

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ESTUDO DO PAPEL DA TCTP (*Translationally Controlled Tumour
Protein*) NA RESPOSTA AOS ESTRESSES BIÓTICOS E
ABIÓTICOS EM PLANTAS**

MÁRCIO DE CARVALHO

PROF. DR. IVAN DE GODOY MAIA

ORIENTADOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) - Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU - SP

- 2010 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Carvalho, Márcio de.

Estudo do papel da TCTP (Translationally Controlled Tumour Protein) na resposta aos estresses bióticos e abióticos em plantas / Márcio de Carvalho. - Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20203004

1. Genética vegetal. 2. Tomate. 3. Crescimento (Plantas).

Palavras-chave: Estresse abiótico; PepYMV; TCTP; Tomate.

*"Nada em biologia faz
sentido exceto à luz da evolução"*
Theodosius Dobzhansky

Agradecimentos

Aos meus pais, José Militão e Matilde, por tudo que me proporcionaram. As dificuldades e os problemas foram superados e hoje estou aqui, só tenho a agradecer a vocês pelo apoio e ajuda. Quando eu pensava em desistir, suas palavras e seus afagos me completaram e me estimularam. Vocês me auxiliaram a subir esta escada e espero contar com vocês sempre e sempre. Eu amo muito vocês, obrigado.

As minhas irmãs, Márcia, Marcela e Juliana, por estarem ao meu lado, por suas ideias. Sei que posso contar com vocês, sempre.

A minha querida e amada Shelly. Devo a você parte desta conquista, sobretudo seu companheirismo junto com seu amor foram os combustíveis da minha jornada. Obrigado pela paciência, fico muito feliz de ter você ao meu lado. “Te amo muito, muito...”

Aos meus queridos sobrinhos, Nicolly, Eduarda, Carol e João Vitor, “meus pequeninos”, o sorriso e a alegria de vocês é um grande prêmio.

Ao seu Nestor e dona Maria que me acolheram em seus braços, obrigado, assim como a Sheila, o Guto, o Bruno, o Lucas, a Sandra, a Mariana e o Raphinha – um abraço especial do Dindo.

Ao meu orientador, Ivan de Godoy Maia, suas opiniões foram válidas e suas críticas enriqueceram muito a minha vida acadêmica, aprendi muito com você, obrigado.

A Irani Quagio-Grassiotto pela suas idéias que me nortearam nos momentos de dúvidas.

Não poderia esquecer o pessoal do BIOGEM, galera boa e competente, muito obrigado pelas ajudas de bancada: Alessandra; Alessandra Vasconcelos; Carol; Edmárcia; Fábio – Escova; Flávio – Bonsai; Juliana; Rodrigo - Japa; Layra; Marcela; Pit.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Celso: Andréia; Júlio; Juliana; Helena; Leonardo; Suzana; Tânia; Vanusa.

Aos Prof. João Pessoa e Paulo Ribolla pelo espaço cedido ao uso do Tempo Real e o robô, em especial a Carine e Carina - Parasitologia

Ao laboratório de Virologia do Departamento de Defesa Fitossanitária do Lageado, em especial a Prof^a Renate, Mônica e Tatiana, pelo auxílio com os ensaios de infecção viral e ELISA.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse projeto.

Índice

1. Resumo	3
2. Introdução Geral	4
2.1. A proteína TCTP	5
2.2. A TCTP em plantas	9
3. Objetivos	13
4. CAPÍTULO I	14
1. Introdução	14
2. Material e métodos	16
2.1. <i>Indução de estresse abiótico a biótico em tomate visando às análises de expressão relativa da TCTP</i>	16
2.1.1. <i>Indução de estresse biótico</i>	16
2.1.2. <i>Indução de estresse abiótico</i>	17
2.1.3. <i>Análise das amostras inoculadas pelo teste de ELISA indireto</i>	17
2.2. <i>Extração de RNA total e análise da expressão relativa da TCTP por RT-PCR em Tempo Real</i>	18
3. Resultados	23
3.1. <i>Quantificação da expressão relativa da TCTP em resposta ao estresse biótico e abiótico</i>	23
5. CAPÍTULO II	28
1. Introdução	28
2. Material e métodos	28
2.1. <i>Amplificação da região codificadora da TCTP de tomate e construção do cassete de expressão</i>	28

2.1.1. <i>Extração de RNA total e RT-PCR</i>	28
2.1.2. <i>Construção do cassete de expressão contendo a região codificadora da TCTP</i> .	29
2.1.3. <i>Inserção do cassete de expressão 2X35S:TCTP:NOS em vetor binário pBI121 e transformação em agrobactéria</i>	32
2.1.4. <i>Verificação da transformação de A. tumefaciens</i>	33
2.1.5. <i>Sequenciamento do DNA</i>	33
2.2. <i>Transformação genética do tabaco e inoculação viral em plantas transgênicas</i>	35
2.2.1. <i>Transformação de discos de folha</i>	35
2.2.2 <i>Análises moleculares das plantas transformadas</i>	36
2.2.3. <i>Western blot</i>	37
2.2.4. <i>Inoculação viral em plantas transgênicas de tabaco</i>	39
3. Resultados	40
3.1. <i>Amplificação da região codificadora da TCTP por RT-PCR e construção do cassete de expressão</i>	40
3.2. <i>Produção e seleção das plantas transgênicas de tabaco super-expressando a TCTP</i>	43
6. Discussão Geral	50
7. Conclusão e Perspectiva	57
8. Apêndice	58
8.1. <i>Preparação de Células Competentes de Escherichia coli usando Cloreto de Cálcio</i> . 28	
8.2. <i>Transformação de células competentes de E. coli por choque térmico</i>	58
8.3. <i>Minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina</i>	59
8.4. <i>Preparação de células competentes de Agrobacterium tumefaciens</i>	59
9. Referências bibliográficas	28

1. Resumo

O gene que codifica a TCTP (*Translationally Controlled Tumour Protein*) está presente em todos os eucariontes e o seu produto está envolvido em diferentes processos celulares. Embora bem caracterizada em mamíferos, poucos são os trabalhos disponíveis na literatura relacionados à análise da TCTP em plantas. No presente trabalho, a expressão do gene que codifica a TCTP em tomateiros foi analisada em situações de estresse biótico e abiótico. No estresse abiótico, as plantas de tomate foram submetidas a dano mecânico nas folhas, e essas coletadas após 4, 8 e 12 horas. No estresse biótico, duas espécies virais foram inoculadas mecanicamente nas plantas de tomate, o *Cucumber mosaic virus* (CMV) e o *Pepper Yellow Mosaic Virus* (PepYMV), respectivamente, e as folhas sistemicamente inoculadas foram coletadas após 25 dias. Um aumento na expressão da TCTP foi constatado em resposta ao estresse biótico, sendo de 1,3x em relação ao controle não inoculado na infecção pelo CMV, e de 1,4x na infecção pelo PepYMV. No estresse mecânico, o pico de expressão ocorreu após 4 horas com um aumento de 3,4x em relação ao controle não tratado, com posterior redução nos demais tempos. Adicionalmente, plantas transgênicas de tabaco capazes de superexpressar a TCTP de tomate foram geradas a fim de determinar o papel dessa proteína na infecção pelo PepYMV. Quando as linhagens transgênicas geradas foram inoculadas com o PepYMV observou-se, aos 14 dias após a inoculação (DAI), um aumento na concentração viral (1,8x) em relação às plantas de tabaco não transformadas, sendo o mesmo verificado aos 21 DAI (1,6x). Essa diferença, entretanto, não foi mais observada aos 28 DAI. Esses dados confirmam a relação funcional da TCTP com a resposta de defesa das plantas aos estresses bióticos e abióticos.

2. Introdução Geral

O padrão de expressão gênica encontrado em organismos biológicos pode ser alterado em determinadas situações. Este fenômeno pode ser atribuído a fatores abióticos como variação de temperatura e falta de nutrientes, e bióticos como o ataque de bactérias, fungos e vírus. Nestes casos, dependendo do evento envolvido, os genes podem ter sua expressão induzida ou então reprimida.

Nesse contexto, alterações significativas no transcriptoma são observadas em plantas submetidas a estresses bióticos, sendo grande parte delas associadas com a execução de mecanismos de defesa apropriados. As respostas de defesa constituem, portanto, um fenômeno complexo governado por mecanismos específicos de reconhecimento e de sinalização celular que permitem ou não ao patógeno invadir e multiplicar-se na célula hospedeira.

Recentemente, um estudo realizado com tomateiros analisou o padrão de expressão diferencial de genes em plantas infectadas pelo vírus do mosaico do pimentão (*PepYMV* – *Pepper yellow mosaic vírus*) e em plantas sadias (Alfenas, 2006; Alfenas-Zerbini et al, 2009). As plantas infectadas mostraram mudanças no perfil de expressão de vários genes em relação às plantas sadias não infectadas. Nesse caso, 881 genes foram identificados como diferencialmente expressos sendo que 53 deles tiveram sua expressão diferencial confirmada por diferentes metodologias. Tal abordagem revelou a presença de transcritos codificando proteínas de resposta a choque térmico, proteínas envolvidas na resposta de defesa contra ataque de patógenos, com a via ubiquitinação/proteossomo, no metabolismo e na transdução de sinal. Dentre os genes cuja expressão foi altamente induzida em resposta ao ataque viral foi observado um que codifica uma proteína denominada *translationally controlled tumor*

protein, mais comumente conhecida pela sigla TCTP. Essa mudança na expressão do referido gene em tomateiro se mostrou especificamente relacionada com a infecção pelo *PepYMV*.

2.1. A proteína TCTP

A TCTP (ou *translationally controlled tumor protein*) está presente em todos os eucariontes e parte da sua seqüência gênica é altamente conservada entre os diferentes filos. Esta proteína também é conhecida como P23 e Q23, devido ao peso molecular de 23 kDa. Trata-se de uma proteína multifuncional envolvida em diferentes processos celulares, como por exemplo, no crescimento e desenvolvimento celular. Apesar de sua descrita multifuncionalidade, o seu papel molecular ainda não está totalmente definido e, em alguns casos, o seu modo de ação ainda permanece obscuro.

A TCTP foi inicialmente isolada e caracterizada de células tumorais humanas (Gross et al, 1989), e sua denominação se deve ao fato da sua síntese ser controlada a nível traducional. Entretanto, proteínas homólogas a TCTP foram identificadas em outras espécies e, nesse caso, demonstrou-se que o controle não é exclusivamente traducional, podendo acontecer tanto por níveis transcricionais como por estímulo extracelular (Bommer e Thiele, 2004).

A análise das seqüências de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos das TCTPs de diferentes organismos, revelou que, aproximadamente 10% dos aminoácidos presentes nessas proteínas são altamente conservados entre os filos de eucariontes. Dentre as seqüências mais conservadas, entretanto, a homologia pode chegar a 90% de identidade (Sage-Ono et al, 1998). Outros trabalhos demonstram que, ao longo do processo evolutivo, a proteína manteve alguns domínios funcionais específicos, dentre os quais se destacam os domínios para ligação a cálcio, a microtúbulos (tubulina), a proteínas sinalizadoras (quinases) e para ligação com

subunidades da bomba sódio e potássio (Hinojosa-Moya et al, 2008; Bommer e Thiele, 2004; Berkowitz et al, 2008, Jung et al, 2004).

Dependendo do grupo taxonômico, a TCTP pode desempenhar papéis distintos e variáveis. Em animais, essa proteína é responsável pela liberação da histamina em eventos inflamatórios (Mac Donald et al, 2001) e também pelo controle positivo de proliferação de células B (Kang et al, 2001). Além disso, a TCTP está envolvida na diferenciação de alguns tecidos, como em *Amphioxus*, onde a proteína desempenha um papel importante durante o desenvolvimento embrionário, principalmente, na diferenciação da mesoderme (Chen et al, 2007).

A TCTP pode formar complexos protéicos com outras proteínas, mudando a atividade destas, como no caso da bomba de sódio e potássio (também conhecida como Na^+ , K^+ -ATPase) que é responsável pela homeostase iônica e pelo potencial de membrana celular. Em camundongos transgênicos com super-expressão da TCTP, essa proteína induz a hipertensão sistêmica atuando como repressora citoplasmática da Na^+ , K^+ -ATPase, ligando-se ao seu domínio α -1 (Kim et al, 2008). Resultado semelhante foi descrito em cultura de células humanas da linhagem HeLa. Nesse caso constatou-se que, em sua estrutura, a TCTP apresenta dois domínios capazes de se ligar à citada enzima transmembrânica (Jung et al, 2004). Já em peixes submetidos ao estresse osmótico, a TCTP, que está associada e inibindo a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, é recrutada por proteínas envolvidas na resposta primária desse estresse. Assim, o processo osmoregulatório dependente da atividade da bomba sódio/potássio é promovido (Evans e Somero, 2009).

A TCTP pode também se ligar aos microtúbulos, desempenhando papel importante na divisão celular, bem como ao cálcio presente no citoplasma celular (Yarm, 2002). Curiosamente, o seu transcrito pode formar estruturas secundárias de dupla fita capazes de

interagir com alguns componentes celulares. Nesse caso, as estruturas secundárias resultantes podem ativar uma proteína quinase denominada PKR (Bommer et al, 2002), que está envolvida na regulação e diferenciação celular, na resposta a estresses, na apoptose, e no mecanismo de defesa antiviral celular (Jagus, 1999).

Durante a apoptose, mecanismo de morte celular programada, a TCTP pode ser encontrada na mitocôndria, organela importante neste mecanismo, ligando-se a proteínas que apresentam atividade anti-apoptótica, evitando, assim, a morte celular (Liu et al, 2005; Rinnerthaler et al, 2006). O mesmo ocorre no citoplasma, onde a TCTP é responsável pela ligação e sequestro de cálcio, diminuindo a apoptose dependente desse íon (Graidist et al, 2007). Nesse contexto, foi observado que a expressão da TCTP é reprimida pelo estresse de Ca^{2+} que, juntamente com a acumulação de peróxido de hidrogênio, é o principal fator indutor da morte celular programada. Sua participação na manutenção da homeostase de Ca^{2+} foi assim sugerida.

A TCTP também desempenha um papel importante em eventos relacionados a processos de sinalização celular em animais e fungos. Análises da sequência deduzida de aminoácidos da TCTP de *Schizosaccharomyces pombe* demonstraram uma alta similaridade desta com a proteína MSS4/DSS4 de mamíferos (Thaw et al, 2001 e Itzen et al, 2006). Em animais, a MSS4/DSS4 é capaz de se ligar à proteína sinalizadora Rab, e assim regular a sua atividade. A proteína Rab pertencente à super família de proteína Ras GTPase cujos membros são responsáveis por muitos processos celulares relacionados com a diferenciação e proliferação celular. Em *Drosophila*, por exemplo, descobriu-se que a TCTP regula a atividade de Rheb, outro membro da super família Ras GTPase. Verificou-se que o silenciamento gênico da TCTP, usando RNA de interferência, proporciona um crescimento e desenvolvimento reduzido das moscas durante a organogênese (Hsu et al, 2007). Desse modo,

pela sua interação com a Rab, a TCTP pode mediar a atividade das GTPases envolvidas em sinalização.

Em ensaios biológicos realizados em células humanas da linhagem HeLa, demonstrou-se que a TCTP participa da etapa de alongamento da tradução. Neste processo, o fator de alongamento eEF1-alfa (eEF1A) necessita de GTP para recrutar aminoácidos sendo dotado de uma atividade GTPase. A TCTP atua como fator de inibição, não permitindo a troca de GDP por GTP junto ao eEF1A, a qual é mediada por um fator de troca específico denominado eEF1B β (Cans et al, 2003). Segundo os autores, a TCTP possui uma atividade inibidora de dissociação de nucleotídeo guanina, sendo um importante regulador da etapa de alongamento da tradução.

Adicionalmente, tanto a Rheb como a TCTP podem atuar como fatores regulatórios de uma importante via de sinalização conhecida como TOR (sigla de *Target of Rapamycin*) que está envolvida em processos de crescimento celular e metabolismo. Essa via é coordenada pela proteína quinase TOR (Wullschleger et al, 2006).

A via de sinalização TOR é altamente conservada nos eucariotos, podendo ser regulada por fatores externos, como estresse e falta de nutrientes. No ambiente celular, esta via de sinalização é constituída por dois complexos TOR 1 e TOR 2 que são regulados por outras proteínas transdutoras de sinais (Serfontein et al, 2010 e Wullschleger et al, 2006).

Nos parasitas, observou-se que a TCTP, além de regular a proliferação e diferenciação celular (Li, 2001), também pode interagir com a proteína G responsável pela sinalização celular. Acredita-se que a TCTP de alguns parasitas como, por exemplo, *Plasmodium* sp. (Mac Donald et al, 2001) e *Schistosoma mansoni* (Rao et al, 2002), esteja intimamente relacionada com o desenvolvimento das patologias ocasionadas por estes organismos, sendo capaz de provocar lesão inflamatória com infiltração de eosinófilos.

O silenciamento gênico da TCTP pode ocasionar mudanças morfológicas e fisiológicas. Usando RNA de interferência para silenciar a TCTP em *Caenorhabditis elegans*, Sönnichsen et al (2005) detectaram crescimento lento, infertilidade na progênie e letalidade embrionária nos indivíduos onde o gene foi silenciado.

2.2. A TCTP em plantas

Proteínas homólogas a TCTP também foram isoladas em plantas, entretanto, os trabalhos na literatura são escassos e a função dessa proteína nos vegetais não está claramente definida. Verificou-se que em plantas de dia curto do gênero *Pharbitis*, a expressão do gene que codifica a TCTP varia conforme o ritmo circadiano, podendo influenciar o mecanismo de floração. Segundo Ermolayev e colaboradores (2003) esta proteína pode ser responsável pela regulação da homeostase do cálcio em células de soja submetidas a estresse iônico. Em uma análise proteômica em citrus, a TCTP foi identificada como sendo uma das proteínas cuja acumulação é reduzida em frutos do *Tangor murcott* durante a senescência pós-colheita (Lliso et al, 2007). Os autores sugerem que a TCTP é dotada de atividade anti-apoptótica em frutos, a qual é reduzida depois que o fruto é destacado da árvore.

Recentemente, Berkowitz e colaboradores (2008) evidenciaram *in vivo* o papel da TCTP empregando *Arabidopsis thaliana*. Segundo os autores, tanto a superexpressão da proteína como seu silenciamento são capazes de influenciar o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos vegetais. A expressão da proteína foi observada em todos os tecidos, especialmente no meristema e em células em expansão. O silenciamento da expressão da TCTP promoveu o crescimento lento e diferenças morfológicas em folhas e raízes, e deficiência na formação do tubo polínico em relação às plantas com a expressão normal do

gene. Além disso, a sensibilidade a hormônios vegetais como a auxina ficou comprometida. Esses resultados sugerem um papel importante da TCTP na regulação do crescimento vegetal.

Como destacado, a presença dos transcritos da TCTP foi observada em todos tecidos vegetais, entretanto, a presença da proteína pode ser mais abundante em determinados tecidos dependendo da função destes. Em tubérculos de batatas, especialmente na periderme que forma uma barreira contra entrada de patógenos e se desenvolve em locais que sofreram danos mecânicos, a expressão do gene que codifica a TCTP mudou em relação ao tecido subsequente, no caso o parênquima (Barel e Ginzberg, 2008). O mesmo fenômeno biológico também foi relatado na regeneração da parede celular de algodão, onde os transcritos da TCTP foram identificados, evidenciando uma possível relação com a montagem da matriz extracelular (Yang et al, 2008).

A capacidade da proteína TCTP de se ligar a outras proteínas, inicialmente relatada em células animais, também foi evidenciada em plantas. A análise das proteínas envolvidas no processo de transporte via floema em arroz e abóbora demonstrou que a TCTP pode se ligar, e regular, determinadas proteínas presentes nos vasos floemáticos (Aoki et al, 2005). Desse modo, supõe-se que a TCTP é capaz de regular, através da interação com outras proteínas, o movimento seletivo no floema, o que pode ser indicativo do seu envolvimento na regulação do transporte viral via floema.

A TCTP pode ser usada por parasitas para estabelecer a infecção nos hospedeiros, como no caso do nematóide *Meloidogyne incognita*, responsável pela formação de galhas em vegetais. A proteína TCTP secretada pelo parasita é homóloga à do hospedeiro, e promove o surgimento de células gigantes nos hospedeiros que é característica da infecção. Neste caso, portanto, a proteína do parasita mimetiza a TCTP do hospedeiro (Bellafiore et al, 2008).

Ainda com relação ao papel da TCTP na relação parasita-hospedeiro, dois importantes estudos foram realizados empregando *Arabidopsis thaliana*. No primeiro, a análise do proteoma de plantas infectadas por *Pseudomonas syringae* revelou mudanças no perfil de expressão de algumas proteínas do hospedeiro, especialmente na mitocôndria e no cloroplasto. Dentre essas, a TCTP apresentou mudanças em sua quantidade (Jones et al, 2006). Curiosamente, um aumento na abundância da TCTP foi constatado na fração solúvel enquanto que uma diminuição foi verificada na fração mitocondrial. No segundo estudo, mudanças no perfil de expressão da TCTP foram observadas nos estágios iniciais de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Veena et al, 2003).

A expressão da TCTP também foi induzida em plantas de soja submetidas a estresse por alumínio, especialmente em genótipos considerados tolerantes (Ermolyev et al, 2003), e após tratamento de plantas de arroz com um elicitor derivado do fungo *Magnaporthe grisea* (Liao e Wang, 2009). Esses dados fornecem evidências adicionais de sua provável participação na resposta a estresses bióticos e abióticos.

Como observado em outros organismos, a TCTP de plantas também está envolvida em processos relacionados à via de sinalização TOR e à atividade de pequenas GTPases. Análises da sequência deduzida de aminoácidos da TCTP de *Arabidopsis thaliana* revelaram a presença de um sítio conservado de ligação a GTPases, o que sugere um possível papel como mediadora da atividade TOR (Berkowitz et al, 2008). Diversos estudos relacionam a TOR com o crescimento e desenvolvimento vegetal tanto na fase embrionária como em plantas adultas, com a organização da parede celular e em eventos de estresse (Leiber et al, 2010, Deprost et al, 2005 e 2007).

Apesar das mencionadas evidências experimentais associando a TCTP às respostas das plantas aos estresses de origem biótica e abiótica, o seu efetivo papel nesse contexto é ainda

pouco conhecido. A maior parte dessas evidências advém de estudos de análise proteômica ou de transcriptômica que normalmente não envolvem uma análise funcional mais detalhada. Nesse cenário, a interação tomateiro-*PepYMV*, na qual a expressão da TCTP é induzida em resposta a infecção viral, constitui um modelo interessante de estudo para tentar desvendar alguns dos aspectos funcionais dessa proteína na resposta ao estresse biótico.

3. Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho foi o de investigar o papel da TCTP na resposta das plantas aos estresses bióticos e abióticos. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Quantificar a expressão relativa do gene que codifica a TCTP em plantas de tomate inoculadas com diferentes espécies virais ou submetidas a estresses abióticos (Capítulo I);
- Obter plantas transgênicas de tabaco capazes de super expressar a TCTP de tomate a fim de determinar o papel da proteína na infecção pelo *PepYMV* (Capítulo II).

4. CAPÍTULO I

Estudo da expressão relativa do gene que codifica a TCTP em plantas de tomate inoculadas com diferentes espécies virais ou submetidas a estresses abióticos

1. Introdução

Como mencionado anteriormente, Alfenas (2006) observou que a expressão da TCTP é induzida em plantas de tomate infectadas pelo *PepYMV*, sendo tal indução não observada quando a planta é infectada por outros patógenos como fungos e bactérias. O *PepYMV* pertence à família *Potyviridae* que agrupa o gênero *Potyvirus* com aproximadamente 200 espécies virais. Os potyvírus são responsáveis por 25% das infecções virais de importância econômica observadas em plantas (Shukla, 1994). São vírus cosmopolitas encontrados em todas as regiões do globo, e infectam mais de 2.000 espécies de plantas em mais de 550 gêneros de 81 famílias. Coletivamente, os potyvírus causam perdas econômicas superiores às causadas por todos os outros vírus de plantas em conjunto.

Os potyvírus apresentam partículas de estrutura filamentosa de 680-900 nm de comprimento e 10-15 nm de largura. O material genético viral compreende uma molécula de RNA de fita simples de sentido positivo de aproximadamente 10 kb. A extremidade 3' do genoma viral é poliadenilada, e uma proteína de origem viral denominada VPg (*viral protein – genome linked*) está acoplada à extremidade 5'. O genoma viral é revestido por aproximadamente 2000 capsômeros que formam o capsídeo viral, porém sem a presença de um envelope (Urcuqui-Inchima et al, 2001; Riechmann et al, 1992; Peng et al, 1998; Fauquet et al, 2005). O RNA viral tem apenas uma fase aberta de leitura (*open reading frame – ORF*),

cuja tradução origina uma poliproteína com peso molecular entre 340-370 kDa, que por sua vez sofre autoprocessamento dando origem às diferentes proteínas virais necessárias para a replicação viral e infecção do hospedeiro (Maia et al, 1996; Urcuqui-Inchima et al, 2001) .

Embora os efeitos da infecção viral sobre a expressão da TCTP tenham sido evidenciados nas análises de expressão diferencial realizadas por Alfenas (2006) empregando o tomateiro como modelo, o papel específico dessa proteína (ou de seu mRNA) na interação vírus-planta é ainda totalmente desconhecido. Não se sabe, por exemplo, se a indução da expressão da TCTP e sua acumulação na planta hospedeira tende a favorecer o vírus durante o processo infeccioso, ou se a mesma é parte integrante da resposta de defesa do hospedeiro frente à infecção viral.

Como mencionado anteriormente, em mamíferos o transcrito da TCTP forma estruturas secundárias que são capazes de acionar uma proteína quinase (PKR) dependente de RNA dupla fita (dsRNA) relacionada com a ativação da resposta de defesa antiviral mediada pelo interferon (Bommer et al, 2002). Em mais uma evidência da associação da TCTP com a defesa viral, Graidist e colaboradores (2006) verificaram, fazendo uso de uma biblioteca subtrativa, que um gene que codifica uma TCTP em camarão (*Penaeus monodon*) é altamente induzido durante o início da infecção pelo *White spot syndrome virus* (WSSV). Em camarões submetidos a injeção com TCTP recombinante verificou-se uma taxa de sobrevivência de 80-100% e uma baixa acumulação de WSSV se comparado ao controle não tratado (Tonganunt et al, 2008). Em conjunto, esses dados representam um forte indicativo da possível participação dessa proteína (ou de seu transcrito) na resposta antiviral.

Tendo em vista a importância dos potyvírus e a crescente necessidade de se estabelecer estratégias de combate a tais vírus, o conhecimento do papel da TCTP na interação vírus-planta é de suma importância. Nesse contexto, estudos recentes também têm evidenciado a

expressão diferencial da TCTP em resposta a estresses abióticos, sugerindo a sua participação na interconexão da resposta a estresses bióticos e abióticos. Entretanto, tal fato também necessita de maior investigação.

Aqui, num primeiro momento, pretendeu-se investigar a expressão da TCTP em folhas de tomate sistemicamente infectadas pelo *PepYMV* (25 dias), uma vez que Alfenas - Zerbini e colaboradores (2009) investigaram essa expressão somente na fase inicial da infecção viral (folhas inoculadas nos tempos de 0 a 96 h pós-inoculação). Além disso, procurou-se analisar a expressão desse gene em resposta a infecção da planta por uma espécie viral não relacionada ao *PepYMV* (no caso o *CMV*), bem como em resposta a dano mecânico induzido.

2. Material e métodos

2.1. Indução de estresse abiótico a biótico em tomate visando às análises de expressão relativa da TCTP

2.1.1. Indução de estresse biótico

Para a indução do estresse biótico foram usadas plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. *Santa Clara*) com três meses de idade, germinadas em terra e mantida em casa de vegetação com isolamento contra vetores. As plantas foram divididas em três grupos, conforme o tratamento, sendo que em cada grupo foram empregadas quatro plantas. Antes da inoculação, folhas de cada grupo foram coletadas, constituindo o tempo zero da análise. O tratamento *mock* consistiu na inoculação do tampão e do agente abrasivo sem o extrato de planta infectada. Nos outros dois tratamentos, a inoculação foi realizada usando extrato foliar de plantas de tomate infectadas com as espécies virais *Cucumber Mosaic Virus* (*CMV*) e *Pepper Yellow Mosaic Virus* (*PepYMV*), respectivamente, e carborundum (600 mesh) como

abrasivo. Para a obtenção do extrato, folhas de plantas infectadas com *CMV* e *PepYMV*, respectivamente, foram maceradas em tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH7,2) contendo sulfito de sódio a 1 g/L. Em cada caso, foram realizadas duas inoculações, com intervalo de dois dias entre elas.

As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação. Após um período de 25 dias, e confirmação da infecção viral por ELISA, conforme descrito no item 2.1.3, as folhas foram coletadas e estocadas a -80°C.

2.1.2. Indução de estresse abiótico

O estresse abiótico consistiu de dano mecânico das folhas de tomate. Para tal, as bordas das folhas de plantas de tomate adultas (3 meses de idade) (quatro plantas/tratamento) foram danificadas com auxílio de uma pinça. As folhas estressadas foram coletadas nos tempos 4, 8, e 12 horas após a realização da injúria, sendo o controle não tratado (tempo zero) constituído de folhas coleadas antes da realização do estresse. As amostras de folhas das plantas tratadas e correspondentes a cada tempo foram analisadas em conjunto, constituindo-se, desta maneira, um *pool* de folhas/tempo amostral.

2.1.3. Análise das amostras inoculadas pelo teste de ELISA indireto

Para a detecção de *PepYMV* nas plantas de tomate inoculadas foi utilizado um antissoro universal antipotyvirus (Agdia) e ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) indireto. As amostras de folha (0,1g) foram inicialmente maceradas em tampão de extração *Indirect Sample Extraction 1X* (10 mM carbonato de sódio, 30 mM bicarbonato de sódio, 3 mM azida de sódio, 2% Polivinilpirrolidona – PVP, pH 9,6) na proporção 1:10. Adicionou-se então 100 µL desse macerado a cada cavidade da placa de poliestireno, e esta foi incubada por

2 horas a 4°C. Após este período, a placa foi lavada por sete vezes em tampão PBS-T 1X (130 mM cloreto de sódio, 8 mM fosfato de sódio dibásico, 1 mM fosfato de potássio monobásico, 3 mM cloreto de potássio, 0,05% Tween-20, pH 7,4). Em seguida adicionou-se o anti-soro diluído (1:200) em tampão ECI 1X (0,2% albumina de boi, 2% PVP, 3 mM azida de sódio, pH 7,4), sendo a placa incubada por 12 horas a 4°C, com posterior ciclo de sete lavagens em tampão PBS-T (1X). Após as lavagens, o anticorpo secundário conjugado (anti-IgG de rato) diluído (1:200) em tampão ECI (1X) foi adicionado e incubou-se por 2 horas a 4 °C. Um ciclo de sete lavagens em PBS-T (1X) foi novamente realizado. A revelação foi feita utilizando-se p-nitrofenilfosfato em pastilha de 5 mg, a qual foi diluída em 5 mL de tampão específico. A leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Plus *Version* 2.03) usando a absorvância a 405 nm. Foram consideradas infectadas as amostras com o triplo do valor de absorvância da amostra usada como controle negativo (planta sadia).

2.2. Extração de RNA total e análise da expressão relativa da TCTP por RT-PCR em Tempo Real

O RNA total de folhas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. *Santa Clara*) foi extraído com o uso do reagente TRIZOL (Invitrogen) conforme o protocolo do fabricante. As amostras de folha foram maceradas em nitrogênio líquido, e a cerca de 100 mg do material macerado foi adicionado 1 mL do reagente TRIZOL. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados ao tubo. Após homogeneização por 3 minutos e incubação a temperatura ambiente pelo mesmo tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com auxílio de micropipeta, sendo adicionados 500 µL de álcool isopropílico. Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a

12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com etanol a 70%. Após nova centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, o excesso de etanol foi retirado por secagem a vácuo, sendo o sedimento ressuspensionado com água livre de DNases e RNases.

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer, NanoDrop Technologies*) usando absorvância a 260 nm, e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose (1%) corado com brometo de etídio.

Para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com DNase. Para tal, ao RNA total (2 µg) foram adicionados 2 µL de DNase (1u/ µL) (Invitrogen), 2 µL de tampão (10x com MgCl₂) e água DEPC para completar o volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos, sendo a enzima inativada pela adição de 2 µL de EDTA (25mM) e incubação por 10 minutos a 65°C. Para a realização da transcrição reversa, a cada amostra de RNA tratada com DNase adicionou-se 2 µL de oligodT (estoque a 10 mM), 2 µL de dNTP *mix* (dGTP, dCTP, dATP, dTTP – estoque a 10mM) e 3,5 µL de água DEPC. O RNA total foi desnaturado a 65°C por 5 minutos (seguida de incubação em gelo por 1 minuto) sendo então adicionados ao tubo 2 µL de DTT 0,1M, 0,5 µL da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (200u/µL; Invitrogen) e 3 µL de tampão de reação (5x). As amostras foram incubadas a 50°C por 60 minutos e a enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos. O cDNA assim obtido foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer, NanoDrop Technologies*) usando absorvância a 260 nm.

Após a quantificação, as amostras de cDNA foram diluídas para uma concentração final de 35 ng/µL. O kit usado nas reações de PCR em Tempo Real foi o *Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix(2X)* (Fermentas). O volume total da reação por amostra foi de

10 µL, sendo esta realizada em triplicata empregando placas de 96 poços. Para preparar as reações foi usado um robô (COBERT'S - ROBOT). Os componentes da reação estão listados na Tabela 1.

Os normalizadores utilizados como referência nas reações de qPCR foram selecionados a partir de 13 genes candidatos (Tabela 2). O desenho dos *primers* para amplificação da TCTP e dos referidos genes normalizadores foi realizado usando o software *Primer Express 2.0* (APPLIED BIOSYSTEM). As sequências destes *primers*, e respectivas referências bibliográficas, estão disponibilizadas na Tabela 2.

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em um termociclador ótico (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems), com um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos e pareamento a 60°C por 1 minuto. Os dados óticos foram posteriormente analisados no programa *7300 System Software* (Applied Biosystems).

O cálculo para a determinação da expressão gênica foi o do $\Delta\Delta C_t$ (Livak e Schmittgen, 2001), o qual se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal a expressão $QR = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde QR representa o nível de expressão gênica, C_t representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial; ΔC_t se refere à diferença entre o C_t da amostra amplificada para o gene alvo e o C_t da mesma amostra amplificada para o gene referência, e $\Delta\Delta C_t$ representa a diferença entre o ΔC_t da amostra de interesse em determinado tempo e o ΔC_t da amostra de referência. A eficiência da reação foi determinada por meio de diluições seriadas (1:1, 1:5, 1:25 e 1:125). A partir do valor de C_t de cada alíquota, a curva padrão foi elaborada e o *slope* da reta foi determinado. Este valor foi então inserido na seguinte fórmula:

$$11^{(1/slope)}$$

Tabela 1. Componentes da reação de PCR para quantificação da expressão relativa da TCTP.

Reagentes	Quantidade e concentração
<i>SYBR Green/ROX MasterMix</i> (2x)	5 μ L (1X)
<i>Primers – Forward e reverse</i> (10 mM)	0,3 μ L (300 nM)
cDNA (35 ng/ μ L)	1,5 μ L
Água	3,2 μ L

Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Sequências dos <i>Primers</i>
Actina (ACT) ¹	<i>Forward</i> 5' CGG TGA CCA CTT TCC GAT CT 3' <i>Reverse</i> 5' TCC TCA CCG TCA GCC ATT TT 3'
Adenosil-fosforibosil transferase 1 - (APT 1) ¹	<i>F.</i> 5' GAA CAG ACA AGA TTG AGA TGC ATG TA 3' <i>R.</i> 5' CCA CGA GGG CAC GTT CA 3'
Beta tubulina - (TUB) ³	<i>F.</i> 5' TTG GTT TTG CAC CAC TGA CTT 3' <i>R.</i> 5' AAG CTC TGG CAC TGT CAA AGC 3'
Complexo adaptador de clatrina - (CAC) ²	<i>F.</i> 5' CTG GAT TGC GTG TTC GGT TT 3' <i>R.</i> 5' TGT TGT AGC CAC TCT TCT CCC AC 3'
Expressed ²	<i>F.</i> 5' TCA TTA GGT CCA GCG TTC TTAG C 3' <i>R.</i> 5' CCC ACC CTA AGG AAT CTG CAT 3'
Fator de alongamento - (EF) ²	<i>F.</i> 5' TCT GAT CCA TTG TTG GAT GCT GG 3' <i>R.</i> 5' TTC AAA CCC TTC CTC TTG CG 3'
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - (GAPDH) ¹	<i>F.</i> 5' TCA TTA GGT CCA GCG TTC TTAG C 3' <i>R.</i> 5' CCC ACC CTA AGG AAT CTG CAT 3'
Proteína fosfatase 2 A - (PP2A) ³	<i>F.</i> 5' GAG GAT TAG TAT CAT CAT CAT TGT TTT GT 3' <i>R.</i> 5' CTG GCG AAT CTA CGG GAT ATG 3'
Proteína Ribossoma L2 - (RPL2) ³	<i>F.</i> 5' CCC ATC AGG AGC CAA AAA GA 3' <i>R.</i> 5' CCA CCA GCA ACC TGA CCA AT 3'
Proteína da família TIP41 - (TIP41) ²	<i>F.</i> 5' CCC ATC AGG AGC CAA AAA GA 3' <i>R.</i> 5' CCA CCA GCA ACC TGA CCA AT 3'
Proteína ligante TATA - (TBP) ¹	<i>F.</i> 5' GTG ATG TTA AAT TTC CTA TTC GAC TTG A 3' <i>R.</i> 5' GGA AAT AGT TCT GGC TCG TAA CTT G 3'
Ubiquitina - (UBI) ³	<i>F.</i> 5' GAT CAT CAA TGT GTT TTC GCT TTT 3' <i>R.</i> 5' CAC AAA CTG CAT ATT CAT AAA GAT ACC A 3'
18S r RNA - (18S) ²	<i>F.</i> 5' GAT CGG CGG ATG TTG CTT T 3' <i>R.</i> 5' CGG AAC CCA AAA ACT TTG ATT T 3'
qTCTP	<i>F.</i> 5' AGA AGT CGA GAA TGG GGT GC 3' <i>R.</i> 5' TGA ACA ACC CAC TTC CCT TGA 3'

1 – Alfenas-Zerbini et al, 2009; 2 - Expósito-Rodríguez et al, 2008; 3 – Løvdal e Lillo, 2009.

3. Resultados

3.1. Quantificação da expressão relativa da TCTP em resposta ao estresse biótico e abiótico

Com a finalidade de determinar o perfil de expressão do gene que codifica a TCTP nas duas situações de estresse, usou-se a quantificação relativa por meio da técnica de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Para tanto, o RNA total foi extraído das folhas de plantas de tomate submetidas aos diferentes tratamentos em estudo. No primeiro caso, as plantas foram inoculadas com duas espécies virais (*PepYMV* e *CMV*), caracterizando o estresse biótico. No segundo caso, as bordas das folhas foram danificadas com auxílio de pinça caracterizando o estresse abiótico.

Depois de extraído, o RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e sua integridade verificada em gel desnaturante de agarose a 1%. Antes da realização da análise de RT-qPCR, objetivando verificar a qualidade do RNA total extraído, a região codificadora da TCTP foi amplificada por RT-PCR usando *primers* específicos. Usando essa análise qualitativa, verificou-se a amplificação de um produto único de aproximadamente 500 pb em todas as amostras analisadas (Figura 1A e B).

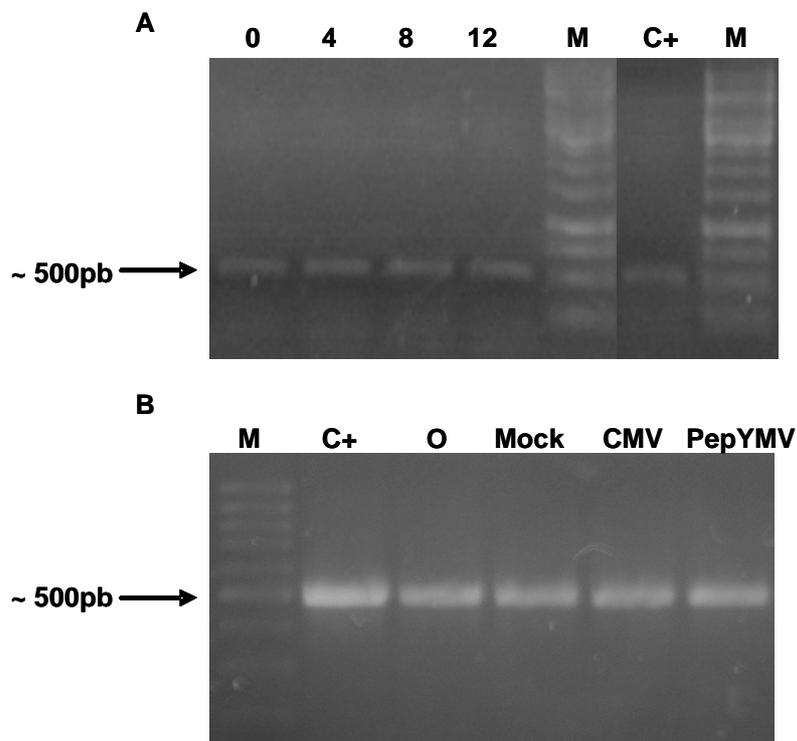


Figura 1 – Confirmação da amplificação da TCTP nas amostras de RNA total extraído das plantas de tomate submetidas a estresse biótico e abiótico. A) amostras das plantas de tomate submetidas ao estresse mecânico nos diferentes tempos – 0, 4, 8, e 12 horas (0, 4, 8, 12); C+ - controle positivo (vetor contendo a região codificadora da TCTP de tomate); (M) - marcador molecular de 1 kb; B) amostras das plantas de tomate submetidas ao estresse biótico. C+ - controle positivo (vetor contendo a região codificadora da TCTP de tomate); (O) – planta não inoculada; mock – planta tratada somente com tampão de inoculação; (CMV) – planta inoculada com *Cucumber Mosaic Vírus*; (PepYMV) - planta inoculada com *Pepper Yellow Mosaic Virus*. (M) - marcador molecular de 100 pb.

Para selecionar os melhores normalizadores para cada tratamento foram testados 13 genes candidatos (Tabela 2), que foram previamente selecionados por serem considerados constitutivos. Esses normalizadores foram validados em reações de RT-qPCR, e os genes *APT1* e *EF* foram aqueles que apresentaram a menor variação de expressão nas condições de

estresse biótico e abiótico, respectivamente (Figura 2). A eficiência da reação considerada para os cálculos de quantificação relativa nos respectivos tratamentos foi igual a 2,0. Com auxílio da curva de dissociação da reação foi possível determinar a ausência de DNA genômico nas amostras usadas para quantificação relativa (Figura 2; painéis E e F).

A análise dos resultados de quantificação da expressão relativa do gene que codifica a TCTP em resposta ao estresse abiótico evidenciou um pico de expressão 4 horas após a realização do dano mecânico nas folhas, sendo este seguido de uma redução na expressão nos intervalos seguintes (8 e 12 h; Figura 3). Nos tempos de 8 e 12 h, a expressão foi semelhante àquela observada no tempo zero (não estressado). Esses resultados indicam que em tomate, a expressão do gene que codifica a TCTP é induzida de forma rápida (4 h) em resposta ao dano mecânico.

Antes da realização das análises de expressão relativa nas amostras submetidas ao estresse biótico, aos 20 dias após a inoculação, a infecção viral nas plantas de tomate foi confirmada por ELISA (dados não mostrados). Uma vez evidenciada a presença dos vírus, aos 25 dias após a inoculação, as folhas sistemicamente infectadas foram coletadas para análise do perfil de expressão da TCTP. Nesse caso foi possível observar que a expressão da TCTP foi induzida pela infecção viral (Figura 3B). Nas plantas infectadas pelo *PepYMV*, o aumento na expressão em relação ao controle não inoculado foi de 1,5x, enquanto que nas plantas infectadas pelo *CMV*, o aumento observado foi de 1,4x. Por outro lado, houve pouca variação na expressão observada no tratamento *mock* em relação ao controle não inoculado.

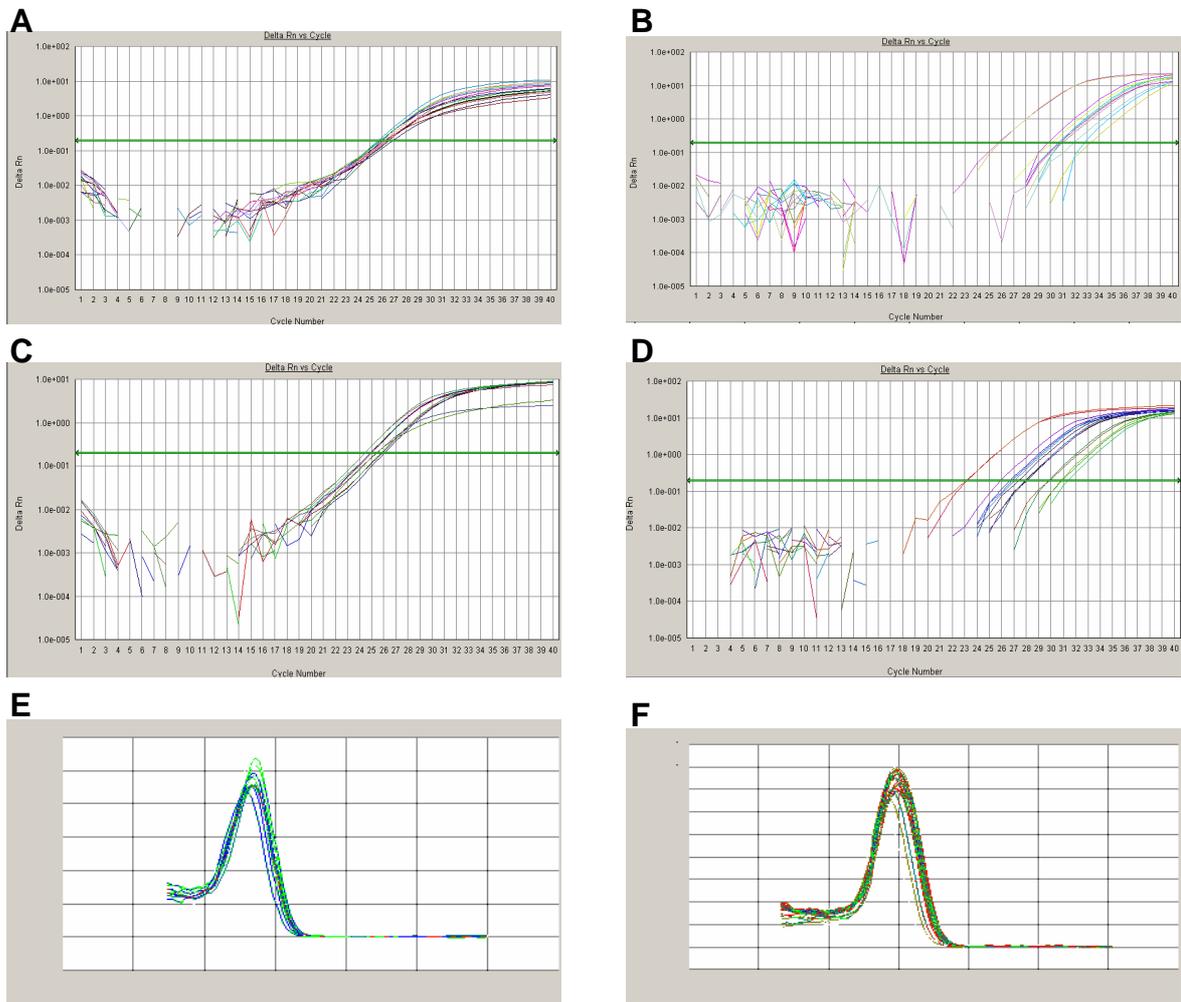


Figura 2 – Análise do perfil de expressão dos genes candidatos a normalizadores e curvas de dissociação correspondentes à amplificação da TCTP. Painéis: A) *APT1*; B) *GAPDH*; (nas duas amplificações foram usadas amostras de estresse biótico); C) *EF*; D) *Actina 1* (nas duas amplificações foram usadas em amostras de estresse abiótico); Curvas de dissociação dos produtos amplificados pelo par de *primers* qTCTP nas amostras submetidas a estresse biótico (E) ou abiótico (F).

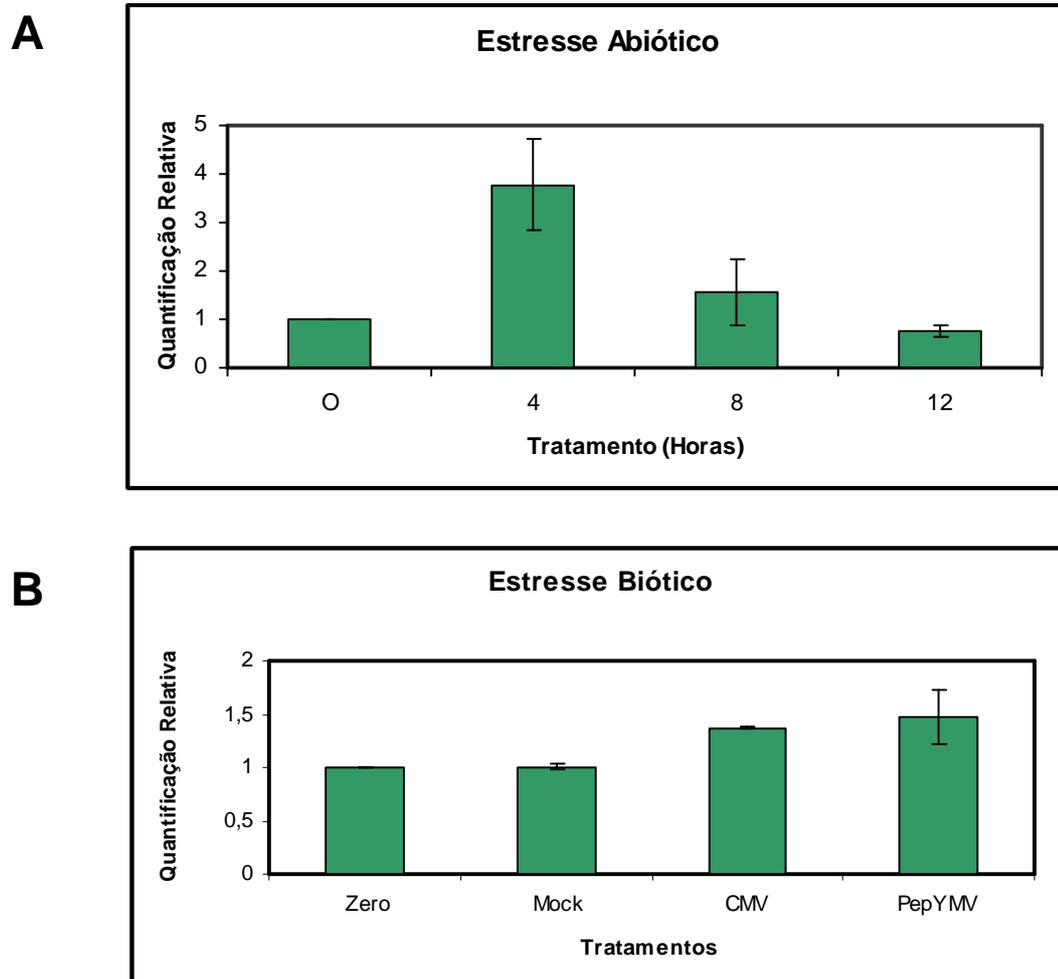


Figura 3 – Quantificação da expressão relativa da TCTP em plantas submetidas a estresse abiótico (A) em diferentes tempos (0, 4, 8 e 12 horas após dano mecânico), ou a estresse biótico (B) com diferentes espécies virais (*CMV* e *PepYMV*). Em (B) Zero corresponde ao controle não inoculado (tempo zero) e *mock* ao tratamento só com tampão e abrasivo.

5. CAPÍTULO II

Obtenção de plantas transgênicas de tabaco capazes de superexpressar a TCTP de tomate a fim de determinar o papel da proteína na infecção pelo *PepYMV*

1. Introdução

Uma vez observada a indução da expressão do gene que codifica a TCTP em plantas de tomate infectadas sistemicamente pelo *PepYMV*, plantas transgênicas de tabaco que superexpressam esse gene foram geradas. Estas plantas transgênicas foram infectadas pelo *PepYMV* na tentativa de desvendar o papel da TCTP na infecção viral.

2. Material e métodos

2.1. Amplificação da região codificadora da TCTP de tomate e construção do cassete de expressão

2.1.1. Extração de RNA total e RT-PCR

O RNA total de folhas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. *Santa Clara*) foi extraído com o uso do reagente TRIZOL (Invitrogen) conforme protocolo descrito no item 2.2 do capítulo I. O cDNA foi sintetizado com uso da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante, conforme descrito no item 2.2 do capítulo I.

A região codificadora da TCTP foi então amplificada por PCR com auxílio dos primers gene - específicos: TCTPF 5'-CGGCCATGGTGGTTGGTTTATCAGG-3' e TCTPR 5-GCCGAGCTCCTACTTGATCTC-3'. Esses primers foram desenhados com base na

sequência parcial de nucleotídeos da TCTP de tomate disponibilizada por Alfenas - Zerbini e colaboradores (2009) e em uma etiqueta de sequência expressa (EST - número SGN-U581240) depositada no banco “*Solanaceae Genomic Network*” (<http://solgenomics.net/>). No desenho dos primers foram inseridos dois sítios de restrição, um específico para a enzima de restrição *NcoI*, e outro para *SacI* (sublinhados na sequência de nucleotídeos acima).

Os componentes da reação de amplificação foram: 2 µL de cDNA (300 ng/µL); 0,5 µL de dNTP *mix* (estoque a 10mM); 0,5 µL de cada primer (estoque a 10 mM); 0,1 µL de enzima *Pfu* (2,5 u/µL; Fermentas); 2,5 µL tampão (10x contendo MgSO₄) e 19,9 µL de água deionizada. O programa usado na PCR consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de um ciclo básico de desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 53,5 °C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, que foi repetido 35 vezes, e de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

2.1.2. Construção do cassete de expressão contendo a região codificadora da TCTP

A construção do cassete de expressão consistiu de duas etapas (Figura 4). Na primeira etapa, o produto de amplificação contendo a região codificadora da TCTP de tomate foi inserido no vetor intermediário pBI2X35S para aquisição de um duplo promotor viral CaMV35S (2x35S) e do terminador do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), ambos importantes para a regulação da expressão do transgene na planta. Para tal, o cDNA amplificado foi purificado em gel, precipitado e digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *SacI*. Para a digestão utilizou-se a uma alíquota do cDNA, 2 µL da enzima *NcoI* (10 u/µL) (Invitrogen), 2 µL da enzima *SacI* (10 u/µL) (Invitrogen), 2 µL de tampão de

enzima (10x) e água para um volume final de 20 μL . Em paralelo, uma alíquota do vetor pBI2X35S (400 ng/ μL) foi igualmente digerida. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C. Após a digestão, as enzimas de restrição foram inativadas a 70°C por 15 minutos, e os produtos da digestão foram purificados em gel de agarose usando o kit *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

O fragmento contendo a região codificadora da TCTP foi então ligado ao vetor pBI2X35S purificado com auxílio da enzima T4 DNA Ligase (1000 u/ μL) (Fermentas). Para cada reação de ligação usou-se 2 μL de enzima (1000 u/ μL), 4 μL de tampão apropriado da enzima (10X), 10 μL de vetor (10 ng/ μL), 10 μL de inserto (20 ng/ μL) e 16 μL de água deionizada e autoclavada. A reação de ligação foi incubada a 22°C por 14 horas com posterior inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Os produtos da ligação foram então transformados em *Escherichia coli* DH5 α conforme o protocolo descrito no apêndice. Após a obtenção dos recombinantes, a inserção do fragmento de interesse no vetor foi verificada por digestão dos plasmídeos obtidos por miniprep (protocolo no apêndice) com as enzimas *NcoI* e *SacI*, e posterior análise em gel de agarose 1%. O plasmídeo recombinante assim obtido foi denominado pBI2X35S: TCTP: NOS.

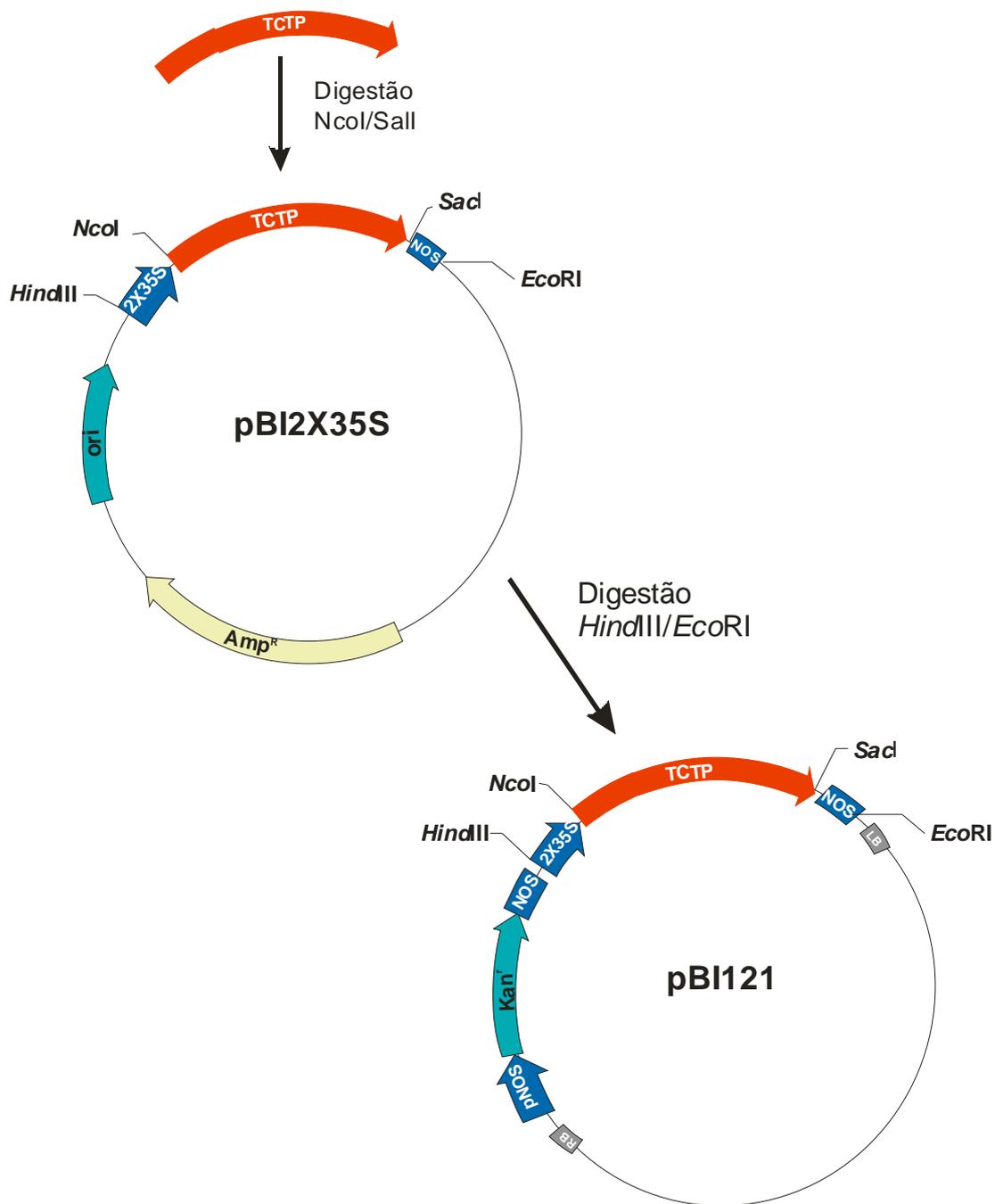


Figura 4 - Representação esquemática dos vetores usados na construção do cassete de expressão contendo a região codificadora da TCTP sob controle de um duplo promotor CaMV35S (2X35S) e do terminador NOS. As posições dos sítios de restrição utilizados estão indicadas. RB – borda direita e LB – borda esquerda.

2.1.3. Inserção do cassete de expressão 2X35S:TCTP:NOS em vetor binário pBI121 e transformação em agrobactéria

Visando a transformação de plantas, o cassete de expressão obtido na etapa anterior foi extraído por digestão do vetor intermediário para posterior ligação no vetor binário pBI121 (Clontech) (Figura 4). Para tal, uma alíquota de 40 µL do vetor pBI2X35S: TCTP: NOS (20 ng/µL) foi incubada a 37°C por 1 hora e 45 minutos com 1 µL das enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* (10 u/µL) (Fermentas) em reação contendo 10 µL de tampão de digestão (2X). Após a incubação, as enzimas foram inativadas a 70°C por 15 minutos. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio.

Após purificação em gel de agarose, o fragmento 2X35S: TCTP: NOS foi ligado ao vetor binário pBI121 igualmente digerido e purificado. Na reação de ligação usou-se 2 µL de enzima T4 DNA Ligase (1000 u/µL) (Fermentas), 4 µL de tampão de ligação (10x), 18 µL de vetor (6 ng/µL), 3,6 µL de inserto (20 ng/µL) e 12,4 µL de água deionizada e estéril. A reação de ligação foi incubada a 22°C por 14 horas com posterior inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. O produto de ligação foi então transformado em células competentes de *E. coli* DH5α conforme o protocolo descrito no apêndice. A inserção do fragmento de interesse no vetor foi checada por digestão dos plasmídeos recombinantes, obtidos usando miniprep, com as enzimas *HindIII* e *EcoRI*, e posterior análise em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio.

Após a confirmação da inserção, o plasmídeo recombinante (denominado pBI121: TCTP) foi inserido em células de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404) tornadas competentes conforme descrito no item X do apêndice. Para tal, adicionou-se 2,0 µL do vetor recombinante pBI121: TCTP (500 ng/µL) a uma alíquota de 100 µL de células competentes de *A. tumefaciens* e procedeu-se uma incubação, primeiramente, em gelo por 30 minutos e, em

seguida, em nitrogênio líquido por 2 minutos. Após este período, uma terceira e última incubação a 37°C por 5 minutos foi realizada. Após o choque térmico, 1 mL de meio LB (Luria-Bertani; 5 g NaCl; 5 g triptona; 2,5 g extrato de levedura; pH 5,7) foi adicionado ao tubo contendo as células e o vetor recombinante, e uma incubação a 28°C por 2 horas foi empreendida. Alíquotas de 100 e 500 µL da transformação foram então transferidas para placas de Petri contendo meio LB sólido e os antibióticos de seleção [canamicina (50 mg/ µL), rifamicina (50 mg/ µL) e estreptomicina (300 mg/ µL)]. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas.

2.1.4. Verificação da transformação de *A. tumefaciens*

Colônias isoladas de *A. tumefaciens* transformadas com o vetor pBI121: TCTP foram inoculadas em 3 ml de meio LB líquido adicionado dos antibióticos de seleção, e incubadas a 28°C por 25 horas a 180 rpm. O vetor recombinante foi então extraído dos transformantes com auxílio do protocolo de minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina conforme descrito no apêndice. A presença do cassete de expressão foi confirmada por PCR usando o DNA plasmidial extraído e *primers* específicos (35S – *Forward* – 5' ACAATCCCACTATCCTTC 3' e TCTP – *Reverse* – 5' CGGCCATGGCTATGTTGGTTTATC 3') complementares, respectivamente, à região codificadora da TCTP e ao promotor 35S. Os produtos de amplificação foram observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

2.1.5. Sequenciamento do DNA

Para obter DNA plasmidial livre de impurezas para o sequenciamento, usou-se o kit de purificação de DNA plasmidial *Wizard DNA Purification System* (Promega) conforme o

protocolo do fabricante. O seqüenciamento dos clones selecionados foi realizado utilizando o kit *BigDye™ Terminator v3. 1 Cycle Sequencing* versão 3.1 (Applied Biosystems). Em cada reação utilizou-se 2 µl do tampão 2,5 *Save Money* (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 2 µl do mix de *BigDye*, 5 pmol dos oligonucleotídeos 35S – *Forward* e TCTP – *Reverse*, e o equivalente a 200 ng de DNA plasmidial. O volume foi completado com água deionizada estéril. As reações foram realizadas em termociclador com os ciclos de temperatura programados para: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos seguida de 40 ciclos de 96°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 6°C até a precipitação. Para cada amostra foram realizadas duas reações, sendo uma para o oligonucleotídeo *forward* e outra para o *reverse*.

Para precipitação do DNA, 40 µl de isopropanol 75% foram adicionados às amostras com posterior incubação à temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 4000 rpm por 45 min a temperatura ambiente. O isopropanol foi removido invertendo os tubos e, a seguir, foi adicionado 200 µl de etanol 70% seguida de centrifugação a 4000 rpm por 10 min. Todo o etanol foi removido com auxílio de micropipeta. As amostras foram secas a temperatura ambiente e o produto ressuspendido em 10 µl de Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems). No momento da aplicação, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 min e rapidamente transferidas para o gelo. As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram comparadas ao banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – Estados Unidos da América).

2.2. Transformação genética do tabaco e inoculação viral em plantas transgênicas

2.2.1. Transformação de discos de folha

O protocolo a seguir foi extraído do “Manual de transformação genética de plantas-modelos” da EMBRAPA (2002). Uma alíquota de 100 µl de um pré-inoculo da agrobactéria transformada com o plasmídeo pBI121: TCTP foi usada para inocular 10 mL de meio LB contendo 20 µl de canamicina (50 mg/µL), 20 µl de rifamicina (50 mg/µL) e 0,8 µl de estreptomicina (300 mg/µL). A cultura foi incubada a 28°C sob agitação (100 rpm) até atingir uma absorbância (600 nm) igual a 1,5. Uma alíquota de 1 mL foi então diluída em 9 mL de meio LB. Discos de folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com aproximadamente 4 cm de diâmetro foram extraídos, com auxílio de um perfurador, de plantas cultivadas em frascos contendo meio MS estéril (Murashige e Skoog - SIGMA) adicionado de sucrose e fitagel. Os discos foliares foram então incubados por 5 minutos a temperatura ambiente sob leve agitação no meio LB contendo agrobactéria. O excesso de meio de cultura foi retirado dos discos foliares com auxílio de papel de filtro e, em seguida, estes foram transferidos para placas com meio MS contendo os hormônios vegetais ANA (0,1 µg/mL) e BAP (2 µg/mL). As placas foram incubadas a 28°C no escuro por 48 horas com a face adaxial dos discos foliares em contato com o meio. Após este período, os discos foram transferidos para placas de regeneração contendo meio MS adicionado de ANA (0,1 µg/mL), BAP (2 µg/mL), canamicina (50 mg/µL) e cefotaxina sódica (300 µg/mL). As placas de regeneração foram mantidas em câmara climatizadas com fotoperíodo 16/8 horas de luz/escuro e temperatura de 22°C±2°C. Os discos foram transferidos para novas placas de regeneração após duas semanas. Após esse período, os brotos regenerados foram transferidos para frascos de enraizamento contendo meio MS adicionado de ANA (0,1 µg/mL), canamicina (50 mg/µL) e cefotaxina sódica (300 µg/mL). Uma vez enraizadas, as plantas regeneradas de tabaco foram transferidas

para potes plásticos contendo uma mistura de terra enriquecida e vermiculita (2:1), sendo aclimatizadas em um recipiente coberto com filme plástico. Passado o período de aclimatização, as plantas transgênicas de tabaco foram submetidas à caracterização molecular.

2.2.2 Análises moleculares das plantas transformadas

Para selecionar as plantas transgênicas de tabaco que apresentavam o cassete de expressão contendo a região codificadora da TCTP de tomate procedeu-se a extração de DNA genômico utilizando o protocolo descrito a seguir. Amostras de folhas frescas das linhagens transgênicas obtidas foram inicialmente maceradas em nitrogênio líquido. Cerca de 100 mg do material macerado foi então transferido para microtubo, ao qual se adicionou 500 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH8, 0,5 mM EDTA pH8,0, 500 mM NaCl, 10mM mercaptoetanol), 70 µL de SDS (10%) e 216 µL de acetato de potássio (3M). Os microtubos contendo as amostras foram incubados, primeiramente, a 65°C por 10 minutos, e posteriormente em gelo por 5 minutos, sendo em seguida centrifugados a 15000xg por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com auxílio de micropipeta, e a este foram acrescentados 640 µL de álcool isopropílico e 60 µL de acetato de potássio (3M). Em seguida, procedeu-se uma incubação a -20°C por 10 minutos e uma centrifugação a 15000xg por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado com auxílio de micropipeta e o material precipitado foi ressuscitado em 200 µL de tampão TE (100 mM Tris-EDTA pH8,0). Em seguida, centrifugou-se o material a 15000xg por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e 20 µL de acetato de potássio (3M) e 440 µL de etanol absoluto foram adicionados. Após incubação a -20°C por 10 minutos procedeu-se nova centrifugação a 15000xg por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado, e o

sedimento lavado em 500 µL de etanol 70%. Após centrifugação a 15000xg por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi novamente descartado e o excesso de etanol retirado usando-se o sistema de secagem a vácuo. O DNA foi ressuspenso em água deionizada estéril e quantificado em espectrofotômetro (NANODROP) usando absorvância a 260 nm.

A inserção do cassete no genoma das plantas transformadas foi então confirmada por PCR empregando a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de um ciclo básico de desnaturação a 94°C por 1 minuto; pareamento a 53,5 °C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, que foi repetido 35 vezes, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Para tal foi empregando o DNA genômico extraído e os *primers* gene - específicos 35S – *Forward* e TCTP – *Reverse*. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

As plantas transgênicas de tabaco que apresentaram a inserção do cassete de expressão foram selecionadas para extração de RNA total visando verificar a presença do transcrito. A extração do RNA total e a síntese do cDNA foram realizadas conforme protocolo descrito no capítulo I. A PCR foi realizada empregando os primers gene - específicos: TCTPF 5'-CGGCCATGGTGTTGGTTTATCAGG-3' e TCTPR 5'-GCCGAGCTCCTACTTGATCTC-3'. As plantas transgênicas de tabaco com a presença do transcrito confirmada foram selecionadas e transferidas para casa de vegetação para obtenção de sementes.

2.2.3. Western blot

A presença da proteína TCTP de tomate nas três linhagens de tabaco selecionadas foi confirmada por *Western blot*. Como controle positivo desse ensaio foi usado extrato protéico total obtido de folhas de tomateiro. Um disco de folha com aproximadamente 2 cm de diâmetro foi extraído de cada linhagem transgênica bem como de uma planta não

transformada. Os discos coletados foram macerados em 200 µl tampão SDS-PAGE (Laemmli, 1970), e os extratos incubados por 5 minutos a 95°C. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Aproximadamente 12 µl desse sobrenadante foram aplicados em gel SDS-PAGE 15%. Após a eletroforese, procedeu-se a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose com o auxílio do sistema de transferência *Transf Dry* (BioRad). Realizada a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada (30 minutos a temperatura ambiente sob agitação) em solução de bloqueio contendo tampão TBS-Tween 0,05% 1x (50 mM Tris, HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl e 0,05% Tween-20) e 5% de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi incubada sob agitação à temperatura ambiente (~12 h) em solução de TBS-Tween 0,05% 1x contendo 3% de leite desnatado, à qual foi adicionado o anticorpo primário (antissoro específico para a TCTP na diluição 1:1000). Após essa incubação, a membrana passou por três etapas de lavagem, sendo as duas primeiras realizadas empregando TBS-Tween 0,25% 1x e a última empregando TBS-Tween 0,5% 1x. Cada lavagem teve duração de 5 minutos sendo realizadas à temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi novamente incubada (2 h) em solução de TBS-Tween 0,05% 1x contendo 3% leite desnatado adicionada do anticorpo secundário (anti-IgG de coelho) conjugado à peroxidase na diluição de 1:2000. Em seguida, a membrana passou pelas mesmas três lavagens descritas anteriormente. Para detecção da proteína de interesse usou-se o sistema *Amersham ECL Western Blotting Systems* (GE Healthcare), segundo o protocolo do fabricante. O filme radiográfico ficou exposto durante 30 segundos sobre a membrana de nitrocelulose sendo então revelado.

2.2.4. Inoculação viral em plantas transgênicas de tabaco

Três linhagens transgênicas de tabaco, todas elas superexpressando a TCTP de tomate, foram selecionadas para inoculação viral e análise da infecção sistêmica. Em paralelo, plantas selvagens de tabaco foram usadas como controle negativo.

Foram usadas plantas com três meses de idade, as quais foram submetidas a dois tratamentos. No primeiro (*mock*) as plantas (3) foram inoculadas com tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH7,2) contendo sulfito de sódio (1 g/L) adicionado de agente abrasivo (carborundum), mas sem adição do extrato de planta infectada. No segundo, as plantas foram inoculadas com um extrato foliar obtido de plantas de tomate infectadas com *PepYMV*. Esse extrato foi obtido usando tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH7,2) contendo sulfito de sódio (1 g/L) e adicionado de abrasivo. A inoculação nos dois tratamentos foi realizada nas duas folhas basais das plantas, sendo que uma segunda inoculação foi realizada dois dias após a primeira. O primeiro par de folhas situado acima do local inoculado foi coletado aos 14, 21 e 28 dias após a inoculação (DAI). Esse material coletado foi macerado em tampão de extração *Indirect Sample Extraction* e submetido à quantificação viral usando ELISA indireto como descrito no item 2.1.3. do capítulo I. A partir de 25 DAI foi possível visualizar os primeiros sintomas nas plantas infectadas.

3. Resultados

3.1. Amplificação da região codificadora da TCTP por RT-PCR e construção do cassete de expressão

A região codificadora da TCTP foi amplificada por RT-PCR usando-se RNA total extraído de tomate e *primers* específicos. O produto de amplificação obtido tem aproximadamente 550 pares de bases e foi amplificado em apenas uma amostra (Figura 5). Esse fragmento foi purificado em gel e inserido em vetores específicos para construção do cassete de expressão.

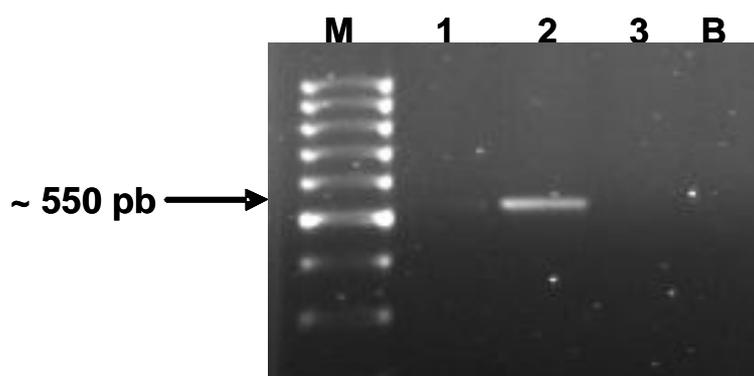


Figura 5 - Fragmento amplificado por RT-PCR correspondente à região codificadora da TCTP de tomate (seta). Apenas a amostra de número 2 apresentou produto de amplificação. M - Marcador molecular de 100 pb. B - Branco. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

A construção do cassete de expressão consistiu em duas etapas. Na primeira etapa, o produto de amplificação correspondente à região codificadora da TCTP foi inserido no vetor pBI2X35S por digestão *NcoI/SacI* para aquisição de um duplo promotor 35S e do terminador NOS conforme esquematizado na Figura 4. O plasmídeo recombinante foi transformado em células de *Escherichia coli*, as quais foram selecionadas pelo antibiótico ampicilina.

O plasmídeo recombinante pBI2X35S: TCTP: NOS foi então submetido ao tratamento com as enzimas de restrição *Hind*III e *Eco*RI para liberação do cassete de expressão 2X35S:TCTP:NOS (Figura 6), visando a sua posterior clonagem no vetor binário pBI121.

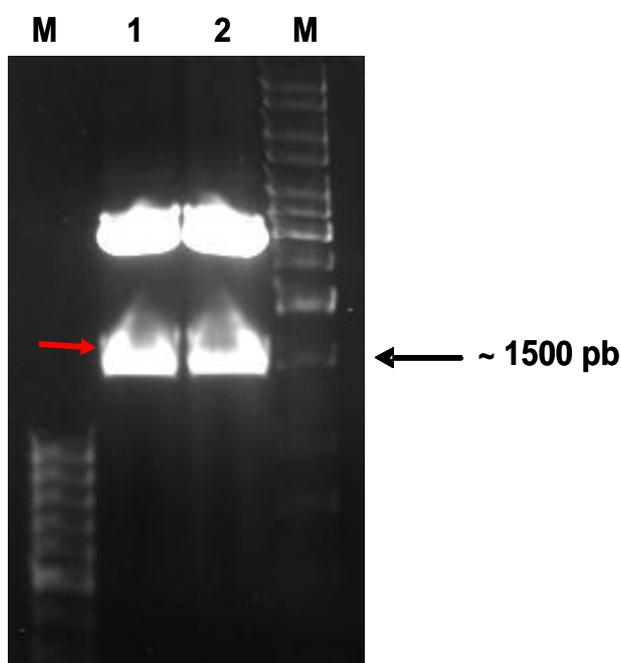


Figura 6 – Digestão do plasmídeo recombinante pBI2X35S: TCTP: NOS com as enzimas de restrição *Hind*III e *Eco*RI. 1, 2, - DNA plasmidial extraído de diferentes colônias de *E. coli*. O fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases (pb) corresponde ao cassete de expressão 2X35S:TCTP:NOS (seta vermelha). (M) Marcador molecular de 1000 pb (à direita) e de 100 pb (à esquerda). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Na etapa seguinte, o fragmento *EcoRI/HindIII* contendo o cassete de expressão foi purificado e inserido no vetor de transformação de plantas pBI121 igualmente digerido. A inserção do cassete de expressão em pBI121 foi confirmada por digestão do vetor recombinante com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* (Figura 7). Nesse caso, dois fragmentos, um de aproximadamente 1500 pb correspondente ao cassete de expressão, e outro acima de 10000 pb correspondente ao vetor pBI121, puderam ser observados, confirmando assim a inserção. A região codificadora da TCTP inserida no vetor binário pBI121 foi sequenciada e as sequências obtidas foram submetidas ao banco de dados do NCBI. Cabe ressaltar que toda essa estratégia teve que ser adotada uma vez que o vetor binário pBI121 apresenta mais de um sítio de restrição para a enzima *NcoI*.

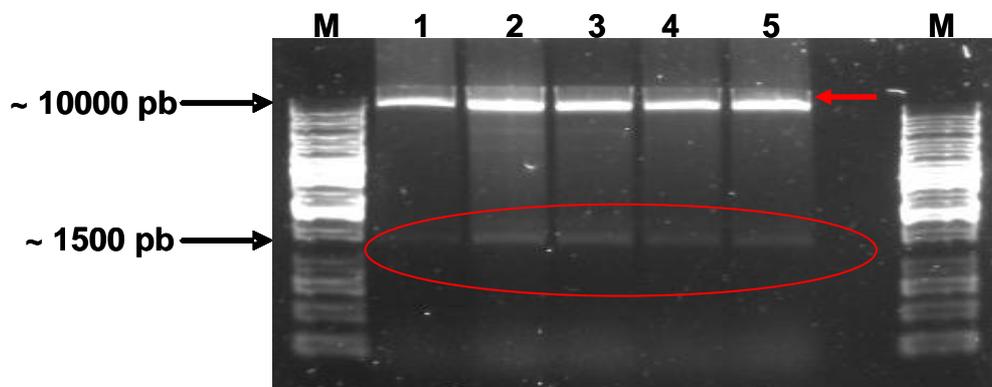


Figura 7 – Confirmação da inserção do cassete de expressão 2X35S: TCTP: NOS no vetor binário pBI121 após digestão com as enzimas *HindIII* e *EcoRI*. 1, 2, 3, 4, 5 - DNA plasmidial extraído de diferentes colônias de *E. coli*. O fragmento de aproximadamente 1500 pb corresponde ao cassete de expressão (círculo), e o fragmento de ~10000 pb ao vetor (seta). (M) Marcador molecular de 100 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

O vetor pBI121 recombinante foi então inserido em *A. tumefaciens* para posterior transformação de plantas. As células de *A. tumefaciens* que receberam o vetor pBI121 recombinante foram selecionadas pelo antibiótico canamicina, e a presença da região codificadora da TCTP nas colônias transformadas foi confirmada por PCR de colônia empregando primers específicos para a região codificadora da TCTP (Figura 8).

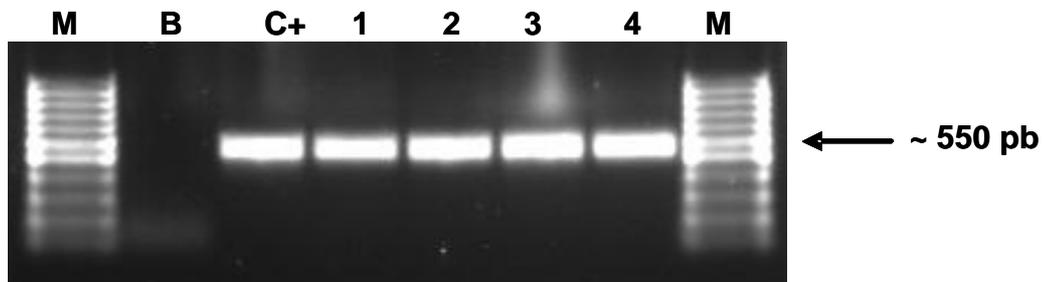


Figura 8 - PCR de colônia usando primers específicos para a região codificadora da TCTP. O DNA plasmidial foi extraído de diferentes colônias de *A. tumefaciens* transformadas com vetor pBI121: TCTP (1 a 4). (M) Marcador molecular de 100 pb; (C+) Controle positivo – vetor pBI121: TCTP extraído de *E. coli*; (B) Branco – amostra sem DNA. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.2. Produção e seleção das plantas transgênicas de tabaco superexpressando a TCTP

Plantas transgênicas de tabaco (*N. tabacum* SR1) capazes de expressar de maneira constitutiva a proteína TCTP de tomate foram produzidas utilizando o método de

transformação de discos de folha mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Os transformantes foram regenerados a partir de calos mantidos em meio MS contendo canamicina, e após enraizamento, transferidos para vasos contendo uma mistura de terra mais vermiculita.

A verificação da inserção do cassete foi realizada inicialmente em oito regenerantes. Para tal, o DNA genômico foi extraído das plantas selecionadas e um fragmento foi amplificado por meio de PCR usando primers específicos ao promotor 35S e à região codificadora da TCTP. O uso de *primer forward* específico para a região 35S se dá devido à presença desse fragmento no cassete de expressão e sua posterior transferência, juntamente com a região codificadora da TCTP, durante a transformação de discos de folha mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Na Figura 8 é possível constatar que cinco (1, 2, 4, 7 e 8), dos oito transformantes analisados, apresentam amplificação do fragmento de tamanho esperado a partir do DNA genômico, confirmando, portanto, a inserção.

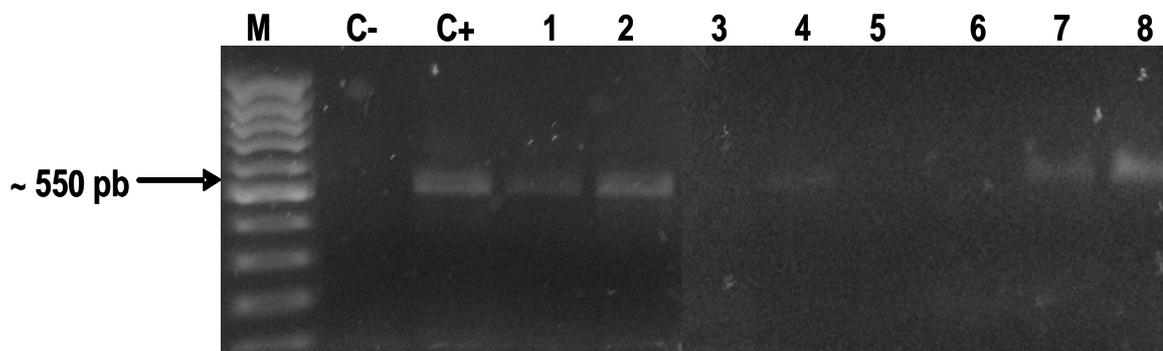


Figura 8 – Confirmação da inserção do cassete de expressão nas diferentes linhagens transgênicas de tabaco selecionadas (numeradas de 1 a 8). (C-) - controle negativo (tabaco selvagem não transformado); (C+) - controle positivo (vetor com a região codificadora da TCTP de tomate). Um marcador molecular (M) de 1000 pb foi usado. O fragmento amplificado tem aproximadamente 550 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

A presença de transcritos da TCTP de tomate nas linhagens transgênicas que apresentavam a inserção do cassete de expressão (linhagens 1, 2, 4, 7 e 8; Figura 8) foi checada por RT-PCR usando-se primers específicos para a região codificadora da TCTP e RNA total extraído de folhas. Para fins de comparação, duas linhagens (3 e 5) que não apresentaram a inserção do cassete de expressão na análise anterior foram incluídas no ensaio. Pelo resultado obtido verifica-se que o transcrito correspondente à TCTP de tomate foi amplificado em apenas três linhagens transgênicas (1, 7 e 8) (Figura 9). As sementes dessas linhagens transgênicas foram coletadas para detecção da proteína e realização de futuras análises funcionais usando vírus.

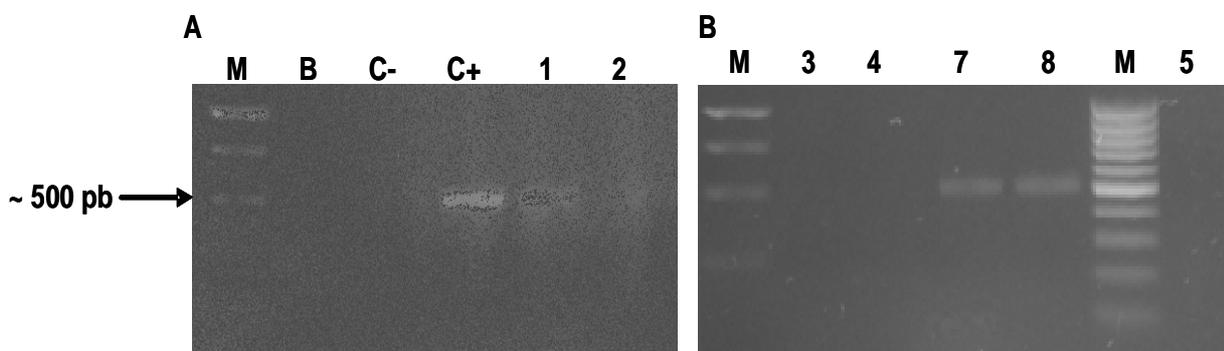


Figura 9 – Amplificação de transcritos da TCTP nas linhagens transgênicas de tabaco (numeradas de 1 a 8) empregando RT-PCR (painéis A e B). (B) – amostra controle sem DNA; (C-) - controle negativo de amplificação (RNA total de tabaco selvagem); (C+) - controle positivo de amplificação (plasmídeo com a região codificadora da TCTP de tomate); (M) - marcador molecular 1K pares de bases (pb). O fragmento amplificado tem aproximadamente 500 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

As linhagens de números 1, 7 e 8 foram então submetidas ao ensaio de *Western Blot* com anticorpos policlonais para detecção da proteína TCTP. Neste ensaio empregou-se extrato protéico total de tomate como controle positivo, e de tabaco não transformado como controle negativo. O resultado de *Western Blot* demonstrou a ausência da TCTP de tomate no controle negativo, enquanto que nas três linhagens transgênicas analisadas, bem como no controle positivo, foi possível detectar uma banda de 19 kDa correspondente à proteína TCTP (Figura 10).

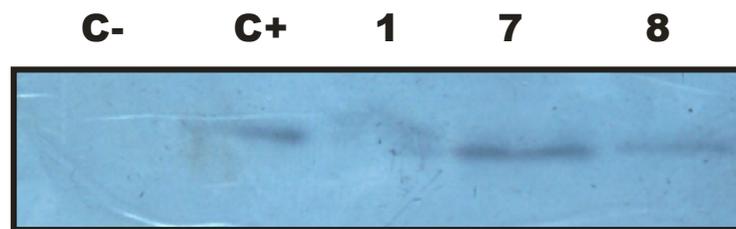


Figura 10 – Detecção da proteína TCTP de tomate em linhagens transgênicas de tabaco usando *western blot*. (C-) - controle negativo, tabaco selvagem; (C+) - controle positivo, tomate selvagem; (1, 7 e 8) – linhagens transgênicas de tabaco mostrando a acumulação da proteína TCTP (19 kDa).

Para avaliação da acumulação viral, plântulas da geração R1 das três linhagens transgênicas obtidas foram inoculadas com o *PepYMV*, e a concentração viral foi analisada em diferentes momentos durante a infecção sistêmica. Nesse caso, plântulas de tabaco não transformadas foram usadas como controle positivo.

Os primeiros sintomas visuais de infecção ocasionada pelo *PepYMV* nas plantas inoculadas surgiram aos 20 DAI e foram caracterizados pela presença de mosqueado nas folhas sem áreas de necrose (Figura 11 A). Somente a partir de 60 DAI foi possível visualizar o início dos sintomas de mosaico (Figura 11 B). Os sintomas observados nas folhas das plantas transgênicas foram semelhantes àqueles observados nas plantas não transformadas, não sendo possível identificar uma predominância de sintomas nestes dois grupos.

Aos 14 DAI, os valores médios de absorvância obtidos nos extratos foliares provenientes das três linhagens transgênicas testadas foram aproximadamente 1,8x maiores que aquele observado nos extratos foliares provenientes de plantas não transformadas (Figura 12), indicando, portanto, uma maior concentração de vírus nas linhagens transgênicas. Já aos 21 DAI, a diferença observada foi de aproximadamente 1,6x. Aos 28 DAI, porém, as diferenças detectadas entre as plantas testadas não foram significativas (1,03x) (Figura 12).

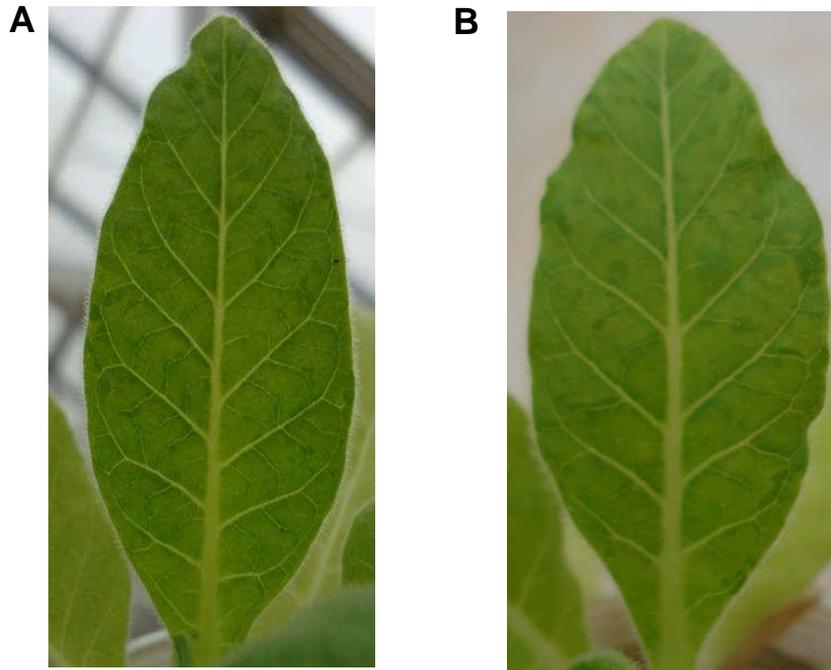


Figura 11 – Sintomas observados em folhas de tabaco transgênico capaz de superexpressar a TCTP de tomate e inoculada com o *PepYMV* . A - 25 DAI; B – 60 DAI.

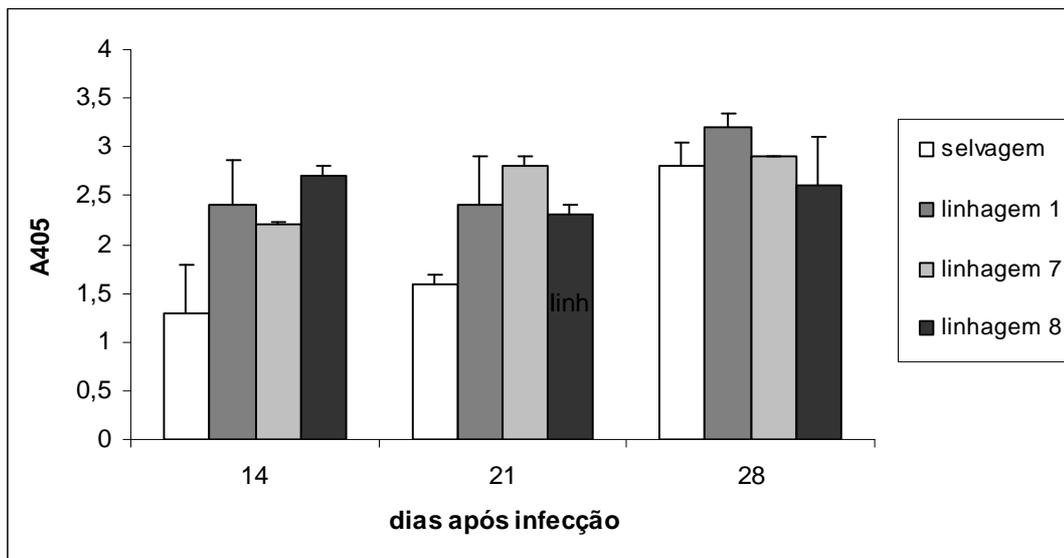


Figura 12 – Detecção do *PepYMV* em plantas transgênicas de tabaco capazes de superexpressar a TCTP de tomate. Linhagem 1, 7 e 8 – linhagens transgênicas de tabaco produzidas nesse estudo; selvagem – plantas não transformadas. A concentração viral foi determinada em ensaio de ELISA indireto e o resultado analisado em espectrofotômetro a 405 mn.

6. Discussão Geral

A análise do perfil de expressão do gene que codifica a TCTP em tomate revelou a sua indução em resposta aos dois tipos de estresse empregados no presente estudo. Nas plantas que sofreram injúria mecânica, o pico de expressão aconteceu 4 horas após o tratamento com posterior queda no intervalo entre 8 e 12 horas. Em plantas infectadas pelo *CMV* ou pelo *PepYMV*, e analisadas após 25 dias da inoculação, a expressão da TCTP aumentou 1,4x e 1,5x, respectivamente. Resultados semelhantes também foram observados nas linhagens transgênicas de tabaco que superexpressam a TCTP de tomate aqui geradas, onde uma maior concentração viral foi observada nas linhagens transgênicas em relação ao controle não transformado. Esses resultados, juntamente com outros trabalhos da literatura, corroboram a associação da TCTP com eventos relacionados tanto ao estresse biótico quanto abiótico.

A TCTP é uma proteína multifuncional envolvida em diferentes processos celulares. Existem na literatura dados experimentais sobre essa proteína que podem funcionar como norteadores para tentar elucidar o seu modo de ação durante a resposta a tais estresses. Barel e Ginzberg (2008), por exemplo, investigando a expressão de algumas proteínas envolvidas na resposta ao estresse abiótico e biótico em periderme de tubérculos de batatas, verificaram que a TCTP é uma das mais induzidas. A periderme é um tecido secundário cuja origem pode estar relacionada aos diferentes tipos de injúrias que a planta está sujeita, como por exemplo, o ataque de patógenos e danos mecânicos. Nestes casos, o tecido original da área danificada é substituído pela periderme, que na sua composição, apresenta células com depósito de suberina na parede celular formando uma barreira contra entrada de patógenos ou outras substâncias. O proteoma da periderme de tubérculo de batata revelou um aumento na síntese

de algumas proteínas em relação à camada inferior, o parênquima. Nesse caso, as proteínas superexpressas foram divididas em grupos, conforme a categoria funcional, e a TCTP foi incluída entre as proteínas responsáveis pela proliferação celular juntamente com actina e tubulina, uma vez que há intensa divisão celular durante o desenvolvimento da periderme. Os autores, entretanto, não quantificaram as proteínas diferencialmente expressas neste ensaio biológico.

Mudanças na expressão da TCTP também foram observadas em estudo sobre regeneração da parede celular em protoplastos de algodão (Yang et al, 2008). A identificação dos genes envolvidos neste processo foi determinada pelo uso de biblioteca subtrativa, sendo que 412 genes foram diferentemente expressos nas 48 horas iniciais. Várias classes de genes mostraram mudanças no perfil de expressão, as quais agregam proteínas relacionadas à defesa celular contra patógenos, organização da parede celular, transdução de sinais, transporte e metabolismo, e energia. Segundo os autores, a TCTP foi enquadrada em um grupo de genes que são expressos durante todo o processo de regeneração da parede celular, incluindo a síntese da parede primária, secundária e durante a divisão celular. Outra possível função relacionada à TCTP foi com a montagem da matriz extracelular.

A indução da expressão da TCTP durante a regeneração da parede celular em protoplastos de algodão pode estar relacionada com a sua atividade regulatória sobre algumas GTPases. As GTPases são pequenas proteínas capazes de se ligar ao GTP e de regular a sua hidrólise sendo encontradas em todos os eucariotos. A função das GTPases é conservada nos diferentes grupos de eucariotos e está relacionada com processos de transdução de sinal, proliferação celular, organização do citoesqueleto e movimentação de vesículas celulares. Como existem diferentes proteínas com a mesma função, as GTPases são divididas em famílias: Ras, Rab, Rho, Arf, e Ran, cada qual responsável por uma via. As proteínas da

família Rab regulam a movimentação de vesículas celulares principalmente entre organelas, retículo endoplasmático e Golgi (Hwang e Robinson, 2009).

Sabe-se que os potyvírus promovem a formação de vesículas membranares derivadas do retículo endoplasmático (ER) para sua replicação, as quais são induzidas pela proteína viral 6K (Schaad et al, 1997). Essas vesículas recrutam na sua formação a rota de secreção ER-Golgi da qual participam as vesículas de transporte revestidas chamadas COPI e COPII (*cargo containing coat protein complex*) (Wei e Wang, 2008). Os complexos COPI e II são compostos por diferentes GTPases, sendo que o bloqueio do recrutamento da GTPase Arf1 pela droga Brefeldina A, o qual inibe a formação de COPI, inibe também a replicação de duas espécies de potyvírus (Wei e Wang, 2008) bem como do *Grapevine fanleaf virus* (Ritzenthaler et al, 2002). Consequentemente, uma participação da TCTP nesse processo através do seu papel regulatório das GTPases pode assim ser vislumbrado (Thaw et al., 2001).

Trabalhos relacionando a TCTP à GTPases em plantas ainda são escassos. Entretanto, estudos em animais confirmam a TCTP como fator regulador de GTPases. A análise das sequências deduzidas de aminoácidos, bem como da estrutura tridimensional da TCTP de *Schizosaccharomyces pombe* revelou similaridade com a proteína Mss4/Dss4, que pode desempenhar algumas funções relacionadas ao auxílio à atividade de pequenas GTPases (Thaw et al, 2001). Dentre estas funções, destaca-se a capacidade da Mss4/Dss4 de se ligar a forma livre da Rab, e o complexo formado por Mss4/Rab pode se ligar mais rapidamente a GTP do que GDP.

O papel da TCTP não fica restrito apenas a trocas de nucleotídeos na família Rab. Segundo Cans e colaboradores (2003), a TCTP desempenha função semelhante na regulação da atividade do fator de alongamento eEF1A, atuando como um inibidor de dissociação de nucleotídeo guanina. Esse importante componente do maquinário de tradução tem sido

relatado como sendo necessário para o estabelecimento da infecção de algumas espécies virais em plantas. O eEF1A faz parte, por exemplo, do complexo de replicação do *Tomato bushy stunt virus*, sendo necessário para a multiplicação do RNA viral (Li et al, 2009). Adicionalmente, o silenciamento da expressão desse fator em *Nicotiana benthamiana* provocou uma redução na acumulação do *Tobacco mosaic virus* (TMV) e na sua capacidade de infecção do hospedeiro (Yamaji et al, 2010). No caso do *Turnip mosaic virus*, um potyvirus como o PepYMV, foi demonstrado que o eEF1A é capaz de interagir com a RNA polimerase dependente de RNA e com a VPg (*viral genome-linked protein*), sendo que os seus níveis nas frações de membrana aumentam em resposta a infecção pelo TuMV (Thivierge et al, 2008).

A TCTP tem sido relatada como uma proteína multifuncional relacionada principalmente com eventos de divisão celular e desenvolvimento. Durante a caracterização da TCTP de *Arabidopsis thaliana*, Berkowitz et al (2008) verificaram que a ausência de expressão desse gene pode ocasionar tanto mudanças morfológicas como fisiológicas *i.e.* o grão de pólen de plantas onde o gene foi nocauteado não forma o tubo polínico e apresenta desvantagem reprodutiva em relação ao grão de pólen de plantas selvagens. Nas linhagens das plantas submetidas ao silenciamento gênico por RNAi foram observados o retardamento do crescimento durante a germinação, redução nas camadas de células epidérmicas de folhas, redução no crescimento primário de raízes e na formação de raízes laterais, diminuição na sensibilidade a auxina exógena e aumento na síntese de auxina endógena. Curiosamente, no nosso caso, a superexpressão da TCTP não provocou mudanças fenotípicas evidentes nas plantas transformadas quando comparadas às selvagens. Ainda segundo os autores, a TCTP pode atuar como possível mediador da atividade TOR -*Target of Rapamycin* em plantas.

A via de sinalização TOR está presente em todos eucariotos, e regula eventos relacionados à maquinaria traducional, crescimento celular, respostas a estresse e nutrientes (Inoki e Guan, 2006). As proteínas dessa via de sinalização atuam como proteínas quinases, conhecidas como fosfatidilinositol quinase, e são divididas em dois complexos multiproteicos, sendo TOR 1 - responsável pela tradução, biogênese de ribossomos, disponibilização de nutrientes, autofagia, metabolismo e TOR 2 - pela organização do citoesqueleto (Serfontein et al, 2010 e Wullschleger et al, 2006). Os dois complexos TOR sofrem diferentes regulações, TOR 1 é sensível a estresse e a rapamicina, sendo responsiva a nutrientes, ao passo que TOR 2 não apresenta sensibilidade a rapamicina.

Em mamíferos, estímulos como insulina, estresse, hipóxia, nutrientes e redução nos níveis de energia celular desencadeiam cascatas de ativação de proteínas transdutoras de sinal e estas ativam a Rhed GTPase, que atua como reguladora da atividade TOR (Wullschleger et al, 2006). Em *Drosophila*, a TCTP funciona como principal fator de regulação da Rhed GTPase, e em indivíduos onde a TCTP foi silenciada notaram-se alterações no desenvolvimento celular em certos órgãos, tais como asas e olhos (Hsu et al, 2007). A TCTP pode atuar como regulador positivo e fator de troca de nucleotídeos da Rhed GTPase.

É sabido que, em animais, alguns vírus são capazes de regular a via de sinalização TOR para aumentar a sua replicação e taxa sobrevivência na célula hospedeira. Dados da literatura demonstram, por exemplo, que a proteína NS5A do *Hepatite C virus* é capaz de ativar a via TOR para inibir a apoptose (Peng et al., 2010).

Formas homólogas à TOR de mamíferos foram caracterizadas em plantas, entretanto, essa via de sinalização ainda não está bem caracterizada nos vegetais. Inserções por T-DNA

em dois genes que codificam RAPTOR (proteína regulatória associada à TOR) em *Arabidopsis* resultou em aborto de sementes e em problemas durante o desenvolvimento embrionário das plantas mutantes (Deprost et al, 2005) Desse modo, TOR parece contribuir para o desenvolvimento embrionário em plantas. Quando o gene que codifica TOR em *Arabidopsis* é silenciado ou super expresso, ocorrem mudanças em mecanismos relacionados ao crescimento, resistência a estresse e produtividade. Segundo Deprost e colaboradores (2007), os níveis de expressão da TOR podem influenciar o crescimento vegetal e a produtividade de sementes. Plantas com gene *TOR* silenciado apresentaram desenvolvimento embrionário prejudicado e alta sensibilidade ao estresse osmótico, ao passo que as plantas que expressaram esse gene de maneira constitutiva demonstraram aumento no crescimento e redução na sensibilidade a estresse osmótico. Os componentes que regulam a atividade da via de sinalização TOR em animais e fungos são encontrados e conservados em plantas.

Outra função atribuída a TCTP, que pode estar associada ao estabelecimento da infecção viral, é seu papel na regulação seletiva do movimento a longa distância nos vasos condutores do floema. Aoki e colaboradores (2005) demonstraram que a TCTP é capaz de interagir, e regular, duas proteínas responsáveis pelo transporte de macromoléculas em floema de abóbora. Curiosamente, a TCTP também foi descrita como estando presente no floema de plantas de mamona (Barnes et al., 2004). Esse aspecto funcional é interessante já que os vírus de planta fazem uso dos vasos condutores para se movimentar na planta hospedeira. Segundo Carrington et al (1996), no desenvolvimento da infecção viral em plantas, os vírus podem utilizar duas rotas. No primeiro momento, a infecção é iniciada na epiderme foliar por meio da inoculação. Posteriormente, os vírus apresentam movimentação célula-célula, usando o plasmodesma, alcançando os tecidos subsequentes, mesoderme e parênquima, até atingir o floema. Na segunda rota, que ocorre via floema durante a movimentação a longa distância, as

partículas virais são transportadas com auxílio de algumas proteínas codificadas pelos vírus, e chegam a outros tecidos estabelecendo a infecção sistêmica. O uso desse mecanismo de transporte necessita de algumas adaptações por parte dos vírus.

As análises realizadas no presente trabalho mostram que a expressão da TCTP é induzida nas primeiras quatro horas após a realização de dano mecânico, fenômeno que pode estar associado a um papel da proteína no reparo dos prejuízos ocorridos em decorrência do referido dano nos tecidos e nas células, seja na divisão ou no reparo da parede celular. O fato de a TCTP atuar como fator de regulação da atividade de algumas GTPases, em especial Ras, e que estas por sua vez, regulam o transporte de moléculas por endomembranas, evento necessário para síntese e reparo da parede celular vegetal, é indicativo da sua participação como componente regulatório desse fenômeno.

Uma indução da expressão do gene que codifica a TCTP também foi observada em plantas de tomate infectadas por duas espécies virais, o *PepYMV* e o *CMV*, sugerindo que a modulação da expressão desse gene é parte da resposta desencadeada pela infecção viral. Essa expressão estimulada da TCTP, entretanto, parece favorecer o agente patogênico já que uma maior concentração viral foi observada nas linhagens transgênicas de tabaco com expressão constitutiva da TCTP de tomate. Tais resultados sugerem, portanto, que o vírus é capaz de modular a expressão da TCTP a seu favor durante a infecção da planta hospedeira. Nesse cenário é possível imaginar que a TCTP esteja envolvida em processos relacionados com a regulação de componentes específicos de determinadas vias de sinalização intracelular (TOR, por exemplo), em especial de pequenas GTPases, ou aqueles envolvidos no transporte via sistema vascular. Por se tratar de uma proteína multifuncional é possível que a TCTP tenha participação em outros eventos que favoreçam a replicação viral no hospedeiro.

7. Conclusões

- A expressão do gene que codifica a TCTP em plantas de tomate é induzida por dano mecânico;
- A expressão do gene que codifica a TCTP é induzida em plantas de tomate sistemicamente infectadas pelo *PepYMV* e pelo *CMV*;
- Um aumento da concentração do *PepYMV* foi observado em plantas transgênicas de tabaco que super expressam a TCTP de tomate, evidenciando a participação dessa proteína na infecção viral.

8. Apêndice

8.1. Preparação de Células Competentes de Escherichia coli usando Cloreto de Cálcio

A cepa DH5a de *Escherichia coli* foi inoculada em 3 mL de meio LB (Luria-Bertani; 5 g NaCl; 5 g triptona; 2,5 g extrato de levedura; pH 5,7) por 12 horas sob agitação de 150 rpm a 37°C. Uma alíquota de 0,5 mL do pré-inoculo foi diluída em 250 mL de meio LB, e incubada a 37°C sob agitação de 150 rpm até atingir uma absorbância (600 nm) entre 0,45 e 0,55. As células foram transferidas para tubos de 50 mL e incubadas em gelo por 25 minutos com posterior centrifugação a 3700 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e o sedimento ressuspensionado em 10 mL de cloreto de cálcio (CaCl₂ 0,1M). Após incubação em gelo por 90 minutos, a amostra foi centrifugada a 3700 rpm por 10 minutos a 4°C. Essa etapa foi repetida mais uma vez, porém diminuindo-se o volume de CaCl₂ para 1 mL e o tempo de incubação em gelo para 60 minutos. As células foram estocadas em microtubos a -80°C.

8.2. Transformação de células competentes de E. coli por choque térmico

A reação de ligação foi adicionada a 300 µL de células competentes e incubadas por 1 h em gelo. Um choque térmico foi então aplicado incubando a amostra a 42°C por 2 min e transferindo-a imediatamente para gelo com incubação por 5 minutos. Após o choque térmico, 400 mL de meio LB foi adicionado ao tubo que foi então incubado a 37°C sob agitação de 100-200 rpm. As células transformadas foram transferidas para placas contendo meio LB adicionado de ágar e dos antibióticos de seleção [ampicilina (100 mg/mL) para o vetor de clonagem pBI2X35S e canamicina (100 mg/mL) para o vetor pBI121], sendo então incubadas a 37°C por 12 horas.

8.3. Minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina

Para obtenção de DNA plasmidial, as bactérias foram inoculadas, com auxílio de palito de dente, em 3 ml de meio LB líquido contendo o antibiótico de seleção, e incubadas sob agitação de 250 rpm a 37°C por 12 horas. Alíquotas de 1,5 mL foram então transferidas para microtubos e centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta, e o sedimento ressuspensado em 200 µL de solução P1 (Tris-HCL 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; RNase 100 µg/mL) e, posteriormente, homogeneizados e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL de solução P2 (NaOH 0,2M; SDS 10%) seguida de gentil homogeneização e incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Duzentos µL da solução P3 (Acetato de Potássio 3 M pH 5,5) foram acrescentados ao microtubo procedendo-se nova homogeneização e incubação por 15 minutos em gelo, com posterior centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante (550 µL) foi transferido para novo microtubo e a este se acrescentou 500 µL de álcool isopropílico gelado. Após incubação por 1 hora a -20°C, procedeu-se nova centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, e submetido a centrifugação como descrito na etapa anterior. Após a retirada do sobrenadante, o DNA plasmidial foi seco em estufa a 37°C e ressuspensado em água deionizada. As amostras foram estocadas a -20°C.

8.4. Preparação de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

O protocolo a seguir foi extraído do “Manual de transformação genética de plantas-modelos” da EMBRAPA – 2002. A Cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* foi

inoculada, a partir de colônia isolada, em 3 mL de meio LB contendo 6 μ L de rifamicina e 0,25 μ L de estreptomicina. As bactérias foram crescidas a 28°C sob agitação de 130 rpm até atingirem uma absorbância (600 nm) entre 0,5 e 1,0. Em seguida, uma alíquota de 2 ml desse pré-inoculo foi transferida para 50 ml de meio LB, e as bactérias crescidas a 28°C sob agitação de 130 rpm até uma absorbância a 600nm entre 0,45 e 0,55. O meio de crescimento foi incubado em gelo por 15 minutos seguido de centrifugação a 4°C por 15 minutos a 1300 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas gentilmente com 1 mL de CaCl₂ (20 mM). Alíquotas de 100 μ L de células em suspensão em CaCl₂ foram transferidas para microtubos e a estes adicionou-se 15% (v/v) de glicerol estéril. Para constituir a cultura permanente, as alíquotas contendo as células competentes foram congeladas rapidamente, em nitrogênio líquido, sendo posteriormente mantidas a -80°C.

9. Referências bibliográficas

ALFENAS, P.F. **Identificação de genes diferencialmente expressos na interação tomateiro – potyvirus**. 2006 59f. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Doctor Scientae”. Universidade federal de Viçosa, Viçosa

ALFENAS-ZERBINI, P. et al. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, p.352–361, mar.,2009.

AOKI, K. et al. Destination-Selective Long-Distance Movement of Phloem Proteins. **The Plant Cell**, v. 17, p.1801–1814, jun., 2005

BAREL, G.; GINZBERG, I. Potato skin proteome is enriched with plant defence components. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3347–3357, jul., 2008.

BARNES, A. et al. Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p.1473–1481, jul., 2004.

BELLAFFIORE, S. et al. Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLoS Pathogens**, v. 4, p.1-12, out., 2008.

BERKOWITZ, O. et al. Characterization of TCTP, the Translationally Controlled Tumor Protein, from *Arabidopsis thaliana* **Plant Cell**, v.20, p. 3430-3447, dez.,2008.

BOMMER, U.A. et al. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. **RNA**, v.8, p.478-496, abr., 2002.

BOMMER, U.A.; THIELE B.J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p.379-385. mar., 2004.

CANS, C. et al. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 100, p.13892–13897, nov., 2003.

CARRINGTON, J.C. et al. Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. **The Plant Cell**, v. 8, p.1669-1681, out., 1996.

CHEN, Z. et al. The expression of AmphiTCTP, a TCTP orthologous gene in amphioxus related to the development of notochord and somites. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.147, p. 460–465, jul., 2007.

DEPROST, D. et al. An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 326 p. 844–850, jan., 2005.

DEPROST, D. et al. The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield stress resistance and mRNA translation. **EMBO Reports**, v. 8, p.864-870, ago. 2007.

EMPRESA BRASILEIRA PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Metodologias para Transformação Genética de Plantas-Modelo**. Brasília, 2002.

ERMOLAYEV, V.; WESCHKE, W.; MANTEUFFEL, R. Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. **Journal of Experimental Botany**, v.54, p.:2745-2756, dez., 2003.

EVANS T.G.; SOMERO G.N. Protein-protein interactions enable rapid adaptive response to osmotic stress in fish gills. **Communicative & Integrative Biology**, v.2, p.94-96; mar., 2009.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M. et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v. 8, p.1-12, dez., 2008.

FAUQUET, C.M. et al. **Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, p 819–841, 1995.

GRAIDIST, P. et al. Establishing a role for shrimp fortilin in preventing cell death, **Aquaculture**, v. 255, p. 157–164, maio, 2006.

GRAIDIST, P. et al. Fortilin binds Ca²⁺ and blocks Ca²⁺-dependent apoptosis in vivo. **Biochemical Journal**, v. 408, p. 181–191, dez., 2007.

GROSS, B. et al. cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.8367, out., 1989.

HINOJOSA-MOYA, J. et al. Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. **Journal of Molecular Evolution**, v. 66, p. 472-483, maio, 2008.

HSU, Y.C. et al. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. **Nature**, v. 445, p. 785–788, mar. 2007.

HWANG, I; ROBINSON D.G. Transport vesicle formation in plant cells. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.660–669, out., 2009.

ITZEN, A., et al. Nucleotide exchange via local protein unfolding structure of Rab8 in complex with MSS4. **The EMBO Journal**, v.25, p.1445-1455, mar., 2006.

INOKI, K., GUAN, K., L. Complexity of the TOR signaling network. **TRENDS in Cell Biology**, v.16, p.206-213, abr., 2006.

JAGUS, R.; JOSHI, B.; BARBER, G.N. PKR, apoptosis and cancer. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.31, p.123–138, jan., 1999.

JONES, A.M.E. et al. Modifications to the arabidopsis defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. **Plant Physiology**, v.142, p.1603–1620, dez., 2006.

JUNG, J. et al. Translationally controlled tumor protein interacts with the third cytoplasmic domain of Na,K-ATPase subunit and inhibits the pump activity in HeLa Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 49868–49875, nov., 2004.

KANG, H.S. et al. Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor. **Journal of Immunology**, v.166, p.6545–6554, mar., 2001.

KIM, M.J. et al. Transgenic overexpression of translationally controlled tumor protein induces systemic hypertension via repression of Na⁺,K⁺-ATPase. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 44, p.151–159, jan., 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680–685, ago. 1970.

LEIBER, R.M., et al. The TOR Pathway Modulates the Structure of Cell Walls in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.22, p. 1898-1908, jun., 2008.

LIAO, M.; LI, Y.; WANG, Z. Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach. **Proteomics**, v. 10, p. 2809-2819, maio, 2009.

LI, F.; ZHANG, D.; FUJISE, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.47542–47549, dez., 2001.

LI, Z. et al. Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor. **Virology**, v. 385, p. 245-260, mar., 2009.

LIU, H. et al. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. **Molecular Cell Biology**, v.25, p.3117-3126, abr., 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, dez., 2001.

LLISO, I. et al. Protein changes in the albedo of citrus fruits on postharvesting storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.9047-9053, out., 2007.

LØVDAL, T.; LILLO, C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. **Analytical Biochemistry**, v.387, p. 238–242, jan., 2009.

MACDONALD, S.M. et al. Immune mimicry in malaria: Plasmodium falciparum secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 98, p.10829– 10832, set., 2001.

MAIA, I.G.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **Journal of General Virology**, v.77, p. 335-1341, jul., 1996.

PENG, Y.H. et al. Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. **Journal of General Virology**, v. 79, p.897-904, abr., 1998.

PENG, L. et al. Hepatitis C virus NS5A activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, contributing to cell survival by disrupting the interaction between FK506-binding

protein 38 (FKBP38) and mTOR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 20870-20881, jul., 2010.

RAO, K.V. et al. Cloning and Characterization of a Calcium-binding, Histamine-releasing Protein from *Schistosoma mansoni* **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, p. 31207–31213, ago., 2002.

RIECHMANN, J.L.; LAIN, S.; GARCIA, J.A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **Journal of General Virology**, v.73, p.1-16, jan.,1992.

RINNERTHALER, M. et al. MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1757, p.631-638, maio, 2006.

RITZENTHALER, C. et al. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. **Journal of Virology**, v.76, p.8808-8819, set., 2002.

SAGE-ONO, K. et al. Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis*. **Plant and Cell Physiology**, v.39, p.357-360, mar., 1998.

SCHAAD, M. C.; JENSEN, P. E.; CARRINGTON, J. C. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. **The EMBO Journal**. v.16, p.4049–4059, jul., 1997.

SERFONTEIN, J. et al. Evolution of the TSC1/TSC2-TOR Signaling Pathway. **Science Signaling**, v.3, p.1-6, jun., 2010.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. Wallingford, U.K.: CAB International. 516 p. 1994.

SÖNNICHSEN, B. et al. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v.434, p. 462-469, mar., 2005.

TONGANUNT, M. et al. The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) infection. **Fish Shellfish Immunology**, v. 25, p. 633-637, nov., 2008.

THAW, P. et al. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide free chaperones. **Nature**, v.8, p.701-704, ago., 2001.

THIVIERGE, K. et al. Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. **Virology**, v. 377, p. 216-225, jun., 2008.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, v.74, p. 157–175, abr., 2001.

VEENA, H.J.; DOERGE, R.W.; GELVIN, S.B. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. **Plant Journal**, v.35, p. 219–236, jul., 2003.

WEI, T.; WANG, A. Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner. **Journal of Virology**, v.24, p. 12252–12264, dec., 2008.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR Signaling in Growth and Metabolism. **Cell**, v.124, p.471-484, fev., 2006

YAMAJI, Y. et al. Significance of eukaryotic translation elongation factor 1A in tobacco mosaic virus infection. **Archives of Virology**, v. 155, p. 263-268, fev., 2010 .

YANG, X. et al. Expression profile analysis of genes involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3661–3674, set., 2008.

YARM, F.R. Plk phosphorylation regulates the microtubulestabilizing protein TCTP. **Molecular Cell Biology**, v.22, p.6209–6221, set., 2002.