

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE QUE CODIFICA A TCTP**  
**(*Translationally Controlled Tumor Protein*) EM TOMATE (*Solanum lycopersicum***  
**cv. Santa Clara)**

Laura Migliorini de Araujo

2011

Laura Migliorini de Araujo

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE QUE CODIFICA A TCTP**  
**(*Translationally Controlled Tumor Protein*) EM TOMATE (*Solanum lycopersicum***  
**cv. Santa Clara)**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas na área de Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu

2011

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

Araujo, Laura Migliorini de.

Caracterização molecular do gene que codifica a TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) em tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) / Laura Migliorini de Araujo. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20203004

1. Genética vegetal. 2. Genética molecular. 3. Tomate.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*; TCTP; Tomate.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, que me proporcionou uma força e perseverança incríveis durante todo esse período, sem as quais nada seria possível. Obrigada por todos os desafios e pela capacidade e vontade de superá-los. Obrigada por todas as pessoas que entraram em minha vida. Obrigada pela oportunidade de estar onde estou.

A meus pais, para quem não tenho palavras para descrever o amor que sinto e o tamanho da minha gratidão por tudo que me proporcionaram durante toda a minha vida e, especialmente, durante a graduação. Obrigada pelo carinho, pelo apoio, pela confiança, pela compreensão e por todo o esforço feito para que tudo ficasse bem. Obrigada por estarem sempre comigo mesmo tão longe, e por levantarem minha cabeça a cada vez que pensei em desistir. É por eles que faço e sempre farei o meu melhor.

Ao meu irmão Lucas, quem admiro demais e por quem sinto muito orgulho, sempre me mostrando, mesmo sem perceber, como ser alguém melhor.

Aos meus avós Orlando e Zenira e toda a minha família, que amo demais! Obrigada por tudo, tudo mesmo e espero nunca desapontá-los.

A Bruno Moda, que acompanhou de perto todo esse percurso, e passou a ser logo no início de tudo uma grande razão para que eu deixasse de lado minha tristeza por sair de casa e por estar aqui. Obrigada pelo carinho, amizade, compreensão e, principalmente, pela paciência. Obrigada por me fazer seguir em frente e abrir meus olhos para tanta coisa. Obrigada por estar ao meu lado nos bons momentos, mas acima de tudo, naqueles em que eu pensei que tudo daria errado. Obrigada por estar na minha vida e fazê-la melhor todos os dias.

A Talita Mazzoni, com quem aprendi muito, muito mais do que havia sido estabelecido e que, acredito eu, não faz idéia da contribuição que teve em minha

formação acadêmica. Obrigada por me ensinar sobre o epitélio germinativo das carpas, mas mais do que tudo, obrigada por me ensinar o que é ser incrível! Sou muito feliz por tê-la conhecido e por tê-la como um grande exemplo a ser seguido, não só no modo de fazer pesquisa, mas também na vida. Sem dúvidas, alguém eternamente *responsável* por mim.

Aos colegas de laboratório Cíntilla, Alessandra T., Alessandra V., Carol, Fábio (Escova), Flávio (Bonsai), Larissa (Pit), Juliana, Marcela e Rodrigo, por toda a ajuda, paciência e compromisso em ensinar sempre. Obrigada também pelo ambiente proporcionado, sempre muito divertido, que fez toda a diferença para o desenvolvimento do meu projeto e do meu gosto pela pesquisa. Como colega de bancada, mas diretamente responsável pelo meu projeto, tenho muito a agradecer ao Márcio, não só por tudo que me ensinou e tudo que fez por mim, mas também pela paciência e dedicação à minha formação e ao meu trabalho. A todos, um muito obrigada!

Aos alunos dos laboratórios dos professores Celso e Fábio, por toda a ajuda e companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Genética, pelo companheirismo e bons momentos.

Ao Prof. João Pessoa, pelo espaço cedido e uso do *Tempo Real*.

A Natalia Kaori, por toda a paciência, compreensão e companheirismo em casa, todos os dias.

À professora que será sempre uma inspiração e um modelo a ser seguido por mim, Irani Quagio-Grassiotto, por despertar minha paixão pela Biologia Celular e Molecular e auxiliar na definição do que eu realmente gosto de estudar. Obrigada pelas oportunidades, pela confiança, pelos conselhos e tudo que foi feito por mim.

Finalmente, um muito obrigada ao meu orientador que muito admiro, Ivan de Godoy Maia. Muito obrigada por me acolher em seu laboratório, por confiar e acreditar em mim, por acreditar no meu projeto, pela paciência, e por estar sempre disposto a resolver o que quer que tenha dado errado. Obrigada pelos conselhos e pela orientação, não só referentes ao projeto. Obrigada por todas as aulas e pela oportunidade de encontrar, em meio a tantas áreas da Biologia, aquela que me definiu e me fez ter paixão pela pesquisa.

*ACASO*

*Cada um que passa em nossa vida  
passa sozinho, pois cada pessoa é única  
e nenhuma substitui outra  
Cada um que passa em nossa vida  
passa sozinho, mas não vai só  
nem nos deixa só  
Leva um pouco de nós mesmos  
deixa um pouco de si mesmo  
Há os que levam muito  
mas há os que não levam nada  
Essa é a maior responsabilidade de nossa vida  
e a prova de que duas alma  
não se encontram ao acaso*

*Antoine de Saint-Exupéry*

## 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 dessa proteína em plantas. No presente trabalho, a expressão do gene que codifica a TCTP foi analisada em diferentes órgãos/tecidos do tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara). A quantificação, realizada por RT-qPCR, revelou a presença do transcrito da TCTP em todos os diferentes tecidos/órgãos analisados, sendo o maior nível de expressão encontrado nas folhas. Com exceção de frutos em estágio intermediário de maturação, em que foi detectado um pequeno aumento, a variação na expressão relativa da TCTP para os demais órgãos/tecidos foi mínima. Paralelamente, os efeitos da expressão constitutiva da TCTP foram investigados empregando linhagens transgênicas de tabaco capazes de superexpressar essa proteína em diferentes níveis (T1, T2 e T3). Plântulas das referidas linhagens, e de um controle não transgênico, foram cultivadas em meio de cultura MS durante 21 dias. Ao final desse período, o comprimento das raízes e das folhas foi registrado e as plântulas fotografadas. Através do Teste de Tukey, a análise das médias do comprimento da raiz revelou uma diferença significativa entre as linhagens T1 e T3 em relação ao controle, ao passo que o mesmo não foi verificado para a linhagem T2. Para as folhas, segundo o teste de Kruskal-Wallis, diferenças estatísticas entre as médias de crescimento em cada uma das linhagens avaliadas foram detectadas. Pelos resultados obtidos, pôde-se constatar o caráter ubíquo da TCTP em tomate, sendo sua maior expressão detectada em folhas, e, ainda, que sua superexpressão promoveu um maior crescimento radicular e foliar em duas das três linhagens transgênicas de tabaco testadas.

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum*; TCTP; tomate.

## **Abstract**

The gene encoding TCTP (*Translationally Controlled Tumour Protein*) is present in all eukaryotes and its product is involved in various cellular processes. Although well characterized in mammals, there are only few works available in the literature related to the analysis of this protein in plants. In this present work, the expression of the gene encoding TCTP was analyzed in different organs/tissues of tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara). A quantification performed by RT-qPCR revealed the presence of TCTP transcript in all tissues/organs analyzed, with the highest expression level found in leaves. With the exception of fruits in intermediate stage of maturation, for which a small increase on the expression was detected, there was minimal variation in the relative expression of TCTP in other organ/tissues. In parallel, the effects of the constitutive expression of TCTP were investigated using transgenic tobacco lines able to overexpress this protein at different levels (T1, T2 and T3). Seedlings of these lines, and of a non-transgenic control line, were grown in MS culture medium for 21 days. At the end of this period, the length of roots and leaves was taken and the seedlings were photographed. According to Tukey's test, the analysis of the mean root length revealed a significant difference between T1 and T3 lines when compared to the control, although the same was not observed for the T2 line. For leaves, according to Kruskal-Wallis test, there was a statistical difference between the averages of leaf growth obtained for the different lines evaluated. According to these results, we can conclude that TCTP shows an ubiquitous expression in tomato plants, with the highest expression detected in leaves, and also that its overexpression promoted a higher root and leaf development in two of three transgenic tobacco lines tested.

**Key words:** *Solanum lycopersicum*; TCTP; tomato.

## SUMÁRIO

I. Introdução.....	11
II.1 A proteína TCTP .....	11
II.2 A TCTP em plantas .....	15
II. Objetivos .....	19
III. 1 Objetivos específicos .....	19
III. CAPÍTULO I.....	20
1. Material e Métodos .....	20
1.1 Extração de RNA total e análise da expressão relativa da TCTP por RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR).....	20
2. Resultados .....	25
2.1 Quantificação da expressão relativa da TCTP .....	25
IV. CAPÍTULO II.....	29
1. Material e Métodos .....	29
1.1 Material vegetal.....	29
1.2 Cultivo das sementes.....	30
1.3 Análise do crescimento das plântulas .....	31
2. Resultados .....	32
2.1 Análise de crescimento radicular e foliar .....	32
V. Discussão geral.....	35
VI. Conclusões.....	38
VII. Referências bibliográficas .....	39

# I. Introdução

## II.1 A proteína TCTP

O gene que codifica a TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) está presente em todos os eucariontes e parte da sua seqüência é altamente conservada entre os diferentes filos. Devido a sua massa molecular de 23 kDa, essa proteína também é conhecida como P23 ou Q23. Trata-se de uma proteína multifuncional envolvida em diferentes processos celulares, como o crescimento e desenvolvimento celular. Apesar de sua descrita multifuncionalidade, seu papel molecular ainda não está totalmente definido e, em alguns casos, seu modo de ação permanece obscuro.

Inicialmente isolada e identificada a partir de células tumorais humanas (Gross *et al.*, 1989), sua denominação se deve ao relatado controle traducional de sua síntese (Chitpatima *et al.*, 1988). Entretanto, proteínas homólogas à TCTP foram identificadas em outras espécies e, nesse caso, demonstrou-se que o controle pode ocorrer também em 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, sendo que entre as seqüências mais conservadas, a identidade pode chegar a 90% (Sage-Ono *et al.*, 1998). 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 seis subunidades da bomba sódio e potássio (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008; Bommer e Thiele, 2004; Berkowitz *et al.*, 2008, Jung *et al.*, 2004). Diversos estudos em leveduras e linhagens celulares humanas sugerem um papel da TCTP na regulação do crescimento e

controle do ciclo celular através de sua fosforilação por uma proteína quinase e interação com proteínas regulatórias, como a MCL1 (*Myeloid Cell Leukemia*) (Gachet *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Yarm, 2002).

Conforme o grupo taxonômico, a TCTP pode desempenhar diferentes funções. Em animais, essa proteína é responsável pela liberação da histamina em eventos inflamatórios (MacDonald *et al.*, 2001), além de exercer um controle positivo na proliferação de linfócitos B (Kang *et al.*, 2001). No anfíbio, a TCTP está envolvida na diferenciação de alguns tecidos, desempenhando um importante papel durante o desenvolvimento embrionário, principalmente durante a diferenciação da mesoderme (Chen *et al.*, 2007).

A TCTP pode formar complexos protéicos com outras proteínas mudando a atividade das mesmas, como é o caso da bomba de sódio e potássio, responsável pela homeostase iônica e pelo potencial de membrana celular. Em camundongos transgênicos com super-expressão da TCTP, essa proteína induz à hipertensão sistêmica atuando como repressora citoplasmática da bomba, ligando-se ao seu domínio  $\alpha$ -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 a estresse osmótico, a TCTP, que está associada e inibindo a atividade da bomba de sódio e potássio, é recrutada por proteínas envolvidas na resposta primária desse estresse, de forma a promover o processo osmoregulatório (Evans e Somero, 2009).

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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  foi assim sugerida.

Outro importante papel desempenhado pela TCTP está relacionado a processos de sinalização celular em animais e fungos. Análises da seqüência deduzida de aminoácidos da TCTP de *Schizosaccharomyces pombe* demonstraram uma alta similaridade desta com a proteína MSS4/DSS4 de mamíferos (Thaw *et al.*, 2001; 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 proteínas 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 (RNAi), 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.

Adicionalmente, tanto a Rheb como a TCTP podem atuar como fatores regulatórios de uma importante via de sinalização conhecida como TOR (*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).

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 $\alpha$  (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 $\beta$  (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.

Nos parasitas, observou-se que a TCTP, além de regular a proliferação e diferenciação celular (Li, 2009), também pode interagir com a proteína G responsável pela sinalização celular. Acredita-se que a TCTP de alguns parasitas como *Plasmodium* sp. (MacDonald *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. O uso de RNAi para silenciar a TCTP em *Caenorhabditis elegans*

promoveu crescimento lento, infertilidade na progênie e letalidade embrionária nos indivíduos em que o gene foi silenciado (Sönnichsen *et al.*, 2005).

## II.2 A TCTP em plantas

Proteínas homólogas à 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. Em células de soja submetidas a estresse iônico, essa proteína pode ser responsável pela regulação da homeostase do cálcio em células de soja submetidas a estresse iônico (Ermolayev *et al.*, 2003). 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, o papel *in vivo* da TCTP foi evidenciado empregando a planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Berkowitz *et al.*, 2008). Segundo os autores, tanto a superexpressão da proteína como seu silenciamento foram 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 mesmos, o que é característico 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 *A. 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 (Ermolayev *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 seqüência 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.*, 2008, 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.

## **II. Objetivos**

O objetivo geral deste trabalho consiste na caracterização do gene que codifica a TCTP em tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) que será usado como modelo experimental. Para tal, análises de expressão gênica em tomate e funcionais empregando plantas de tabaco capazes de superexpressar a TCTP foram realizadas.

### **III. 1 Objetivos específicos**

- Investigar a expressão do gene que codifica a TCTP em diferentes órgãos/tecidos de plantas de tomateiro (Capítulo I).
- Analisar o impacto da superexpressão da TCTP no crescimento de diferentes linhagens transgênicas de tabaco (Capítulo II).

### III. CAPÍTULO I

*Estudo da expressão relativa do gene que codifica a TCTP em diferentes  
órgãos/tecidos em plantas de tomate*

#### 1. Material e Métodos

##### 1.1 Extração de RNA total e análise da expressão relativa da TCTP por RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

O RNA total de raiz, caule, folha, flor e frutos em diferentes estágios de maturação (verde, amarelo e vermelho) de diferentes exemplares selvagens de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) foi extraído com o uso do reagente TRIZOL (Invitrogen) conforme o protocolo do fabricante, sendo escolhidas as amostras que apresentaram melhor qualidade. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, e a cerca de 100 mg do material vegetal macerado foi adicionado 1 mL do reagente TRIZOL. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, para então 200 µL de cloroformio serem adicionados aos tubos. 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 de cada amostra 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 ressuspenso 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 eliminação de 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 (1 u/ µL) (Invitrogen), 2 µL de tampão (10x com MgCl<sub>2</sub>) 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 oligo-dT (estoque a 10 mM), 2 µL de dNTP *mix* (dGTP, dCTP, dATP, dTTP – estoque a 10 mM) 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 aos tubos 2 µL de DTT 0,1 M, 0,5 µL da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (200 u/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 30 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 12  $\mu\text{L}$ , sendo esta realizada em triplicata empregando placas de 96 poços. Os componentes da reação estão listados na Tabela 1.

Os genes normalizadores utilizados como referência nas reações de qPCR foram selecionados a partir de 12 genes candidatos (Tabela 2; Carvalho, 2010). O desenho dos *primers* para amplificação da *TCTP* e dos referidos genes normalizadores foi realizado usando o software *Primer Express 2.0* (APPLIED BIOSYSTEMS). As sequências destes *primers*, e respectivas referências bibliográficas, estão disponibilizadas na Tabela 2.

O cálculo para a determinação da expressão gênica foi o do  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001), o qual se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal foi usada a fórmula  $\text{QR} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , onde QR representa o nível de expressão gênica; Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial;  $\Delta\text{Ct}$  se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene referência, e  $\Delta\Delta\text{Ct}$  representa a diferença entre o  $\Delta\text{Ct}$  da amostra de interesse em determinado tempo e o  $\Delta\text{Ct}$  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 Ct de cada alíquota, a curva padrão foi elaborada e o *slope* da reta foi determinado. Este valor foi então inserido na seguinte fórmula:  $11^{(1/\text{slope})}$ .

**Tabela 1.** Componentes da reação de qPCR para quantificação da expressão relativa do gene *TCTP*.

<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade e concentração</b>
SYBR <i>Green/ROX MasterMix</i> (2x)	6,25 $\mu$ L (1x)
<i>Primers - Forward e Reverse</i> (10 mM)	0,3 $\mu$ L (300 nM)
cDNA (30 ng/ $\mu$ L)	1,0 $\mu$ L
Água	3,2 $\mu$ L

**Tabela 2.** Descrição dos oligonucleotídeos usados nas reações de qPCR.

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

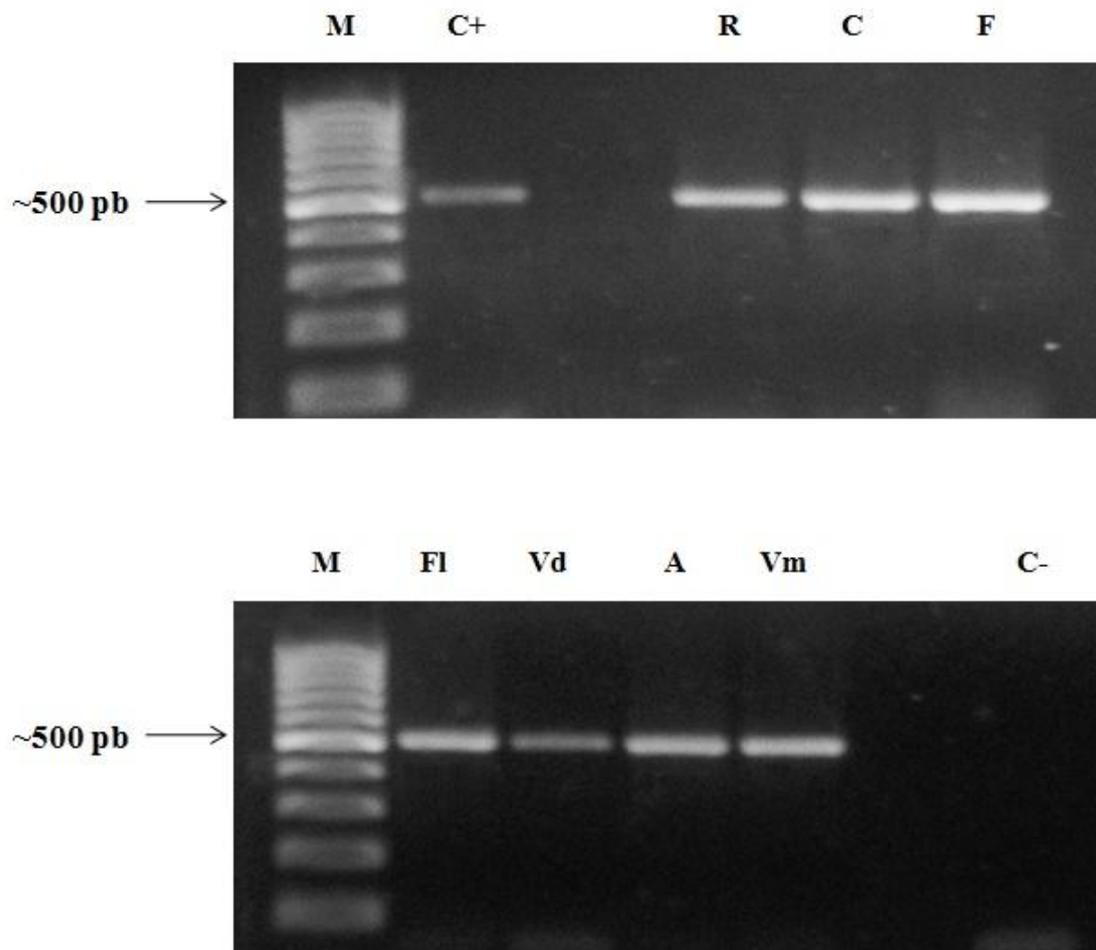
1-Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009; 2-Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008; 3-Lovdal e Lillo, 2009

## 2. Resultados

### 2.1 Quantificação da expressão relativa da TCTP

Com a finalidade de determinar o perfil de expressão do gene que codifica a TCTP nos diferentes tecidos/órgãos em plantas de tomate, usou-se a quantificação relativa por meio da técnica de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Para tanto, o RNA total foi extraído a partir de raiz, caule, folha, flor, e frutos em diferentes estágios de maturação (verde, amarelo e vermelho) de tomate.

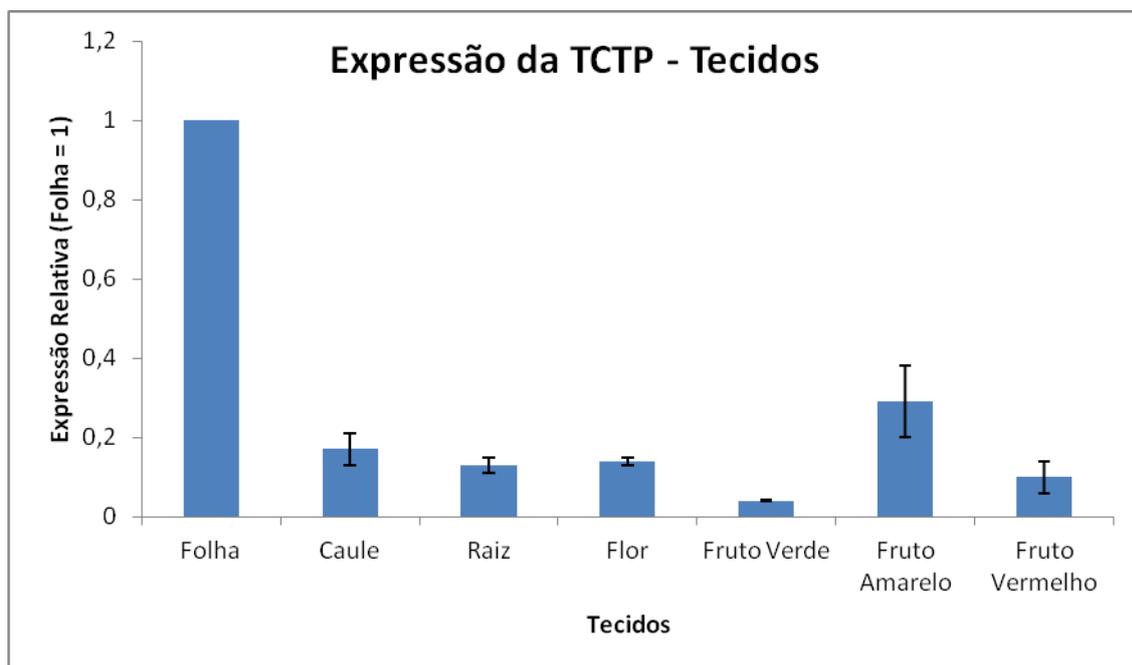
Depois de extraído, o RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e sua integridade verificada em gel desnaturante de agarose a 1%. Antes da realização da análise de RT-qPCR, objetivando verificar a qualidade do RNA total extraído, a região codificadora da TCTP foi amplificada por RT-PCR usando *primers* específicos. Usando essa análise qualitativa, verificou-se a amplificação de um produto único de aproximadamente 500 pb em todas as amostras, revelando portanto, a presença de transcrito correspondente à TCTP em todos os tecidos/órgãos de tomate analisados (Figura 1).



**Figura 1:** Amplificação de *cDNA* correspondente à *TCTP* nas amostras de *RNA total* extraído dos tecidos/órgãos de tomate. **M:** Marcador Molecular de 100 pb; **C+:** Controle Positivo; **R:** Raíz; **C:** Caule; **F:** Folha; **Fl:** Flor; **Vd:** Fruto Verde; **A:** Fruto Amarelo; **Vm:** Fruto Vermelho; **C-:** Controle Negativo (mix de reagentes de RT-PCR sem adição de RNA).

Para a seleção do melhor gene normalizador foram testados *primers* para 12 genes candidatos (Tabela 2), os quais foram previamente selecionados por serem considerados constitutivos (Carvalho, 2010). Esses *primers* foram validados em reações de RT-qPCR empregando amostras de diferentes órgãos/tecidos do tomateiro, e o gene *Ubiquitina (UBI)* foi aquele que apresentou a menor variação de expressão entre as amostras. A eficiência da reação considerada para os cálculos de quantificação relativa 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 a quantificação relativa.

Tomando-se o nível de expressão encontrado em folhas como padrão (equivalente a 1), a expressão relativa da TCTP nos demais órgãos/tecidos foi calculada, resultando no gráfico representado na Figura 2.



**Figura 2:** Análise da expressão relativa da TCTP em diferentes órgãos/tecidos de tomateiro. A expressão foi determinada de acordo com a expressão encontrada em folhas, sendo os demais valores relativos a esse órgão. Os dados estão representados pela média  $\pm$  desvio padrão entre as réplicas quando normalizadas pelo gene de referência (*Ubiquitina*).

Pelo gráfico é possível constatar que o gene que codifica a TCTP de tomate é expresso de forma ubíqua, sendo essa expressão mais exacerbada em folhas, quando comparada aos demais órgãos/tecidos analisados. Com exceção das folhas, a variação na expressão relativa da TCTP nos órgãos vegetativos (caule e raiz) e reprodutivos (flor e frutos) foi mínima, exceção feita a frutos em estágio intermediária de maturação (amarelos), onde um pequeno aumento de expressão foi detectado.

## IV. CAPÍTULO II

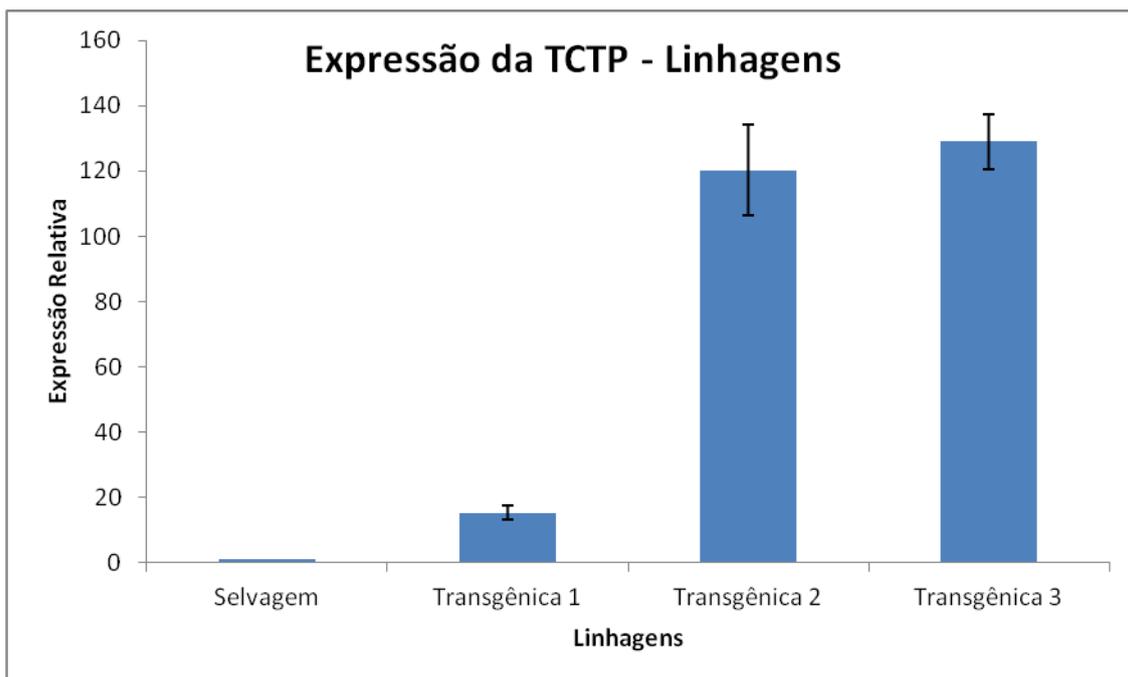
### *Análise do impacto da superexpressão da TCTP em plantas transgênicas de tabaco*

#### **1. Material e Métodos**

##### **1.1 Material vegetal**

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) transformadas com um cassete de expressão contendo a região codificadora da TCTP de tomate sob controle de um duplo promotor 35S (obtidas por Carvalho, 2010) foram empregadas para avaliar o impacto da superexpressão dessa proteína no crescimento e desenvolvimento. Três linhagens transgênicas da geração R7 (denominadas T1, T2 e T3), correspondentes a eventos independentes de transformação, e apresentando diferentes níveis de expressão do transgene (Carvalho, 2010), foram empregadas (Figura 3). Plantas de tabaco não transformadas foram usadas como controle.

As linhagens transgênicas 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 e vermiculita.



**Figura 3:** Níveis relativos de expressão da TCTP nas diferentes linhagens transgênicas de tabaco empregadas nesse estudo. Os dados referem-se às médias  $\pm$  desvio padrão entre as réplicas quando normalizadas pelo gene de referência EF. Tomando-se a expressão relativa na linhagem selvagem como padrão (equivalente a 1), pode-se comparar os diferentes níveis de expressão para cada linhagem, sendo este cerca de **15x** maior para a transgênica 1, **120x** maior para a transgênica 2 e **129x** maior para a transgênica 3 (Carvalho, 2010).

## 1.2 Cultivo das sementes

As sementes das linhagens transgênicas e de tabaco selvagem, usadas como controle, foram esterilizadas e colocadas para germinar visando à obtenção de plântulas estéreis. Para isso, as sementes foram inicialmente embebidas em água Milli-Q pelo período de uma hora, sendo em seguida imersas em etanol 70% por 1 minuto e lavadas por 2x com água Milli-Q autoclavada. Posteriormente, foram incubadas em solução de hipoclorito 70% por 10 minutos e lavadas por 5x com água Milli-Q autoclavada. Após a esterilização, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio MS

(Murashige e Skoog, 1992) e 0,23% de Phytigel (Sigma), e mantidas em câmara climatizada com fotoperíodo de 16 horas de luz artificial e temperatura entre 20-22°C.

### **1.3 Análise do crescimento das plântulas**

Para as análises de crescimento, 20 sementes de cada linhagem transgênica foram germinadas em placas de Petri contendo meio MS adicionado de canamicina. As sementes do controle selvagem (20 no total) foram germinadas em placas contendo meio MS sem antibiótico. As placas foram posicionadas verticalmente em câmara de crescimento, e o desenvolvimento das plântulas foi acompanhado durante 21 dias. Ao término do período de observação, os comprimentos das raízes principais e das folhas de cada plântula foram registrados, e as mesmas foram fotografadas. Para cada plântula, a medida da raiz corresponde ao seu tamanho desde o colo até sua extremidade mais distal, enquanto que a medida de uma das folhas, escolhida ao acaso, foi feita a partir de sua base até sua extremidade no sentido longitudinal.

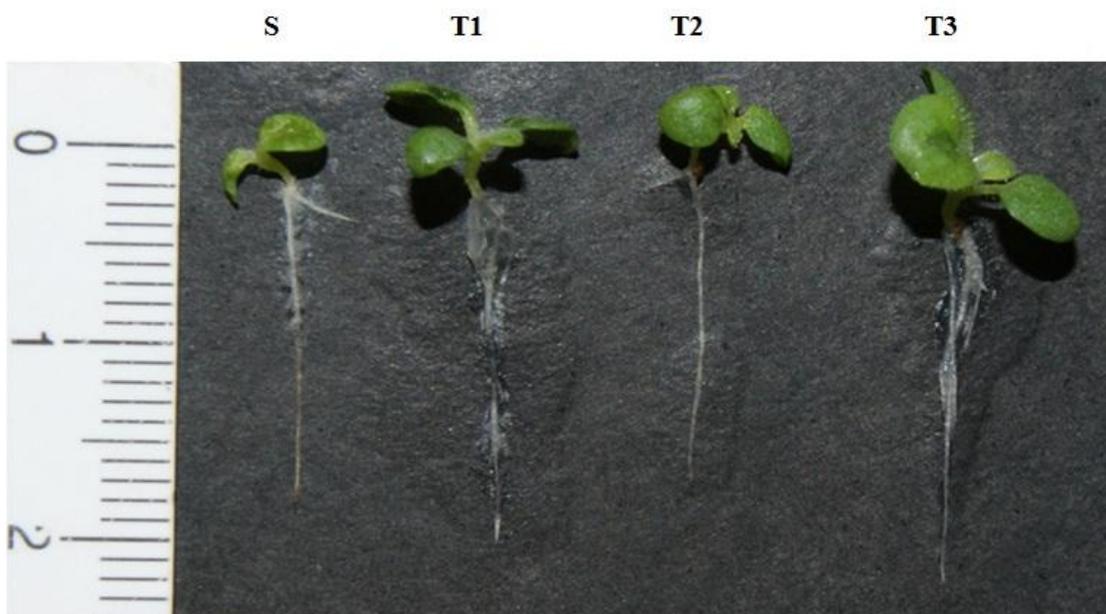
Para a análise estatística das médias obtidas para as raízes, foi verificado através do teste F ( $F = 27,83$ ;  $F$  crítico = 4,05;  $p < 0,01$ ) que estas apresentam distribuição normal, permitindo a comparação entre a média de cada linhagem transgênica com a média das plântulas selvagens através do Teste de Tukey (com  $p < 0,05$ ). No caso das folhas, não foi encontrado o mesmo padrão de distribuição, sendo necessária a utilização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (com  $p < 0,05$ ) para a comparação entre as médias obtidas para cada linhagem. Em ambos os casos, a análise estatística foi realizada através do *software* ASSISTAT.

## 2. Resultados

### 2.1 Análise de crescimento radicular e foliar

A fim de verificar o padrão de crescimento e desenvolvimento das plântulas de cada linhagem transgênica foram tomadas medidas do comprimento da raiz e folha. Os valores médios obtidos para cada linhagem transgênica foram então comparados àqueles obtidos para as plântulas de tabaco selvagem.

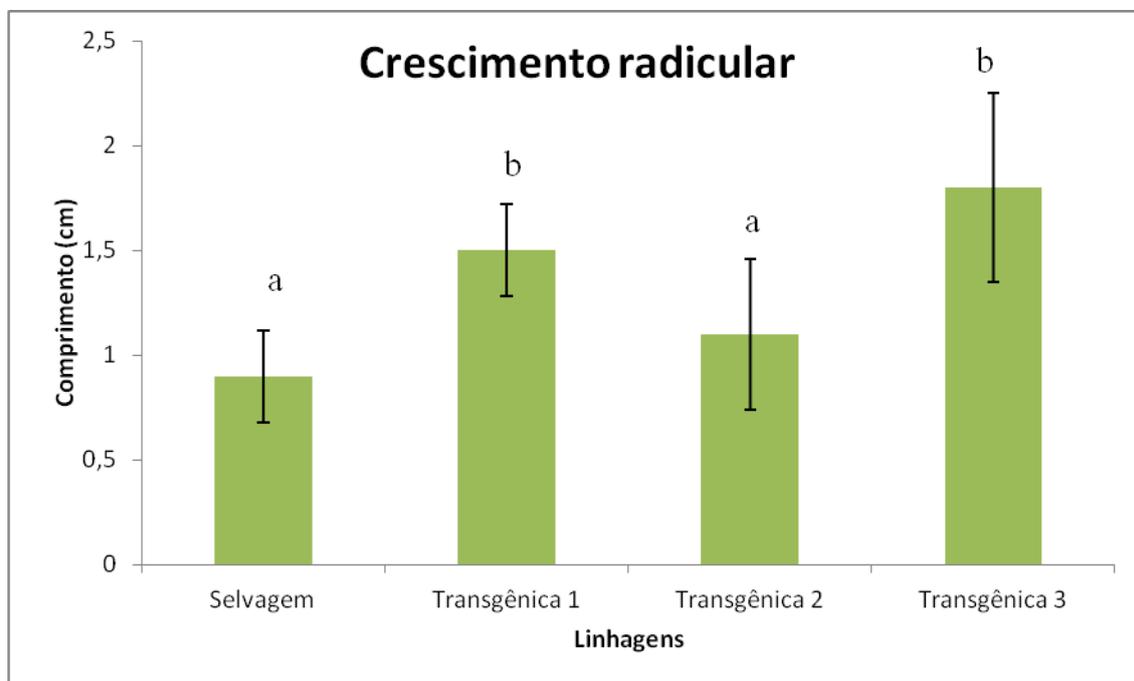
Pela análise global dos resultados foi possível constatar que tanto o crescimento radicular quanto o foliar, quando comparados aos observados para o controle, foram afetados de forma diferencial pela superexpressão da TCTP (Figura 4).



**Figura 4:** Plântulas de tabaco germinadas em meio MS após 15 dias. **S:** Linhagem selvagem (não-transgênica); **T1:** Linhagem transgênica 1; **T2:** Linhagem transgênica 2; **T3:** Linhagem transgênica 3. Uma plântula representativa de cada linhagem (ou controle) foi fotografada.

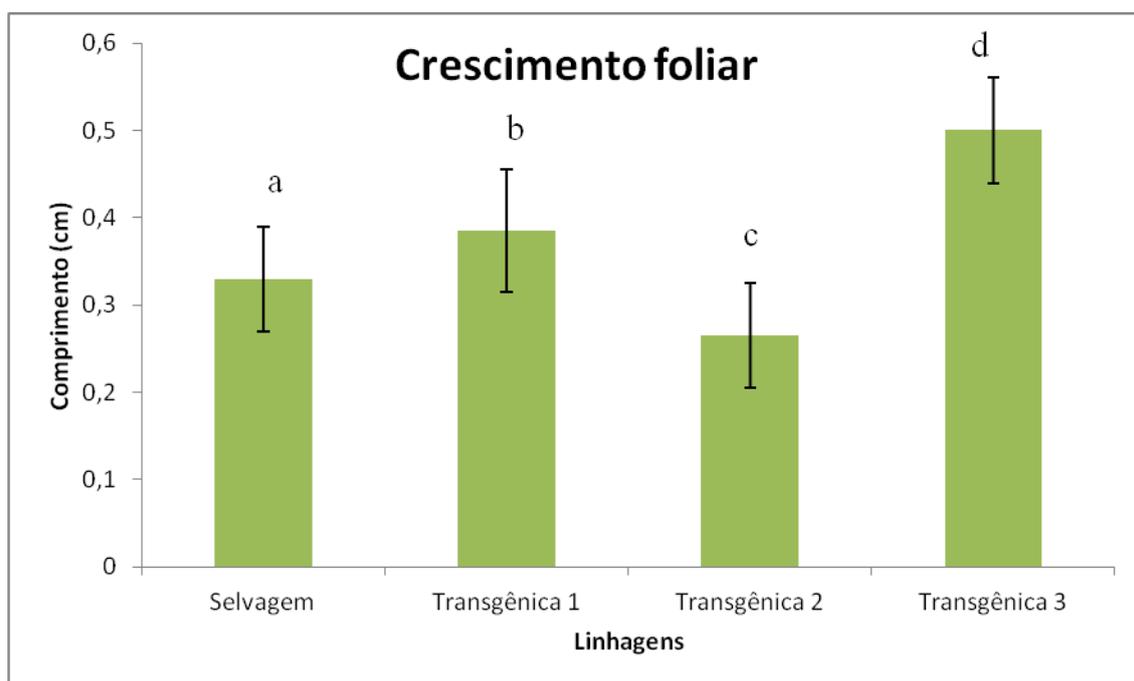
Como demonstrado na Figura 4, a análise visual revela uma diferença entre o tamanho da raiz principal das plântulas das linhagens transgênicas T1 e T3 em relação ao controle selvagem (S). Contudo, essa diferença não é observada quando se compara a linhagem transgênica T2 com o exemplar selvagem. A mesma observação é válida para a formação de raízes laterais secundárias, que foi mais abundante nas linhagens T1 e T3 enquanto que na linhagem T2 o padrão observado foi semelhante ao selvagem (Figura 4).

Quando as médias do comprimento da raiz principal foram comparadas pelo Teste de Tukey, uma diferença significativa entre o crescimento radicular das linhagens transgênicas T1 e T2 em relação ao controle (selvagem) pode ser constatada (Figura 5). No entanto, essa diferença não foi significativa quando a linhagem transgênica T2 foi comparada ao controle.



**Figura 5:** Crescimento radicular médio das diferentes linhagens de tabaco. Os dados representados correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão obtidas para o comprimento da raiz principal de 20 plântulas de cada linhagem analisada. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Já para o crescimento foliar, diferenças significativas entre as linhagens transgênicas e o controle selvagem foram encontradas. Por não apresentarem distribuição normal, as médias para o comprimento das folhas foram analisadas segundo o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0,01$ ). O resultado obtido confirmou estatisticamente a diferença entre as médias de crescimento das folhas em cada uma das linhagens avaliadas (Figura 6). Nesse caso, o comprimento médio das folhas das linhagens transgênicas T1 e T3 foi significativamente maior que aquele obtido para a linhagem selvagem, sendo a média da linhagem T3, a maior entre todas. Por outro lado, o valor médio obtido para a linhagem transgênica T2 foi o menor entre as quatro linhagens analisadas.



**Figura 6:** Crescimento foliar médio das diferentes linhagens de tabaco. Os dados representados correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão obtidas para o comprimento da folha principal escolhida ao acaso de 20 plântulas de cada linhagem analisada. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

## V. Discussão geral

O papel da TCTP em organismos eucariontes, especialmente em plantas, permaneceu obscuro durante um longo período de tempo. A dificuldade de estudar sua função reside em seu amplo envolvimento em diversos processos celulares aparentemente não-relacionados, como a liberação de histamina em animais, formação de microtúbulos e osmorregulação iônica. Através de estudos de caracterização molecular em tomate e funcional empregando plantas de tabaco capazes de superexpressar a TCTP, algumas dessas funções puderam ser melhor elucidadas.

A análise do perfil de expressão do gene que codifica a TCTP em tomate revelou seu caráter ubíquo, sendo sua expressão detectada em todos os tecidos/órgãos analisados. Os transcritos da TCTP foram observados tanto em órgãos vegetativos (folha, caule e raiz) quanto em órgãos reprodutivos (flor e diferentes estágios de desenvolvimento do fruto), indicando uma associação entre a sua presença e os tecidos fisiologicamente ativos da planta como previamente descrito para *Arabidopsis thaliana* (Berkowitz *et al.*, 2008).

Segundo a literatura, a expressão da TCTP, apesar de ubíqua, apresenta uma grande variação conforme o órgão/tecido analisado, mostrando-se aumentada em tecidos mitoticamente ativos (Thiele *et al.*, 2000). No caso do tomate, a expressão foi mais acentuada em folhas, seguida pelo fruto no estágio intermediário de maturação (amarelo), caule, flor, raiz, fruto nos estágios vermelho e verde, nessa ordem. Já em *A. thaliana*, um maior nível de expressão da TCTP foi encontrado em raízes, seguida pelos frutos, flores e, finalmente, folhas (Berkowitz *et al.*, 2008).

Na literatura encontram-se diversas referências ao papel da TCTP no ciclo celular, sendo de grande importância para a divisão e crescimento das células. Em

*Caenorhabditis elegans*, o uso de RNAi e o conseqüente silenciamento do gene que codifica a TCTP resultou em fenótipos de crescimento lento (Kamath *et al.*, 2003), assim como o knockout do gene que codifica a TCTP é letal nos estágios iniciais da embriogênese de camundongos, *Drosophila* e *C. elegans* (Sonnichsen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007).

Em *A. thaliana*, o *knockout* do gene da TCTP resultou na formação de tubos polínicos com crescimento retardado, em conseqüência da presença do alelo mutado nos grãos de pólen (Berkowitz *et al.*, 2008). Por estar diretamente relacionada à via de sinalização TOR, responsável pela regulação do crescimento celular (Cheung e Wu, 2008), e atuar na regulação da proteína sinalizadora Rab, pertencente à super família de proteínas Ras GTPase, uma possível participação da TCTP na regulação de Rab GTPases envolvidas no crescimento do tubo polínico foi proposta. 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 determinada via. As proteínas da família Rab regulam a movimentação de vesículas celulares principalmente entre organelas, retículo endoplasmático e Golgi (Hwang e Robinson, 2009). Membros dessa família foram também relacionados com a regulação do crescimento da extremidade de ramificações na raiz (Molendijk *et al.*, 2001; Preuss *et al.*, 2004), sugerindo, assim, uma possível função da TCTP no desenvolvimento radicular semelhante àquele proposto para os tubos polínicos (Berkowitz *et al.*, 2008).

Nesse contexto, as plântulas de duas (T1 e T3) das três linhagens transgênicas de tabaco utilizadas no presente estudo apresentaram um maior crescimento radicular, o

qual que diferiu estatisticamente do controle não transgênico. Nessas linhagens, o sistema radicular apresentou ainda um maior número de raízes secundárias. Esses resultados sugerem que a superexpressão da TCTP, aproximadamente 15 vezes maior em T1 e 129 vezes maior em T3 quando comparadas ao controle selvagem, foi capaz de promover um maior crescimento e desenvolvimento das raízes em tais linhagens. Corroborando esses dados, o silenciamento do gene que codifica a TCTP em *A. thaliana* resultou em uma significativa redução do comprimento das raízes e da formação de raízes laterais quando comparadas às plântulas selvagens, embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa entre a linhagem selvagem e as linhagens silenciadas (Berkowitz *et al.*, 2008). De forma semelhante, a superexpressão de uma ROP2 GTPase nas raízes de *A. thaliana* levou à formação de extremidades múltiplas na mesma célula ou pêlos com diversas pontas (Jones, *et al.*, 2002). Globalmente, esses dados evidenciam uma importante função da TCTP no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular.

Resultados semelhantes aos obtidos para as raízes também foram observados quando se avaliou o crescimento foliar. Nesse caso, as linhagens T1 e T3 apresentaram folhas de maior comprimento se comparadas com o controle não transgênico, indicando que a superexpressão da TCTP também tem um efeito promotor de crescimento na parte aérea.

Estudos realizados em *A. thaliana* envolvendo o silenciamento do gene *AtTOR* (que codifica uma quinase TOR; Deprost *et al.*, 2007) e da TCTP (Berkowitz *et al.*, 2008), respectivamente, resultaram em fenótipos semelhantes, ou seja, as plantas apresentaram um retardo no crescimento vegetativo causado pela redução no crescimento celular. Constatou-se, por exemplo, uma redução no tamanho das células pavimentosas da epiderme foliar nas plantas silenciadas. Por outro lado, a

superexpressão de *AtTOR* em *Arabidopsis* resultou em um aumento do tamanho celular e conseqüente crescimento da planta (Deprost *et al.*, 2007), fato que não foi constatado em *Arabidopsis* que expressam constitutivamente a TCTP. Considerando a relatada hipótese de regulação da atividade TOR pela TCTP, é possível supor que a superexpressão da TCTP poderia promover um efeito semelhante ao constatado com a superexpressão de *AtTOR*, resultando em crescimento aumentado. Embora em *Arabidopsis* as linhagens transgênicas que superexpressavam a TCTP não diferiram fenotipicamente das selvagens (Berkowitz *et al.*, 2008), no caso do presente estudo empregando tomate como modelo, o aumento da expressão da TCTP resultou em promoção do crescimento, o que é compatível com a hipótese mencionada acima.

Com relação à linhagem transgênica T2, apesar desta apresentar um alto acúmulo de transcritos da TCTP (cerca de 120x), não foi possível constatar o mesmo aumento de crescimento observado para as outras duas linhagens testadas (T1 e T3). Este fato pode estar associado à conhecida regulação pós-transcricional da TCTP, especialmente a nível protéico, como observado em modelos animais. Em *Arabidopsis*, por exemplo, verificou-se que mesmo com altos níveis de expressão do transgene (13x em relação ao selvagem), não houve um acúmulo proporcional da proteína nas linhagens transgênicas analisadas (Berkowitz *et al.*, 2008). Esse fenômeno também poderia estar acontecendo na linhagem T2. Entretanto, novos estudos precisam ser realizados empregando a linhagem T2 para verificar essa possibilidade.

## VI. Conclusões

- O gene que codifica a TCTP de tomate é expresso de forma ubíqua, sendo a sua expressão mais abundante em folha.

- A superexpressão da TCTP promoveu um maior crescimento radicular e foliar em duas das três linhagens transgênicas de tabaco testadas.

## VII. Referências bibliográficas

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.

BELLAFIORRE, 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.
- CARVALHO, M. Estudo do papel da TCTP (*Translationally Controlled Tumour Protein*) na resposta aos estresses bióticos e abióticos em plantas. Dissertação de mestrado, IB, UNESP, 2010.
- CHEN, S., *et al.* A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue – or cell type – specific manner. **Mol. Cell. Biol.** 18: 2525 – 2532, 2007.
- 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.
- CHEUNG, A.Y.; WU, H.M. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. **Annu. Rev. Plant Biol.** 59: 547-572, 2008.
- CHITPATIMA, S.T. *et al.* Nucleotide sequence of a major messenger-RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.2350. 1988.
- 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.
- ERMOLAYEV, V. *et al.* 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 realtime RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v. 8, p.1-12, dez., 2008.
- GACHET, Y. *et al.* The growth-related, Translationally Controlled Tumor Protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. **J. Cell. Sci.** 112: 1257-1271, 1999.
- GRAIDIST, P. *et al.* Fortilin binds  $Ca^{2+}$  and blocks  $Ca^{2+}$ -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, may, 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.
- 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.
- JONES, M.A. *et al.* The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. **Plant Cell**. 14: 763-776, 2002.
- 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.
- KAMATH, R.S. *et al.* Systematic functional analysis of *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. **Nature**, 421, 231-23, 2003.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- LOVDAL, 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.
- MOLENDIJK, A.J. *et al.* *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. **EMBO J.** 20:2779-2788, 2001.
- 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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 44, p.151–159, jan., 2008.
- LI, F. *et al.* Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **J. Biol. Chem.** 276: 47542 – 47549, 2001.
- 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.
- PREUSS, M.L. *et al.* The *Arabidopsis* Rab GTPase RabA4b localizes to the tips of growing root hair cells. **Plant Cell** 16: 1589-1603, 2004.
- 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.
- RINNERHALER, 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.
- 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.
- SERFONTEIN, J. *et al.* Evolution of the TSC1/TSC2-TOR Signaling Pathway. **Science Signaling**, v.3, p.1-6, jun., 2010.

- SONNICHSEN, B. *et al.* Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v.434, p. 462-469, mar., 2005.
- THAW, P. *et al.* Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide free chaperones. **Nature**, v.8, p.701-704, ago., 2001.
- THIELE, H. *et al.* Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit *Translationally Controlled Tumour Protein* (TCTP). **European Journal of Biochemistry**, 267, 5473 – 5481, 2000.
- 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.
- WULLSCHLEGER, S. TOR Signaling in Growth and Metabolism. **Cell**, v.124, p.471-484, fev., 2006.
- 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 microtubule-stabilizing protein TCTP. **Mol. Cell. Biol.** 22: 6209-6221, 2002.