

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 08/04/2024.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus Botucatu

**Avaliação funcional das proteínas desacopladoras mitocondriais
em *Arabidopsis thaliana* utilizando mutantes de inserção**

Rômulo Pedro Macêdo Lima

Botucatu – SP

Março 2022

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus Botucatu

**Avaliação funcional das proteínas desacopladoras mitocondriais
em *Arabidopsis thaliana* utilizando mutantes de inserção**

Rômulo Pedro Macêdo Lima

Orientador/Supervisor: Dr. Ivan de Godoy Maia

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Genética.

Botucatu – SP

Março 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lima, Rômulo Pedro Macêdo.

Avaliação funcional das proteínas desacopladoras mitocondriais em *Arabidopsis thaliana* utilizando mutantes de inserção / Rômulo Pedro Macêdo Lima. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Ivan de Godoy Maia
Capes: 20203004

1. Mutagênese insercional. 2. Expressão gênica.
3. Metaboloma. 4. Mitocôndrias. 5. Proteínas de desacoplamento mitocondrial.

Palavras-chave: Duplo-mutante; Expressão gênica; Metaboloma; Mitocôndria; Proteína desacopladora.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE RÔMULO PEDRO MACÊDO LIMA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 08 dias do mês de abril do ano de 2022, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de RÔMULO PEDRO MACÊDO LIMA, intitulada **Avaliação funcional das proteínas desacopladoras mitocondriais em Arabidopsis thaliana utilizando mutantes de inserção**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. IVAN DE GODOY MAIA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. DOUGLAS SILVA DOMINGUES (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biodiversidade / Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP, Prof. Dr. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. JORGE MAURICIO COSTA MONDEGO (Participação Virtual) do(a) Instituto Agrônomo de Campinas, Prof. Dr. CELSO LUIS MARINO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. IVAN DE GODOY MAIA



Agradecimentos

À Deus, por minha vida, a de meus familiares e amigos.

Ao meu orientador, Dr. Ivan de Godoy Maia, pela orientação, confiança, ensinamentos passados e imensurável contribuição neste trabalho.

Aos colegas doutores Luís Fernando Rolim, Pedro Barreto e Douglas Domingues, pelas enormes contribuições e sugestões transmitidas no exame geral de qualificação.

Aos amigos e colegas do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas (Setor Genética), do Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular (BIOGEM), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) e do Centro de Convivência Infantil (CCI) “Pertinho da Mamãe”, por todas as pessoas que passaram por mim e deixaram uma marca de aprendizado, incentivo e carinho aqui na cidade de Botucatu, em especial à Camila Baldin, Priscila Medeiros, Thársis Gabryel, Amanda Tanamachi, Erasmo Oliveira, Alessandra Nunes-Laitz, Cristiane Rosa, Ricardo Manoel, Maiara Cornacini, Marcelo Alcântara, Darlin Zaruma, Valdeir Carvalho, Rafael Mendonça, Carlos Barreira, dona Malvina, Zé, Simone Campos, Talita Aleixo, Rafael Nakajima, Bruna Jerônimo, Prof. Robson Carvalho, Jeferson Souza, Paula Freire, Sarah Cury, Silvana Melo e Vanessa Rafaela.

Aos ex-colegas amigos e professores do Centro de Citricultura (CCSM) pelos anos de aprendizado e convivência, em especial ao Nicholas Vinícius, por todo conhecimento transmitido na parte de RNA-Seq e ciências “ômicas” da vida.

A toda “galera da Bio”, amigos e professores da época de graduação na UESB, em especial ao professor Dr. Antonio Carlos de Oliveira, pelos encontros online durante esta pandemia e também nas idas para a Bahia, com conversas de motivação e descontração, obrigado mesmo por tudo, se hoje estou aqui vocês têm contribuído imensamente para esta formação.

A todos os meus amigos da minha cidade natal (Poções-Bahia) e meus familiares da “Macedônia” e “Rocha Lima”, em especial a Wallas Meira e Lêda Cristina, conterrâneos e amigos queridos que carrego comigo aonde quer que eu vá.

Aos amigos de Vitória da Conquista-Bahia, principalmente os familiares da minha esposa, em especial a minha sogra Eliane e meu sogro Gildásio, minhas cunhadas Elaine e Tamiris, minha sobrinha de coração Maria Fernanda, pelas palavras de incentivo, conforto e confiança, e a Aline (“Né”), por ter vindo com a gente para Botucatu e ter nos ajudado com os cuidados da minha filha Maria Liz logo no início do doutorado.

A minha avó, Lacimi Caires, por todo amor e dedicação comigo, a minha mãe, Vanuza Macêdo, por todo suporte, paciência e amor incondicional transmitidos, e a meu pai (in memoriam), por sempre ter me dado forças e coragem para percorrer os obstáculos da vida.

A minha família incrível que construí desde a Bahia com esta admirável e forte mulher, Jakeline Oliveira, que a cada devaneio e desânimo me fortaleceu com suas palavras de ajuda e força, pelas conversas sobre o meio acadêmico e também sobre genética. Você vai longe!!! A minha filhota linda e que sou completamente apaixonado, Maria Liz, muito obrigado pela ternura, amor e pelo conforto nos momentos mais difíceis. E

a Kiara, nossa filhota felina que me acompanha desde o Mestrado, obrigado pelos inúmeros afagos e conforto durante esta caminhada. Amo vocês!!!

Ao apoio financeiro essencial para a realização desta pesquisa, pela concessão das bolsas de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2018/19021-1. Obrigado!!!

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“Mas tu não deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

Antonie de Saint-Exupéry

Resumo

As proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs) são proteínas especializadas no transporte mitocondrial capazes de dissipar o gradiente eletroquímico de prótons gerados na respiração independente da síntese de ATP. Essas proteínas fazem parte da família de carreadores aniônicos mitocondriais e desempenham um papel fundamental na manutenção da função mitocondrial. Em plantas, a importância das UCPs como componentes da tolerância celular ao estresse oxidativo já foi demonstrada em estudos prévios. Três genes codificando UCP já foram descritos em *Arabidopsis thaliana* (nomeados *AtUCP1-3*), sendo boa parte dos dados funcionais obtidos para a isoforma *AtUCP1*. Portanto, o papel desempenhado pelas demais isoformas é ainda pouco estudado. Diante disso, mutantes de inserção de *Arabidopsis* foram empregados para investigar a existência de redundância funcional entre essas isoformas. Para tal, numa primeira abordagem, duplo-mutantes de inserção para diferentes combinações gênicas (*atucp1/atucp2*, *atucp1/atucp3* e *atucp2/atucp3*) foram obtidos e analisados funcionalmente durante o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Em uma segunda etapa foram empreendidas análises de metabólitos durante a fase vegetativa destes duplo-mutantes. Em paralelo, baseado em dados prévios da primeira abordagem que indicaram fenótipos mais evidentes na fase vegetativa do duplo-mutante *atucp1/atucp3* em relação ao controle selvagem, o perfil global de expressão gênica deste duplo-mutante na fase vegetativa foi determinado usando RNA-Seq. Análises subsequentes de bioinformática com datasets encontrados na literatura foram empreendidas. Os dados obtidos na primeira etapa indicam que as três isoformas parecem atuar de forma complementar em diferentes processos associados ao crescimento e desenvolvimento de *A. thaliana*. As isoformas *AtUCP1* e *AtUCP2* atuam de forma conjunta na manutenção da homeostase e função mitocondrial durante a fase reprodutiva. Por outro lado, as isoformas *AtUCP2* e *AtUCP3* teriam maior relevância funcional na atividade fotossintética, enquanto que a *AtUCP1* atuaria na manutenção do aparato fotossintético. Além disso, as isoformas *AtUCP2* e *AtUCP3* atuam em conjunto na manutenção do equilíbrio redox. Os dados indicam ainda que todas as três isoformas atuam em conjunto para a redução das espécies reativas de oxigênio (ERO) na mitocôndria. Cabe ressaltar que o duplo *knockdown* dos genes *AtUCP1* e *AtUCP3* foi o que promoveu as maiores alterações fenotípicas e de função mitocondrial na fase vegetativa. Curiosamente, uma maior atividade respiratória foi registrada no duplo-mutante *atucp2/atucp3*, o que pode ser justificado pela forte expressão compensatória do gene *AtUCP1* sob condições normais. De maneira similar, uma forte expressão compensatória da isoforma não inativada foi detectada em todas as três combinações de duplo-mutantes crescidos em condições normais ou em presença de estresse (salino e osmótico), o sugerindo uma redundância parcial entre elas. As análises de metabólitos revelaram profundas alterações no teor de alguns metabólitos primários (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e componentes de ácidos nucleicos) e secundários nos três duplo-mutantes. Em consonância, diversos genes diferencialmente expressos associados ao cloroplasto, mitocôndria e à resposta aos estresses abióticos foram detectados no duplo-mutante *atucp1/atucp3*. As análises comparativas de RNA-Seq para validação com o dataset selecionado de *A. thaliana* tipo selvagem reforçam os impactos causados por toda a célula. Em conjunto, os resultados obtidos evidenciaram uma intensa reprogramação transcricional e metabólica em decorrência do duplo *Knockdown* de genes *AtUCP1* and *AtUCP3*. As análises apontaram ainda para a existência de uma redundância funcional parcial entre as três isoformas, que atuam

ora de forma isolada, ora de maneira conjunta na manutenção da homeostase e função mitocondrial durante o crescimento e desenvolvimento de *A. thaliana*. Essas descobertas fornecem novos subsídios para fundamentar o papel desempenhado pelas diferentes isoformas e fornecem *insights* sobre a atuação *in planta* da isoforma AtUCP3 em associação com a AtUCP1.

Palavras-chave: Proteína desacopladora, mitocôndria, duplo-mutante, expressão gênica e metaboloma.

Abstract

Mitochondrial uncoupling proteins (UCP) are specialized proteins involved in mitochondrial transport, which are able to dissipate the proton electrochemical gradient generated by respiration independent of ATP synthesis. These proteins belong to the mitochondrial anionic carrier family and play a key role in the maintenance of the mitochondrial function. In plants, their relevance as components of cell tolerance to oxidative stress has already been shown in previous studies. Three genes encoding UCP have been described in *Arabidopsis thaliana* (named *AtUCP1-3*), with most functional data being obtained for the *AtUCP1* isoform. Therefore, the role played by the other isoforms is still poorly understood. In view of this, we decided to investigate the occurrence of functional redundancy between these isoforms using *Arabidopsis* insertion mutants. For this, in a first approach, double-insertion mutants for different gene combinations (*atucp1/atucp2*, *atucp1/atucp3* and *atucp2/atucp3*) were obtained and functionally analyzed during vegetative and reproductive development. In a second step, metabolome analysis was carried out during the vegetative phase of these double mutants. In parallel, based on previous data from the first approach indicating more evident phenotypes in the vegetative phase of the *atucp1/atucp3* mutant compared with the wild-type (WT) control, the global gene expression profile of this double mutant in the vegetative phase was determined using RNA-Seq. Subsequent bioinformatics analyzes with datasets found in the literature were carried out. The data obtained in the first approach indicate that the three isoforms act in a complementary way in different processes associated with *A. thaliana* growth and development. The concerted action of the *AtUCP1* and *AtUCP2* isoforms seems to be required for maintaining homeostasis and mitochondrial function during the reproductive phase. On the other hand, our data suggest that the *AtUCP2* and *AtUCP3* isoforms have higher functional relevance in the photosynthetic activity, while *AtUCP1* would act in favor of photosynthetic apparatus maintenance. In addition, a concerted action of the *AtUCP2* and *AtUCP3* isoforms seems to be required for maintaining the redox balance. All three isoforms are necessary to reduce reactive oxygen species (ROS) in mitochondria. Of note, the double knockdown of the *AtUCP1* and *AtUCP3* promoted the highest phenotypical changes and alterations in mitochondrial function in the vegetative phase. Interestingly, the *atucp2/atucp3* mutant showed a higher respiratory activity, which can be explained by the strong compensatory expression of *AtUCP1* under normal conditions. Similarly, a strong compensatory expression of the non-inactivated isoform was detected in all three double mutants grown under normal and stressed conditions (saline and osmotic), thus suggesting a partial redundancy between the isoforms. Additionally, the metabolome analysis revealed profound changes in the content of some primary (sugars, amino acids, organic acids and nucleic acid components) and secondary metabolites in all three double mutants. Accordingly, several differentially expressed genes associated with chloroplast, mitochondria and response to abiotic stresses were detected in *atucp1/atucp3* double mutant plants. Comparative analysis of RNA-Seq for validation with the selected dataset of wild-type *A. thaliana* reinforce the impacts caused throughout the cell. Overall, these results indicate that an intense transcriptional and metabolic reprogramming occurs as a consequence of the double knockdown of *AtUCP1* and *AtUCP3* genes. Our data revealed the existence of a partial functional redundancy between the three isoforms, which would act either alone or in a concerted way for the maintenance of homeostasis and mitochondrial function during *A. thaliana* growth and development. These findings provide clues for the functionality of different *AtUCP*

isoforms and give insights for the role played by the AtUCP3 isoform in association with AtUCP1 in the entire plant level.

Keywords: Uncoupling protein, mitochondria, double mutant, gene expression and metabolome.

Avaliação funcional das proteínas desacopladoras mitocondriais em
Arabidopsis thaliana utilizando mutantes de inserção

Rômulo Pedro Macêdo Lima

Orientador: Dr. Ivan de Godoy Maia

Sumário

Introdução geral e justificativa	11
Objetivos	19
Referências bibliográficas	20
Capítulo I: The Double Knockdown of the Mitochondrial Uncoupling Protein Isoforms Reveals Partial Redundant Roles During <i>Arabidopsis thaliana</i> Vegetative and Reproductive Development	23
Capítulo II: Effects of Mitochondrial Disturbances on Transcriptional and Metabolite Profiles of <i>Arabidopsis ucp</i> double mutant plants	60
Considerações Finais	171

Objetivos

Objetivo geral

O presente estudo teve por principal objetivo empreender a caracterização funcional de duplo-mutantes de inserção em diferentes combinações gênicas visando um melhor entendimento do papel funcional das isoformas AtUCP1-3 em arabidopsis.

Objetivos específicos

Na tentativa de elucidar o papel das UCPs no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Empreender a obtenção dos duplo-mutantes *atucp1 atucp2*; *atucp1 atucp3* e *atucp2 atucp3* e avaliar o fenótipo dos mesmos em condições normais e sob estresse;
2. Avaliar as alterações fisiológicas, de estado redox e metabólicas dos referidos duplo-mutantes de inserção;
3. Avaliar o grau de redundância funcional nos duplo-mutantes a partir de alterações no nível de expressão dos genes *AtUCP1-3* em condições normais e sob estresse;
4. Avaliar as alterações transcricionais em duplo-mutantes, selecionados com base nas análises fenotípicas a partir de estágios específicos do desenvolvimento vegetativo em *A. thaliana*, usando a técnica de RNA-Seq e análises de bioinformática;
5. Avaliar o perfil de metabólitos dos duplo-mutantes durante a fase vegetativa.

Referências bibliográficas

- ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; KHOMSI, H.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E. **Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit.** *Plant Physiol.*, v.119, p.1323-1329, 1999.
- ARCURI, M.L.C.; NUNES-LAITZ, A.V.; LIMA, R.P.M.; BARRETO, P.; MARINHO, A.N.; ARRUDA, P.; MAIA, I.G. The Knockdown of Mitochondrial Uncoupling Proteins 1 and 2 (AtUCP1 and 2) in *Arabidopsis thaliana* Impacts Vegetative Development and Fertility. *Plant Cell and Physiol.*, v.00, p.1-15, 2021.
- BARRETO, P.; DAMBIRE, C.; SHARMA, G.; VICENTE, J.; OSBORNE, R.; YASSITEPE, J.; GIBBS, D.J.; MAIA, I.G.; HOLDSWORTH, M.J.; ARRUDA, P. Mitochondrial retrograde signaling through UCP1-mediated inhibition of the plant oxygen-sensing pathway. *Curr. Biol.*, v.32, p.1-9, 2022.
- BARRETO, P.; OKURA, V.; PENA, I.A.; MAIA, R.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P. **Overexpression of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) induces a hypoxic response in *Nicotiana tabacum* leaves.** *J. Exp. Bot.*, v.67, p.301-313, 2015.
- BARRETO, P.; OKURA, V.K.; NESHICH, L.A.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P. **Overexpression of UCP1 in tobacco induces mitochondrial biogenesis and amplifies a broad stress response.** *BMC Plant Biol.*, v.14, p.144-159, 2014.
- BEGCY, K.; MARIANO, E.D.; MATTIELLO, L.; NUNES, A.V.; MAZZAFERA, P.; MAIA, I.G.; MENOSSI M. **An *Arabidopsis* mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants.** *PLOS ONE*, v.6, p.1-10, 2011.
- BORECKÝ, J.; NOGUEIRA, F.T.S.; DE OLIVEIRA, K.A.P.; MAIA, I.G.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. **The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots.** *J. Exp. Bot.*, v.57, p.849-864, 2006.
- BRANDALISE, M.; MAIA, I.G.; BORECKY, J.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. **Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress.** *J. Bioenerg. Biomembr.*, v.35, p.203-209, 2003.
- BUSI, M.V.; GOMEZ-LOBATO, M.E.; RIUS, S.P.; TUROWSKI, V.R.; CASATI, P.; ZABALETA, E.J.; GOMEZ-CASATI, D.F.; ARAYA, A. **Effect of mitochondrial dysfunction on carbon metabolism and gene expression in flower tissues of *Arabidopsis thaliana*.** *Mol. Plant.*, v.4, p.127-43, 2011.
- CHEN, S.; LIU, A.; JI, D.; LIN, X.; LIU, Z.; XIA, X.; LIU, D.; AHAMMED, G.J. **Silencing of tomato mitochondrial uncoupling protein disrupts redox poise and antioxidant enzymes activities balance under oxidative stress.** *J. Plant Biol.*, v.57, p.9-19, 2014.

- CHEN, S.; LIU, A.; ZHANG, S.; LI, C.; CHANG, R.; LIU, D.; AHAMMED, G.J.; LIN, X. **Overexpression of mitochondrial uncoupling protein conferred resistance to heat stress and *Botrytis cinerea* infection in tomato.** *Plant Physiol. Biochem.*, v.73, p.245-253, 2013.
- HARTL, M.; FINKEMEIER, I. **Plant mitochondrial retrograde signaling: posttranslational modifications enter the stage.** *Front. Plant Sci.*, v.3, p.253, 2012.
- HOUTON-CABASSA, C.; MESNEAU, A.; MIROUX, B.; ROUSSAUX, J.; RICQUIER, D.; ZACHOWSKI, A.; MOREAU, F. **Alteration of plant mitochondrial proton conductance by free fatty acids. Uncoupling protein involvement.** *J. Biol. Chem.*, v.277, p.41533-41538, 2002.
- JACOBY, R.P.; LI, L.; HUANG, S.; PONG LEE, C.; MILLAR, A.H.; TAYLOR, N.L. **Mitochondrial composition, function and stress response in plants.** *J. Integr. Plant Biol.*, v.54, p.887-906, 2012.
- KOWALTOWSKI, A.J.; COSTA, A.D.; VERCESI, A.E. **Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain.** *FEBS Letters*, v.425, p.213-216, 1998.
- LAITZ, A.V.N.; ACENCIO, M.L.; LEMKE, N.; RIBOLLA, P.E.M.; MAIA, I.G. **Transcriptome response signatures associated with the overexpression of a mitochondrial uncoupling protein (AtUCP1) in tobacco.** *PLOS ONE*, v.10, p.1-13, 2015.
- MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. **The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen species production in plant cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.96, p.8271-8276, 1999.
- MILLAR, A.H.; WHELAN, J.; SOOLE, K.L.; DAY, D.A. **Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants.** *Ann. Rev. Plant Biol.*, v.62, p.79-104, 2011.
- MOLLER, I.M. **Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH Turnover, and metabolism of reactive oxygen species.** *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v.52, p.561-91, 2001.
- MONNÉ, M.; DADDABBO, L.; GAGNEUL, D.; OBATA, T.; HIELSCHER, B.; PALMIERI, L.; MINIERO, D.V.; FERNIE, A.R.; WEBER, A.P.M.; PALMIERI, F. **Uncoupling proteins 1 and 2 (UCP1 and UCP2) from *Arabidopsis thaliana* are mitochondrial transporters of aspartate, glutamate, and dicarboxylates.** *J. Biol. Chem.*, v.293, n.11, p.4213-4227, 2018.
- NICHOLLS, D.G. **A history of UCP1.** *Biochem. Soc. Trans.*, v.29, p.751-755, 2001.
- NOGUEIRA F.T.; SASSAKI F.T.; MAIA I.G. ***Arabidopsis thaliana* Uncoupling Proteins (AtUCPs): insights into gene expression during development and stress response and epigenetic regulation.** *J. Bioenerg. Biomembr.*, v.43, p.71-79, 2011.
- PALMIERI, L.; PICAULT, N.; ARRIGONI, R.; BESIN, E.; PALMIERI, F.; HODGES, M. **Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial**

dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochem. J.*, v.410, p. 621-629, 2008.

PASTORE, D.; TRONO, D.; LAUS, M.N.; DI FONZO, N.; FLAGELLA, Z. **Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria.** *J. Exp. Botany*, v.58, p.195-210, 2007.

SMITH, A.M.; RATCLIFFE, R.G.; SWEETLOVE, L.J. **Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants.** *J. Biol. Chem.*, v.279, p.51944-51952, 2004.

SWEETLOVE, L.J.; LYTOVCHENKO, A.; MORGAN, M.; NUNES-NESE, A.; TAYLOR, N.L.; BAXTER, C.J.; EICKMEIER, I.; FERNIE, A.R. **Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.103, p.19587-19592, 2006.

VANLERBERGHE, G.C. **Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants.** *Int. J. Mol. Sci.*, v.14, p.6805-6847, 2013.

VERCESI, A.E.; BORECKÝ, J.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. **Plant uncoupling mitochondrial proteins.** *Ann. Rev. Plant Biol.*, v.57, p.383-404, 2006.

VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.P.A.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. **PUMPing plants.** *Nature*, v.375, p.24-25, 1995.

WELCHEN, E.; GARCIA, L.; MANSILLA, N.; GONZALEZ, D. H. **Coordination of plant mitochondrial biogenesis: keeping pace with cellular requirements.** *Frontiers in Plant Science*, v.4, n.551, p.1-12, 2014.

YUN, J.; FINKEL, T. **Mitohormesis.** *Cell metabolism*, v.19, n.6, p.757-766, 2014.

Considerações Finais

Os resultados obtidos a partir da utilização dos duplo-mutantes de inserção gerados no presente trabalho revelaram que a expressão reduzida dos genes alvos provoca profundos impactos (fenótipos alterados, alterações no metabolismo mitocondrial, no balanço redox, nos cloroplastos e por toda a célula) em toda a planta. Estes impactos puderam ser observados durante os estágios de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Os dados gerados no capítulo I forneceram novos *insights* para o melhor entendimento do papel desempenhado pelas três isoformas, indicando uma redundância funcional parcial entre elas. Os dados de RNA-Seq no capítulo II revelam que uma intensa reprogramação transcricional ocorre em decorrência da mutação concomitante dos genes *AtUCP1* e *AtUCP3*. Diversos dos genes desregulados estão associados a vários compartimentos, processos e mecanismos internos por toda a célula, a exemplo de transcritos de genes mitocondriais, de cloroplastos, responsivos a estresses abióticos, bem como aqueles relacionados ao metabolismo de DNA e energético. Em concordância com as análises do transcriptoma de plantas *ucp1 ucp3*, as análises do metaboloma de plantas *atucp* duplamente mutantes revelaram distúrbios tanto no metabolismo primário, com mudanças importantes nas concentrações de aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e componentes de ácidos nucleicos, quanto no secundário, com alterações de metabólitos vinculados às classes dos flavonoides, terpenos e alcaloides. Portanto, um importante ajuste metabólico se faz necessário para compensar a expressão reduzida dos genes *AtUCP1-3*. Os dados apresentados, além de fornecer subsídios importantes para melhor compreender as respectivas funções em plantas das referidas proteínas, poderão ser empregados em aplicações futuras visando a aquisição de tolerância a estresses.