várias espécies, como por exemplo, o tomateiro (159), a planta do arroz (98) e em *Arabidopsis* (135).

A diminuição do teor proteico da GS2 ocorre porque, para além de haver um decréscimo dos seus transcritos, há perda da funcionabilidade dos cloroplastos, que correspondem ao organelo onde a GS2 se acumula e ao primeiro a sofrer destruição durante a senescência (72), o que acarreta como consequência imediata a diminuição da actividade total da GS foliar.

Esta redução da acumulação de polipeptídeos e de mRNAs da GS2 pode resultar da repressão da expressão do gene da GS2 através de um mecanismo de regulação possivelmente comum aos genes envolvidos na fotossíntese (146). Um outro factor que poderá conduzir à diminuição do teor de polipeptídeos da GS2 será a destruição desta enzima pelos radicais livres de oxigénio que são libertados durante a senescência e que se sabe serem responsáveis pelo aumento da susceptibilidade de proteínas existentes no estroma dos cloroplastos, entre as quais a GS, como já foi proposto anteriormente (148, 150, 184).

Sabe-se muito pouco acerca dos mecanismos de controlo da transcrição dos genes que codificam a GS2 (40); o aprofundamento do conhecimento dos promotores dos genes da GS2 e dos factores *cis* e *trans* envolvidos no controlo da sua expressão permitirá, no futuro, compreender melhor o papel desta isoenzima durante a senescência foliar assim como noutros processos fisiológicos nos quais esteja envolvida.

Os transcritos com tamanho aproximado de 1,3 kb foram detectados em todos os órgãos e estados de desenvolvimento analisados. Estes constituem os únicos transcritos da GS detectados nos órgãos não fotossintéticos. Fazendo a analogia com os resultados obtidos por RT-PCR verificou-se que apenas os mRNAs relacionados com os clones citosólicos foram acumulados em todos os órgãos. Comparando estes dados com os obtidos por "Western blotting", relativamente à banda correspondente aos 42 kDa, verificou-se ter ocorrido sobreposição dos padrões de acumulação detectados por ambas as técnicas utilizadas. Estes resultados permitem concluir que as bandas de 1,3 kb e de 42 kDa detectadas no "Northern" e no "Western blotting" estarão relacionadas com os mRNAs e os polipeptídeos da GS1, respectivamente, em batateira.

Ao comparar o teor de acumulação relativo das bandas obtidas por "Western blotting" com os resultados do "Northern blotting" obtidos com uma sonda conservada ao longo do desenvolvimento foliar verificou-se a ocorrência de um aumento de intensidade destas nos dois ensaios e que se traduz num aumento da acumulação de polipeptídeos e de transcritos da GS1 ao longo do desenvolvimento foliar. Tais padrões de acumulação da GS1, desde o início do desenvolvimento foliar até à senescência, já foram referidos para outras espécies (98, 99, 101, 143, 159).

O aumento de acumulação de transcritos relacionados com dois genes que codificam a GS citosólica foi detectado durante a senescência induzida pela obscuridade em cotilédones destacados de beterraba (204). Durante a senescência natural de folhas da planta do arroz foi possível observar um aumento gradual da acumulação de mRNAs da GS1 ao longo de toda a lâmina foliar. Este aumento de acumulação de transcritos da GS1 foi acompanhado por um

aumento de glutamina no floema (97, 99, 207). Em tomateiro foi detectado um padrão de acumulação semelhante ao descrito neste trabalho para os transcritos e polipeptídeos da GS1 (159). Estes dados sugerem que a GS1 será responsável pela conversão do glutamato em glutamina em folhas senescentes, a qual será exportada via floema para ser utilizada nos outros órgãos da planta, em especial nos tecidos jovens como as sementes e os órgãos em formação (folhas e tubérculos, principalmente, no caso da batateira).

Quando a acumulação dos transcritos da GS1 de batateira foi analisada recorrendo a sondas específicas verificou-se que o aumento da acumulação de mRNAs desta isoforma na folha não foi devido ao aumento de expressão de ambos os genes que a codificam. Foi possível verificar que o clone T5F8.1A apresentou um padrão de acumulação muito semelhante ao clone plastidial, sendo detectado um aumento de acumulação da fase de folha jovem para folha expandida, diminuindo drasticamente nas fases de desenvolvimento mais avançadas da folha. Um padrão de expressão semelhante ao obtido para o clone T5F8.1A foi detectado em folhas de feijoeiro onde se verificou que os níveis dos transcritos dos genes que codificam as subunidades α e β da GS1 apresentaram um padrão de acumulação semelhante à dos respectivos polipeptídeos durante o desenvolvimento da folha, tendo sido os teores mais elevados detectados quando as folha eram jovens (38).

Em *Brassica napus* ocorreu um decréscimo da expressão da GS2 durante o envelhecimento foliar. Paralelamente, um dos genes que codifica a GS1, o qual é expresso a níveis reduzidos nas folhas jovens, sofre um aumento da expressão durante o envelhecimento foliar. Nas fases mais avançadas de senescência a GS é representada unicamente por subunidades da GS1 (63). O mRNA relacionado com o clone C1A1A sofreu um aumento progressivo de acumulação desde a fase mais jovem até à fase de desenvolvimento mais avançada e estudada neste trabalho. Da comparação destes resultados com os obtidos com a sonda conservada é possível verificar que o padrão de acumulação que prevaleceu foi o do clone C1A1A. Este resultado sugere que este será o tipo de mRNA da GS1 mais abundante neste órgão durante toda a sua existência.

À excepção da raiz, onde apenas se detectaram mRNAs relacionados com o clone T5F8.1A, foi possível verificar que os mRNAs relacionados com os cDNAs da GS1 em estudo são acumulados ao nível dos restantes órgãos analisados. Apesar de não ser possível excluir a possibilidade de existirem outros produtos relacionados com a GS1 (ou até mesmo com a GS2), os quais poderão não ter sido visualizados devido ao limite de detecção das técnicas utilizadas, estes dados sugerem que a GS1 presente nas raízes é uma holoenzima, formada apenas por um tipo de subunidades, por sua vez relacionadas com o clone T5F8.1A.

Os resultados obtidos através da análise bidimensional dos polipeptídeos que compõem a GS vêm reforçar esta hipótese na medida em que apenas um tipo de polipeptídeo foi observado nas raízes, o qual apresentou um pI=4,8. Nos restantes órgãos verificou-se haver acumulação dos dois tipos de mRNAs e de polipeptídeos da GS1 (PI=5,0 e pI=4,8) o que implica a existência de pelo menos duas subunidades da GS1 nos órgãos analisados.

A comparação dos padrões de acumulação dos mRNAs com os obtidos na análise bidimensional permite estabelecer uma possível relação entre o clone de cDNA e o ponto isoeléctrico (polipeptídeo) correspondente. Esta especulação deve-se ao facto de ser observável uma sobreposição entre os padrões de acumulação obtidos nos dois tipos de análise efectuadas.

Na análise bidimensional dos polipeptídeos da GS foi possível verificar que um dos dois pontos isoeléctricos de menor massa (correspondentes à GS1), com pI=5,0, apresentou uma abundância relativa superior à dos outros polipeptídeos (com pI=4,8) em todos os estados fisiológicos da folha estudados. Outro aspecto relativo a estes polipeptídeos (pI=5,0) é o facto de a sua acumulação relativa aumentar desde o início do desenvolvimento foliar até ao estado de folha velha. Uma outra observação a tomar em consideração reside no facto de estes polipeptídeos não terem sido detectados nos extractos das raízes. Este padrão de acumulação é perfeitamente sobreponível ao padrão de acumulação de mRNAs observado para o clone de cDNA C1A1A, sugerindo que ambos estarão inter-relacionados.

Para além desta conclusão verifica-se que este clone pertence à classe II dos "SAG" (Senescence Associated Genes) (72), ou à classe 7 de genes envolvidos no processo de senescência (25), devido ao facto de ter apresentado uma expressão reduzida no início do desenvolvimento foliar, a qual aumentou gradualmente ao longo do tempo até as fases de desenvolvimento mais tardio da folha terem ocorrido.

Os outros polipeptídeos de menor massa (pI=4,8) sofreram um aumento de acumulação da fase de folha jovem para expandida, diminuindo o seu teor na fase de folha velha. O mesmo padrão pode ser observado na análise por "Northern blotting" quando se utilizou a porção 3' não traduzida do cDNA T5F8.1A como sonda. No caso das raízes correspondem à única isoforma detectada e deverão desempenhar como principal função a fixação metabólica da amónia absorvida do solo ou resultante da actividade da nitrato redutase presente nesse órgão. O aumento transitório da sua acumulação nas fases iniciais de desenvolvimento da folha poderá reflectir uma maior exigência de precursores azotados de modo a satisfazer as necessidades metabólicas relacionadas com a elevada taxa biossintética característica desta fase de desenvolvimento inicial, durante a qual a folha funciona como recebedor metabólico.

Em luzerna foi possível verificar que havia acumulação preferencial nas folhas de um dos transcritos que codificam a GS1 em relação ao outro (182). Esta expressão diferencial dos genes da GS1 pode ser parcialmente explicada pela capacidade indutora do tipo de azoto inorgânico presente. Por exemplo, o gene da GS1 de soja parece ser activado pela presença de amónia (132). Em beterraba foram isolados 3 clones de cDNA relacionados com a GS1. Dois destes clones são expressos durante a senescência de cotilédones induzida pela obscuridade, sendo o nível de expressão de um deles mais baixo. A adição de azoto inorgânico (NH_4NO_3) retardou a senescência e conduziu ao aumento da expressão de um destes genes e à diminuição da expressão do outro, tendo a adição de glutamina conduzido à aceleração do processo de senescência (204). Estes dados sugerem que a expressão diferencial dos genes da GS1 pode ser parcialmente influenciada pela forma azotada presente no órgão.

Na *SOLANACEAE* planta do tabaco verificou-se que nas folhas jovens a concentração de amónia é bastante elevada enquanto que a de nitrato é reduzida. Com o aumento da idade da folha verificou-se que o teor de nitrato aumentou enquanto que o teor de amónia diminuiu, voltando a aumentar novamente nas folhas senescentes (128).

O aumento da acumulação de transcritos dos clones citosólicos da GS da batateira poderá ser resposta a uma variação do teor de azoto inorgânico nas folhas. Assumindo um padrão semelhante à planta do tabaco, poderá ser colocada a hipótese de os mRNAs relacionados com o clone C1A1A sofrerem um aumento gradual de acumulação ao longo das diferentes fases de desenvolvimento foliar estudadas, acompanhando o teor de nitrato, enquanto que os mRNAs relacionados com o clone T5F8.1A sofrerão um aumento de acumulação nas fases iniciais do desenvolvimento foliar, acompanhando os níveis de amónia. No entanto não foi observado um aumento do teor destes transcritos nas folhas senescentes de tabaco, pelo que a concentração de amónia não pode ser considerada o principal factor a influenciar a expressão do gene relacionado com este clone, ou então em batateira não haverá aumento do teor de amónia durante a senescência, o que é pouco provável devido ao facto de esta fase caracterizar-se por uma elevada taxa de catabolismo proteico, de onde resulta a libertação de grandes quantidades de amónia.

Em folhas de *Arabidopsis* foi possível verificar que a luz induziu indirectamente a acumulação de transcritos da GS1 devido ao aumento do teor em açúcares, como a sacarose, a glucose e a frutose resultantes da actividade fotossintética (146). O clone T5F8.1A poderá sofrer uma regulação ao nível da transcrição de acordo com a disponibilidade de azoto inorgânico e de carbono orgânico, sendo a sua expressão nas folhas activada quando estes dois factores estão presentes. A determinação dos teores destes compostos ao longo do desenvolvimen-

to foliar permitirá elucidar melhor a influência do controlo metabólico na acumulação de transcritos e polipeptídeos relacionados com este clone de cDNA.

Em alface foi possível isolar um clone de cDNA da GS1 cuja acumulação de transcritos é regulada pelo fitocromo, visto terem verificado que o efeito da luz vermelha era completamente cancelado pela subsequente irradiação com luz vermelho-distante (172).

É sabido que o etileno é um dos principais reguladores de crescimento envolvidos no processo de senescência. A aplicação de etileno induziu o aumento da actividade da GS1, pelo menos em células lacticíferas de *Hevea brasilensis* (162), onde foi verificado ter ocorrido também um aumento do teor de mRNA e de polipeptídeos da GS1. De modo semelhante, o etileno libertado durante a senescência foliar poderá conduzir ao aumento gradual da acumulação de GS1 nas folhas de batateira.

Uma hipótese explicativa do padrão de acumulação de transcritos e polipeptídeos relacionados com o clone C1A1A poderá ser a indução pela presença de nitrato, cujo teor aumenta ao longo do desenvolvimento foliar em tabaco (128), pela luz vermelha (172) e pelo aumento da concentração de etileno libertado durante a senescência foliar. Esta isoforma também será a principal responsável pela reincorporação da amónia libertada pelo catabolismo proteico que ocorre durante a senescência uma vez que sofre uma aumento de acumulação durante esta fase de desenvolvimento.

Não deverá ser excluída a hipótese de formação de heteroenzimas da GS1 nas folhas de batateira. A expressão simultânea dos genes da GS1, com diferentes níveis de expressão num mesmo órgão pode ser indicativo da presença de isoformas da GS1 heterólogas e portanto com características bioquímicas diferentes, as quais poderão desenvolver maior ou menor actividade de acordo com as necessidades das células que compõe o órgão onde estão presentes. A detecção simultânea dos mRNAs relacionados com os cDNAs da GS1 em estudo numa determinada célula através da técnica de hibridação *in situ* permitiria confirmar esta hipótese, uma vez que a possibilidade de haver formação de GS heteroméricas já foi confirmada em trabalhos anteriores para outras espécies (11, 34, 202).

A GS1 de *Brassica napus* é regulada pós-tradução por fosforilação reversível. Verificou-se que quando fosforilada ficava mais protegida contra a degradação e a sua actividade aumentava por associação a proteínas 14-3-3 (63). Estas proteínas são homo ou heterodímeros e associam-se a motivos contendo resíduos de fosfoserina nas suas moléculas alvo, resultando na aproximação de duas moléculas de natureza proteica, com consequente alteração da sua actividade (64, 137). Este dado reforça a hipótese de formação de heterodímeros de GS1 em batateira.

Estudos anteriores permitiram verificar que nos feixes vasculares das *SOLANACEAE* tabaco e batateira ocorre acumulação da GS1 nas células de companhia do floema, sendo a sua intensidade maior nas células do floema interno (33, 155, 156). Posteriormente foi possível identificar que a isoforma da GS1 que era acumulada no floema de tabaco correspondia ao clone de cDNA *gln 1-5*, enquanto que o outro cDNA (*gln 1-3*) reconhecia transcritos noutros tipos celulares (51). A manipulação dos níveis dos mRNAs da GS1 expressa ao nível dos feixes vasculares de tabaco (*gln 1-5*) permitiu verificar que a isoforma localizada nestes tecidos era responsável pela manutenção dos teores de prolina (22), um aminoácido preferencialmente acumulado em tecidos jovens como as folhas em desenvolvimento desta planta (128).

Durante a senescência natural foliar de tabaco verificou-se ocorrer um aumento da acumulação da GS1 devido ao aumento da expressão do gene *gln 1-3*, cujos transcritos não eram visualizados em folhas expandidas. Estes estudos permitiram sugerir que durante a senescência natural ocorre uma transferência do metabolismo do azoto dos cloroplastos para o citosol nas células de mesófilo.

Tendo em consideração o padrão de acumulação dos transcritos e dos polipeptídeos obtidos em batateira e em tabaco, pode ser postulado um modelo de actuação da GS durante o desenvolvimento foliar da batateira: o clone C1A1A terá uma equivalência ao clone *gln 1-3* de tabaco, isto é, será responsável pela produção de glutamina ao nível das células de mesófilo, a qual será exportada da folha em senescência. O clone T5F8.1A corresponderá à isoforma acumulada nos feixes vasculares e será a principal isoforma citosólica a actuar nas fases iniciais de desenvolvimento foliar, possivelmente produzindo glutamina quer para utilização dos tecidos jovens da folha em formação (folha jovem – reservatório), quer para exportação quando a folha adquire uma função de fonte (folha expandida).

Apesar da regulação da expressão da GS2 parecer ser conservada entre as diferentes espécies estudadas e a presença de GS1 estar associada ao floema da maioria das Angiospérmicas, e em algumas *SOLANACEAE* estudadas (33, 155), existe uma enorme variabilidade na expressão das isoenzimas da GS1, o que torna por vezes a interpretação e generalização fisiológica e bioquímica difícil. Tal deve-se parcialmente ao facto de haver uma baixa homologia entre as sequências dos promotores da GS1 que se traduz numa baixa probabilidade de ocorrência de elementos *cis* comuns, resultando assim em padrões de expressão diferentes. Os dados obtidos até à data na maioria das espécies estudadas sugerem que o controlo da GS1 ocorrerá principalmente ao nível da transcrição, uma vez que foi possível estabelecer uma correlação bastante boa entre a expressão de um determinado membro da família de genes da GS e seu o produto correspondente resultante da tradução (40).

Quando os níveis dos transcritos da GS1 são comparados com os níveis de polipeptídeos nos dois estados de desenvolvimento de tubérculos verifica-se ocorrer uma discrepância nas intensidades das bandas obtidas. Na situação de tubérculo em crescimento ocorreu maior acumulação de mRNAs relacionados com ambos os clones de cDNA do que nos tubérculos em abrolhamento, enquanto que a análise por SDS-PAGE seguida de "Western blotting" permitiu verificar que os tubérculos em abrolhamento apresentam maior quantidade relativa de polipeptídeos da GS1 do que os tubérculos em crescimento. Esta variação poderá reflectir as diferenças no metabolismo geral dos órgãos em questão (tubérculo em abrolhamento – órgão a funcionar como fonte; tubérculo em crescimento – órgão a funcionar como reservatório) as quais se manifestam na população de mRNAs e de proteínas presentes, quer do ponto de vista qualitativo quer quantitativo, havendo espécies de mRNA e de polipeptídeos mais abundantes e/ou mais estáveis do que outras nas duas situações. Esta hipótese é apoiada pela análise efectuada das proteínas solúveis por SDS-PAGE, onde foi possível observar diferenças qualitativas e quantitativas nos perfis electroforéticos dos estados fisiológicos de tubérculo estudados.

Apesar de se admitir que o principal ponto de regulação da GS reside no controlo da transcrição, existem evidências de que GS pode ser regulada pós-transcrição (63, 64, 146, 148, 149). No que diz respeito à GS1, a diferença nos resultados observados ao nível dos tubérculos poderá ser devida, por exemplo, à estabilidade dos mRNAs ou então ao controlo da quantidade de proteína da GS1 presente. De facto, verificou-se que plantas transgénicas de luzerna (*Medicago sativa*), nas quais havia sido introduzida uma construção contendo o promotor 35S do vírus do mosaico CaMV e um gene portador da informação para a GS citosólica, de modo a haver a expressão constitutiva deste gene, apresentavam níveis elevados de transcritos somente nas folhas, enquanto que nos nódulos radiculares não havia acumulação destes mRNAs. Apesar dos níveis dos transcritos detectados nas folhas terem sido bastante elevados não foi possível verificar um aumento significativo na actividade ou nos níveis de polipeptídeos da GS1. Estes resultados demonstraram que a GS1 pode ser regulada ao nível pós-transcrição, quer ao nível da estabilidade dos mRNAs, quer ao nível do "turn-over" proteico (149).

O facto de a GS1 não fosforilada ser mais susceptível de ser degradada do que quando fosforilada e/ou associada a proteínas 14-3-3 (63) é uma outra hipótese que permite explicar os resultados obtidos nas duas fases de desenvolvimento dos tubérculos analisadas neste trabalho. O metabolismo do azoto é reduzido, sendo essencialmente composto pelas reacções enzimáticas conducentes à síntese de proteínas de reserva (15), não sendo tão necessária a fi-

xação de amónia por parte da GS uma vez que na situação de tubérculo em crescimento há importação de nutrientes para serem armazenados, entre os quais hidratos de carbono e azoto orgânico na forma de aminoácidos. A GS não será necessária, estando desfosforilada e mais vulnerável à degradação.

Quando os tubérculos iniciam o abrolhamento, verificam-se alterações drásticas no metabolismo deste órgão e, em especial do azoto, caracterizadas por um aumento do catabolismo proteico, com consequente libertação de amónia, e estimulação dos sistemas de transporte de hidratos de carbono e azoto orgânico de modo a haver exportação destes nutrientes para as partes jovens e em formação da planta (15). Nesta altura, a GS1 actuará na reassimilação da amónia libertada pelo catabolismo proteico e na síntese de glutamina para o transporte intercelular, até que a planta seja auto-suficiente, pelo que foi possível verificar uma diminuição da actividade de GS em tubérculos em abrolhamento à medida que a parte aérea da planta se desenvolvia (154).

Efeito da secura e da salinidade (NaCl 250 mM) na acumulação da GS na planta

Quando comparado o crescimento dos conjuntos de plantas crescidas nas diferentes situações de secura e salinidade, foi possível observar que as plantas da situação controlo apresentaram maior estatura, seguidas das plantas crescidas em secura, sendo as plantas sujeitas a salinidade as que apresentaram menor crescimento. As plantas que cresceram sob stresse apresentaram folhas mais pequenas e, no caso das submetidas a stresse salino, mais cloróticas que as restantes plantas. A diminuição da área foliar é uma estratégia adoptada pelas plantas para reduzir as perdas de vapor de água pela transpiração. A clorose observada nas plantas sujeitas a salinidade deve-se à destruição dos cloroplastos resultante da acumulação de sais (Na^+, Cl^- e SO_4^{2-}) no seu interior (189). Esta sintomatologia consistiu na primeira evidência de que as condições experimentais utilizadas foram efectivas na imposição de stresse nas plantas. Resultados semelhantes em batateira já foram descritos anteriormente (27, 117, 177) como resposta às condições de stresse impostas semelhantes às utilizadas neste trabalho.

A diminuição do crescimento pode ser causa de uma taxa fotossintética inadequada, provocada pelo fecho dos estomas por parte da planta para evitar as perdas de água por evapotranspiração, acarretando uma limitação da entrada de CO_2 (211), ou devido à acumulação de sais nos cloroplastos, ou por interferência com o metabolismo do carbono ou da fotofosforilação (189). O controlo directo do ciclo celular e do alongamento celular por parte do ABA, o

qual está envolvido na regulação da expressão de proteínas associadas a respostas ao stresse hídrico (136), pode fazer diminuir o crescimento das plantas quando crescidas nestas condições (211).

Um outro processo que parece ser afectado por estes tipos de stresse é a absorção de azoto, devido à interferência do mecanismo de simporte do NO_3^- por parte do NaCl existente na solução do solo, o que conduz à redução da actividade metabólica das plantas e consequentemente a alterações do crescimento destas (83).

A diminuição do número de tubérculos formados na situação de secura e a ausência destes na situação de salinidade ao fim de duas semanas deveu-se ao facto de a batateira ser mais sensível a estes tipos de stresse durante o período de iniciação destes órgãos. Após esta fase verifica-se que de um modo geral ocorre formação de tubérculos mais pequenos e menos numerosos nas plantas sujeitas a estes tipos de stresse (177).

As plantas acumulam substâncias osmoticamente activas no citosol em resposta a condições de stresse conducentes ao desequilíbrio osmótico. Estes metabolitos (como por exemplo, hexoses, malato e prolina) estão envolvidos no ajustamento osmótico resultante do desequilíbrio hídrico provocado pelo aumento da concentração de sais (28, 211). A prolina permite a manutenção da homeostasia osmótica e também exerce um efeito protector contra o stresse oxidativo, originado como consequência do stresse osmótico, aprisionando radicais hidroxilo e protegendo proteínas e membranas biológicas da desnaturação (199, 211).

O stresse oxidativo pode ser originado pela acção do ácido salicílico (SA). O SA desempenha um papel importante na resposta das plantas a condições ambientais adversas como o stresse osmótico. Verificou-se que *Arabidopsis* mutantes deficientes em SA conseguiam germinar e desenvolver folhas em condições de stresse hídrico, enquanto que *Arabidopsis* selvagens desenvolviam necrose extensa na parte aérea. Foi possível concluir que o SA potencia a formação de EROs nos tecidos fotossintéticos durante as condições de stresse osmótico. Estas EROs possivelmente funcionarão como sinal ou mensageiro químico, sendo responsáveis pela activação dos mecanismos de defesa da planta (16).

O aumento da acumulação de prolina ocorreu em todos os órgãos analisados das plantas crescidas sob condições ambientais desfavoráveis, tendo sido maior nas raízes do que nos restantes órgãos. As raízes parecem estar activamente envolvidas na adaptação ao stresse salino, dado que uma menor sensibilidade destes órgãos à salinidade implica um melhor mecanismo de exclusão do excesso de iões (140). A presença de um teor elevado de prolina nestes órgãos poderá justificar esta capacidade de exclusão, contribuindo para a tolerância da planta à condição ambiental a que está exposta. A prolina acumulada em resposta à salinidade e à secura

contribuirá para a manutenção do balanço osmótico de um modo compatível com o metabolismo celular, promovendo o estabelecimento de interacções com proteínas que resultam na exclusão dos iões da camada de hidratação destas (208).

O teor de prolina foi maior na situação de salinidade do que na situação de secura. Tal deve-se ao facto de o stresse salino provocar, para além da toxicidade inerente ao excesso de sais, stresse oxidativo, estando por isso as plantas crescidas nesta situação sujeitas a condições mais severas que as crescidas em secura e necessitando por isso de desenvolver uma resposta mais adequada. A prolina também desempenhará o papel fundamental de aprisionar o radical hidroxilo formado.

A diminuição do teor clorofilino em plantas crescidas sob condições de stresse salino já foi observada em trabalhos anteriores, como por exemplo em tomateiro (102), em *Cicer arietinum* L. (181) e em batateira (62, 174). Esta diminuição pode ser devida ao facto de os cloroplastos serem os principais produtores de EROs quando as plantas estão sujeitas a um stresse salino (211). A diminuição do teor clorofilino tem como consequências directas a diminuição dos processos de assimilação de carbono. Esta diminuição de fotoassimilados poderá ser uma das causas do não aparecimento de tubérculos no final do período de tratamento com NaCl, uma vez que a quantidade de hidratos de carbono resultantes da fixação fotossintética do CO_2 poderá não ser suficiente para manter o crescimento da planta e o enchimento dos tubérculos com substâncias de reserva.

O aumento observado no teor clorofilino das plantas crescidas sobre secura pode ser devido à diminuição do teor hídrico das mesmas, com consequente aumento da concentração destes pigmentos quando expressos por peso fresco. Foi possível verificar que em batateiras submetidas artificialmente à secura pela adição de PEG ocorreu uma diminuição do teor hídrico foliar, ainda que reduzido, ao fim de duas semanas de tratamento. Como consequência o teor clorofilino aumentou ligeiramente nestas plantas quando comparadas com a situação controlo, mas não apresentou variação significativa quando expresso por peso seco (27). Estes resultados são apoiados pelo facto de a fotossíntese não ser severamente afectada quando ocorre inicialmente diminuição da quantidade de água disponível ao nível das raízes (189). Possivelmente o tempo de exposição ao stresse hídrico não terá sido suficiente para conduzir a alterações mais marcadas nas plantas utilizadas. Tal poderá ser explicado, por exemplo, pelas propriedades do solo utilizado: um solo mais argiloso terá capacidade de reter água durante mais tempo, o que implica que o tempo de exposição à secura seja mais reduzido do que o esperado.

O teor proteico solúvel da quarta folha a contar do ápice baixou nas plantas crescidas sob as condições de stresse, tendo sido este decréscimo maior na situação de salinidade do que nas plantas sujeitas a secura. A diminuição do teor proteico nas folhas em resposta a condições ambientais conducentes ao desequilíbrio hídrico já foi observado em situações anteriores (35, 62, 181, 189). A diminuição do teor proteico poderá ser devida à indução da expressão de genes que codificam proteases as quais estarão envolvidas em processos de remoção e reciclagem de proteínas desnaturadas pela acção do stresse imposto (189). A variação do teor de proteínas solúveis ocorreu devido a alterações na acumulação relativa de alguns polipeptídeos, tendo o perfil electroforético sido diferente entre as condições de salinidade e de secura. Isto significa que o metabolismo proteico das folhas respondeu de maneira diferente em resposta às condições ambientais impostas. Apesar de estes perfis terem sido distintos, é característica comum o desaparecimento de polipeptídeos de elevada massa molecular e o aparecimento ou aumento de acumulação de polipeptídeos de menor massa (15 a 22 kDa).

A quantidade relativa de proteínas solúveis aumentou nas raízes das plantas crescidas sob stresse. À semelhança das folhas, verificou-se que as plantas das diferentes situações de stresse responderam de modo diferente nas raízes porque os perfis electroforéticos obtidos por SDS-PAGE diferiram. O aumento do teor proteico nestes órgãos deveu-se não só ao aumento da acumulação relativa de determinados polipeptídeos como também ao aparecimento de novos. As plantas responderam à salinidade e à secura impostas diminuindo a acumulação de polipeptídeos de massa elevada e aumentando a acumulação de polipeptídeos de massa molecular compreendida entre 15 e 22 kDa, à semelhança do que ocorreu nas folhas. O aumento da acumulação de polipeptídeos com massa aproximada aos valores obtidos neste trabalho já foi observado em raízes de tomateiro expostas a 170 mM NaCl (35).

As raízes correspondem ao primeiro órgão da planta a experimentar o stresse salino. Para manterem o crescimento sofrem alterações na síntese proteica, as quais são muito mais pronunciadas quando comparadas com as alterações ocorridas ao nível da parte aérea da planta (35), o que reflecte a sua exposição directa à situação de stresse. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam esta ideia. O aumento do teor proteico observado nas raízes das plantas submetidas a stresse também pode ser reflexão da alteração do desenvolvimento radicular, uma vez que as plantas tendem a promover o crescimento destes órgãos quando sujeitas a condições de pouca abundância de água (189).

Nos tubérculos em crescimento das plantas sujeitas a secura houve um aumento do teor de proteínas solúveis. Esse aumento deveu-se não só a um aumento de acumulação de alguns polipeptídeos como também à síntese *de novo* de outros quando tomado em consideração o

perfil electroforético obtido pela análise de SDS-PAGE. Os polipeptídeos que sofreram maior aumento de acumulação apresentam um tamanho aproximado de 40 kDa, o qual corresponde ao tamanho da família das patatinas (161). O grupo das patatinas corresponde a cerca de 40% do total das proteínas solúveis que compõem os tubérculos, sendo consideradas proteínas de reserva apesar de possuírem actividade como acil-hidrolases lipídicas (55, 152). Em trabalhos anteriores foi possível verificar que a secura induziu a expressão de uma proteína semelhante à patatina em *Vigna unguiculata*, tendo sido a sua acumulação superior no caso das plantas mais sensíveis à secura do que nas menos sensíveis (129). À semelhança dos outros órgãos analisados, também foi verificado um aumento da acumulação de polipeptídeos com massa compreendida entre os 15 e os 20 kDa nos tubérculos em crescimento colhidos das plantas crescidas na secura. Este aumento do teor proteico, e em especial o da acumulação de patatina, pode reflectir uma tentativa por parte da planta de assegurar a sua descendência, favorecendo a formação de tubérculos e aumentando a acumulação das substâncias de reserva nestes órgãos em detrimento da parte aérea.

A diminuição do teor proteico ao nível das folhas e o aumento deste nas raízes e nos tubérculos pode ser explicada por um aumento do catabolismo proteico ao nível das folhas e exportação dos aminoácidos resultantes para os tubérculos ou para as raízes, para aqui serem utilizados na síntese de proteínas e para promover a formação de novos tecidos. O azoto translocado no floema é essencialmente representado por aminoácidos e amidas, em especial por glutamato e aspartato e as suas respectivas amidas, glutamina e asparagina (189), os quais serão metabolizados nos órgãos para onde foram transportados, como as raízes e os tubérculos. Esta hipótese é suportada pelo facto de se ter verificado um aumento no teor de aminoácidos livres ao nível das folhas de plantas sujeitas a secura e a salinidade (1, 28, 76, 179, 181), entre os quais se salientam a prolina, o glutamato, a glutamina, a arginina, a asparagina, a glicina e a serina (28, 76).

Um padrão comum na acumulação de polipeptídeos nos órgãos estudados consistiu no aumento da acumulação de polipeptídeos com massa compreendida entre os 15 e os 20 kDa. Este comportamento é reflexo de uma resposta metabólica por parte das plantas às condições ambientais a que estão sujeitas. Estes polipeptídeos poderão estar relacionados com produtos envolvidos em processos metabólicos desde a acumulação de osmólitos e a manutenção da homeostasia iónica até à reparação e defesa celular (35). Os polipeptídeos de massa compreendida entre 15 e 20 kDa poderão corresponder a HSPs (do inglês "Heat Shock Proteins"). As HSPs pertencentes a esta gama de valores de massa são bastante abundantes nas plantas. Tratam-se de proteínas que são induzidas pelo calor, podendo surgir também em resposta a outras

condições ambientais como os stresses hídrico e salino. Estas proteínas acumulam-se em vários compartimentos celulares onde vão desempenhar diversas funções como estabilizar outras proteínas, transportar polipeptídeos através de membranas ou proteger resíduos de aminoácidos hidrofóbicos nas cadeias polipeptídicas. Outro grupo de proteínas que sofrem aumento da expressão e acumulação nas plantas sujeitas a estes tipos de stresse correspondem às proteínas *LEA* ("Late Embryogenesis Abundant") as quais parecem estar também envolvidas na protecção das membranas biológicas. As enzimas do sistema enzimático anti-oxidante também sofrem aumento de acumulação nestas situações de stresse (189).

A acumulação de polipeptídeos da GS ao nível da 4ª folha foi afectada pelas condições de salinidade utilizadas neste estudo visto ter ocorrido uma diminuição do teor de GS2. A diminuição da actividade da GS2 já foi observada em plântulas de arroz submetidas a 400 mM de NaCl (108) e em folhas de plantas de arroz regadas com uma solução contendo NaCl 150 mM, enquanto que os níveis da GS1 se mantiveram inalterados ao fim de 4 semanas de tratamento (91).

A diminuição do teor de polipeptídeos da GS2 teve paralelismo com os níveis de transcritos, quando analisados por "Dot blotting" com uma sonda específica (14A1.2), os quais sofreram uma ligeira diminuição na sua acumulação. A diminuição do teor de polipeptídeos da GS2 pode ser devida aos efeitos tóxicos do stresse salino por este ter induzido o stresse oxidativo. O stresse salino conduz ao fecho dos estomas por acção da fito-hormona ABA, limitando o fornecimento de CO_2 à folha o que conduz à redução da cadeia fotossintética transportadora de electrões e consequentemente à libertação de EROs (91), os quais irão afectar a integridade das proteínas cloroplastidiais como a GS2. Um aumento da acumulação de mRNAs da GS2 nas plantas sujeitas à salinidade poderia corresponder a uma tentativa por parte da planta de minimizar os efeitos nefastos da salinidade pela manutenção da fotorrespiração, uma vez que há estudos que sugerem que o passo limitante deste processo corresponde à reacção catalisada pela GS2 (81, 106, 203). Esta hipótese é suportada pelo facto de plantas de arroz transgénicas a sobreexpressar a GS2 apresentaram uma capacidade fotorrespiratória mais elevada que as plantas não transformadas, o que se manifestou num aumento da tolerância destas à salinidade (91).

Apesar de não terem sido verificadas alterações nos níveis de polipeptídeos da GS1 nas folhas das plantas crescidas sob salinidade, tal não se passou com os respectivos transcritos. A salinidade induziu a acumulação dos mRNAs relacionados com o clone T5F8.1A e a diminuição da acumulação dos transcritos relacionados com o clone C1A1A. A variação dos níveis de transcritos relacionados com os dois cDNAs em estudo parece não ter tido influência nos

níveis de polipeptídeos quando analisados por SDS-PAGE. A análise bidimensional permitirá no futuro aferir se a variação dos teores destes mRNAs terá tido reflexo na qualidade e quantidade de polipeptídeos da GS1 ou se haverá outro(s) factor(es) em jogo, como por exemplo, a estabilidade dos mRNAs ou o "turn-over" proteico.

O aumento da concentração da amónia nas folhas das plantas sujeitas à salinidade, proveniente da fotorrespiração e do catabolismo proteico, poderá afectar a expressão dos genes que codificam a GS1, um vez que a expressão destes parece ser afectada pela fonte inorgânica de azoto que é fornecida à planta (168, 186, 187, 194). Dado que a GS1 expressa no floema de tabaco (*gln 1-5*) é responsável pela manutenção dos níveis de prolina na planta (22), e uma vez que houve aumento da acumulação deste aminoácido nas folhas das plantas sujeitas a salinidade, é possível admitir que o aumento da acumulação de mRNAs relacionados com o clone da GS1 T5F8.1A, o qual apresenta elevada homologia com o clone *gln 1-5* de tabaco, estará relacionado com o teor de prolina quantificado. Deste modo estes resultados estarão de acordo com a hipótese levantada anteriormente, na qual era proposto que o gene da GS1 que seria expresso no floema da batateira estaria relacionado com este clone de cDNA, sendo responsável pela manutenção dos níveis de prolina nesta planta.

A secura não afectou a acumulação relativa dos polipeptídeos da GS nas folhas quando analisados por SDS-PAGE. No entanto os transcritos da GS sofreram alteração na sua acumulação quando comparados com a situação controlo. Os níveis dos mRNAs relacionados com a isoforma plastidial diminuíram ligeiramente, assim como os níveis dos mRNAs relacionados com os clones T5F8.1A e C1A1A. Resultados semelhantes quanto ao comportamento da acumulação dos produtos relacionados com a GS2, mas não com a GS1, foram obtidos em folhas de tomateiros sujeitos a secura (7). A manutenção dos níveis dos polipeptídeos da GS nas folhas das plantas sujeitas a secura poderá resultar da manutenção da integridade das isoenzimas ou ao aumento da estabilidade dos mRNAs que as codificam.

A diminuição reduzida do teor proteico, assim como o aumento também reduzido do teor clorofilino, são parâmetros que sugerem não ter havido uma imposição muito severa da condição de secura, pelo que o aumento do tempo de exposição ao stresse poderá, no futuro, dar azo a respostas mais distintas por parte dos diferentes elementos que compõem a GS das folhas da batateira.

Apesar de não ter sido possível detectar transcritos relacionados com os clones 14A1.2 e C1A1A nas raízes por "Northern blotting", a metodologia utilizada neste estudo para avaliar a acumulação de mRNAs relacionados com os três clones permitiu a detecção destes em algumas situações particulares.

No caso do clone 14A1.2 surgiu sinal resultante da hibridação deste cDNA nas situações correspondentes às raízes provenientes das plantas sujeitas a secura e aos tubérculos em crescimento das plantas controlo. Este fenómeno pode tratar-se de um artefacto da técnica, uma vez que a quantidade de RNA total aplicada não foi fraccionada pelo tamanho e as probabilidades de haver hibridações inespecíficas são elevadas. Esta hipótese é reforçada pelo facto de o teor de transcritos da GS1 presentes nestas situações serem elevados, o que traz como consequência o reconhecimento destes transcritos por parte desta sonda devido à elevada homologia existente entre os mRNAs que codificam as GS. No entanto não é de excluir a possibilidade de estes resultados corresponderem a mRNAs da GS2 acumulados nestes órgãos, dado esta isoforma poder ser acumulada nos plastídios das células não fotossintéticas (66). Perante esta última explicação, seria possível admitir que ocorreu aumento da acumulação de mRNAs relacionados com a GS2 nas raízes em resposta à salinidade e uma diminuição da sua acumulação nos tubérculos em resposta à secura. Estes resultados terão que ser avaliados futuramente recorrendo a outras metodologias, como por exemplo, a hibridação *in situ* e a imunocitoquímica, as quais permitirão determinar a presença ou ausência dos produtos relacionados com este clone devido à maior sensibilidade inerente.

Os resultados obtidos para o cDNA C1A1A resultaram de uma noite de exposição, pelo que a detecção de níveis muito reduzidos dos mRNAs com ele relacionados foi potenciada. Possivelmente o aumento da exposição nos ensaios de "Northern blotting" efectuados anteriormente permitiriam facultar também a detecção de transcritos relacionados com este clone nas raízes. No entanto, os dados obtidos por esta técnica não estão livres de representar um fenómeno de hibridação não específica com outros mRNAs expressos nas raízes por parte da sonda utilizada. Verificou-se um aumento da acumulação dos mRNAs relacionados com os clones C1A1A e T5F8.1A em resposta à salinidade e apenas para o clone C1A1A nas raízes das plantas expostas à secura, enquanto que os transcritos relacionados com o clone T5F8.1A não sofreram alteração da acumulação em resposta à secura. Estes dados sugerem a possibilidade do gene relacionado com o clone C1A1A poder ser induzido em resposta às condições de stresse utilizadas. O aparecimento de uma nova forma da GS1 já foi reportado anteriormente em folhas de tomate após a infecção por *Pseudomonas syringae* (158). A análise bidimensional permitirá esclarecer este assunto numa futura abordagem.

A acumulação de transcritos da GS1 teve paralelismo directo com a acumulação dos polipeptídeos. A diminuição do teor de GS1 nas raízes das plantas sujeitas à secura pode ser explicada pelo decréscimo da transcrição do gene relacionado com o clone T5F8.1A (que corresponde ao mRNA mais abundante neste órgão, visto ter sido detectado ao fim de pouco

tempo de exposição), sendo o aumento do teor de mRNAs relacionados com o clone C1A1A insuficiente para conduzir a alterações marcantes na quantidade de polipeptídeos da GS1 nesta situação. No entanto, o aumento da acumulação da GS1 observado nas raízes das plantas sujeitas à salinidade será resultado do aumento da acumulação dos mRNAs relacionados com o clone C1A1A.

A expressão da GS1 nos tubérculos em crescimento foi afectada pela secura uma vez que houve alteração dos teores de mRNAs e de polipeptídeos desta isoforma em resposta a esta condição ambiental. Os níveis de polipeptídeos da GS1 diminuíram na secura essencialmente devido à diminuição da acumulação dos mRNAs relacionados com o cDNA C1A1A, apesar de ter ocorrido um pequeno aumento do teor dos mRNAs relacionados com o clone T5F8.1A. De modo semelhante ao que já foi discutido para as folhas, o aumento da expressão do gene relacionado com o clone T5F8.1A poderá estar relacionado com a síntese de prolina, a qual se verificou acumular nos tubérculos em resposta à secura (22, 208, 211).

A alteração da expressão da GS1 nalgumas das situações analisadas poderá ser reflexo dos níveis de metabolitos presentes nestes órgãos. A absorção de NO_3^- é diminuída pelo stresse salino (83). A diminuição da quantidade de NO_3^- implica uma diminuição da quantidade de amónia resultante da sua redução pela acção conjunta das enzimas NR e NiR, com consequente diminuição da disponibilidade de substrato para a GS e portanto a uma menor necessidade da sua presença.

Com a imposição do stresse hídrico e/ou salino ocorre diminuição da taxa fotossintética e consequentemente a exportação de fotoassimilados é menor (7, 91, 189). Por sua vez, a quantidade (e a qualidade) de hidratos de carbono que chega aos diferentes órgãos será diferente, implicando alterações no metabolismo celular e, obrigatoriamente, na expressão génica. Por outro lado, estas condições ambientais promoveram a diminuição do teor proteico nas folhas e ao aumento deste nos outros órgãos analisados, o que pode ser consequência da alteração da concentração de aminoácidos livres aí presentes (27, 28, 179, 181). Uma elevada razão hidratos de carbono/azoto orgânico resulta na activação da expressão de genes da GS, enquanto que a razão inversa conduz à sua inactivação (146). A determinação dos teores dos diferentes hidratos de carbono e aminoácidos presentes nos diferentes órgãos e nas diferentes condições ambientais permitirá testar esta hipótese no futuro.

O controlo hormonal da expressão dos genes que codificam a GS é outro factor que estará em jogo. Verificou-se que os teores das fito-hormonas ABA e etileno aumentam em condições de limitação de água (189). Apesar de até à data não ter sido descrita qualquer influência da acção do ABA na expressão da GS, sabe-se que o etileno induz o aumento da acumula-

ção de transcritos e da actividade da GS1 (162). O estudo da influência destes e de outros reguladores de crescimento na expressão da família multigénica da GS poderá no futuro originar informações adicionais que permitirão melhorar a compreensão da resposta das plantas sujeitas a estes tipos de stresse.

Efeito de concentrações crescentes de salinidade (NaCl 100 e 200 mM) na acumulação da GS na planta

Na tentativa de avaliar se a expressão da família multigénica da GS em resposta à rega com uma solução contendo NaCl 250 mM poderia ser reflexo de um stresse severo e súbito, podendo reflectir-se num choque para a planta, procedeu-se à avaliação da expressão da GS recorrendo à rega das plantas com soluções salinas de concentração mais baixa, aproveitando simultaneamente a colaboração com outro grupo de trabalho.

As condições de salinidade utilizadas neste ensaio conduziram à diminuição do teor proteico foliar, tendo sido a condição de NaCl 200 mM mais notória nesta diminuição. A diminuição do teor total de proteínas neste conjunto de plantas foi devido principalmente à diminuição do teor em proteínas solúveis (62), possivelmente resultante do aumento do catabolismo proteico devido à indução da expressão de proteases (189). Nos tubérculos em crescimento houve um aumento do teor proteico solúvel. A análise do teor proteico solúvel por SDS-PAGE permitiu verificar diferenças quantitativas na acumulação relativa de alguns polipeptídeos. Houve um aumento de acumulação de polipeptídeos de baixa massa molecular quer nas folhas, quer nos tubérculos em crescimento, os quais poderão estar relacionados com mecanismos de defesa e de protecção aos stresses impostos (35), nomeadamente HSPs, proteínas *LEA* e enzimas do sistema anti-oxidante (189). Nos tubérculos parece ter havido um aumento de acumulação de patatina na condição de salinidade. Este aspecto poderá ser parcialmente responsável pelo aumento do teor proteico observado, uma vez as patatinas são proteínas de reserva que correspondem a cerca de 40% das proteínas solúveis que compõem os tubérculos (152).

A aplicação do stresse salino conduziu a uma diminuição do teor relativo de água e a um aumento do teor de prolina nas folhas. Nestas, ainda foi verificada a desorganização da integridade cloroplastidial (62, 174). Estes parâmetros indicam que as condições de stresse utilizadas neste estudo conduziram ao desencadear de respostas por parte das plantas ao nível do metabolismo do azoto, como observado no teor das proteínas e no seu perfil electroforéti-

co, assim como no aumento do teor deste aminoácido o qual desempenhará as funções de osmoprotecção e osmorregulação.

A acumulação dos polipeptídeos que compõem a GS nos órgãos estudados também foi afectada pelas condições de salinidade impostas às plantas. Verificou-se haver um declínio na acumulação da GS2 na quarta folha a contar do ápice com o aumento da concentração de salinidade utilizada. Pelo contrário, a salinidade conduziu ao aumento da acumulação da GS1, quer nas folhas, quer nos tubérculos em crescimento.

A variação do padrão de acumulação de polipeptídeos da GS teve paralelismo com a acumulação de transcritos. A salinidade conduziu à diminuição da acumulação dos mRNAs relacionados com o cDNA 14A1.2 (GS2) nas folhas. Nestes órgãos, a acumulação dos transcritos relacionados com o clone de cDNA C1A1A (GS1) não foi afectada pelas condições utilizadas no estudo, enquanto que a acumulação dos mRNAs relacionados com o clone T5F8.1A (GS1) sofreu um aumento, o qual estará relacionado com o aumento do teor de GS1 verificado no "Western blotting". Nos tubérculos em crescimento ambas as sondas citosólicas detectaram um aumento de acumulação dos seus transcritos, tendo sido este aumento mais notório no caso do cDNA T5F8.1A. Este aumento de acumulações reflectiu-se no teor de GS1 detectada no "Western blotting".

A análise bidimensional contribuirá com mais informações acerca do padrão de acumulação da GS em resposta às condições de salinidade utilizadas pois permitirá averiguar a existência de possíveis correlações entre os níveis de transcritos e de polipeptídeos correspondentes, indicando deste modo qual o principal nível de regulação da GS em resposta às condições de salinidade impostas neste estudo– transcrição ou pós-transcrição.

De facto, há outros factores poderão estar relacionados com o aumento do teor da GS1, os quais vão desde um aumento da expressão dos genes que a codificam (o que parece ser o caso do clone de cDNA T5F8.1A), o aumento da estabilidade dos mRNAs (66) ou uma diminuição da taxa de degradação desta isoforma, possivelmente por interacções com outras proteínas, como as 14-3-3 (63). Outros factores, como a razão C/N (146) e o controlo hormonal poderão estar envolvidos na regulação desta expressão diferencial, pelo que seria interessante dissecar estes aspectos em estudos futuros.

Os dados obtidos neste estudo indicam que a salinidade afecta o metabolismo do azoto na batateira, e em especial, a acumulação da GS. O teor de GS2 nas folhas das plantas crescidas em salinidade diminui não só devido à desorganização dos cloroplastos mas também devido à diminuição da acumulação dos seus transcritos. O teor de GS1 aumenta devido essencialmente ao aumento da acumulação de mRNAs relacionados com o clone T5F8.1A, suge-

rindo que as condições geradas pela salinidade exercerão uma estimulação da expressão do gene relacionado com este clone de cDNA. A acumulação dos mRNAs relacionados com este cDNA acompanha os níveis de prolina, o que sugere o envolvimento, ainda que indirecto, desta isoforma da GS1 com a biossíntese deste aminoácido. Esta hipótese é apoiada pelo facto de o cDNA de tabaco, para o qual o clone T5F8.1A apresenta maior homologia (*gln 1-5*), estar relacionado com a síntese de prolina (22), como já referido anteriormente.

O stresse salino teve repercussões na biomassa das plantas, uma vez que as plantas sujeitas a este stresse apresentaram estatura menor que as respectivas controlo. Tal diminuição não só é devida à diminuição da actividade fotossintética (211), como também ao decréscimo na actividade foliar da GS(2) com consequente diminuição da taxa de assimilação primária de azoto (83) e do metabolismo azotado em geral. Esta hipótese é apoiada pelo facto de se ter verificado que a sobreexpressão da GS2 nas folhas estimula o crescimento de plântulas de tabaco (133) e confere uma maior tolerância à salinidade a plantas de arroz (91).

Comparando este estudo com o estudo anterior verifica-se que as condições de salinidade utilizadas, embora distintas, conduziram a respostas que podem ser consideradas semelhantes, como por exemplo: o aumento do teor de prolina; a diminuição do teor proteico solúvel nas folhas e o aumento deste nos tubérculos (principalmente em patatina) e o aumento de acumulação de polipeptídeos com massa molecular baixa em todos os órgãos estudados. No que diz respeito à acumulação da GS verifica-se haver diminuição dos teores de polipeptídeos e de transcritos relacionados com a GS2 e o aumento da acumulação de transcritos da GS1 relacionados com o clone T5F8.1A.

As diferenças encontradas são devidas às diferentes concentrações de NaCl utilizadas, assim como à altura de aplicação do stresse salino. Uma concentração mais elevada de sal implica uma variação mais acentuada da razão Na^+/K^+ nas células, o que resulta na inactivação de enzimas e do metabolismo em geral da planta, como a síntese proteica e a fotossíntese, e no desencadear de um stresse oxidativo mais severo do que a sujeição a concentrações mais baixas de sal implicaria. A aplicação das soluções salinas de menor concentração foi mais precoce no último ensaio realizado por ter sido aplicada poucos dias após emergência das plantas. Isto implica um tempo de exposição ao stresse e de capacidade de desenvolver resposta por parte das plantas superior ao do primeiro estudo.

Estas diferenças são manifestação das respostas metabólicas diferentes executadas por parte das plantas, como pode ser observado pelos diferentes perfis electroforéticos obtidos por SDS-PAGE nos dois estudos, por exemplo: enquanto que nas plantas que foram sujeitas a NaCl 250 mM verificou-se haver diferenças qualitativas e quantitativas nos perfis obtidos, no

conjunto de plantas tratadas com NaCl 100 e 200 mM só foi possível verificar diferenças quantitativas. A expressão de algumas proteínas *de novo* na primeira situação estudada corresponderá a um mecanismo de defesa distinto, que actuará em situações de stresse possivelmente mais nefastas para a planta. A acumulação de polipeptídeos de menor massa e a síntese *de novo* de outros podem corresponder a estratégias diferentes de adaptação e/ou defesa às condições ambientais distintas que as plantas enfrentam. A acumulação destas proteínas aumentaria a protecção e/ou a manutenção da integridade (proteica) celular contribuindo para um suporte mais adequado por parte das plantas às condições ambientais impostas.

No que respeita à GS, verifica-se que o teor de GS2 diminui em ambos os estudos, indicado que a expressão e acumulação desta isoforma é afectada pela salinidade. Resultados semelhantes já foram observados em estudos anteriores (91, 108, 125). A redução do teor de GS2 acarreta uma diminuição generalizada da actividade total da GS na folha, e em especial, do mecanismo protector desempenhado por esta isoforma na fotorrespiração (106, 203). Nestas condições (salinidade) ocorre uma redução em excesso da cadeia fotossintética transportadora de electrões conduzindo à libertação de EROs, as quais provocam stresse oxidativo na planta (91). A diminuição da actividade da GS2 acarreta também uma diminuição da reassimilação da amónia proveniente da fotorrespiração e consequente aumento do seu teor na célula. O aumento da acumulação de mRNAs da GS1 poderá ter sido consequência do aumento do teor de amónia numa tentativa por parte da planta de recuperar o azoto perdido por este processo ou até mesmo de eliminar o efeito tóxico exercido por esta molécula. Seria interessante verificar se a outra enzima envolvida no metabolismo da amónia – a GDH – sofrerá alterações na actividade, na acumulação e/ou na expressão em resposta às condições utilizadas nos estudos efectuados. Deste modo seria possível elucidar o(s) possível (eis) papel (eis) das diferentes enzimas envolvidas na assimilação de azoto em resposta às condições de stresse utilizadas nestes estudos.

Efeito de concentrações crescentes de salinidade (NaCl 50 e 100 mM) na acumulação da GS no tecido caloso de batateira

As culturas de tecido caloso utilizadas foram seleccionadas fazendo crescer o tecido em concentrações crescentes de sal até este ser capaz de manter o crescimento nas concentrações utilizadas neste estudo, isto é, até terem sido estabelecidas culturas tolerantes às concentrações de sal utilizadas (163).

As condições de stresse salino utilizadas neste estudo conduziram a diferenças na taxa de crescimento do tecido caloso, tendo esta sido mais reduzida nas condições de salinidade utilizadas, tendo o valor mais baixo correspondido à condição de 100 mM (163), indicando que esta situação manifestou-se ser mais severa que a de 50 mM.

A salinidade conduziu ao aumento do teor proteico solúvel, tendo esse valor sido maior na concentração mais elevada de sal. O tecido caloso respondeu às condições impostas com o aumento da acumulação de alguns polipeptídeos com massa molecular compreendida entre os 15 e os 35 kDa, tendo a acumulação de alguns dos polipeptídeos sido maior na situação de 100 mM do que em 50 mM (191). À semelhança do descrito nos ensaios anteriores, alguns destes polipeptídeos estarão relacionados com produtos envolvidos em processos metabólicos como a acumulação de osmólitos e a manutenção da homeostasia iónica, a reparação e a defesa celular, como por exemplo, as HSPs, as proteínas *LEA* ou as enzimas do sistema enzimático anti-oxidante.

O teor de prolina aumentou com o aumento da salinidade (191). A prolina acumulada em resposta às condições impostas de salinidade contribuirá para a manutenção do balanço osmótico de um modo compatível com o metabolismo celular, promovendo o estabelecimento de interacções com proteínas que resultam na exclusão dos iões da camada de hidratação destas (208). Este aminoácido também participará na remoção do radical hidroxilo libertado pelo stresse oxidativo imposto pela salinidade (191).

A análise por "Western blotting" revelou um decréscimo no teor de polipeptídeos da GS2 paralelo ao aumento da salinidade no meio de cultura. Este fenómeno pode ser devido à destruição dos cloroplastos ou dos plastídios onde esta isoforma é acumulada, pela acção conjunta da elevada concentração de sais nestes organelos (189) e das EROs originadas do metabolismo celular em resposta ao stresse imposto (91). No entanto, não foram detectadas alterações da morfologia e ultraestrutura em células de batateira adaptadas a um potencial hídrico baixo e tolerantes a concentrações extracelulares de NaCl 200 mM em trabalhos anteriores (116), pelo que a diminuição da acumulação da GS2 poderá ser essencialmente reflexo da diminuição da expressão do gene que a codifica.

Estes aspectos serão tomados em consideração no futuro, através da análise da acumulação de transcritos e da ultraestrutura das células crescidas nas diferentes situações de salinidade.

O teor de GS1 aumentou com os valores de salinidade usados. Possivelmente este aumento do teor da GS1 estará envolvido com a síntese de prolina, como demonstrado anteriormente (22), ou na produção de precursores azotados a serem utilizados na biossíntese de

proteínas e de outros compostos azotados envolvidos nos processos de reparação e defesa contra as condições de stresse impostas.

A análise bidimensional da acumulação da GS apoia os resultados obtidos no "Western blotting" na medida em que se verificou a diminuição do teor de GS2 com o aumento da salinidade. Esta técnica permitiu verificar que o aumento do teor da GS1 ocorreu devido ao aumento da acumulação do polipeptídeo correspondente ao pI=5,0, o qual se postulou estar relacionado com o clone de cDNA C1A1A, já que o outro polipeptídeo (pI=4,8) não sofreu variação da sua acumulação com o aumento da concentração de NaCl no meio de cultura. Uma outra informação obtida da análise bidimensional, e que é devida ao facto de terem sido detectados ambos os polipeptídeos da GS1 no mesmo tipo celular, é a forte indicação de estes se poderem associar de modo a originarem diferentes heteroenzimas (11, 34, 66), as quais poderão apresentar uma actividade que melhor responda às necessidades fisiológicas e metabólicas impostas pelas condições a que as células estão expostas.

Se for considerada a relação cDNA / ponto isoeléctrico descrita anteriormente é possível verificar que os resultados obtidos por "Northern blotting" não encontram paralelismo com a análise bidimensional. Neste último tipo de análise foi verificada uma certa manutenção dos níveis de polipeptídeos com pI=4,8, os quais estarão relacionados com o cDNA utilizado como sonda na análise por "Northern blotting" – o clone T5F8.1A – a qual, por sua vez, detectou um aumento ligeiro na acumulação de transcritos com ela relacionados. Esta não correspondência poderá ser devida por exemplo, à estabilidade dos mRNAs (e portanto à sua durabilidade/degradabilidade) ou a alterações pós-tradução, como o envolvimento na participação da formação de enzimas activas ou o aumento do "turn-over" proteico destes polipeptídeos (66). A análise da acumulação dos transcritos relacionados com o clone de cDNA C1A1A como sonda auxiliará a compreensão destes resultados, pois dará uma noção do comportamento da outra forma da GS1 em resposta às condições utilizadas.

O aumento da acumulação da GS1 também poderá ser reflexo da alteração da capacidade de absorção das diferentes formas azotadas disponíveis no meio de cultura. Verificou-se que as culturas de células em suspensão de batateira a crescer num meio suplementado com NaCl 75 mM apresentavam uma menor velocidade de absorção de NO_3^- que a respectiva situação controlo (83). Também não poderá ser excluída a possibilidade de haver um controlo hormonal da expressão da família de genes da GS. O aumento do teor de ABA já foi reportado em culturas de células de batateira sujeitas ao stresse hídrico (116), e o etileno induziu o aumento da acumulação e da actividade da GS1 em células lacticíferas de *Hevea brasiliensis* (162). Como a influência do ABA na expressão da GS ainda está por elucidar, o uso da técni-

ca de cultura de tecidos poderá revelar-se uma ferramenta poderosa para estudar o possível envolvimento deste e dos diferentes reguladores de crescimento, na expressão da família de genes que constitui a GS.

Uma interpretação geral dos resultados obtidos neste ensaio é que a diminuição da expressão do gene que codifica a GS2 e o aumento da expressão do gene relacionado com o clone de cDNA T5F8.1A serão dois mecanismos envolvidos na resposta celular à salinidade.

5 - CONCLUSÕES

O rastreio da biblioteca de cDNAs construída a partir da população de mRNAs de folha e a excisão *in vivo* do clone de cDNA T5F8.1A permitiram isolar dois clones de cDNA relacionados com subunidades citosólicas da GS (GS1) em batateira. Foi observada uma elevada homologia entre os clones isolados neste trabalho e entre estes e o clone plastidial previamente isolado. O facto de os 16 resíduos de aminoácidos e os resíduos de cisteína que estão presentes na sequência de aminoácidos deduzida para o clone de cDNA que codifica a subunidade plastidial (14A1.2), estarem ausentes nestes clones são indicações de que os clones de cDNA C1A1A e T5F8.1A codificam subunidades de GS1.

A comparação das sequências nucleotídicas e respectivas sequências aminoacídicas deduzidas dos clones isolados com as sequências existentes nas bases de dados revelou uma elevada homologia com sequências relacionadas com a GS1. Esta comparação permitiu ainda verificar que ambos os clones de cDNA da GS1 de batateira são incompletos a 5' devido ao facto de não ter sido identificado qualquer códão de iniciação nas suas sequências, o que é apoiado pelo alinhamento destas com as sequências mais homólogas existentes no banco de dados, e que correspondem à GS1 de tabaco. A análise das sequências destes clones permitiu concluir que estes são relativos a moléculas de mRNA distintas, as quais correspondem a polipeptídeos também distintos. Esta conclusão implica a existência de pelo menos 3 polipeptídeos da GS em batateira: dois da GS1 e um da GS2. A baixa homologia observada a montante do códão STOP entre os três clones de cDNA em estudo revelou que a região 3' não traduzida poderá servir como sonda específica nos estudos de expressão dos genes que codificam a GS na planta, como foi efectivamente demonstrado neste trabalho.

Devido ao facto de terem sido visualizadas apenas 3 bandas resultantes da hibridação dos fragmentos de restrição de DNA genómico com uma sonda conservada é sugerida a existência de apenas três genes a constituir uma pequena família multigénica a codificar a GS nesta espécie: dois genes codificarão a GS1 e o terceiro a GS2.

O surgimento de apenas três pontos isoeléctricos na análise bidimensional dos polipeptídeos da GS (dois de menor massa molecular e um com maior massa), associado aos resultados obtidos pela análise de "Southern blotting" nas condições utilizadas e ao número total de cDNAs isolados, são dados que apoiam a hipótese formulada. Esta hipótese também é apoiada pelo facto de não terem sido identificados mais do que dois cDNAs, ao todo, a codificar a GS1 nas espécies da família *SOLANACEAE* estudadas até à data.

A caracterização da acumulação da GS na batateira foi efectuada por RT-PCR, por "North-ern blotting" e por "Western blotting" acoplado à análise uni- e bidireccional em dife-

rentes órgão e fases de desenvolvimento da planta: raízes, tubérculos (em formação e em abrolhamento, caules e folhas (desde folhas jovens a senescentes).

Foi possível concluir que a GS é expressa diferencialmente na batateira. Os polipeptídeos e os transcritos relacionados com a isoforma plastidial surgiram nos órgãos aéreos da planta, como as folhas e os caules, enquanto que a GS1 foi detectada em todos os órgãos da planta. Nas raízes a GS1 parece ser constituída apenas por polipeptídeos relacionados com o clone de cDNA T5F8.1A, podendo o gene que está relacionado com o outro polipeptídeo ser induzido em determinadas situações de stresse, como a salinidade e a secura. A holoenzima formada por subunidades relacionadas com o clone de cDNA T5F8.1A será responsável pela fixação metabólica da amónia absorvida do solo ou resultante da actividade da enzima nitrato redutase presente nos plastídios das raízes, originando glutamina que será utilizada no metabolismo local ou então exportada para as partes aéreas da planta. Nos restantes órgãos foi detectada a acumulação simultânea de ambos os transcritos da GS1, assim como a presença de dois pontos isoeléctricos com a mesma massa, indicando a possibilidade de haver formação de heteroenzimas as quais corresponderão às necessidades metabólicas do momento no órgão onde estão presentes.

A expressão dos genes que compõem a GS na batateira varia com o estado de desenvolvimento de alguns dos seus órgãos. Nas folhas, o aumento da acumulação da GS2 da fase de folha jovem para expandida acompanha a aquisição da capacidade fotossintética, uma vez que esta isoforma sofre um decréscimo quando a folha deixa de corresponder a uma fonte activa de fotoassimilados e passa a exportar nutrientes que antes entravam na sua constituição (estados de folha velha e senescente) caracterizando-se pela perda da integridade cloroplastidial. A GS1 sofreu um aumento progressivo na sua acumulação ao longo das diferentes fases de desenvolvimento da folha, essencialmente devido à contínua acumulação das subunidades relacionadas com o clone C1A1A, o que faz desta subunidade a mais abundante das subunidades da GS1 nas folhas.

Na transição de folha jovem (recebedor) para folha expandida (fonte) ocorre um aumento da acumulação de ambas as formas da GS1 o que poderá reflectir uma maior exigência de percursores azotados de modo a satisfazer as necessidades metabólicas relacionadas com a elevada taxa biossintética característica destas fases de desenvolvimento. Nas fases mais avançadas do desenvolvimento foliar a GS é representada apenas pela GS1, e essencialmente por polipeptídeos relacionados com o clone C1A1A. Com base neste padrão de expressão conclui-se que esta isoforma está relacionada com os SAG ("Senescence Associated Genes") e será responsável pela reassimilação da amónia libertada, possivelmente ao nível das células

de mesófilo, dos processos catabólicos decorrentes nas fases mais avançadas do desenvolvimento foliar e que caracterizam a senescência. Da sua actividade será originada glutamina, a qual será exportada da folha para as diferentes partes da planta. Os polipeptídeos relacionados com o clone T5F8.1A poderão ter correspondência à isoforma da GS1 preferencialmente acumulada nos feixes vasculares, à semelhança da planta de tabaco (22, 51), a qual actuará nas fases iniciais de desenvolvimento foliar produzindo glutamina quer para utilização local quer para exportação quando a folha adquire função de fonte.

A regulação da expressão dos genes que codificam a GS nas diferentes fases de desenvolvimento foliar está, portanto, relacionada com as possíveis vias de utilização de glutamina – local – para a biossíntese de constituintes azotados – exterior – para a translocação de compostos azotados e a utilização destes noutros locais da planta. Outros factores, como a razão C/N e o envolvimento de reguladores de crescimento, estarão seguramente a interferir com este padrão de expressão, pelo que será interessante esclarecer estes pontos numa futura abordagem.

A GS é exclusivamente representada por ambos os polipeptídeos da GS1 nos tubérculos, quer em fase de abrolhamento, quer em crescimento, não tendo sido detectada a GS2. Nos tubérculos em abrolhamento ocorre aumento do catabolismo proteico, com consequente libertação de amónia; simultaneamente, há uma necessidade enorme de exportar activamente percursores azotados para suster a taxa biossintética da parte aérea da planta em formação. Nesta situação ambas as formas da GS1 participarão na síntese de glutamina essencialmente para exportação assim como na reassimilação da amónia resultante do catabolismo proteico. Nos tubérculos em crescimento há acumulação de um teor inferior de polipeptídeos da GS1 uma vez que estes reservatórios estão a receber activamente compostos azotados os quais são essencialmente utilizados na biossíntese de proteínas de reserva, como por exemplo as patatinas. A pouca proteína da GS1 que foi detectada poderá estar a actuar na manutenção do metabolismo azotado, como por exemplo, na reincorporação da amónia libertada pela actividade metabólica deste órgão, ou na formação de glutamina para uso local. A discrepância observada entre o teor de transcritos e o teor de polipeptídeos da GS1 nas diferentes fases de desenvolvimento dos tubérculos estudadas dever-se-á essencialmente à estabilidade dos transcritos ou à regulação do "turn-over" proteico da GS.

As plantas sujeitas a secura e a NaCl 250 mM apresentaram respostas fisiológicas distintas mas que contiveram aspectos em comum. Estes aspectos consistiram na diminuição da estatura, acompanhada pela diminuição do número de folhas e do teor proteico solúvel nestas. O teor de prolina aumentou em todos os órgãos analisados das plantas tratadas, enquanto que

o teor de proteínas solúveis aumentou nas raízes, tendo diminuído nas folhas. Na situação de secura ainda foi possível verificar um decréscimo no número e tamanho dos tubérculos formados e um aumento da acumulação de prolina nestes órgãos.

A prolina acumulada em resposta a estas condições de stresse abiótico permitirá manter o balanço osmótico de um modo compatível com o metabolismo celular, pois promoverá interacções com proteínas que resultam na exclusão dos iões em excesso da camada de hidratação destas, mantendo a sua integridade e actividade. Simultaneamente, a prolina baixará o potencial hídrico das células de modo a promover a entrada de água para a planta. Este aminoácido também será responsável pelo aprisionamento dos radicais hidroxilo libertados do metabolismo das plantas, evitando que este exerça danos na integridade celular e proteica.

O metabolismo proteico dos diferentes órgãos analisados diferiu com o tipo de tratamento aplicado, visto terem sido observados perfis electroforéticos diferentes por SDS-PAGE para um mesmo órgão. No entanto, um padrão comum na acumulação qualitativa e quantitativa dos polipeptídeos nos diferentes órgãos estudados consistiu num aumento de acumulação destes numa de massa molecular compreendida entre 15 e 20 kDa. Estes polipeptídeos poderão estar relacionados com produtos envolvidos em processos metabólicos desde a acumulação de solutos compatíveis e a manutenção da homeostasia iónica até à reparação e defesa celular, como por exemplo as HSPs, as proteínas *LEA* e as enzimas do sistema enzimático antioxidante.

O aumento do teor em proteínas solúveis nas raízes e tubérculos poderá reflectir o aumento da degradação proteica ocorrida nas folhas e estará relacionado com a produção de novos tecidos e, no caso dos tubérculos, com a formação de substâncias de reserva.

A expressão da GS em resposta à condição de 250 mM NaCl consistiu na diminuição dos teores de transcritos e polipeptídeos da GS2 nas folhas. Este fenómeno não só foi devido à diminuição da expressão do gene que codifica esta isoforma assim como à destruição dos cloroplastos onde esta se localizava. A manutenção dos níveis dos polipeptídeos da GS1 deveu-se ao aumento da expressão do gene relacionado com o clone T5F8.1A. A sua elevada homologia e a sobreposição do seu padrão de expressão com a forma *gln 1-5* de tabaco (22) sugere que esta será a GS1 responsável pelo aumento dos teores de prolina na planta.

A detecção de transcritos relacionados com o clone C1A1A nas raízes das plantas sujeitas a salinidade é uma forte indicação que esta condição ambiental induziu a sua expressão *de novo*, uma vez que estes não foram detectados anteriormente pelas técnicas de RT-PCR e "Northern blotting". O aumento de expressão dos genes relacionados com a GS1 resultou no aumento do teor desta isoforma nas raízes expostas à salinidade. Este aumento de acumulação

da GS1 nas raízes estará envolvido com a produção de precursores azotados a serem utilizados na produção de defesas contra a salinidade, uma vez que estas correspondem ao primeiro órgão a entrar em contacto com a condição ambiental a que as plantas estão expostas.

A secura exerceu um efeito semelhante no padrão de expressão da GS2 ao nível das folhas, na medida em que ocorreu diminuição dos teores de transcritos e polipeptídeos desta isoforma nestes órgãos. Os níveis de GS1 mantiveram-se constantes mas não devido ao aumento ou manutenção da expressão dos genes da GS1. Possivelmente terão decorrido fenómenos conducentes à manutenção da integridade das isoenzimas ou ao aumento da estabilidade dos mRNAs com eles relacionados.

O teor da GS1 diminuiu nas raízes expostas à secura devido ao decréscimo da transcrição do gene relacionado com o clone T5F8.1A, não tendo sido suficiente para manter constantes os níveis da GS1 o aumento da expressão do gene relacionado com a outra forma da GS1. A activação da expressão *de novo* do gene relacionado com o clone C1A1A nas raízes expostas às situações de stresse impostas é forte indicação de que esta isoforma desempenha um papel fundamental na manutenção do metabolismo azotado nestes órgãos.

O pequeno aumento de acumulação de transcritos relacionados com o clone T5F8.1A não foi suficiente para compensar a diminuição do teor de GS1 nos tubérculos em crescimento, o qual se deveu essencialmente à diminuição do teor de mRNAs relacionados com o clone C1A1A. O padrão da expressão do primeiro gene poderá estar de algum modo envolvido com a síntese local de prolina. A diminuição da expressão do segundo clone poderá ser reflexo de uma taxa metabólica menos elevada a qual se traduziu em tubérculos mais pequenos.

A determinação da influência dos vários factores possíveis de interferir com a expressão da família de genes da GS em batateira, nomeadamente a razão C/N, os níveis de NO_3^- e de NH_4^+ e o envolvimento dos reguladores de crescimento nos vários órgãos da planta poderão, no futuro, contribuir para uma melhor compreensão da resposta do metabolismo do azoto a estas condições adversas.

Algumas respostas das folhas às condições de menor concentração de NaCl (100 e 200 mM) foram semelhantes às obtidas com a exposição a concentrações mais elevadas. Na salinidade o teor proteico diminuiu e houve aumento da acumulação de polipeptídeos de massa molecular reduzida, os quais desempenharão funções de defesa e reparação das células, como descrito anteriormente. A ausência da expressão *de novo* de alguns polipeptídeos traduz uma resposta metabólica diferente às condições utilizadas neste ensaio por parte destes órgãos quando comparadas com o ensaio anterior.

Relativamente à expressão da GS nas folhas também foram observadas semelhanças com o estudo anterior. A diminuição dos teores de polipeptídeos e mRNAs relacionados com o clone plastidial e o aumento da acumulação de mRNAs relacionados com o clone T5F8.1A foram respostas comuns. A expressão do outro gene que codifica a GS1 não foi afectada pelas condições de salinidade usadas, diferindo este aspecto do ensaio anterior. O aumento dos teores de GS1 em resposta às condições de salinidade deveram-se essencialmente à forma relacionada com o cDNA T5F8.1A. Os polipeptídeos da GS1 relacionados com o clone C1A1A parecem apresentar uma regulação muito fina, pelo que o estudo das sequências promotoras dos genes que codificam a GS(1) na batateira conduzirá a uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à expressão destes genes perante as diferentes condições de desenvolvimento e/ou ambientais.

Nos tubérculos em crescimento ocorreu um aumento do teor proteico que em parte se deveu ao incremento de patatina. A GS1 descreveu um padrão de acumulação semelhante ao das folhas, o qual se deveu ao aumento de expressão de ambos os genes que a codificam nesta planta, em especial ao relacionado com o cDNA T5F8.1A.

O aumento observado dos níveis de GS1, quer nas folhas quer nos tubérculos, estará relacionado com a síntese de prolina, de percursores azotados para exportação/importação e na reassimilação de amónia resultante do metabolismo celular.

A salinidade conduziu ao aumento do teor proteico solúvel no tecido caloso, tendo sido maior na concentração mais elevada de sal. O tecido caloso respondeu às condições impostas com o aumento da acumulação de alguns polipeptídeos com massa molecular compreendida entre os 15 e os 35 kDa. O teor de prolina também sofreu um aumento paralelamente ao aumento da concentração de NaCl no meio de cultura.

O decréscimo verificado no teor de polipeptídeos da GS2 deveu-se essencialmente à diminuição da expressão do gene que a codifica e foi paralelo ao aumento da salinidade no meio de cultura. O teor de GS1 aumentou com os valores de salinidade usados. Esta isoforma estará envolvida na síntese de prolina e na produção de precursores azotados que poderão ser utilizados na biossíntese de proteínas e de outros compostos azotados envolvidos nos processos de reparação e defesa contra as condições impostas. O aumento da acumulação da GS1 deveu-se essencialmente ao aumento da acumulação dos polipeptídeos relacionados com o clone C1A1A.

A diminuição da expressão do gene que codifica a GS2 e o aumento da expressão do gene relacionado com o clone de cDNA T5F8.1A serão dois mecanismos envolvidos na resposta celular à salinidade.

Em qualquer um dos estudos efectuados com salinidade neste trabalho foi possível verificar que o clone de cDNA T5F8.1A detectou o aumento de acumulação de mRNAs com ele relacionados em todos os órgãos e condições de salinidade analisados. Este será o produto génico responsável pela produção de prolina, um aminoácido cujo teor aumentou em todas as situações analisadas, de um modo semelhante ao já descrito anteriormente (22).

Outra característica comum a todas os ensaios efectuados foi o decréscimo da acumulação de transcritos e polipeptídeos relacionados com a GS2. Este comportamento será devido à toxicidade resultante da acumulação dos iões Na^+ e Cl^- nos plastídios, e sua subsequente degradação, associada à diminuição da expressão do gene que codifica esta subunidade. A diminuição da sua acumulação acarreta uma diminuição bastante pronunciada na actividade da GS foliar, implicando não só um decréscimo da capacidade fotorrespiratória com consequente perda de azoto por este processo na forma de amónia, como também uma diminuição da assimilação primária de amónia e consequentemente uma diminuição no metabolismo de azoto, manifestando-se numa menor produção de biomassa.

A expressão do gene relacionado com o clone C1A1A parece ser dependente do órgão, sendo afectada negativamente nas folhas e induzida pela salinidade nos restantes órgãos analisados. O aumento da sua expressão nestes órgãos estará envolvido com a manutenção do metabolismo do azoto e a incorporação da amónia existente nesses órgãos, independentemente dos processos metabólicos de onde seja proveniente, e a formação de precursores azotados a serem utilizados pela planta nos seus processos metabólicos. A expressão deste gene estará sob a influência de um mecanismo de controlo fino, o qual estará relacionado com o tecido em questão, e por exemplo com a razão C/N ou o balanço hormonal.

Um aspecto que fica por esclarecer no final deste trabalho reside na possibilidade de haver coexpressão dos genes que codificam a GS1 ao nível celular. Este aspecto poderá ser desvendado recorrendo à técnica de hibridação *in situ* acoplada à microscopia óptica ou electrónica e permitirá verificar, a este nível, a possibilidade de ocorrerem enzimas heterólogas da GS1 em batateira. Esta possibilidade revelar-se-á de grande importância para a planta pois permitirá a formação de enzimas com cinéticas diferentes de modo a melhor satisfazer as necessidades metabólicas da célula.

6 - APÊNDICES

1 - Estirpes bacterianas

Foram utilizadas várias estirpes de *E. coli* que apresentam genótipos característicos e condições de cultura próprios que permitiram a sua utilização em ensaios específicos. Na tabela A.1 estão representados os genótipos, condições de cultura e funções das diferentes estirpes usadas. A tabela A.2 refere os marcadores genéticos característicos das estirpes usadas.

Tabela A.1: Genótipos, condições de cultura e funções das estirpes de *E. coli* usadas.

Estirpe	Genótipo	Condições de cultura	Funções
LE392	F⁻,*hsd*R574, (r_k^-,m_k^+), *sup*E44, *sup*F58, *lac*Y1 ou (*lac*IZY)6, *gal*K2, *gal*T22, *met*B1, *trp*R55	LB com ampicilina com agitação a 37 °C L-agar com ampicilina a 37 °C	propagação e rastreio das bibliotecas de cDNA
Y1090	*F'*,D*lac*U169, *pro*A⁺, D(lon), *ara*D139, *str*A, *sup*F, [*trp*C22::Tn*10*(tet^r)], (pMC9), *hsd*R(r_k^-,m_k^+)	LB com ampicilina com agitação a 37 °C L-agar com ampicilina a 37 °C	propagação e rastreio das bibliotecas de cDNA
JM109	*end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*, *hsd*R17, (r_k^- ,m_k^+), *rel*A1, *sup*E44, D(*lac-pro*AB), [F',*tra*D36, *pro*AB, *lac*I^{q}ZDM15]	LB com ampicilina com agitação a 37 °C L-agar com ampicilina a 37 °C	crescimento dos faguemídios pGEMZ11f(+), recombinantes ou não
XL1-Blue	*sup*E44, *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *lac*⁻[F', *pro*AB⁺, *lac*I^q, *lac*ZDM15, Tn*10*(tet^r), *rel*A1	LB com ampicilina com agitação a 37 °C L-agar com ampicilina a 37 °C	crescimento dos faguemídios pSK (+) e pCR-Script SK (+), recombinantes ou não
DH5α	*F' hsd*R17(r_k^-,m_k^+), *rel*A1, *sup*E44, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *end*A1 Δ*lac*U169 (∅80 *lac*ZΔM15)	LB com ampicilina com agitação a 37 °C L-agar com ampicilina a 37 °C	crescimento dos faguemídios pGEMZ11f(+), pSK (+) e pCR-Script SK (+), recombinantes ou não

2 - Meios de cultura utilizados para o crescimento de bactérias e bacteriófagos:

Meio de LB (Luria - Bertani): - é o meio líquido que permite o crescimento de diferentes estirpes bacterianas. Composição:

Bacto-triptona	10 g
bacto-extracto de levedura	5 g
NaCl	5 g

Ajustar o pH para 7,0, completar o volume até 1 L e autoclavar durante 20 minutos a 121 °C.

Meio de LB com ampicilina: - meio líquido de selecção que permite o crescimento de estirpes bacterianas que sejam resistentes à ampicilina. Adiciona-se ampicilina para uma concentração final de 50 μg/mL.

Tabela A.2: Marcadores genéticos característicos das estirpes de *E. coli* usadas.

Símbolo	Descrição	Efeito
ara	mutação no metabolismo da arabinose	bloqueia o metabolismo da arabinose
***end*A1**	mutação na endonuclease	melhora a qualidade do isolamento de DNA plasmídico
***gal*K**	mutação da galactocinase	bloqueia o catabolismo da galactose
***gyr*A96**	mutação da DNA girase	confere resistência ao ácido nalidíxico
***hsd*R(r_k^-,m_k^+)**	restrição menos, modificação positiva	permite a clonagem sem partir o DNA por endonucleases de restrição endógenas. O DNA preparado nesta variedade pode ser usado para transformar estirpes r_k^+ de *E. coli*
***lac*I^q**	produção em excesso do repressor *lac*	provoca níveis elevados da proteína repressora *lac*, inibindo a transcrição pelo promotor *lac*
***lac*Y1**	mutação na β-D-galactosidase	bloqueia a utilização da lactose
***lac*ZDM15**	delecção parcial do gene para a β-D-galactosidase	permite a complementação da actividade da β-galactosidase por α-complementação da sequência dos vectores pGEM-Z. Permite seleccionar colónias recombinantes quando plaqueadas em X-gal
***met*B**	mutação na cistationina g-sintase	necessita de metionina para o crescimento em meio mínimo
***pro*AB**	mutações no metabolismo da prolina	necessita prolina para o crescimento em meio mínimo
D(lon)	delecção da protease *lon*	reduz a proteólise das proteínas de fusão expressas
***rec*A1**	mutação na recombinação	previne a recombinação do DNA introduzido com o do hospedeiro, aumentando a estabilidade do DNA clonado
***rel*A**	fenótipo relaxado	permite a síntese de RNA na ausência da síntese proteica
***sup*E, *sup*F**	mutações de supressor	suprime as mutações amber (UAG)
***thi*1**	mutação no metabolismo da tiamina	necessita de tiamina para o crescimento em meio mínimo
***tra*D36**	mutação no factor de transferência	previne a transferência do epissoma F`
F$^-$		hospedeiro que não contem o epissoma F`
F`		hospedeiro com o epissoma F` com as características referidas
tet^r		resistência à tetraciclina
Tn*10*	transposão que codifica a resistência à tetraciclina	resistência à tetraciclina
pMC9	plasmídio que codifica o *lac*I^q	

Meio de L-agar: - meio sólido que permite o crescimento de bactérias e bacteriófagos, que são visualizados, respectivamente, pela formação de colónias e de placas fágicas. Composição:

Bacto-triptona	10 g
bacto-extracto de levedura	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

Ajustar o pH para 7,0, completar o volume até 1 L e autoclavar durante 20 minutos a 121 °C.

Meio de L-agar com ampicilina: - meio de selecção que permite o crescimento de estirpes bacterianas que sejam resistentes à ampicilina. Depois de autoclavado deixar arrefecer para 50 °C e acrescentar ampicilina para a concentração final de 50 µg/mL de meio.

Meio de L-agar com ampicilina, IPTG e X-gal: - meio de selecção que permite o crescimento de estirpes bacterianas que possuem vectores que conferem resistência à ampicilina. Permite fazer a distinção dos vectores recombinantes dos não recombinantes através, respectivamente, da formação de colónias brancas e de colónias azuis. Depois de autoclavado, arrefecer para 50 °C e adicionar ampicilina para uma concentração final de 50 µg/mL, IPTG para uma concentração final de 25 µg/mL e X-gal para uma concentração final de 25 µg/mL de meio.

Meio M-9 suplementado com Tiamina-HCl: - meio de cultura bacteriano necessário para o crescimento das células da estirpe JM109 de *E. coli* antes de iniciar o processo de preparação de células competentes. Como esta estirpe possui *lacZDM15* e *LacI*^{q} no episoma F`, esta incubação é necessária para seleccionar a presença do episoma e diminuir o surgimento de falsas colónias positivas. Composição:

Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3
NaCl	0,5 g
NH_4Cl	1 g
agar	15 g

Adicionar água destilada até 1 L, ajustar o pH para 7,4 e autoclavar a 121 °C durante 20 minutos. Deixar arrefecer até aos 50 °C e adicionar:

$MgSO_4$ 1M *	2 mL
$CaCl_2$ 1M **	0,1 mL
glucose 20 % (p/v) **	10 ml
Tiamina-HCl 1 M **	1 mL

* - autoclavado; ** - esterilizado por filtração

Top-agarose: - meio sólido que permite o crescimento e individualização das placas fágicas resultantes da infecção bacteriana por parte dos bacteriófagos. Composição (para 100 mL):

Bacto-triptona	1 g
bacto-extracto de levedura	0,5 g
NaCl	0,5 g

Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C. Quando a solução arrefecer para os 50 °C adicionar 1 mL de $MgSO_4$ 1 M.

3 - Tampões e soluções usados:

Ampicilina 50 mg/mL: - solução concentrada. A ampicilina permite fazer a selecção de vectores que contenham o gene que codifica para a resistência à ampicilina. Composição:

ampicilina	500 mg
água destilada	10 mL

Esterilizar por filtração. Dividir por alíquotas de 500 µL e congelar a -20 °C.

IPTG: - (isopropiltio-β-D-galactosídeo) - inactivador do repressor *lac*. Permite a expressão do gene para a β -galactosidase. Solução concentrada (200 mg/mL). Dissolver 2 g de IPTG em 10 ml de água destilada. Esterilizar por filtração e guardar a -20 °C em alíquotas de 500 µL.

X-gal: - (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) - substrato cromogénico usado na selecção azul/branca de vectores não recombinantes e recombinantes (57). Estes vectores produzem colónias azuis quando o gene para a β -galactosidase está intacto e colóni-

as brancas quando o fragmento de inserção se encontra no gene da β -galactosidase, e o IPTG e a X-gal estão presentes. Solução concentrada (25 mg/mL). Composição(57):

X-gal	250 mg
DMSO	10 mL

Dissolver em DMSO (dimetilsulfóxido), esterilizar por filtração e guardar em alíquotas de 500 µL a -20 °C. Proteger da luz.

$MgSO_4$ 1 M: - o sulfato de magnésio é adicionado ao meio de cultura bacteriano no rastreio das bibliotecas de cDNA na concentração final de 10 mM porque facilita a adsorção dos fagos aos receptores das bactérias (173). Composição (solução concentrada):

$MgSO_4 . 7 H_2O$	24,648 g
H_2O	até 100 mL

Maltose 20 % (p/v): - a maltose, adicionada ao meio de cultura bacteriano na concentração final de 0,2 % (p/v), induz a expressão do gene *lam*B que codifica para os receptores da membrana externa de *E. coli* utilizados para o transporte de maltose para dentro da célula. Os bacteriófagos infectam as bactérias por adsorsão a estes receptores (173). Composição:

maltose	20 g
H_2O	até 100 mL

Depois de dissolvida, esteriliza-se por filtração e conserva-se a 4 °C.

10x TAE: - tampão de corrida de electroforese em gel de agarose 10x concentrado. Composição:

Tris-base	400 mM
Acetato de sódio	200 mM
EDTA (pH=8,0)	20 mM

Para preparar o tampão de corrida (1x TAE) faz-se uma diluição de 1/10 em água destilada.

30x SSC: - solução salina concentrada utilizada para fazer o tampão de hibridação "High SDS buffer/Church buffer". Composição:

NaCl	4,5 M
citrato de sódio	0,45 M

Depois de bem dissolvido autoclava-se a 121 °C durante 20 minutos.

20x SSC: - solução salina concentrada. As soluções mais diluídas são usadas para outras aplicações. Composição:

NaCl	3 M
citrato de sódio	0,3 M

Depois de bem dissolvido autoclava-se a 121 °C durante 20 minutos.

Solução de desnaturação: - solução utilizada para desnaturar o DNA quer em membrana de "nylon" quer em gel. Composição:

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Solução de neutralização: - permite neutralizar o gel ou a membrana onde está o ácido nucleico, deixando-o desnaturado. Composição:

Tris-HCl (pH=7,4 a 8,0)	0,5 M
NaCl	1,5 M

Tampão de fago: - tampão onde são eluídas as placas fágicas retiradas do rastreio das bibliotecas, onde são feitas as diluições destas (e das bibliotecas) e onde se encontram os fagos em suspensão nos lisados. Composição:

Tris-HCl pH=7,4	50 mM
NaCl	100 mM
$MgSO_4$	10 mM

Autoclavar a 121 °C durante 20 minutos. Deixar arrefecer e adicionar gelatina para a concentração final de 0,01 % (p/v).

Gelatina 5 % (p/v): - dissolver 2 g em 100 mL de água destilada estéril. Esterilizar por filtração e guardar em alíquotas de 500 µL a -20 °C.

EDTA 0,5 M pH=8,0:

etilenodiaminotetraacetato dissódico	93,05 g
água destilada	até 350 mL

Depois de dissolvido, acertar o pH para 8,0 com NaOH em pastilhas; acertar o volume para 500 mL e autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.

Tris-HCl 1 M:

Dissolver 121,1 g de Tris-base em 800 mL de água destilada. Ajustar o pH desejado pela adição de HCl concentrado.

pH=7,4	70 mL HCl
pH=7,6	60 mL HCl
pH=8,0	42 mL HCl

Completar o volume para 1 L e autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.

TLE + SDS: - tampão de extracção de RNA total. Composição:

Tris-base	200 mM
LiCl	100 mM
EDTA	5 mM

Ajustar o pH para 8,2 com HCl e autoclavar a 121 °C durante 30 minutos.

Depois de arrefecido, adicionar SDS (10% (p/v)) para uma concentração final 1% (p/v).

10x MOPS: - tampão 10x concentrado usado na separação electroforética de RNA em geles de agarose para "Northern blotting". Composição:

ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico (MOPS)	200 mM
Acetato de sódio	50 mM
EDTA	20 mM

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH e autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.

Tampão de amostra: - solução corada para facilitar o carregamento de amostras nos poços dos geles de agarose e a visualização da corrida. Composição:

ficol (400)	15 % (p/v)
azul de bromofenol	0,25 % (p/v)
água	até 3 mL

Preparação do Sephadex: - adicionar devagar o Sephadex a água destilada estéril num frasco de 500 mL. 10 g de Sephadex correspondem a 160 mL de solução. Lavar a resina com água destilada estéril várias vezes para remover o dextrano solúvel. Equilibrar a resina com TE (pH=7,6) e autoclavar a 121 °C durante 20 minutos. Guardar à temperatura ambiente.

10x APS ("ammonium persulfate"): - Persulfato de amónio - a 1 g de persulfato de amónio adicionar água para 10 mL. Guardar a solução a 4 °C até a uma semana.

Tampão STET: - Tampão de extracção usado nos mini-preps de DNA plasmídico. Composição:

sacarose	8 % (p/v)
Triton X-100	0,1 %
EDTA	50 mM
Tris-HCl pH=8,0	50 mM

Esterilizar por filtração. Manter à temperatura ambiente.

CTAB 5% (p/v): - pesar 0,5 g de brometo de hexadeciltrimetilamónio, dissolver em 10 mL de água destilada estéril. Esterilizar por filtração.

TE (pH=8,0): - Composição:

Tris-HCl pH=8,0	10 mM
EDTA pH=8,0	1 mM

TNE: - usado na filtração das sondas. Composição:

Tris-HCl pH=7,5	10 mM
EDTA pH=8,0	1 mM
NaCl	20 mM

10x TBE: - tampão de electroforese para sequenciação de DNA 10x concentrado. Composição:

Tris-base	89 mM
ácido bórico	89 mM
EDTA pH=8,0	2 mM

4 - Vectores:

Vector Lambda gt11 *Sfi-Not*: - é um vector desenhado para a clonagem de cDNA com orientação específica e a expressão de fragmentos de inserção clonados na forma de polipeptídeos fundidos com a β-galactosidase (fig. A.1). O vector foi construído substituindo o local *Eco*RI do lambda gt11 por um fragmento que contem os locais de restrição *Not*I, *Eco*RI e *Sfi*I. A clonagem direccional é conseguida um iniciador-adaptador único com o local de restrição *Not*I a montante da sequência oligo(dT), utilizado para a síntese da primeira cadeia.

Depois da síntese da segunda cadeia e a ligação de 2 adaptadores *Eco*RI, as moléculas das 2 cadeias são digeridas com *Not*I. O cDNA fica pronto a ser ligado aos braços *Eco*RI-*Not*I do vector (fig. A.2). Os fagos recombinantes são reconhecidos pela capacidade de formar placas fágicas sem cor quando plaqueados em hospedeiros *lac*$^-$ na presença de X-gal. Por este método, todas as moléculas de cDNA são clonadas com a mesma orientação relativamente ao gene *lacZ*, aumentando a probabilidade 2 vezes de ocorrer expressão dos fragmentos de inserção de DNA clonados em matriz de leitura como polipeptídeos de fusão. O cDNA pode ser removido do genoma do fago com as enzimas *Sfi*I e *Not*I e clonado no vector pGEM-11Zf, podendo aí ser expresso em matriz de leitura. A capacidade de clonagem para este vector ronda os 0,7 - 2,0 kb. O seu genótipo - *llac5*, *Dshn*dIII12-3, *sr*II3°, c*Its*857, *sr*II4°, *nin5*, *sr*II5°, *sam*100 (173) - implica o uso de estirpes hospedeiras "restrição menos", tais como Y1090 ou LE392.

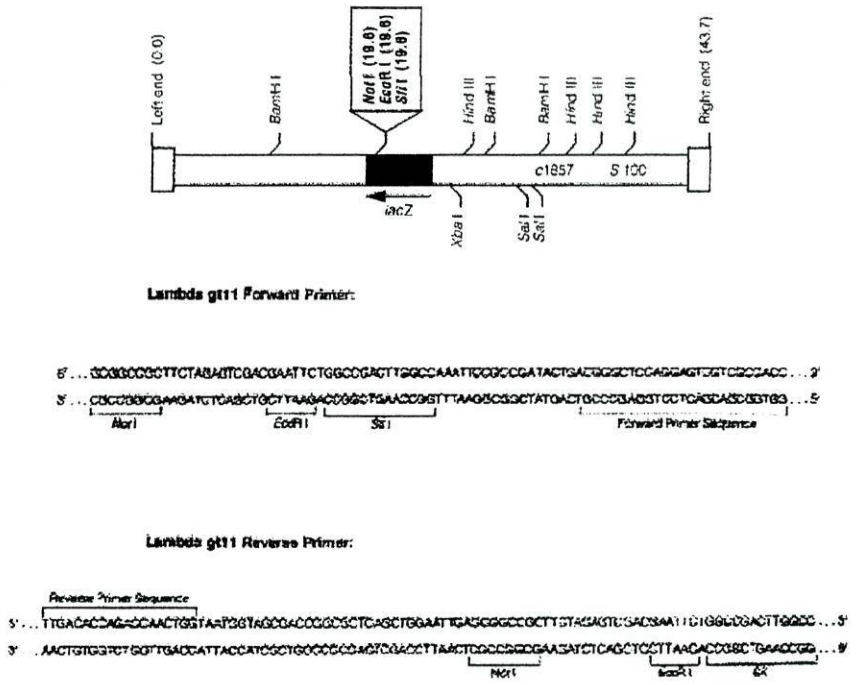


Figura A.1: Diagrama esquemático do vector λgt11 (*SfiI/NotI*).

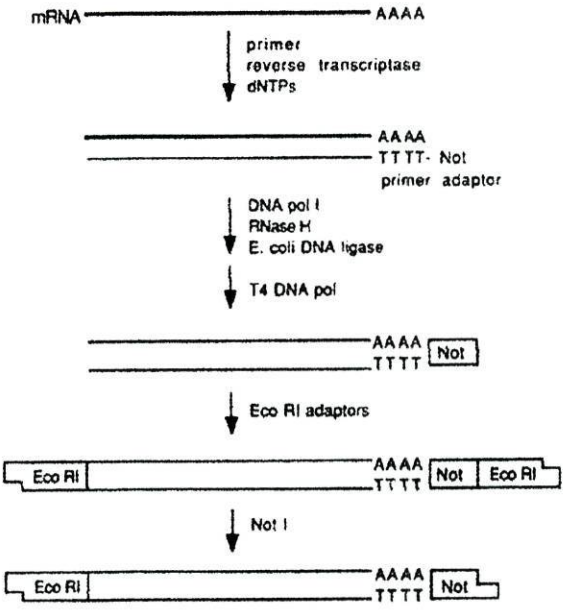


Figura A.2: Preparação dos cDNAs para clonagem no vector λgt11 (*SfiI/NotI*).

Vector lambda ZAPII: - é um vector de inserção, com múltiplos locais de clonagem no interior da sequência de plasmídio, que pode ser excisado *in vivo* e convertido no vector plasmídico pBluescript SK (M13 -). De modo semelhante ao vector lambda gt11 *Sfi-Not*, os cDNAs foram clonados direccionalmente em *Eco*RI-*Xho*I (figura A.3).

O local de clonagem múltipla está localizado na porção amino-terminal do operão *lacZ*,

permitindo, se o cDNA estiver clonado na matriz de leitura, produzir proteínas de fusão. O genótipo deste vector é: *lsbh*Il1°, *chi*A131 (T, *amp*, ColE1, *ori*, *lacZ'*, promotor T3 - local de clonagem múltipla - promotor T7 I), *sr*Il3°, *cIts*857, *sr*Il4°, *nin*5, *sr*Il5° (173).

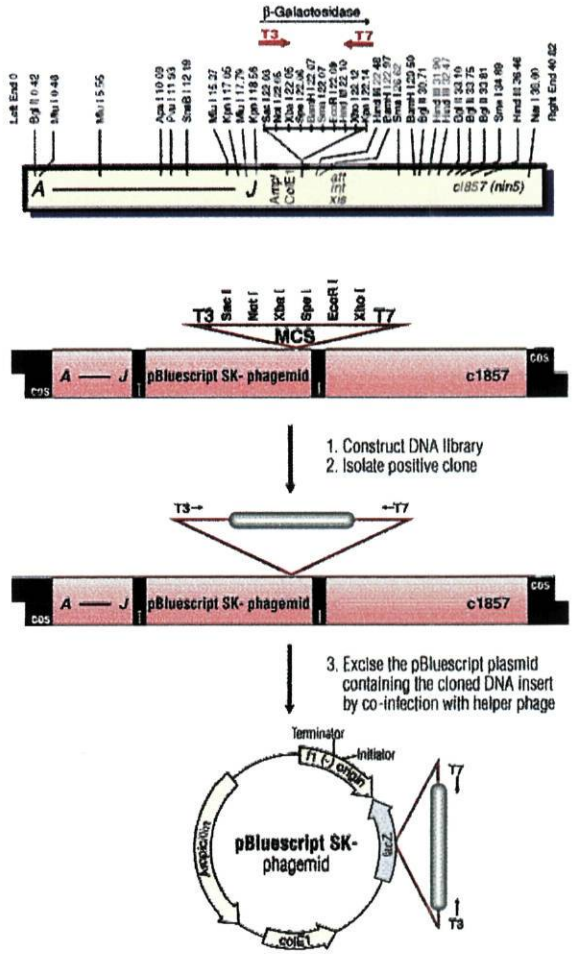


Figura A.4: Mapa estrutural do vector lambda ZAPII.

Tabela 3: características genéticas dos vectores derivados do bacteriófago λ.

	λgt11	**λZAPII**
mutações amber	sam 100	
supressor necessário	*supF*	*supF*
delecções	shn*dIII*2-3, *nin5*	*nin5*
substituições	*lac5*	T *amp*^{r} ColE1*orilacZ* (promotor T3, local de clonagem múltipla, promotor T7) I
inserções		
estado *red/gam* do vector	*red*$^+$ *gam*$^+$	*red*$^+$ *gam*$^+$
estado *red/gam* do recombinante	*red*$^+$ *gam*$^+$	*red*$^+$ *gam*$^+$
local *chi* presente nos recombinantes		sim
propaga-se em hospedeiros *recA*$^-$	sim	sim
selecção Spi		
hospedeiros usados	Y1090/LE392	Y1090

Faguemídio pBluescript II SK (+/-): - é um faguemídio de 2961 pares de bases derivado do pUC19. A designação SK indica que a região de clonagem múltipla está orientada de maneira a que a transcrição do *lacZ* ocorra do local *Sac*I para o local *Kpn*I (figura A.5).

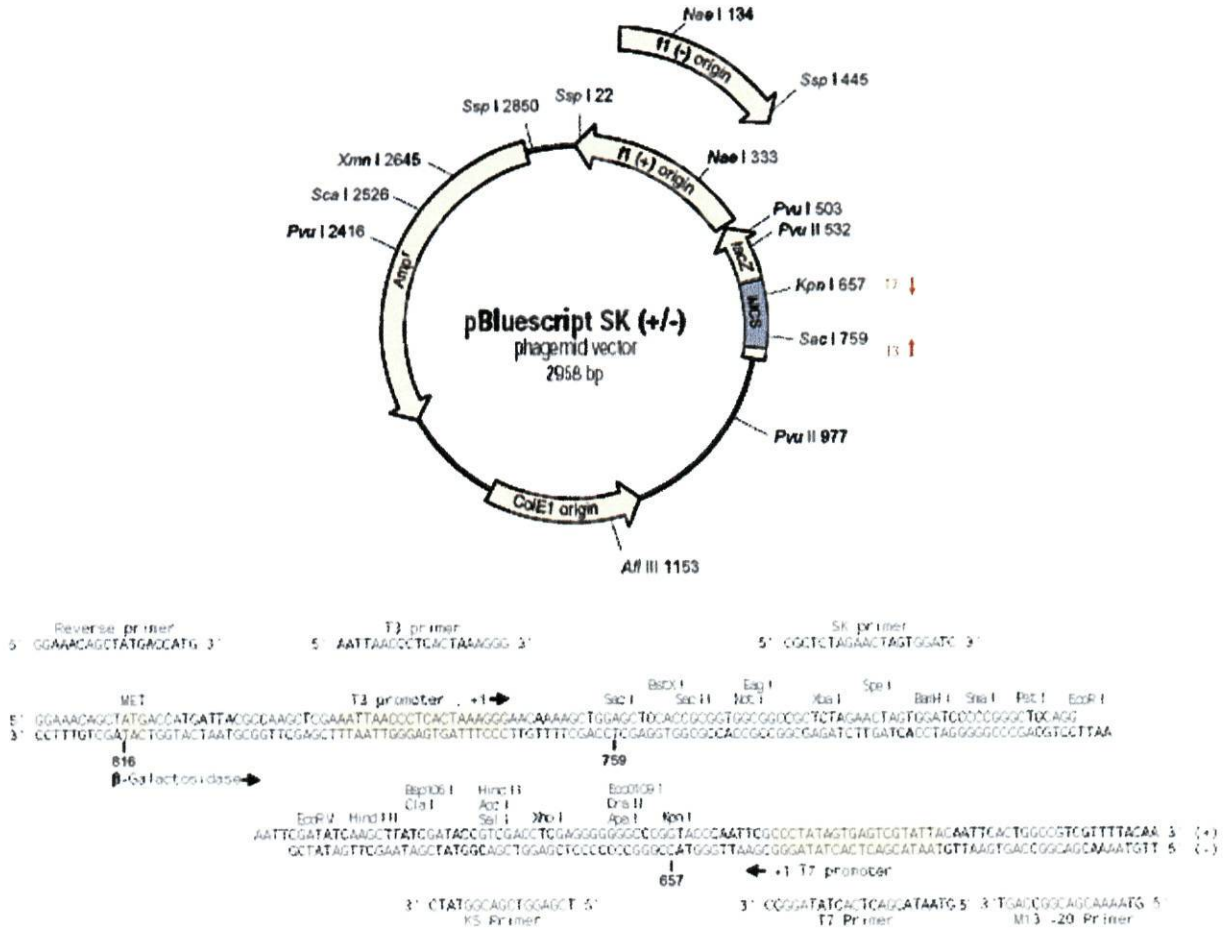


Figura A.5: Mapa circular do vector pSK (+) e sequências das regiões promotoras e de clonagem múltipla.

Vector plasmídio pGEM-11Zf (+): - de 3223 pares de bases de tamanho, este vector pode ser usado para clonagem, como molde para transcrição *in vitro* e para produzir DNA de cadeia simples (ssDNA) (fig. A.6). O plasmídio contem os promotores T7 e SP6 para a RNA polimerase a flanquear o local de clonagem múltipla que se encontra inserido na região codificante para o α-peptídeo da β-galactosidase. A inactivação por inserção no α-peptídeo permite a identificação directa dos clones recombinantes pela cor em placas de IPTG/X-gal. Contem vários locais de restrição, entre os quais os locais *Sfi*I, *Eco*RI e *Not*I, que são convenientes para subclonar a partir do vector λgt11 *Sfi-Not*.

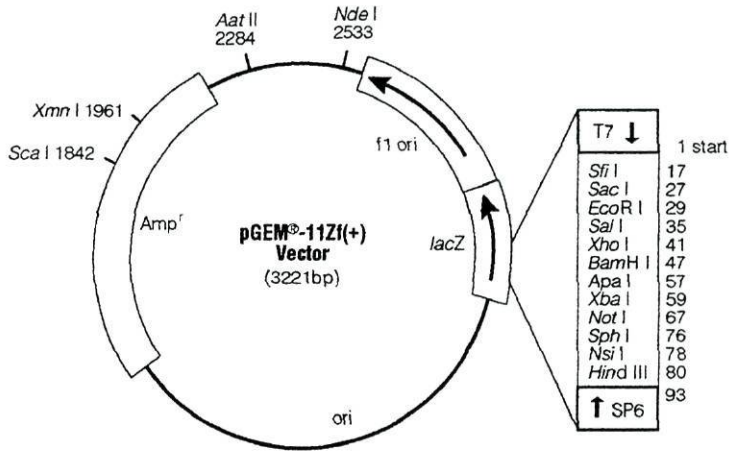


Figura A.6 - Mapa circular do vector pGEM-11Zf (+).

5 - Marcadores de tamanhos moleculares de ácidos nucleicos

A determinação do tamanho dos segmentos de DNA corridos nos geles de agarose foi feita na presença de marcadores de tamanho conhecido, obtidos após digestão de DNA de fago λ com as enzimas de restrição *Hind*III ou *Hind*III e *Eco*RI, simultaneamente. Nas tabelas que se seguem são referidos os fragmentos resultantes das digestões e as respectivas massas moleculares após a aplicação de 1 μg de DNA digerido num gel de agarose.

λHind*III* (1μg)		λHind*III*+Eco*RI* (1μg)	
ng	bp	ng	bp
476,9	23130	437,1	21227
194,1	9416	106,1	5148
135,2	6557	102,5	4973
89,9	4361	88,0	4268
47,9	2322	72,8	3530
41,8	2027	41,8	2027
11,6	564	39,3	1904
2,6	125	32,7	1584
		28,3	1375
		19,5	947
		17,1	831
		11,6	564

7 - BIBLIOGRAFIA

1. Albassam BA. 2001. Effect of nitrate nutrition on growth and nitrogen assimilation of pearl millet exposed to sodium chloride stress. *Journal of Plant Nutrition* 24: 1325-1335

2. Almassy RJ, Janson CA, Hamlin R, Xuong NH, Eisenberg D. 1986. Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* 323: 304-09

3. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-402.

4. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Serdam JG, et al. 1987. Phenol/SDS method for plant RNA preparation. In *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Serdam, et al, pp. 4.3.1-4.3.4

5. Avila C, Muñoz-Chapuli R, Plomion C, Frigerio JM, Cánovas FM. 2000. Two genes encoding distinct cytosolic glutamine synthetases are closely linked in the pine genome. *FEBS Lett* 477: 237-243

6. Avila C, Suarez MF, Gomez-Maldonado J, Canovas FM. 2001. Spatial and temporal expression of two cytosolic glutamine synthetase genes in Scots pine: functional implications on nitrogen metabolism during early stages of conifer development. *Plant J* 25: 93-102.

7. Bauer D, Biehler K, Fock H, Carrayol E, Hirel B, et al. 1997. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress. *Physiologia Plantarum* 99: 241-8

8. Becker TW, Caboche M, Carrayol E, Hirel B. 1992. Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase and light inducibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. *Plant Mol Biol* 19: 367-79.

9. Becker TW, Perrot-Rechenmann C, Suzuki A, Hirel B. 1993. Subcellular and immunocytochemical lozalization of the enzymes involved in ammonia assimilation in mesophyll and bundle-sheath cells of maize leaves. *Planta* 191: 129-136

10. Benavídes MP, Marconi PL, Gallego SM, Comba ME, Tomaro ML. 2000. Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Aust J Plant Physiol* 27: 273-78

11. Bennett M, Cullimore J. 1990. Expression of three plant glutamine synthetase cDNA in *Escherichia coli*. Formation of catalytically active isoenzymes, and complementation of a *glnA* mutant. *Eur J Biochem* 193: 319-24.

12. Bennett MJ, Lightfoot DA, Cullimore JV. 1989. cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase γ polipeptide of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Molecular Biology* 12: 553-65

13. Biochemicals RM. 2000. *DIG Application Manual for filter hybridization*. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH

14. Bonierbale MW, Ganal MW, Tanksley SD. 1990. Applications of restriction fragment length polymorphisms and genetic mapping in potato breeding and molecular genetics. In *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*, ed. ME Vayda, WD Park, pp. 13-24. Wallingford Oxon: CAB International

15. Borgmann K, Sinha P, Frommer WB. 1994. Changes in the two-dimensional protein pattern and in gene expression duriong the sink-to source transition of potato tubers. *Plant Science* 99: 97-108

16. Borsani O, Valpuesta V, Botella MA. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 126: 1024-30

17. Botella JR, Verbelen JP, Valpuesta V. 1988. Immunocytolocalisation of glutamine synthetase in green leaves and cotyledons of *Lycopersicum esculentum*. *Plant Physiol* 88: 943-46

18. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of migrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54

19. Brangeon J, Hirel B, Forchioni A. 1989. Immunogold localization of glutamine synthetase in soybean leaves, roots, and nodules. *Protoplasma* 151: 88-97

20. Brears T, Walker EL, Coruzzi GM. 1991. A promoter sequence involved in cell-specific expression of the pea glutamine synthetase GS3A gene in organs of transgenic tobacco and alfalfa. *Plant J* 1: 235-44.

21. Brown T. 1995. Southern blotting. In *Short protocols in molecular biology*, ed. F Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, et al, pp. 2-28 - 2-32: John Wiley & Sons, Inc

22. Brugière N, Dubois F, Limami AM, Lelandais M, Roux Y, et al. 1999. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell* 11: 1995-2012.

23. Brugière N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B. 2000. Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* 211: 519-27.

24. Buchanan BB, Gruissen W, Jones RL. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists

25. Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C. 1997. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Molecular Biology* 33: 821-834

26. Burton WG. 1989. *The potato*. Harlow: Longman Scientific & Technical

27. Büssis D, Heineke D. 1998. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. I. Photosynthesis and metabolism. *Journal of Experimental Botany* 49: 1349-1360

28. Büssis D, Heineke D. 1998. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *Journal of Experimental Botany* 49: 1361-70

29. Cai X, Wong PP. 1990. Mechanism for the variations in electrophoretic mobility of glutamine synthetase from *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Plant Science* 72: 199-206

30. Cánovas FM, Cantón FR, Gallardo F, García-Gutiérrez A, de Vicente A. 1991. Accumulation of glutamine synthetase during early development of maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings. *Planta* 185: 372-8

31. Cánovas FM, Valpuesta V, Nuñez de Castro I. 1984. Characterization of tomato leaf glutamine synthetase. *Plant Science Letters* 37: 79-85

32. Cantón FR, García-Gutiérrez A, Gallardo F, de Vicente A, Cánovas FM. 1993. Molecular characterization of a cDNA clone encoding glutamine synthetase from a gymnosperm, *Pinus sylvestris*. *Plant Mol Biol* 22: 819-28.

33. Carvalho H, Pereira S, Sunkel C, Salema R. 1992. Detection of a cytosolic glutamine synthetase in leaves of *Nicotiana tabacum* L. by immunocytochemical methods. *Plant Physiol* 100: 1591-94

34. Carvalho H, Sunkel C, Salema R, Cullimore JV. 1997. Heteromeric assembly of the cytosolic glutamine synthetase polypeptides of *Medicago truncatula*: complementation of a *glnA Escherichia coli* mutant with a plant domain-swapped enzyme. *Plant Mol Biol* 35: 623-32.

35. Chen CCS, Plant AL. 1999. Salt-induced protein synthesis in tomato roots: the role of ABA. *J Exp Bot* 50: 677-87

36. Church GM, Gilbert W. 1984. Genomic sequencing. *PNAS USA* 81: 1991-5

37. Clemente MT, Marquez AJ. 1999. Site-directed mutagenesis of Glu-297 from the alpha-polypeptide of *Phaseolus vulgaris* glutamine synthetase alters kinetic and structural properties and confers resistance to L-methionine sulfoximine. *Plant Mol Biol* 40: 835-45.

38. Cock JM, Brock IW, Watson AT, Swarup R, Morby AP, Cullimore JV. 1991. Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol Biol* 17: 761-71.

39. Cock JM, Hemon P, Cullimore JV. 1992. Characterization of the gene encoding the plastid-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris*: regulation of beta-glucuronidase gene fusions in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* 18: 1141-9.

40. Cren M, Hirel B. 1999. Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiol* 40: 1187-93

41. Cullimore JV, Bennett MJ. 1988. The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseouls vulgaris* L. and other legumes. *J. Plant Physiol* 132: 387-393

42. Cullimore JV, Gebhardt C, Saarelainen R, Miflin BJ, Idler KB, Barker RF. 1984. Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: organ-specific expression of a multi-gene family. *J Mol Appl Genet* 2: 589-99

43. Cullimore JV, Miflin BJ. 1984. Immunological studies on glutamine synthetase using antisera raised to the two plant forms of the enzyme from *Phaseolus* root nodules. *J Exp Bot* 35: 581-587

44. Cutter EC. 1992. *Structure and development of the potato plant*. London: Chapman & Hall

45. Darnay BG, Engel M. 1992. An efficient method for pouring sequencing gels. *Biotechniques* 13

46. Datta DB, Cai X, Wong PP, Triplett EW. 1991. Immunocytochemical localization of glutamine synthetase in organs of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 96: 507-12

47. de la Haba P, Cabello P, Maldonado JM. 1992. Glutamine synthetase isoforms appearing in sunflower cotyledons during germination. *Planta* 186: 577-81

48. Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C. 1988. A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *NAR* 16: 9878

49. Downs CC, Borst WM, Hurst PL, Stevenson DG. 1994. Isoforms of glutamine synthetase ia asparagus spears: the cytosolic enzyme increases after harvest. *Plant, Cell and Environment* 17: 1045-52

50. Doyle JF, Doyle JL. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (BRL)* 12: 13-15

51. Dubois F, Brugiere N, Sangwan RS, Hirel B. 1996. Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol Biol* 31: 803-17.

52. Ducreux G, Rossignol L, Rossignol M. 1986. La pomme de terre. *La Recherche* 17: 193-201

53. Edwards JBDM, Delort J, Mallet J. 1991. Oligonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by *in vitro* amplification. *Nuc Ac Res* 19: 5227-32

54. Edwards JW, Coruzzi GM. 1989. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell* 1: 241-8.

55. Edwards JW, Coruzzi GM. 1990. Cell-specific gene expression in plants. *Annu Rev Genet* 24: 275-303

56. Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM. 1990. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3459-63.

57. Edwards MJ, Taylor MF. 1992. Substitution of DMSO for DMF as a solvent for X-Gal. *Biofeedback. Biotechniques*

58. Ericson MC. 1985. Purification and properties of glutamine synthetase from spinach leaves. *Plant Physiol* 79: 923-27

59. Fehr C, Fickova M, Hiemke C, Dahmen N. 1999. Rapid cloning of cDNA ends polymerase chain reaction of G-protein-coupled receptor kinase 6: an improved method to determine 5'- and 3'-cDNA ends. *Brain Res Brain Res Protoc* 3: 242-51

60. Feller U, Fischer A. 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 241-273

61. Fidalgo F. 1995. *Tratamentos de batateiras com agroquímicos. Estudos bioquímicos e ultraestruturais de plantas crescidas no campo.* PhD thesis. Universidade do Porto, Porto

62. Fidalgo F, Santos A, Santos I, Salema R. 2000. *Effect of salt stress on protein and proline levels in potato plants*. Presented at Congresso Nacional de Bioquímica, Póvoa de Varzim, Portugal

63. Finnemann J, Schjoerring JK. 2000. Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant Journal* 24: 171-81.

64. Finnie C, Borch J, Collinge DB. 1999. 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Molecular Biology* 40: 545-554

65. Fischer W-N, André B, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, et al. 1998. Amino acid transport in plants. *Trends in Plant Science* 3: 188-95

66. Forde BG, Cullimore JV. 1989. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology* 6: 247-96

67. Forde BG, Day HM, Turton JF, Shen WJ, Cullimore JV, Oliver JE. 1989. Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell* 1: 391-401.

68. Frohman MA. 1995. Rapid Amplification of cDNA Ends. In *PCR Primer. A laboratory manual*, ed. CW Dieffenbach, GS Dveksler, pp. 381-409. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press

69. Frohman MA, Dush MK, Martin GR. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8998-9002.

70. Gallardo F, Cánovas FM. 1992. A macromolecular inhibitor of glutamine synthetase activity in toamto root extracts. *Phytochemistry* 31: 2267-71

71. Gálvez S, Lancien M, Hodges M. 1999. Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis? *Trends in Plant Science* 4: 484-90

72. Gan S, Amasino RM. 1997. Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* 113: 313-319

73. García-Gutiérrez A, Dubois F, Cantón FR, Gallardo F, Sangwan RS, Cánovas FM. 1998. Two different modes of early development and nitrogen assimilation in gymnosperm seedlings. *The Plant Journal* 13: 187-99

74. Gardé A, Gardé N. 1981. *Culturas hortículas*. Lisboa: Livraria Clássica Editora A. M. Teixeira & C.ª (filhos), Lda. 297-321 pp.

75. Ghosn CR, Gil DW, Spanoyannis AF, Stern ME. 1994. Synthesis of selective nonradioactive probes by unidirectional PCR. *Biochemica* 11: 22-24

76. Gilbert GA, Gadush MV, Wilson C, Madore MA. 1998. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. *J Exp Bot* 49: 107-114

77. Green PD, Wong PP. 1992. Subunit analysis of glutamine synthetase isozymes from root nodules of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* Gray). *Plant Science* 82: 179-186

78. Gupta A, Heinen J, Holaday A, Burke J, Allen R. 1993. Increased Resistance to Oxidative Stress in Transgenic Plants that Overexpress Chloroplastic Cu/Zn Superoxide Dismutase. *PNAS* 90: 1629-1633

79. Guyer D, Patton D, Ward E. 1995. Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 92: 4997-5000

80. Harvey RJ, Darlison MG. 1991. Random-primed cDNA synthesis facilitates the isolation of multiple 5'- cDNA ends by RACE. *Nucleic Acids Res* 19: 4002.

81. Häusler RE, Blackwell RD, Lea PJ, Leegood RC. 1997. Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase. *Planta* 194: 406-17

82. Hawkes JG. 1990. *The potato: evolution, biodiversity and genetic resources*. Washington D. C.: Smithsoniam Institution Press

83. Hawkins H-J, Lips SH. 1997. Cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. as a model system for N and salinity response. Effect of salinity and NO_3^- uptake and PM-ATPase activity. *J Plant Physiol* 150: 103-9

84. Hayakawa T, Kamachi K, Oikawa M, Ojima K, Yamaya T. 1990. Response of glutamine synthetase and glutamate synthase isoforms to nitrogen sources in rice cell cultures. *Plant Cell Physiol* 31: 1071-7

85. Hirel B, Gadal P. 1980. Glutamine synthetase in rice. *Plant Physiol* 66: 619-23

86. Hirel B, Marsolier MC, Hoarau A, Hoarau J, Brangeon J, et al. 1992. Forcing expression of a soybean root glutamine synthetase gene in tobacco leaves induces a native gene encoding cytosolic enzyme. *Plant Mol Biol* 20: 207-18.

87. Hirel B, Weatherley C, Cretin C, Bergounioux C, Gadal P. 1984. Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* 74: 448-450

88. Höpfner M, Ochs G, Wild A. 1990. Glutamine synthetases of green and etiolated leaves of *Sinapis alba*. Evidence of the identity of the respective enzyme proteins. *Planta* 181: 155-61

89. Höpfner M, Ochs G, Wild A. 1991. Detection of a single gene encoding glutamine synthetase in *Sinapis alba* L. *J Plant Physiol* 139: 76-81

90. Höpfner M, Reifferscheid G, Wild A. 1988. Molecular composition of glutamine synthetase of *Sinapis alba* L. *Z Naturforsch* 43: 194-8

91. Hoshida H, Tanaka Y, Hibino T, Hayashi Y, Tanaka A, Takabe T. 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol Biol* 43: 103-11.

92. Hsieh MH, Lam HM, van de Loo FJ, Coruzzi G. 1998. A PII-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13965-70.

93. Ingelbrecht I, Mandelbaum CI, Mirkov TE. 1998. Highly sensitive northern hybridization using a rapid protocol for a downward alkaline blotting of RNA. *BioTechniques* 25: 420-25

94. Instruments HS. 1988-89. Hoefer Scientific Instruments. San Francisco

95. Iyer S, Caplan A. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol* 116: 203-11

96. Jefferies RA, Lawson HM. 1991. A key for the stages of development of potato (*Solanum tuberosum*). *Ann appl Biol* 119: 387-399

97. Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T, Ojima K. 1992. Changes in cytosolic glutamine synthetase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence. *Plant Physiol* 98: 1323-29

98. Kamachi K, Yamaya T, Mae T, Ojima K. 1991. A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol* 96: 411-17

99. Kamachi K, Yamaya T, Mae T, Ojima K. 1992. Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol* 99: 1481-86

100. Kanamori T, Matsumoto H. 1972. Glutamine synthetase from rice plant roots. *Archives of biochemistry and biophysics* 125: 404-412

101. Kawakami N, Watanabe A. 1988. Senescence-specific increase in cytosolic glutamine synthetase and its mRNA in radish cotyledons. *Plant Physiol* 88

102. Khavari-Nejad RA, Mostofi Y. 1998. Effect of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars. *Photosynthetica* 35: 151-154

103. Knight TJ, Langston-Unkefer PJ. 1988. Adenine nucleotides as allosteric effectors of pea seed glutamine synthetase. *J Biol Chem* 263: 11084-9.

104. Kozaki A, Sakamoto A, Takeba G. 1992. The promoter of the gene for plastidic glutamine synthetase (GS2) from rice is developmentally regulated and exhibits substrate-induced expression in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol* 33: 233-38

105. Kozaki A, Sakamoto A, Tanaka K, Takeba G. 1991. The promoter of the gene for glutamine synthetase from rice shows organ-specific and substrate-induced expression in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol* 32: 353-358

106. Kozaki A, Takeba G. 1996. Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* 384: 557-60

107. Kumada Y, Benson DR, Hillemann D, Hosted TJ, Rochefort DA, et al. 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3009-13.

108. Kumar RG, Dubey RS. 1999. Glutamine synthetase isoforms from rice seedlings: effects of stress on enzyme activity and the protective role of osmolytes. *Journal of Plant Physiology* 155: 118-121

109. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

110. Lam HM, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, et al. 1995. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* 7: 887-98.

111. Lam HM, Hsieh MH, Coruzzi G. 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 345-53.

112. Lam HM, Peng SS, Coruzzi GM. 1994. Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 106: 1347-57.

113. Lam H-M, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-93

114. Lara M, Porta H, Padilla J, Folch J, Sánchez F. 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 76: 1019-1023

115. Lawlor DW. 1993. *Photosynthesis. Molecular, physiological and environmental processes*. Essesx: Longman Scientific & Technical

116. Leone A, Costa A, Tucci M, Grillo S. 1994. Adaptation versus shock response to polyethylene glycol-induced low water potential in cultured potato cells. *Physiologia Plantarum* 92: 21-30

117. Levi D. 1992. The response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to salinity: plant growth and tuber yeld in the arid desert of Israel. *Ann appl Biol* 120: 547-55

118. Lewin B. 1994. *Genes V.* New York: Oxford University Press

119. Li MG, Villemur R, Hussey PJ, Silflow CD, Gantt JS, Snustad DP. 1993. Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. *Plant Mol Biol* 23: 401-7.

120. Li PH. 1985. *Potato Physiology*. London: Academic Press, Inc

121. Lightfoot DA, Green NK, Cullimore JV. 1988. The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.:nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Molecular Biology* 11: 191-202

122. Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA. 1996. Characterization of *Vitis vinifera* L. glutamine synthetase and molecular cloning of cDNAs for the cytosolic enzyme. *Plant Mol Biol* 31: 983-92.

123. Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA, Kanellis AK. 1994. Regulation of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in avocado fruit during development and ripening. *Plant Physiol* 106: 217-222

124. Ludwig RA. 1993. *Arabidopsis* chloroplasts dissimilate L-arginine and L-citruline for use as N-source. *Plant Physiol* 101: 429-434

125. Lutts S, Majerus V, Kinet JM. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 105: 450-58

126. Mäck G, Tischner R. 1990. Glutamine synthetase oligomers and isoforms in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* 181: 10-17

127. Marsolier MC, Debrosses G, Hirel B. 1995. Identification of several soybean cytosolic glutamine synthetase transcripts highly or specifically expressed in nodules: expression studies using one of the corresponding genes in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Mol Biol* 27: 1-15.

128. Masclaux C, Valadier M-H, Brugière N, Morot-Gaudry J-F, Hirel B. 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211: 510-518

129. Matos AR, d'Arcy-Lameta A, Franca M, Peters S, Edelman L, et al. 2001. A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Lett* 491: 188-92

130. Mc Cormack DK, Farnden KJF, Boland MJ. 1982. Purification and properties of glutamine synthetase from the plant cytosol fraction of lupin nodules. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 218: 561-571

131. Membranes H. 2000. Technical Tip 158 (R962516). Strategies for reducing background in membrane based nucleic acid detection. : apbiotech

132. Miao GH, Hirel B, Marsolier MC, Ridge RW, Verma DP. 1991. Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Cell* 3: 11-22.

133. Migge A, Carrayol E, Hirel B, Becker TW. 2000. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* 210: 252-60.

134. Migge A, Carrayol E, Hirel B, Lohmann M, Meya G, Becker TW. 1998. Regulation of the subunit composition of plastidic glutamine synthetase of the wild-type and of the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato by blue/UV-A- or by UV-B-light. *Plant Mol Biol* 37: 689-700.

135. Miller JD, Arteca RN, Pell EJ. 1999. Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120: 1015-23.

136. Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M. 2001. Antagonistic effects of abcisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *The Plant Cell* 9: 2243-59

137. Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Hartill J, Morrice N, et al. 1999. Phosphorilation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *The Plant Journal* 18: 1-12

138. Münch S. 1994. Nonradioactive northern blots in 1.5 days and with substantially increased sensitivity through "alkaline blotting". *Biochemica* 3: 30-32

139. Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497

140. Naik PS, Widholm JM. 1993. Comparision of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 273-280

141. Nam HG. 1997. The molecular genetic aspects of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 200-207

142. Nato F, Hirel B, Gadal P. 1984. Chloroplastic glutamine synthetase from tobacco leaves: a glycosilated protein. *FEBS* 175: 443-46

143. Ochs G, Schock G, Trischler M, Kosemund K, Wild A. 1999. Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 39: 395-405.

144. Ochs G, Schock G, Wild A. 1993. Chloroplastic glutamine synthetase from *Brassica napus*. *Plant Physiol* 103: 303-4.

145. O'Farrel PH. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-21

146. Oliveira IC, Coruzzi GM. 1999. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 121: 301-10.

147. O'Neal D, Joy KW. 1973. Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. *Arch Biochem Biophys* 159: 113-22.

148. Ortega JL, Roche D, Sengupta-Gopalan C. 1999. Oxidative turnover of soybean root glutamine synthetase. In vitro and in vivo studies. *Plant Physiol* 119: 1483-96.

149. Ortega JL, Temple SJ, Sengupta-Gopalan C. 2001. Constitutive overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS1) gene in transgenic alfalfa demonstrates that GS1 may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover. *Plant Physiol* 126: 109-21.

150. Palatnik JF, Carrillo N, Valle EM. 1999. The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplast glutamine synthetase. *Plant Physiol* 121: 471-8

151. Panaud O, Magpantay G, McCouch S. 1993. A protocol for non-radioactive DNA labelling and detection in the RFLP analysis of rice and tomato using single-copy probes. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 54-59

152. Park WD. 1993. Regulation and evolution of the patatin genes of potato. In *Control of plant gene expression*, ed. DPS Verma, pp. 393-405. New York: CRC Press, Inc

153. Peat LJ, Tobin AK. 1996. The effect of nitrogen nutrition on the cellular localization of glutamine synthetase isoforms in barley roots. *Plant Physiology* 111: 1109-1117

154. Pereira MSJ. 1998. *Isoformas da glutamina sintetase em Solanum tuberosum L.. Localização da expressão, caracterização bioquímica e molecular e o papel das isoenzimas na eficiência de utilização de azoto em diferentes situações fisiológicas.* PhD thesis. Universidade do Porto, Porto

155. Pereira S, Carvalho H, Sunkel C, Salema R. 1992. Immunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves of *Solanum tuberosum L. Protoplasma* 167: 66-73

156. Pereira S, Pissarra J, Sunkel C, Salema R. 1996. Tissue-specific distribution of glutamine synthetase in potato tubers. *Annals of Botany* 77: 429-32

157. Pérez-García A, Cánovas FM, Gallardo F, Hirel B, de Vicente A. 1995. Differential expression of glutamine synthetase isoforms in tomato detached leaflets infected with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *The American Phytopatological Society* 8: 96-103

158. Pérez-García A, Pereira S, Pissarra J, García Gutiérrez A, Cazorla FM, et al. 1998. Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta* 206: 426-34

159. Pérez-Rodríguez J, Valpuesta V. 1996. Expression of glutamine synthetase genes during natural senescence of tomato leaves. *Physiologia Plantarum* 97: 576-82

160. Peterman TK, Goodman HM. 1991. The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light- regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Mol Gen Genet* 230: 145-54.

161. Pikaard CS, Brusca JS, Hannapel DJ, Park WD. 1987. The two classes of genes for the major potato tuber protein, patatin, are differentially expressed in tubers and roots. *Nucl Acids Res* 15: 1979-1994

162. Pujade-Renaud V, Clement A, Perrot-Rechenmann C, Prevôt J-C, Cherstin H, Jacob, J-L & Guern, J. 1994. Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. *Plant Physiol* 105: 127-32

163. Queirós F, Fidalgo F, Santos I, Salema R. 2001. *Biochemical aspects of a NaCl-tolerant potato cell line selected in vitro*. Presented at XiV Reunión de la sociedad española de fisiologia vegetal y VII congreso Hispano-Luso, Badajoz

164. Quirino BF, Noh Y-S, Himelblau E, Amasino RM. 2000. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* 5: 278-282

165. Ranashighe C, Hobbs AA. 1998. A simple method to obtain the 5' ends of mRNA sequences by direct ligation of cDNA-RNA hybrids to a plasmid vector. : Elsevier Science Ltd

166. Redinbaugh MG, Campbell WH. 1993. Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiology* 101: 1249-1255

167. Roosens NH, Willem R, Li Y, Verbruggen I, Biesemans M, Jacobs M. 1999. Proline metabolism in the wild-type and in a salt-tolerant mutant of *Nicotiana plumbaginifolia* studied by ^{13}C-nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol* 121: 1281-90

168. Sakakibara H, Kawabata S, Hase T, Sugyama T. 1992. Differential effects of nitrate and light on the expression of glutamine synthetases and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Plant Cell Physiology* 33: 1193-98

169. Sakakibara H, Kawabata S, Takahashi H, Hase T, Sugiyama T. 1992. Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol* 33: 49-58

170. Sakakibara H, Shimizu H, Hase T, Yamazaki Y, Takao T, et al. 1996. Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. *J Biol Chem* 271: 29561-8.

171. Sakamoto A, Ogawa M, Masumura T, Shibata D, Takeba G, et al. 1989. Three cDNA sequences coding for glutamine synthetase polypeptides in *Oryza sativa* L. *Plant Mol Biol* 13: 611-4.

172. Sakamoto A, Takeba G, Shibata D, Tanaka K. 1990. Phytochrome-mediated activation of the gene for cytosolic glutamine- synthetase (GS1) during imbibition of photosensitive lettuce seeds. *Plant Mol Biol* 15: 317-23.

173. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Springer Harbor Laboratory Press

174. Santos A, Fidalgo F, Santos I, Salema R. 2000. *Changes induced by NaCl in superoxide dismutase and in chloroplast ultrastructure of leaves of potato plants.* Presented at Congresso Nacional de Bioquímica, Póvoa de Varzim

175. Santos I, Salema R. 1992. Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchöe lateritia* Engl. *Plant Science* 84: 142-152

176. Schramm G, Bruchhaus I, Roeder T. 2000. A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic Acids Research* 28: e96

177. Shannon MC, Grieve CM. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae* 79: 5-38

178. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stresses signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 217-23

179. Silveira JAG, Melo ARB, Viegas RA, Oliveira JTA. 2001. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Environmental and Experimental Botany* 46: 171-179

180. Smith O. 1976. *Potatoes. Production, storing, processing.* Connecticut: Avi Publ

181. Soussi M, Ocaña A, Lluch C. 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *J Exp Bot* 49: 1329-1337

182. Stanford AC, Larsen K, Barker DG, Cullimore JV. 1993. Differential expression within the glutamine synthetase gene family of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 103: 73-81.

183. Stewart CR, Hanson AD. 1980. Proline accumulation as a metabolic response to water stress. In *Adaptation of plants to water and high temperature stress*, ed. NC Turner, PJ Kramer, pp. 173-89. New York: John Wiley and Sons

184. Stieger PA, Feller U. 1997. Requirements for the light-stimulated degradation of stromal proteins in isolated pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *J Exp Bot* 48: 1639-45

185. Stryer L. 1996. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A.

186. Sugiarto B, Sugiyama T. 1992. Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phospho*enol*pyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. *Plant Physiology* 98: 1403-08

187. Sukanya R, Li MG, Snustad DP. 1994. Root- and shoot-specific responses of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonium. *Plant Mol Biol* 26: 1935-46.

188. Ta CT. 1991. Nitrogen metabolism in the stalk tissue of maize. *Plant Physiology* 97: 1375-1380

189. Taiz L, Zeiger E. 1998. *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer Associates

190. Teixeira AJG. 1997. *Isolamento e caracterização de cDNAs da glutamina sintetase em Solanum tuberosum: a isoforma cloroplastidial.* MSc thesis. Universidade de Lisboa; Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa

191. Teixeira J, Queiros F, Fidalgo F, Pereira S, Salema R. 2001. *Effect of salinity on glutamine synthetase (GS) polypeptide accumulation and on proline and protein levels in potato callus tissue.* Presented at 6th International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation. From the field to the genome. 4th FOHS biostress symposium., Reims, France

192. Temple SJ, Bagga S, Sengupta-Gopalan C. 1998. Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant Mol Biol* 37: 535-47.

193. Temple SJ, Vance CP, Gantt JS. 1998. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends in Plant Science* 3: 51-6

194. Terce-Laforgue T, Carrayol E, Cren M, Desbrosses G, Hecht V, Hirel B. 1999. A strong constitutive positive element is essential for the ammonium- regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase. *Plant Mol Biol* 39: 551-64.

195. Tingey S, Coruzzi GM. 1987. Glutamine synthetase of *Nicotiana plumbaginifolia.* Cloning and *in vivo* expression. *Plant Physiol* 84: 366-373

196. Tingey SV, Tsai FY, Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM. 1988. Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed in vivo. *J Biol Chem* 263: 9651-7.

197. Tingey SV, Walker EL, Coruzzi GM. 1987. Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *Embo J* 6: 1-9.

198. Tjaden G, Edwards JW, Coruzzi GM. 1995. *cis* elements and *trans*-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Physiol* 108: 1109-17.

199. Van Der Mescht A, De Rounde JA, Van Der Merwe T, Rossouw FT. 1998. Changes in free proline concentrations and polyamine levels in potato leaves during drought stress. *South African Journal of Science* 94: 347-50

200. Vázquez-Flota F, Quiroz J, Scorer KN, Loyola-Vargas VM. 1989. Effect of the auxin/cytokinin ration on the enzymes of nitrogen metabolism in *Canavalina ensiformes* L. tissue cultures. *J. Plant Physiol* 135: 57-62

201. Verbruggen N, Hua XJ, May M, Van Montagu M. 1996. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *PNAS USA* 103: 771-81

202. Walker EL, Coruzzi GM. 1989. Developmentally regulated expression of the gene family of cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Physiol* 91: 702-8

203. Wallsgrove RM, Turmer JC, Hall NP, Kendall AC, Bright SW. 1987. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase. Biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol* 83: 155-8

204. Watanabe A, Hamada K, Yokoi H. 1994. Biphasic and differential expression of cytosolic glutamine synthetase genes of radish during seed germination and senescence of cotyledons. *Plant Mol Biol* 26: 1807-17.

205. Winicov I. 1993. Enhanced gene expression in salt tolerance of alfalfa cell lines and regenerated plants. In *Control of plant gene expression*, ed. DPS Verma, pp. 301-10. New York: CRC Press

206. Woodall J, Boxall JG, Forde BG, Pearson J. 1996. Changing prespectives in plant nitrogen metabolism: the central role of glutamine synthetase. *Science Progress* 79: 1-26

207. Yamaya T, Hayakawa T, Tanasawa K, Kamachi K, T M, Ojima K. 1992. Tissue distribution of glutamate synthase amd glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol* 100: 1427-1432

208. Yeo A. 1998. Molecular biology of salt toleance in the context of whole-plant physiology. *J Exp Bot* 49: 915-29

209. Yu J, Woo KC. 1988. Glutamine transport and the role of the glutamine translocator in chloroplasts. *Plant Physiol* 88: 1048-54

210. Yu J, Woo KC. 1991. Correlation between the development of photorespiration and the change in activities of NH3 assimilation enzymes in greening oat leaves. *Aust J Plant Physiol* 18: 583-8

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