

NATÁLIA MANUELA ABREU COELHO

Plantas transgênicas:

- **Transformação de *Nicotiana tabacum* L. utilizando a GFP.**
- **Análise da transgenia de *Nicotiana tabacum* L. transformada com cDNA da cardosina A.**

Departamento de Botânica

Faculdade de Ciências

Universidade do Porto

2002

NATÁLIA MANUELA ABREU COELHO

Plantas transgênicas:

- Transformação de *Nicotiana tabacum* L. utilizando a GFP.
- Análise da transgenia de *Nicotiana tabacum* L. transformada com cDNA da cardosina A.

Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
2002

NATÁLIA MANUELA ABREU COELHO

Plantas transgênicas:

- Transformação de *Nicotiana tabacum* L. utilizando a GFP.
- Análise da transgenia de *Nicotiana tabacum* L. transformada com cDNA da cardosina A.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para prestação de Provas de Mestrado em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal

Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
2002

Agradecimentos

Ao Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, por ter sido possível proporcionar todas as condições necessárias à realização deste trabalho, no âmbito do programa de Mestrado em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal.

À Doutora Susana Pereira, pelo entusiasmo, orientação e ensinamentos transmitidos no percurso da investigação e pela confiança depositada no meu trabalho.

Ao Doutor José Pissarra, pela prontidão que sempre demonstrou em esclarecer assuntos que me foram suscitando dúvidas e pelo acompanhamento na microscopia óptica.

Ao doutorando Jorge Teixeira e à doutoranda Patrícia Duarte, pela colaboração, dedicação e paciência em me ter como aprendiz na investigação científica. Agradeço à Raquel Figueiredo, ao Américo Sousa, à Rosário Ferreira e ao Paulo Oliveira, que sempre disponibilizaram ajuda em alguns trabalhos e a todos os frequentadores do laboratório pelo bom ambiente de trabalho.

À Natália Oliveira, pelo tempo que sempre disponibilizou simplesmente para me ouvir e a outros que não será necessário nomear pelo que representam na minha vida.

Índice

Pág.	
6	Resumo
8	Summary
10	Abreviaturas
12	Capítulo Um: Introdução geral
13	Culturas de tecidos e transformação genética de plantas
26	Objectivos do trabalho
28	Capítulo dois: proteína verde fluorescente
29	Introdução
36	Materiais e Métodos
36	Cultura de <i>N. tabacum</i> .
36	Germinação de <i>N. tabacum</i>
38	Multiplicação de <i>N. tabacum</i>
38	Preparação das culturas bacterianas
38	Transformação da cultura de <i>E. coli</i> DH5 α
40	Preparação da estirpe <i>A. tumefaciens</i> LBA4404
	Preparação da estirpe <i>A. tumefaciens</i> LBA4404
40	competente através do método químico
	Preparação de células electrocompetentes, segundo
40	Hooykaas
41	Transformação do <i>Agrobacterium</i> com o vector pCAMBIA
41	Transformação do <i>Agrobacterium</i> segundo
	Walkerpeach
42	Transformação do <i>Agrobacterium</i> por electroporação
42	<i>Mini-prep</i> do <i>Agrobacterium</i>
43	Transformação do tabaco
43	Preparação das secções de folha e co-cultura

45	Análises da transgenia
45	Isolamento de DNA e RNA
45	Análise do DNA
46	Análise do RNA
46	Observação de fluorescência
48	Resultados e Discussão
63	Capítulo três- Cardosina A
64	Introdução
70	Materiais e Métodos
70	Material vegetal
70	Seleção das plantas transgênicas
71	Multiplicação de <i>N. tabacum</i>
71	Análises da transgenia
71	Isolamento de DNA, RNA e proteínas
72	Análise do DNA
73	Análise do RNA
73	RT-PCR
73	Hibridação <i>in situ</i>
74	Análise às proteínas
74	<i>Western blotting</i>
76	<i>Tissue printing</i>
76	Imunocitoquímica
78	Resultados e Discussão
90	Capítulo quatro: Conclusão
91	Conclusão
93	Capítulo cinco: Referências e Bibliografia
94	Referências
100	Bibliografia

Resumo

As plantas transgênicas são de enorme importância porque permitem o estudo de fenómenos biológicos complexos, representam potenciais recursos para a produção de certos compostos, diminuindo a agressividade no ambiente, e são utilizadas como meios de combate a certas doenças, a nível da saúde mundial como é o exemplo do arroz dourado.

O presente trabalho tem por objectivo transformar plantas de *Nicotiana tabacum* utilizando a GFP como gene repórter e analisar plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o cDNA da cardosina A.

Antes da transformação das plantas, a cultura de tecidos de *Nicotiana tabacum* ocorreu por organogénese directa a partir de explantes de folhas e por enraizamento de ápices caulinares. Os explantes foram transferidos para um meio suplementado com hormonas (benziladenina e isopenteniladenina) e os ápices transferidos para o meio apropriado para o seu enraizamento (MSB5).

A transformação das plantas foi efectuada pelo método de transformação mediada pelo *Agrobacterium*. Este método é o mais frequentemente utilizado neste tipo de procedimentos.

O *Agrobacterium* utilizado foi transformado com o vector binário pCAMBIA1302 que contém um gene de resistência à higromicina, *hptII*, para selecção de plantas transformadas, um gene de resistência à kanamicina, *nptII*, para selecção do plasmídeo em bactérias, um local de clonagem múltipla derivado do pUC18 e um gene repórter, *gfp*. O gene repórter é um mutante, *mgfp5**.

A presença da GFP permitiu confirmar a transgenia das plantas, uma vez que a selecção pelo antibiótico higromicina B (50 µg/mL) levava à morte das plantas quando permaneciam muito tempo no mesmo. Através de cortes dos órgãos das plantas observados ao microscópio de fluorescência, a GFP permitiu visualizar as plantas transformadas uma vez que a GFP fluoresce de verde quando excitada com UV.

A transgenia foi ainda confirmada com PCR do DNA genómico e RT-PCR do RNA total das plantas.

Neste trabalho também se estudou a transgenia de *Nicotiana tabacum* L. transformada com o cDNA da cardosina A de cardo (*Cynara cardunculus* L.). A cardosina A é uma proteinase aspártica presente nas flores do cardo.

A selecção das plantas transformadas ocorreu durante a germinação das sementes. Estas foram colocadas em meio (MSB5) suplementado com o antibiótico canamicina (100 µg/mL). As sementes que germinaram e permaneceram verdes, plantas transformadas, foram transferidas para o meio (MSB5) para permitir o seu desenvolvimento.

A transgenia foi verificada por métodos bioquímicos, PCR e RT-PCR. Nestes métodos houve amplificação de um fragmento do cDNA da cardosina A. Ainda para a localização de RNA foi realizada a hibridação *in situ* utilizando-se um anticorpo conjugado com a fluoresceína. Nesta técnica os núcleos e alguns citoplasmas fluoresciam de verde.

Para detecção da proteína cardosina A foram realizadas as seguintes técnicas: *Western blotting*, imunocitoquímica e *tissue printing*. Nestas técnicas não foi detectada a presença da proteína.

A presença de RNA pré-mensageiro e mensageiro e a ausência de proteínas sugerem a existência de mecanismos de silenciamento do gene.

Este trabalho permite futuras pesquisas na identificação de prováveis sequências de endereçamento da cardosina A bem como o seu trajecto na dinâmica intracelular através de fusões com a GFP.

Summary

The transgenic plants are extremely important for the study of complex biological phenomena, they are also potential resources to the production of compounds, diminishing the aggression to the environment and are used to fight diseases in a world health level such as the golden rice.

The purpose of this work is to transform plants of *Nicotiana tabacum* and analyse *Nicotiana tabacum* transformed with a cDNA of cardosin A.

Before the transformation, the culture of tissues of *N. tabacum* occurred by direct organogenesis from leaf explants and by cutting the top of the stems. The explants were removed into a medium supplemented with hormones (benzyladenine and isopentenil adenine). The top of stems were removed into the appropriate medium in order to develop roots.

The transformation of the plants was made with the method of *Agrobacterium*-mediated transformation. This method is the most used in this kind of proceedings.

The *Agrobacterium* was transformed with a binary vector pCAMBIA1302 which contains a gene resistant to hygromycin, *hptII*, to the selection of plants, a gene resistant to kanamycin, *ntpII*, to the selection of bacteria, a multiple cloning site which derives from pUC18 and a reporter gene, *gfp*. The reporter gene is a mutant, *mgfp5**.

The presence of GFP confirmed that plants were transgenic, since the selection by hygromycin B antibiotic (50 µg/mL) killed the plants when they were in it for long time. Through the cuts of the organs of the plants observed in the fluorescence microscope, the GFP allowed to see the plants transformed once GFP became fluorescent green when stimulated with UV.

The transgenia was still confirmed with PCR of the genomic DNA and RT-PCR of the total RNA.

In this work it was also studied the *Nicotiana tabacum* L. transformed with a cDNA of cardosin A of cardoon (*Cynara cardunculus* L.).

The cardosin A is an aspartic proteinase present in cardoon flowers.

The selection of transformed plants was performed during the germination of the seeds. The seeds were placed in medium (MSB5) supplemented with the antibiotic kanamycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The plants that germinated and remained green, transformed plants, were removed to the medium (MSB5) to allow its development.

The transgenia was corroborated by biochemical methods, PCR and RT-PCR where a fragment of DNA of cardosin A was amplified. For the localization of RNA the in situ hybridization was performed where an anti-dig antibody associated with fluorescein was used. In this technique the nucleus and some cytoplasm became green fluorescent, showing the presence of pre-messenger and messenger RNA.

In order to detect the protein cardosin A the following techniques were done: Western blotting, immunocytochemistry and tissue printing. It was not possible to detect the protein with these techniques. The presence of pre-messenger and messenger RNA and the absence of the protein suggest the existence of mechanisms of gene silencing.

This work allows further researches in the identification of probable sequences heading to cardosina A as well as its way in the intercellular dynamic through the fusion with GFP.

Abreviaturas

BA- benziladenina

BSA- albumina de soro de bovino

bp- pares de bases

cDNA- ácido desoxirribonucleico complementar

CTAB- bromido de amónia hexadeciltrimetil

DABCO- (2.2.2) octano de 1,4-diazabicyclo

DAB- diaminobenzidina

DEPC- dietilpirocarbonato

Dig- digoxigenina

DNA- ácido desoxirribonucleico

DTT- ditioneitol

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

FITC- isotiocianato de fluoresceína

g- unidade de força centrífuga relativa (gravidade)

GFP- proteína verde fluorescente

Ig- imunoglobulina do tipo G

IP- isopentiladenina

kDa- quilo daltons

LB- limite esquerdo

M- molar

mM- milimolar

m/v- relação massa/volume

NAA- ácido acético naftaleno

NP-40- Nonidet 40

PA- proteinase aspártica

PAGE- electroforese em gel de poliacrilamida
PCR- reacção em cadeia de polimerização
PBS- solução salina tamponizada com fosfato
TE- Tris –EDTA
TPBS- solução salina tamponizada com fosfato e Tween 20
RB- limite direito
RNA- ácido ribonucleico
RNAm- ácido ribonucleico mensageiro
RT- transcrição reversa
SDS- dodecilsulfato de sódio
TBS- solução salina tamponizada com Tris
TBST- solução salina tamponizada com Tris e Tween 20
Ti- indutor de tumor
Tris- 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
T-DNA – DNA de transferência
UV- ultra violeta
v/v- relação volume/volume
vir – virulentos
WT- tipo selvagem

Capítulo Um: Introdução geral

- Culturas de tecidos e transformação genética de plantas
- Objectivos do trabalho

Culturas de tecidos e transformação genética de plantas

A ideia de experimentar a cultura de tecidos e órgãos de plantas isolados sob condições controladas em laboratório surgiu no final do séc. XIX. Mas, só no início do séc. XX é que Haberlandt iniciou a experimentação da cultura de células *in vitro* num meio nutritivo. Desde então, assiste-se a um rápido desenvolvimento de técnicas de cultura.

A expressão *cultura de tecidos de plantas* descreve todos os tipos de procedimentos de culturas estéreis que podem ser de protoplastos, células, tecidos, órgãos, embriões ou plântulas.

A cultura de plantas *in vitro* baseia-se na totipotencialidade das células vegetais implícita na teoria celular, ou seja, na capacidade que uma célula (viva e nucleada) apresenta em desenvolver-se até regenerar um organismo inteiro. Assim, teoricamente, qualquer parte da planta pode formar um explante, o qual originará a planta adulta.

A micropopagação, termo utilizado especificamente para se referir à aplicação das técnicas de cultura, de plantas efectua-se em condições muito particulares.

A micropopagação vegetativa pode ocorrer: 1) a partir de meristemas laterais e apicais, tendo a vantagem de se efectuar a cultura livre de vírus; 2) por proliferação de gomos axilares, indução do desenvolvimento dos gomos axilares, inibindo os gomos apicais; 3) por organogénese que consiste em, a partir de um fragmento da planta já diferenciado, induzir o desenvolvimento *de novo* de gomos. A formação *de novo* de gomos pode ser directa ou indirecta, passando esta última por tecido caloso. Este é considerado uma massa proliferativa desorganizada de tecido meristemático; e 4) por embriogénese somática que consiste na formação de embriões a partir de células vegetativas com estruturas semelhantes às das células somáticas. Estes embriões desenvolvem-se até formar plântulas passando pelos mesmos fenómenos que ocorrem

nos embriões zigóticos. Tem a vantagem de ultrapassar a dormência que existe em certos embriões zigóticos.

O grau de sucesso em qualquer tecnologia que emprega cultura de células, tecidos ou órgãos de plantas está relacionado com alguns factores. Um desses factores é a escolha do material biológico e o outro é a escolha dos componentes nutricionais e reguladores de crescimento. Nas últimas décadas assistiu-se ao aparecimento e modificações de inúmeros meios nutritivos que foram otimizados de acordo com o tipo de material biológico e tipo de cultura.

A composição de um meio consiste em 1) sais inorgânicos: macroatmentos (N, P, K, Ca, Mg e S) e microatmentos (B, Co, Cu, Mn, I, Fe, Zn, Mo, Cl, Na); 2) componentes orgânicos: glicídios (sacarose, glucose e frutose) para fonte de carbono, vitaminas (tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e ácido pantoténico) e reguladores de crescimento (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliaminas, oligossacarinas, salicilatos e jasmonatos). Por vezes há o fornecimento de aminoácidos como fonte de N orgânico; 3) componentes naturais complexos: hidrolisado de caseína ou de outras proteínas de leite de coco, sumo de tomate ou de laranja e extracto de levedura. Estes componentes são apenas para certas plantas; 4) outros componentes utilizados em casos específicos: anti-oxidantes (ácido cítrico ou ascórbico) e compostos adsorventes (carvão activado). Estes componentes são utilizados em casos muito específicos.

Além da selecção dos nutrientes num meio, deve ter-se em atenção a consistência do meio, podendo ser líquido ou sólido, adicionando-se para este último agar.

A execução das técnicas de cultura tem de ocorrer em condições de assepsia por isso tem de se desinfectar e/ou esterilizar devidamente todo o material utilizado.

A cultura de plantas permitiu um maior conhecimento científico a vários níveis, acabando por ser uma estratégia para alcançar outros fins, como por exemplo a formação de plantas transgénicas.

A transformação genética é um valioso recurso para o melhoramento e para a pesquisa em Genética, Fisiologia e Bioquímica. Plantas transgénicas são usadas para complementar ou substituir mutantes na pesquisa fundamental e para auxiliar em estudos de fenómenos biológicos complexos como a patogenicidade, organização do genoma, captação de luz e transdução de sinais. As plantas transgénicas são potenciais

recursos para a produção de compostos animais, remediação biológica e síntese de polímeros.

Pode dizer-se que um dos objectivos dos programas de técnicas modernas de transformação de plantas é resolver problemas da agricultura sem causar prejuízo no ambiente, desenvolvendo, por exemplo, *plantas inteligentes* capazes de matar exclusivamente células infectadas por fungos (Alves et al., 1999).

A transformação de plantas consiste na introdução de um gene ou pequenos grupos de genes no genoma das plantas, produzindo um novo fenótipo nas plantas que promove um valor na agricultura, horticultura ou ornamental e facilita o estudo de processos biológicos particulares (Glick et al., 1993). A produção de plantas transgénicas requer uma integração estável do DNA introduzido (transgene) no genoma da planta e regeneração de toda a planta, mantendo a estabilidade nas gerações seguintes.

Há vários métodos de transformação de plantas que se desenvolveram rapidamente nas últimas décadas, e que se classificam em métodos directos e métodos indirectos. Os métodos directos requerem uma via biológica para a inserção do DNA que pode ser o *Agrobacterium* ou um vírus. Os métodos indirectos requerem uma via química ou física para a inserção do DNA, como por exemplo electroporação, microinjecção, biobalística e a infiltração no vácuo. A electroporação é uma técnica que usa descargas eléctricas para criar poros reversíveis na membrana plasmática, permitindo a introdução do DNA estranho. Porém tem uma desvantagem, ou seja, durante a incorporação do DNA estranho no genoma nuclear da célula hospedeira, por vezes ocorrem rearranjos do DNA. A biobalística consiste na projecção de partículas (1,2 µg de partículas de tungsténio) cobertas por DNA a grandes velocidades para o interior de tecido. Tem a vantagem de poder ser aplicado em tecidos ou regiões da planta intactos e também pode ser aplicada a organelos celulares. No entanto, tem a desvantagem de certas regiões do DNA serem perdidas durante a incorporação.

A escolha do sistema de transformação e o seu vector acompanhante é realmente ditada pelo objectivo da transformação. Um dos sistemas mais utilizado na transformação é mediado pelo *Agrobacterium*. As bactérias do género *Agrobacterium* são bastonetes Gram-negativos que pertencem à família Rhizobiaceae. As bactérias são classificadas de acordo com o seu grau de patogenicidade. O *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogeneses* são bactérias patogénicas do solo que transformam geneticamente células no caule ou na raiz de plantas, respectivamente. Os agentes

responsáveis são os plasmídios circulares de 200 a 500 Kbp, respectivamente o plasmídio Ti do *A. tumefaciens* e plasmídio Ri de *A. rhizogeneses*. Enquanto que as estirpes *A. radiobacter* são avirulentas.

O *Agrobacterium* é designado de *engenheiro genético natural* porque o seu sistema de transformação é um fenómeno natural sem ter necessidade de recorrer a maquinaria externa.

O *Agrobacterium* é atraído por compostos quimiotáticos que são libertados na zona injuriada da planta (Glick et al., 1993) e, como parte deste parasitismo sofisticado, o *Agrobacterium* transfere uma pequena porção de seu DNA (T-DNA ou DNA de transferência) para o interior do genoma nuclear da planta hospedeira. A maioria da maquinaria necessária para a transferência de T-DNA reside no plasmídio Ti, plasmídio indutor do tumor. Este plasmídio Ti inclui o próprio T-DNA, delimitado por repetições imperfeitas de 25bp (conhecidas como limite esquerdo- LB- e limite direito -RB) que definem os limites do T-DNA e aproximadamente 35 genes virulentos (*vir*), agrupados numa região *vir*.

A acção combinada de genes *vir* realizam a transferência do T-DNA para o núcleo das células da planta hospedeira (Hellens et al., 2000). O T-DNA contém genes com informação para a produção de auxinas (ácido indoloacético), citocininas (isopenteniladenina) e que codificam biossíntese de opinas (derivados de aminoácidos) (Glick et al., 1993) que podem ser octopinas ou nopalinas codificadas pelos genes presentes nos dois plasmídios Ti, pTiAch5 e pTiC5, respectivamente (Herrera-Estrela, 1988). Aquelas hormonas em elevadas concentrações promovem um crescimento indiferenciado de células (tumor) na planta hospedeira. O tecido proliferativo no tumor da planta hospedeira fornece às bactérias o derivado de aminoácido invulgar (opinas) que é uma importante fonte de C e N.

Uma importante questão é saber como é que células procarióticas conseguem transferir DNA para o núcleo de células eucarióticas. Para tentar perceber este fenómeno, Nester e colaboradores (1997) focaram a sua pesquisa em três áreas: primeiro, como é que as moléculas sinal das plantas activam a expressão dos genes virulentos (*vir*) requeridos para o processo e transferência de T- DNA; segundo, como é que o T-DNA é transferido para fora das células bacterianas e entra nas células da planta. E, terceiro, quais as proteínas das plantas que interactivam directamente na transferência do T-DNA para o interior do núcleo.

A transformação das células da planta pelo *Agrobacterium* é iniciada quando os metabolitos sintetizados pela planta injuriada são reconhecidos por uma proteína sensorial que sofre fosforilação, VirA, um dos dois membros dos componentes do sistema regulador (figura 1).

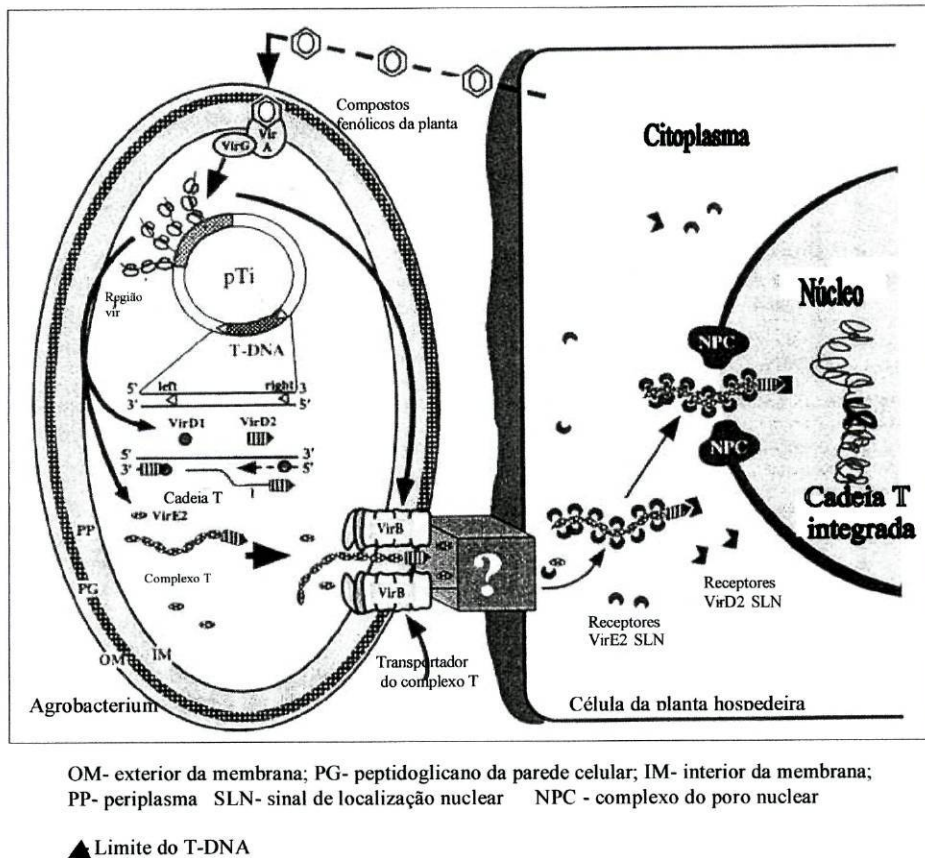


Figura 1 – Etapas básicas na transformação de células da planta por *A. tumefaciens*. (Adaptado de Zupan et al., 2000).

O sinal é então traduzido à VirG, proteína da resposta reguladora. A proteína VirG depois de fosforilada activa todos os genes virulentos cuja função é requerida para o processo de transferência, e possivelmente integração do T-DNA no interior do cromossoma das células da planta. Esta activação resulta da ligação da proteína VirG activada à caixa *vir*. Estudos num número de estirpes de *Agrobacterium* têm ilustrado as variações a que este processo está sujeito. As moléculas sinal da planta consistem em compostos fenólicos, por exemplo acetoseringona, e uma variedade de monossacarídeos, todos componentes da parede celular das células da planta. Evidências sugerem que os compostos fenólicos activam directamente a proteína VirA,

enquanto os monossacarídeos, primeiro actuam com a proteína ligada ao açúcar, que por sua vez, interacciona com o domínio periplásmico da proteína VirA (Nester et al., 1997).

Embora sejam os compostos fenólicos os principais componentes responsáveis pela indução da região *vir*, os açúcares e o pH ácido amplificam a resposta (Zupan et al., 2000).

O T-DNA e a região *vir* são os responsáveis pela transferência do intermediário complexo T e medeiam o seu transporte. A indução dos genes *vir* inicia a produção do intermediário de transferência, fazendo uma cópia de cadeia simples do T-DNA para formar a cadeia T. As proteínas VirD1 e VirD2 são essenciais para este processo. Ambas reconhecem os limites da sequência de 25 bp do T-DNA e fazem uma clivagem endonucleotídica na extremidade de cada limite. Estes *nicks* são usados como iniciação e terminação para a produção da cadeia T. A VirD2 permanece ligada covalentemente à extremidade 5' da cadeia T (Zupan et al., 1995) e parece ser importante como proteína de endereçamento nuclear. Assim, o complexo T compreende uma cópia de cadeia simples (ss) do T-DNA com uma única molécula de proteína VirD2 ligada covalentemente à extremidade 5', e revestida ao longo do seu comprimento com proteína ligada ao ssDNA, proteína VirE2. O sistema *vir* do *Agrobacterium* processará e transferirá qualquer DNA entre as repetições directas de 25 bp (LB e RB) que flanqueiam o T-DNA (Zupan et al., 2000).

A pesquisa nos últimos anos tem incidido no sistema de secreção tipo IV específico *vir*, o transportador do complexo T (transportador T). Este é unido a 11 proteínas codificadas pelo operão *virB*, e VirD4. O transportador T facilita a transferência do complexo T para a planta ou células de leveduras. Pode transportar proteínas, tais como VirE e VirF, para as células das plantas (Zupan et al., 2000).

O mecanismo que explica o processo do transportador T ainda é desconhecido, mas a arquitectura dos seus componentes estruturais começa a ser descrita.

Todo este processo é provavelmente precedido por uma hidrólise da camada de peptidoglicano por VirB1. Esta actividade é essencial para a mobilização do VirB2 e VirB5 para a superfície celular de modo a formar o pêlo-T (canal que facilitará a passagem da cadeia T). Estudos sobre a interacção e localização subcelular sugerem que pelo menos alguma das restantes proteínas VirB/VirD4 unem-se num complexo multimérico que separa a membrana bacteriana. Este hipotético *núcleo* do transportador T provavelmente transporta substratos para fora da bactéria. A energia para conduzir à união deste complexo e efectuar o seu transporte é provavelmente vinda das três

ATPases (VirB4; VirB11 e VirD4) associadas com o transportador T (Zupan et al., 2000).

Estudos efectuados por Chen et al. (2000) sugerem que as proteínas VirD2, VirE2 e VirF são transportadas para a membrana citoplasmática, uma via específica independente do operão *virB*. Assim, a transferência do complexo T do *Agrobacterium* pode ocorrer em dois passos, um mediado por uma via ainda desconhecida e outro mediado pelo operão *virB*.

A integração da cadeia T no genoma da planta requer a absorção nuclear, que é um processo regulado e que pode ocorrer apenas através de poros nucleares. As proteínas grandes com aproximadamente 40 kDa requerem um sinal de localização nuclear (SNL) que medeia a sua absorção a nível nuclear. O complexo T tem três componentes que podem potencialmente contribuir para a importação nuclear. A própria cadeia e as proteínas VirD2 e VirE2. O transportador nuclear é muito provavelmente mediado pelas suas proteínas associadas VirD2 e VirE2 (Zupan et al., 1995). A integração pode induzir a deleções pequenas, menor que 100bp, do DNA da planta no local de inserção (Zupan et al., 2000).

Embora já existam algumas explicações para mecanismos envolvidos na transformação mediada pelo *Agrobacterium*, muitos permanecem ainda por esclarecer, demonstrando que todo o processo é bastante complicado.

Este sistema natural de transferência de genes requer muitas modificações antes de ser usado como um sistema vector-gene eficiente para a produção de células transformadas. Primeiro, os genes para a autonomia dos reguladores de crescimento têm de ser retirados, uma vez que a expressão destes genes interfere com a regeneração da planta fértil normal. Segundo, porque a autonomia dos reguladores de crescimento pode não ser usada nas células transformadas, um gene marcador é necessário para a selecção das células transformadas. Finalmente, foram investigados meios para introduzir o gene de interesse no interior da sequência do plasmídeo Ti para assim ser transferido para a planta (Bevan, 1984).

O vector ideal para a transformação contém um local de clonagem múltipla, um gene para a resistência a um antibiótico para a selecção em *E. coli* e *Agrobacterium*, origem de replicação, e um gene que codifica resistência ao antibiótico para selecção do DNA estranho na planta transgénica (Glick et al., 1993).

Existem dois factos importantes que fizeram a transformação mediada pelo *Agrobacterium* um método de escolha. Um é o desenvolvimento de vectores binários e

o outro é o *desarmar* a estirpe de *Agrobacterium*, ou seja, retirar todos os genes cuja expressão induz o tumor.

A utilização de *Agrobacterium* para modificar geneticamente culturas requer: 1) vector com T-DNA onde os genes alvo possam ser inseridos, preferencialmente adjacente ao gene marcador selectivo; 2) células recipientes capazes de aceitarem e integrarem o T-DNA e tornarem-se transformadas; e 3) células transformadas capazes de regeneração em plantas com expressão de transgenes (Gamborg et al., 1995).

Os dois componentes principais para o sucesso de transferência de genes mediada pelo *Agrobacterium*, o T-DNA e a região *vir*, podem residir em plasmídios separados e podem funcionar quer em *trans*, quer em *cis*, formando o moderno vector plasmídeo Ti, designado vector binário. As funções dos genes *vir* são providenciadas pelo plasmídeo Ti *desarmado* na estirpe de *Agrobacterium*. O T-DNA, no qual estão os genes a ser transferidos, está contido no vector (Hellens et al., 2000a).

Existe uma polaridade no T-DNA a transferir do *Agrobacterium* para a célula da planta: o RB precede o LB. Os primeiros vectores binários construídos tinham o local do gene marcador selectivo próximo do RB (pBIN19). Isto significa que o gene marcador selectivo seria o primeiro a ser transferido para a célula da planta. E se, por acaso, a transferência fosse interrompida iriam obter-se plantas transformadas falsas, porque estas tinham o gene marcador selectivo mas não o gene de interesse. Assim, as construções de vectores mais recentes (pCAMBIA; pGreen) contêm o gene marcador selectivo próximo do LB para assegurar que nas plantas transformadas seleccionadas esteja o gene de interesse. Para além desta alteração outras vão surgindo de modo a adaptarem melhor o vector ao objectivo da transformação.

Por exemplo, o novo pGreen tem um tamanho reduzido, flexibilidade de selecção na transformação e um extenso local de clonagem múltipla (Hellens et al., 2000b). No entanto, tais procedimentos não poderão comprometer a flexibilidade dos plasmídios como vectores de clonagem através da perda de locais de restrição convenientes.

Os componentes *standard* do vector binário são 1) o local de clonagem múltipla; 2) origem de replicação, funcional em *E. coli* e *Agrobacterium tumefaciens*; 3) marcador selectivo para plantas e bactérias; 4) funções de transferência para a transformação de *Agrobacterium* baseada na conjugação (não essencial se usar exclusivamente electroporação ou via directa de transformação de DNA); e 5) sequências que delimitam o T-DNA (Walkerpeach e Velten, 1994).

A tabela 1 mostra alguns vectores binários que têm sido utilizados na transformação de plantas.

Tabela 1- Vectores binários

Vector	Tamanho (kb)	Locais de restrição únicos no T-DNA	LacZ	Seleção bacterial	Marcador selectivo no	Origem de replicação		Mobilização	Ref.
						<i>Agrobacterium</i>	<i>E. coli</i>		
pBIN19	11777	9	Sim	kanamicina	RB	pRK2	pRK2	Sim	14
pC22	17500	2	Não	Ampicilina, estreptomicina e espectinomicina	RB	pRi	ColEI	Sim	21
pGA482	13200	7	Não	Tetraciclina	RB	pRK2	ColEI	Sim	31
pPCV001	9200	6	Não	Ampicilina	RB	pRK2	ColEI	Sim	6
pCGN1547	14440	5	Sim	Gentamicina	LB	pR1	ColEI	Sim	32
pJJ1881	25700	4	Não	Tetraciclina	LB	pRK2	pRK2	Sim	24
pPZP111	8909	9	Sim	Cloranfenicol	LB	pVS1	ColEI	Sim	7
pGreen	4632	18	Sim	Kanamicina	LB	pSa	pUC	Não	5

A maioria destes vectores binários são *reliquias históricas* com muitas características que fazem construções de DNA grosseiras ou pesadas. Estas características incluem: origem de replicação de pequeno número de cópias resultando numa produção baixa de DNA; replicões instáveis, causando danos variáveis do plasmídeo durante a propagação; tamanho grande; falta de locais de restrição convenientes para manipulação; escolha limitada de marcadores selectivos; falta de vias simples para a construção e fusões com genes repórter e regiões sequenciadas incompletas. Assim, surge a necessidade de construir uma série única de vectores que possa ser usada com eficiência na transformação da maioria de culturas de plantas, dicotiledóneas e monocotiledóneas, e que ultrapassem todas as falhas dos vectores utilizados anteriormente.

A série pCAMBIA foi construída como uma nova série de vectores que concentram todos os requerimentos para a transformação de plantas, tais como: tamanho pequeno, número elevado de marcadores selectivos; facilidade de construções posteriores, modificação e análise do transgene (figura 2).

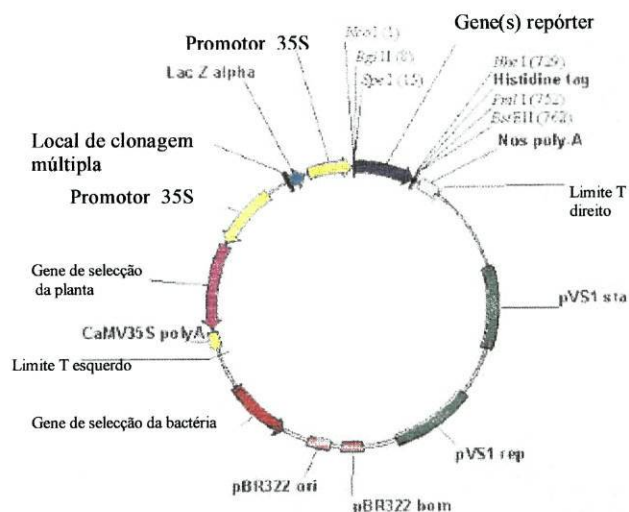


Figura 2- Estrutura geral da série pCAMBIA

O vector binário é largamente utilizado devido à facilidade de uso na manipulação de DNA quer *in vitro*, quer *in vivo* e tem elevada eficiência de transformação.

O vector binário foi construído para colmatar alguns problemas que surgiram com o vector cointegrado.

O vector cointegrado contém um único plasmídeo onde estão integrados a região *vir* e o T-DNA. A inserção do gene de interesse entre os limites do T-DNA depende da co-integração entre as sequências homólogas presentes no vector de clonagem e do T-DNA do plasmídeo Ti (Herrera-Estrela et al., 1988).

O vector cointegrado contém 1) locais convenientes para a inserção do gene de interesse; 2) gene marcador selectivo para antibiótico que actua em *E. coli* e *A. tumefaciens*; 3) gene marcador selectivo funcional na planta; e 4) origem de replicação funcional em *E. coli* que não opera em *Agrobacterium*.

Há um número de vantagens associadas à utilização do sistema binário relativamente ao método cointegrado. Não tendo uma origem de replicação funcional no *Agrobacterium*, o vector cointegrado requer a uma recombinação numa certa ordem de modo a manter a estabilidade na estirpe do *Agrobacterium* alvo. Alternativamente, o vector binário requer apenas que o vector plasmídeo intacto seja introduzido na bactéria alvo, tornando o processo de transformação bacteriano mais eficiente e mais rápido (2-3 d versus 4-7d). O vector binário foi projectado para aperfeiçoar significativamente a facilidade e eficiência da transformação do *Agrobacterium* com genes de construção prontos para a planta. Em adição, porque os plasmídios binários existem em replicões separados, um número de cópias não é estritamente ligado ao do plasmídeo Ti. Assim, em muitos casos, a confirmação da transformação é simplesmente efectuada via *mini-prep* do *Agrobacterium* (Walkerpeach e Velten, 1994). Um *mini-prep* consiste numa extracção de DNA plasmídico em pequena escala. Para a sua análise recorre-se a uma electroforese depois de efectuar uma restrição.

Após a transformação é necessário eliminar o *Agrobacterium* e para isso recorre-se ao uso de antibióticos. Os antibióticos baseados em penicilinas (carbenicilina e amoxicilina) são usados para eliminar ou inibir o crescimento do *Agrobacterium* durante horas ou dias após a co-cultivação com os explantes alvo. Alguns vectores Ti e estirpes de *Agrobacterium* hospedam genes de resistência a ampicilina (que codifica a β -lactamase) e deste modo não é fácil remover tais estirpes de *Agrobacterium* da cultura de tecidos. Quando tais estirpes e plasmídios são usados, misturas de penicilina e

inibidor de β -lactamase (Augmentin) ou cefalosporinas (cefotaxime) são efectivos (Hellens et al., 2000b).

As penicilinas e as cefalosporinas inibem a ligação cruzada do peptidoglicano por ligação e inactivação de transpeptidases, inibindo a síntese da parede celular bacteriana. Os genes marcadores do plasmídeo mais comumente utilizados são aqueles que codificam a resistência a canamicina (pBIN19 e pGreen), gentamicina (séries pCGN) e estreptomomicina e/ou espectinomicina (séries pPZP) e tetraciclina (séries pJJ).

Os antibióticos também são utilizados para seleccionar as plantas transformadas. Os plasmídios introduzidos na planta normalmente têm um gene marcador selectivo, ou seja, contém um gene que codifica a resistência a antibióticos. Contudo, as estirpes de *Agrobacterium* são marcadas com resistência a antibióticos que estão localizados ou no cromossoma ou no plasmídeo Ti. Assim, o vector binário e marcador bacteriano de resistência ao antibiótico não podem ser duplicados.

O gene *nptII* e o gene *hptII* conferem resistência ao antibiótico aminoglicósido, como a canamicina e higromicina B, respectivamente.

O gene *nptII* foi o primeiro a ser estabelecido como marcador selectivo dominante no uso de selecção de plantas superiores.

A resistência à canamicina é conferida pela expressão transgénica de fosfotransferase neomicina, produto de gene *nptII* do transposição Tn5 bacterial. A enzima transfere o fósforo do ATP para o aminoglicósido inactivando-o. O gene *nptII* é efectivo quando é expresso ou no genoma nuclear ou genoma plastideal (Xiang et al., 1999)

O gene *hptII* codifica uma cinase (fosfotransferase higromicina B) que inactiva a higromicina B através de fosforilação, ou seja, transfere fósforo do ATP para a higromicina B.

Normalmente os antibióticos são colocados no meio nutritivo onde crescem as plantas. Contudo, Xiang et al. (1999) através de estudos efectuados em *Arabidopsis thaliana* demonstram que a selecção de plantas transformadas pode ocorrer no jardim. As plantas foram borrifadas com uma solução de canamicina e apenas cresceram as plantas transformadas. Este método mostrou-se tão efectivo como o anteriormente utilizado.

Inicialmente utilizavam-se os genes de resistência aos antibióticos como genes marcadores selectivos para distinguir as transformadas das não transformadas. No entanto, o uso de agentes selectivos, frequentemente antibióticos e herbicidas, retarda a

diferenciação celular e o seu desenvolvimento de gomos no explante submetido ao processo de transformação (Colby e Mereth, 1990). Por outro lado, se é necessário outra transformação do mesmo material, o marcador selectivo já não é efectivo (Alves et al., 1999).

A identificação imediata das células transformadas é uma característica desejável, mas como a maioria dos genes introduzidos foram incapazes de induzir fenótipos distintos do tipo selvagem alguns investigadores propuseram um marcador que não prejudicasse as células e que produzisse um fenótipo nos gomos transgénicos-**gene repórter**.

Genes repórter são assim designados porque podem fundir-se com genes da planta para se estudar a sua expressão.

Os genes repórter ideais para a planta devem ter um número de características inerentes: 1) o seu produto deve ser único e não tóxico para as células da planta hospedeira; 2) a enzima marcadora deverá exibir elevado nível de estabilidade após a tradução; 3) deve ser o conveniente, barato, sensível, e poder avaliar a análise da enzima específica para o produto do gene repórter; e 4) poderá ter fusões com polipéptidos externos durante a tradução, enquanto retém actividade enzimática (Glick et al., 1993).

O gene repórter mais utilizado até agora é o *uidA*, que codifica uma enzima monomérica estável, β -glucuronidase (GUS), que catalisa a conversão de glucurónido metilumbeliferona em metilumbeliferona formando um precipitado azul insolúvel facilmente identificável. Há muitas vantagens em utilizar o GUS pois é inconfundível de visualizar, a enzima não é facilmente desnaturada e o precipitado é estável (Jeferson, 1987). Contudo, as desvantagens do sistema GUS é que é uma análise destrutiva, ou seja, o explante não pode ser recuperado e necessita de um substrato.

Os níveis de GUS podem ser medidos por análise fluorométrica ou por uso de análise colorimétrica de tecido.

Outro gene repórter é o acetiltransferase cloranfenicol – CAT.

A análise do CAT é geralmente por combinação de cromatografia de camada fina com autoradiografia, seguida de incorporação de cloranfenicol com motivos acetil ligados a radio.

Há ainda a considerar a β -galactosidase (lac Z) como gene repórter. Este processo consiste na produção da proteína β -galactosidase que reage com um produto análogo à lactose, o X-gal, que se encontra no meio de cultura, conferindo uma cor azul.

Alternativamente, Chalfie et al. (1994) sugerem a GFP como gene repórter para o sistema de plantas e animais. A principal vantagem da GFP comparada com o GUS é que é mais facilmente visualizada. Não precisa de substrato extra e não é uma análise destrutiva porque é observável em células vivas.

Em adição ao gene marcador selectivo e gene repórter, muitos vectores destinados para o uso em transformação de plantas contêm uma sequência necessária à expressão do transgene, uma região reguladora 5' constituída por uma sequência 5' não traduzível, uma sequência de iniciação da tradução (AUG) com contexto na planta e a sequência de terminação/poliadenilação da transcrição (ex: poliA 5'-AAUAAA-3') (Glick et al.,1993). Frequentemente níveis elevados de expressão são desejáveis, assim promotores constitutivos, como o 35S CaMV, são usados em cópias duplas ou simples.

O promotor forte responsável por replicação genómica do 35SCaMV tem sido extensivamente explorado para a expressão de genes heterólogos em plantas.

Quando se escolhe o gene repórter deve ter-se o cuidado de seleccionar o promotor adequado. Estudos efectuados em *Arabidopsis thaliana*, por Mantis et al. (2000) demonstram que quando se utiliza um promotor fraco, o gene repórter GUS tem vantagem em relação à GFP. Embora a GFP surja mais cedo, o GUS é mais fácil de detectar.

Perante tal variedade e flexibilidade nos vectores modernos, é necessário verificar o objectivo da transformação (por ex: expressão constitutiva ou expressão regulada; estudos quantitativos de expressão de transgenes; transformação com sequências de DNA superiores a 50 kb) para melhor escolher o vector.

Objectivos do trabalho:

Numa altura em que por vezes é necessário recorrer a transformação de plantas para melhor conhecer o funcionamento das mesmas, tornou-se imperativo implementar o sistema de transformação de plantas no departamento de Botânica onde se localiza um importante núcleo de estudo científico.

O presente trabalho consiste em duas partes: 1) apurar técnicas/estratégias para a obtenção de plantas transgénicas, *Nicotiana tabacum* L. utilizando a GFP como gene repórter e analisar os seus padrões de expressão e ao mesmo tempo implementar o sistema no laboratório; 2) seleccionar plantas transgénicas (*Nicotiana tabacum* L. onde está inserido o cDNA da cardosina A) e apurar técnicas para averiguar sua transgenia .

Em relação à primeira parte do trabalho, a decisão de utilizar *N. tabacum* L. como material biológico experimental foi baseada em duas considerações: 1) este tecido de planta tem sido usado intensamente em estudos *in vitro* a partir dos anos 60 e os meios de cultura já estão optimizados; 2) a transformação de *N. tabacum* L. tem sido referida em inúmeros artigos, por isso fornece um elevado número de estratégias a desenvolver.

A transformação de *N. tabacum* L. foi mediada pelo *Agrobacterium* que por sua vez foi transformado com o vector pCAMBIA1302.

A selecção do vector da série pCAMBIA teve por base o facto de este vector ser mais recente e por isso foi construído de modo a colmatar alguns problemas que surgiram com outros vectores. A série de vectores pCAMBIA é utilizada em transformação e tem elevada eficiência de transformação na maioria de culturas, monocotiledóneas e dicotiledóneas, tem inúmeros locais onde se podem colocar genes de selecção. Este vector também facilita construções posteriores, modificação e análise de transgenes e variantes.

O vector utilizado da série é o pCAMBIA1302, que contém um gene de resistência à higromicina, *hptII*, para selecção de plantas, um gene de resistência à kanamicina, *nptII*, para selecção de bactérias, um local de clonagem múltipla derivado do pUC18 e um gene repórter, *gfp*. O gene repórter é um mutante, *mgfp5** (figura 3).

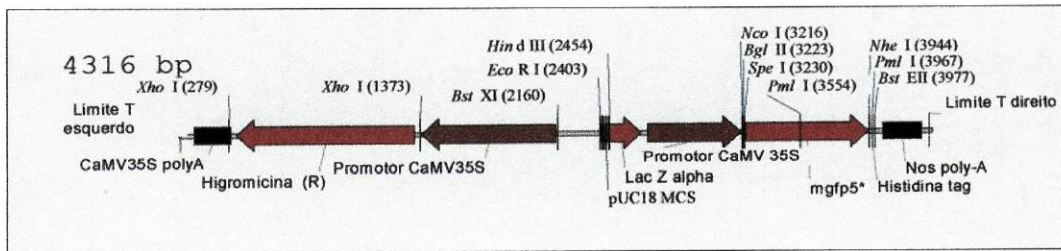


Figura 3- Sequência do fragmento T-DNA do vector pCAMBIA1302

Capítulo Dois: Proteína verde fluorescente (GFP)

Introdução

As proteínas verde fluorescente (GFP -*green protein fluorescent*) estão envolvidas na bioluminescência dos *Cnidaria*, um filo inferior na evolução dos metazoa. Elas emitem luz verde após aceitação de energia das luciferases ou fotoproteínas, dependendo das espécies. A luciferase é uma enzima que catalisa a oxidação de um substrato, luciferina, que subsequentemente emite luz. A luciferina é um termo genérico referente ao composto reduzido que pode ser oxidado, num ambiente apropriado, para produzir um estado singlete electronicamente excitado. A luciferina dos *Cnidaria* é designada celenterazina. As fotoproteínas diferem das luciferases porque actuam primeiramente no pré-limite da celenterazina. As fotoproteínas produzem um único *flash* de luz durante a activação (Prasher, 1995).

Os sistemas de *Aequorea* e *Renilla* (figura 4) são bons exemplos de diferentes vias bioquímicas de produção de luz nos *Cnidaria* (Prasher, 1995).

As duas GFPs têm diferentes espectros de excitação. A GFP da *Aequorea* tem dois picos de excitação a 395 nm e 470 nm, enquanto que a GFP da *Renilla* tem apenas um pico de excitação a 498 nm. Tem sido sugerido que a diferença é devido ao diferente ambiente da apoproteína do cromóforo (Prasher, 1995).

Tal como se pode observar na figura 4, as duas GFPs têm um espectro de emissão idêntico na luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 509 \text{ nm}$).

As GFPs são proteínas invulgarmente estáveis, por isso as suas propriedades espectrais não são facilmente afectadas nas soluções de desnaturação. A GFP da *Renilla* é resistente à 6M guanidina-HCl, 8M ureia, ou a 1% SDS (acima de 45 °C) (Prasher, 1995) e a dois dias de tratamento com várias proteases tais como a tripsina, a quimotripsina, a papaína, a subtilisina, a termolisina e a pancreatina até concentrações de 1 mg/mL. Acima destas concentrações há alteração da intensidade da fluorescência da GFP devido à desnaturação da GFP (Prasher, 1995). Em soluções aquosas neutras, a temperatura à qual metade da fluorescência é perdida foi encontrada a 78 °C e 70 °C para a *Aequorea* e *Renilla*, respectivamente (Karlsson, 1998).

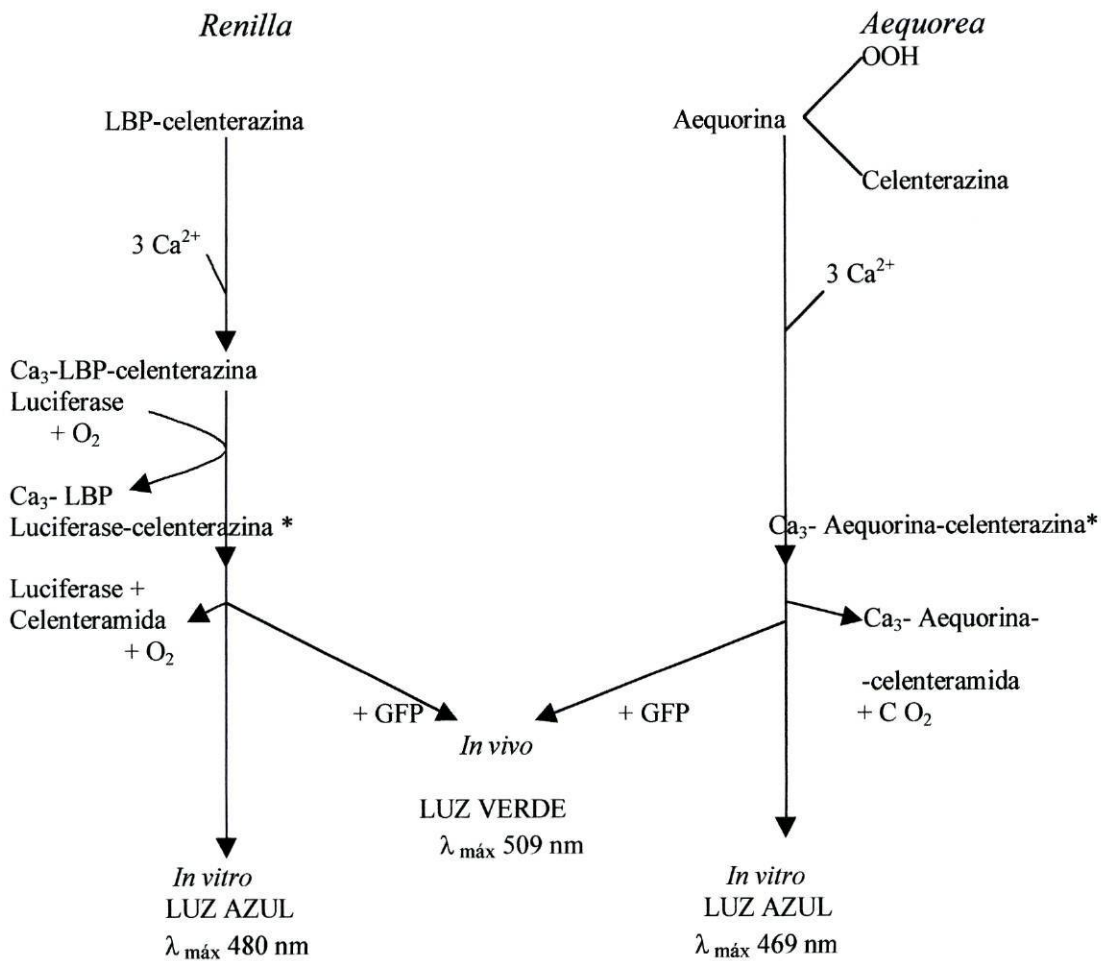


Figura 4- Comparação das vias de bioluminescência em *Renilla* e *Aequorea*. A luciferina envolvida em ambas as vias é a celenterazina. Na *Renilla*, a LBP, quando exposta ao Ca^{2+} liberta a celenterazina que pode então ser oxidada pela luciferase. Na *Aequorea*, a fotoproteína aequorina responde directamente ao Ca^{2+} por oxidação do limite da celenterazina. Em ambos os casos, a energia libertada pela oxidação da celenterazina estimula GFP a emitir luz verde *in vivo*. Contudo, a luciferase da *Renilla* e aequorina libertarão luz azul *in vitro* na ausência da GFP. (Os asteriscos significam estado excitado da luciferina).
 (Adaptado de Prasher, 1995).

A *Aequorea victoria* são brilhantemente luminescentes, com pontos brilhantes à volta da margem da umbela. A luz surge de massas de tecido amarelo que consistem em cerca de 600-7000 células fotogénicas. O citoplasma destas células é densamente preenchido com finos grânulos que contêm componentes necessários para a bioluminescência. Os pontos brilhantes têm sido caracterizados como partículas de $0,2 \mu\text{m}$ de diâmetro rodeados por uma membrana sendo designados de lumisomas. Os

componentes para a bioluminescência incluem a apoproteína activada pelo Ca^{2+} , aequorina, que emite luz verde-azul, e a proteína necessária, GFP, que aceita energia da aequorina e a reemite como luz verde (Prasher, 1995), tal como se observa na figura 4.

A GFP é produzida como uma apoproteína, que é convertida na sua forma activa fluorescente após ciclização e autooxidação (Brand, 1995). A GFP é uma proteína de 27 kDa (238 aminoácidos) e o cromóforo é criado por uma modificação pós- tradução: uma ciclização e uma oxidação autocatalíticas do tripéptido Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ (Siemering, 1996).

Desde 1987 que Douglas Prasher se interessou pela GFP por esta representar um potencial gene repórter por várias razões. A primeira é que a sua detecção, dando um nível suficiente de expressão, poderia ser relativamente trivial, porque pode ser detectada na irradiação usando fontes convencionais de luz UV. A detecção em tempo real *in vivo* foi vista como uma distinta possibilidade. Segundo, a introdução de um substrato poderia não ser requerido, diferente de outros comumente utilizados como genes repórter, tal como a β - galactosidase, a luciferase dos pirilampos, a fosfatase alcalina, acetiltransferase cloranfenicol (CAT) e β - glucoronidase (GUS). Terceiro, o seu tamanho relativamente pequeno (27 kDa) e monomérica natural podendo fazer proteínas de fusões manejáveis, especialmente em neurónios onde a difusão de proteínas grandes é difícil. Por último, a recolocação de aminoácidos no polipéptido produz formas de diferentes cores.

Assim o uso de cDNA da proteína GFP é útil para: identificar células transformadas; avaliar a expressão dos genes *in vivo*; marcar e localizar proteínas de fusão; estudar o trânsito intracelular de proteínas; marcar organismos unicelulares; marcar células específicas em organismos multicelulares; identificar organismos libertados no ambiente e identificar organismos que não são libertados no ambiente (Prasher, D., 1995).

A utilização da GFP como gene repórter começou a ser bastante alargada, iniciando-se a sua utilização em células animais, *Drosophila* (Brand, 1995), *E. coli* (Heim, 1996), células de mamíferos (Rizzuto, 1995) passando a células vegetais, *Zea mays* (Schenk, 1998), *Petunia* (Garabagi, 2000), *Nicotiana* (MacFarlane, 1999; Ratcliff, 2001), *Arabidopsis thaliana* (Haseloff, 1995; Mantis, 2000).

Durante estes experimentos a GFP tem sofrido bastantes alterações de modo a corresponder ao melhor gene repórter utilizado.

Estudos efectuados por Rosario Rizzuto et al. (1995) em células de mamíferos, mostram que a expressão da GFP é efectuada no citosol. Com esta descoberta os investigadores foram mais longe e fizeram alterações ao cDNA da GFP de modo a endereçá-la para a mitocôndria, resultando num mutante *mtgfp*, sem no entanto alterar as propriedades de fluorescência. O cDNA da *gfp10* de 1,0 kb foi fundido com a sequência que codifica o epitopo da hemaglutinina HA1. A sequência resultante foi então excisada do vector e clonada no vector pBSK+, imediatamente a seguir ao fragmento que codifica o polipéptido N-terminal de 31 aminoácidos do precursor da subunidade VIII da oxidase do citocromo c, que forma a sequência direccionada para a mitocôndria.

As mutações do cDNA da GFP não são só a nível de endereçamento mas também a nível das características no espectro de absorção.

Para alterar a cor do cromóforo basta substituir um aminoácido. Assim, se o aminoácido tirosina 66 for substituído por histidina (Y66H) ou por triptofano (Y66W) observa-se fluorescência azul, e se o aminoácido serina 65 for substituído por trionina (S65T) observa-se a fluorescência verde (Heim et al., 1996).

Por outro lado, se o aminoácido tirosina 66 for substituído por histidina (Y66H) observa-se fluorescência azul, e se o aminoácido serina 65 for substituído ou por cisteína (S65C) ou por trionina (S65T) aumenta a fluorescência verde (Reichel et al., 1996).

Estas alterações são importantes porque ajudam a distinguir marcadores em células múltiplas quando utilizados simultaneamente, servir como dadores ou receptores para transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET- *fluorescence resonance energy transfer*) e esclarecer a fascinante relação estrutura-função na proteína intrínseca (Rizzuto, 1995).

Em 1996, Rosário Rizzuto et al., construíram quimeras de mutantes que alteram as propriedades do espectro de absorção e direccionamento da GFP.

As quimeras foram construídas com mutantes (*mtGFP*) utilizados anteriormente com os que alteram os picos de absorção, obtendo *mtGFPS65T* e *mtGFPY66H/Y145F*.

O sucesso destas experiências abriu novas perspectivas a posteriores investigações como por exemplo o estudo directo da redistribuição da proteína e interacção proteína-proteína em células vivas.

Outras mutações têm sido obtidas, nomeadamente de mutantes para uma correcta expressão nas plantas.

Estudos efectuados por Haseloff em *Arabidopsis thaliana* demonstraram que o cDNA *gfp* da *Aequorea victoria* é encurtado devido a um corte de 84 nucleótidos, designado de *intrão críptico* localizado entre 400-483 nucleótidos, correspondendo a um polipéptido de 28 aminoácidos. Como este fenómeno não ocorre em *Aequorea victoria* foi necessário recorrer a alterações da sequência *gfp*, mutando o local do intrão críptico e diminuindo o conteúdo de UA (Uracilo e Adenina) no mRNA, para construir o *mgfp4* (Haseloff e Amos, 1995).

Os mesmos autores efectuaram estudos em *A. thaliana* e verificaram que a GFP se localiza no citoplasma e nucleoplasma, não aparecendo no nucléolo, vacúolos e sistema endomembranar.

É possível que níveis elevados de expressão de GFP sejam moderadamente tóxicos ou que interfiram na regeneração da planta, talvez devido à fluorescência ou a propriedades catalíticas. A fluorescência é uma fonte de radicais livres que podem ser prejudiciais à planta. Os autores referidos concluíram que em situação normal, em *Aequorea victoria*, os níveis elevados de GFP são tolerados devido à compartimentação da proteína em lumisomas semelhantes aos microcorpos.

Face a estes dados, surgiu a necessidade de endereçar a GFP para compartimentos subcelulares de modo a que não seja prejudicial à planta. Portanto, os estudos mais recentes têm incidido no direccionamento da GFP para o retículo endoplasmático (Haseloff et al., 1997; Heilein et al., 1998, Mankin et al., 2001).

Em 1996, Siemering et al., efectuaram trabalhos em *E. coli* e leveduras de modo a alterar a termosensibilidade da GFP imatura. Após sucessivas experimentações a nível de substituição de aminoácidos formaram a GFP_A tolerante a elevadas temperaturas, assegurando no entanto a estabilidade estrutural da molécula. A mutação consiste em substituir a serina 175 por uma glicina (S175G).

O *mgfp5* surge de mutações do *mgfp4*/GFP_A com a substituição I167T, produzindo uma variante (GFP5) que tem dois picos de excitação (máx até 395 nm e 473 nm) quase exactamente de igual amplitude e espectro de emissão ($\lambda_{\text{máx}} = 507$ nm). Assim a GFP5 também retém o fenótipo termotolerante (figura 5).

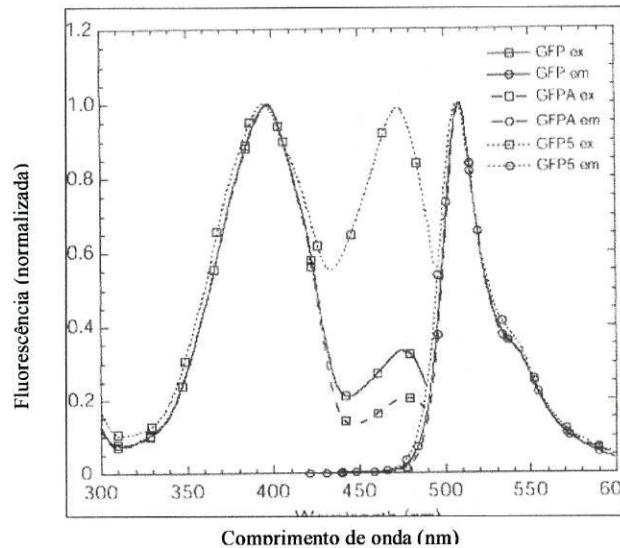


Figura 5- Espectro de excitação (ex) e emissão (em) de GFP, GFP5 e GFP5. (Adaptado de Siemering, 1996)

O problema da expressão correcta nas planta foi parcialmente resolvido, o *intrão críptico* deixou de ser cortado, contudo o sinal de intensidade de fluorescência em *A. thaliana* continuou a ser fraco e como a expressão da GFP em *E.coli* surge em agregados, sendo citotóxicos para as células, parece provável que a baixa fluorescência nas plantas se deva à insolubilidade da proteína. Assim, Davis et al. (1998) a partir do *mgfp4* construído por Haseloff, efectuaram sucessivas mutações, substituindo a fenilalanina por serina (F99S), a metionina por trionina (M153T) e a valina por alanina (V163A). Estas alterações resultaram numa proteína solúvel (smGFP) com um aumento de fluorescência relativamente ao *mgfp4*. Em conjugação com estas mutações, efectuaram substituições (S65T e Y66H) de modo a alterar os picos máximos de excitação.

Desde então a GFP tem sido utilizada em vários trabalhos, como por exemplo: estudos na embriogénese em *Arabidopsis thaliana* (Berger et al., 1998); comparação entre promotores (Schenk et al., 1998), hiperpolarização em raízes de *Arabidopsis thaliana* (Kiegle et al., 2000); stresses abióticos (Kiegle, et al., 2000).

Inicialmente a marcação de células requeria o uso de técnicas de microinjecção ou imunohistoquímica. Com o uso da GFP como gene repórter as células individuais podem ser estudadas *in vivo*, seguindo o seu desenvolvimento sem recorrer a manipulação nociva.

Sendo a GFP autofluorescente pode ser iluminada por um comprimento de onda apropriado e a luz emitida é então detectada por microscopia de fluorescência; mas, deve ter-se em atenção que, devido à elevada concentração de autofluorescência da planta a fluorescência da GFP pode ser ofuscada (Mantis, 2000).

Materiais e Métodos

CULTURA DE *Nicotiana tabacum* L.

Germinação de *Nicotiana tabacum* L.

Para se obter o material biológico estéril partiu-se da germinação de sementes desinfectadas. As sementes de *Nicotiana tabacum* L. cedidas pela UTAD foram submersas em água destilada com duas gotas de Tween 20 (Sigma) e agitadas durante 2 minutos. De seguida foram enxaguadas com água destilada para retirar o detergente, cobertas com etanol a 70% (v/v) (Merck) e agitadas durante 1 minuto. Decantou-se o etanol e cobriram-se as sementes com uma solução de lixívia comercial a 20% (v/v) e duas gotas de Tween 20. Agitou-se durante 20 minutos. Na câmara de fluxo laminar, decantou-se a solução e efectuaram-se 5 lavagens com água esterilizada. As sementes foram colocadas no meio MS (0,5X) sólido em placas de Petri (Gamborg et al., 1995). O meio tem apenas macronutrientes (Merck, Alemanha) e micronutrientes (Merck, Alemanha, excepto o CoSO₄, May & Bayes, Ltd, England) do meio MS e sacarose 0,5% (m/v) (Merck, Alemanha) (tabela 2).

Algumas sementes desinfectadas foram colocadas em papel de filtro esterilizado humedecido com água esterilizada numa caixa de Petri.

Todas as sementes foram colocadas no local de crescimento com uma temperatura de 25 °C e com um ciclo de 18 h luz (Mazdafluor 6CTF36W)/6 h obscuridade.

Após germinação, as plântulas foram transferidas para frascos de vidro com meio MSB5. Este meio é constituído por macro e micronutrientes do meio MS e vitaminas (Sigma) do meio B5 e com sacarose a 0,5% (m/v), segundo Gamborg et al., 1995 (tabela 3).

Os frascos são tapados com uma película de plástico (Sigma) e presos com um elástico.

Em cada seis semanas as plantas foram mudadas para meio fresco MSB5.

Todos os meios, materiais e água são autoclavados (Sanyo) durante 22 minutos a uma temperatura de 121 °C (0,1Mpa).

Tabela 2- Meio MS (segundo Murashige e Skoog, 1962). O pH do meio é acertado com KOH 1 M para valores 5,7 - 5,8. Para solidificar o meio adicionou-se agar (6,25 mg/L)

Nutrientes do meio		mg/L
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2 H ₂ O	439
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	Fe-EDTA	40
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,01689
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,025
	KI	8.3

Tabela 3 – Meio MSB5 segundo Gamborg et al. (1995). O pH do meio é acertado com KOH 1 M para valores 5,7 - 5,8. Para solidificar o meio adicionou-se agar (6,25 mg/L)

Nutrientes do meio		mg/L
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2 H ₂ O	439
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	Fe-EDTA	40
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,01689
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,025
	KI	8,3
Nutrientes orgânicos	Ácido nicotínico	1
	Piridoxina-HCl	1
	Tiamina-HCl	10
	Mio-inositol	100
	Sacarose	5000

Multiplicação de *N. tabacum* L.

A multiplicação *in vitro* de *N. tabacum* foi conseguida a partir dos ápices caulinares das plantas que foram colocados em meio MSB5 anteriormente descrito.

A multiplicação foi também conseguida a partir de explantes (1 cm²) de folhas com mais ou menos 5 semanas. Os explantes são colocados em placas de petri com o meio SM (Gamborg et al., 1995) ligeiramente alterado. O meio consiste no meio MSB5 suplementado com 2-IP (7,5 mg/L) e NAA (0,1 mg/L), esta substitui a hormona 2-CPA e MSB5 em vez de MS, uma vez que as plantas se desenvolvem bem neste meio. Ainda para a regeneração dos explantes utilizou-se outro meio constituído por MSB5 (também a substituir o MS pelo mesmo motivo apresentado acima) suplementado com BA (1 mg/L).

Após a formação de caules, estes foram cortados com bisturi esterilizado e, em condições de esterilização, transferidos para meio MSB5 para enraizamento.

PREPARAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS

Transformação da cultura de *E. coli* DH5 α

Para a preparação da cultura com o vector pCAMBIA (CAMBIA, Austrália) foi necessário recorrer à transformação de células competentes da estirpe de *E. coli* DH5 α . A transformação foi efectuada segundo procedimento recomendado pela Life Technologies™. Num tubo *ependorf* misturou-se 100 μ L de células competentes DH5 α e 9 μ L de pCAMBIA e colocou-se a mistura em gelo durante 30 minutos. De seguida, colocou-se a mistura em banho-maria a 37 °C durante 45 segundos. Voltou a colocar-se 2 minutos no gelo e adicionou-se 0,95 mL de LB (tabela 4). Colocou-se em banho-maria a 37 °C com agitação durante uma hora. Inoculou-se 150 μ L da cultura em meio LB sólido com canamicina (50 μ g/mL) porque o vector tem o gene que codifica a resistência à canamicina e colocou-se a 37 °C durante a noite.

Inoculou-se uma colónia em meio LB e colocou-se a 37 °C durante a noite. Guardou-se a placa a 4 °C.

A extracção do DNA plasmídico foi efectuada de dois modos diferentes. No primeiro, realizou-se um *mini-prep* da cultura bacteriana com um *kit* comercializado

pela QIAGEN. No segundo, para a extracção de DNA plasmídico (*mini-prep*) recorreu-se ao método enzimático de lise celular. Inoculou-se uma colónia em meio líquido LB com canamicina (50 µg/mL) e colocou-se a 37 °C com agitação durante a noite. Transferiu-se 1,5 mL da cultura para um *eppendorf* e centrifugou-se à velocidade máxima durante 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se mais 1,5 mL da cultura e voltou-se a centrifugar à velocidade máxima durante 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 400 µL de tampão STET (sacarose 8% (m/v); de Triton X-100 0,1% (v/v); 50 mM de EDTA; 50 mM de Tris –HCl pH 8,0) com a ajuda de uma micropipeta. Adicionou-se 8 µL e lisozima (50 mg/mL), inverteu-se o tubo e colocou-se a incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Descartou-se a alíquota da lisozima depois de descongelada. Ferveu-se a solução durante 45 segundos e centrifugou-se a 14000 rpm durante 10 minutos.

De seguida, removeu-se o sedimento com uma ponta esterilizada (também pode ser com um palito esterilizado) e adicionou-se 400 µL de isopropanol frio e misturou-se no vortex. Centrifugou-se novamente a 14000 rpm durante 10 minutos. Aspirou-se o sobrenadante com uma micropipeta e deixou-se secar ao ar durante 30 minutos (ou na estufa a 37 °C durante 10 minutos). Ressuspendeu-se o sedimento em 40 µL de água estéril.

Posteriormente efectuou-se uma reacção de restrição. Para um volume final de 20 µL, juntou-se 16 µL de água estéril, 2 µL de REACT 2 (Life Technologies™), 1 µL de pCAMBIA (*mini-prep*) e 1 µL de *Hind* III. Colocou-se a mistura em banho-maria a 37 °C durante uma hora. Adicionou-se mais 1 µL da enzima e deixou-se decorrer a reacção mais uma hora. Para a análise em electroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) com brometo de etídio, adicionou-se 1 µL de tampão de amostra.

O gel foi carregado com plasmídeo não cortado, com plasmídeo cortado e marcador Fago λ cortado com *Hind* III e decorreu até uma migração de mais ou menos dois terços do gel numa voltagem de 65V.

Tabela 4- Meio LB (Luria-Bertani). Acertar pH 7,5 com NaHO.
Para meio sólido adicionar agar 1,5% (m/v).

Nutrientes do meio	g/L
Triptona	10
Extracto de levedura	5
NaCl	10

Preparação da estirpe *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

Preparação da estirpe *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 competente através do método químico.

A transformação do *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Life technologies™) efectuou-se segundo Walkerpeach et al. (1994), substituindo o meio YEP por LB: inoculou-se 5 mL de meio LB suplementado com espectinomicina (100 µg/mL). Colocou-se em banho-maria a 28 °C, com agitação (150-250 rpm) durante 2 dias. De seguida, inoculou-se 50 mL de LB com 2 mL da cultura e colocou-se novamente em banho-maria a 28 °C, com agitação, até uma DO₆₀₀ de 1,0 (4 horas ou mais). Centrifugou-se 50 mL da cultura num tubo *Falcon* esterilizado a 3000g durante 15 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento bacteriano em 1 mL de CaCl₂ 10 mM gelado, mantendo-se a suspensão em gelo. Seguidamente, colocou-se 100 µL num tubo *ependorf* esterilizado e misturou-se glicerol esterilizado 50 % (v/v), armazenando-se a -70 °C.

Preparação de células electrocompetentes, segundo o método de Hooykaas et al. (1994):

Prepararam-se placas frescas com riscado das bactérias e inocularam-se em 2 mL de meio YM (tabela 5) a 30 °C com agitação durante 6 horas. Transferiu-se 100 µL da pré-cultura para 100 mL de YM suplementado com glicose 0,1% (m/v) e espectinomicina (100 µg/ml) e incubou-se a 30 °C com agitação durante a noite, até uma DO₆₆₀ de 1-1,5. Arrefeceu-se a cultura em gelo durante 15 minutos e centrifugou-se durante 20 minutos a 5000 rpm. Realizaram-se três lavagens ao sedimento com 10 mL de 1 mM HEPES (pH 7,0) e uma lavagem com 10 mL de glicerol a 10% (v/v). Ressuspendeu-se o sedimento em 500 µL de glicerol a 50% (v/v) (densidade celular 1-5 x10¹¹ bact/mL).

Distribuiu-se a suspensão de bactérias em alíquotas de 50 µL para tubos *ependorf* e congelou-se a -70 °C onde ficou armazenado.

Tabela 5- Meio YM. Acertar pH 7,0. Para meio sólido adicionar agar a 1,5% (m/v).

Nutrientes do meio	g/L
Extracto de levedura	0.4
Manitol	10
NaCl	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
K ₂ HPO ₄	0.5

Transformação do *Agrobacterium* com o vector pCAMBIA.

Transformação do *Agrobacterium* segundo o método Walkerpeach et al. (1994)

Na transformação do *Agrobacterium* substituiu-se o meio YEP por YM e prosseguiu-se do seguinte modo: mergulhou-se 50 µL do mini-prep do pCAMBIA no topo das células geladas de *Agrobacterium* (100 µL). Incubou-se a mistura a 37 °C em banho-maria durante 5 minutos. De seguida, adicionou-se 1 mL de meio YM e agitou-se durante 4 horas à temperatura de 30 °C. Centrifugou-se a cultura durante 2 min a 12000 g e ressuspendeu-se o sedimento em 100 µL de YM. Inoculou-se 50 µL da ressuspensão na placa com YM com canamicina (50 µg/mL). Incubou-se a 30 °C durante 2 dias.

Usando uma ansa de inoculação esterilizada, transferiu-se uma colónia de *Agrobacterium* da placa para um tubo *Falcon* esterilizado com 25 mL de meio líquido YM com espectinomicina (100 µg/ml) e canamicina (50 µg/mL). Colocou-se o tubo *Falcon* num agitador (150-250 rpm) durante a noite, a 30 °C. De seguida, diluiu-se 25 mL da cultura com 10-15 mL de meio YM líquido fresco. Deixou-se a suspensão de *Agrabacterium* a crescer 4 h no agitador a 30 °C.

Opção: medir a densidade óptica a 550 nm até as células atingirem a leitura de 0,8-1,0 (0,8-1 x10⁹ células/mL)

Transformação do *Agrobacterium* por electroporação

A electroporação realizou-se segundo o procedimento recomendado pela Life Technologies™ ligeiramente alterado (segundo o método de Hooykaas et al., 1994). Colocaram-se as duas cuvetes de electroporação e dois *ependorfs* em gelo. Retirou-se o *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 electrocompetente do congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelou-se em gelo. Depois de descongelado misturaram-se gentilmente as células. Colocaram-se $40\text{ }\mu\text{L}$ de células em cada tubo *ependorf* e adicionou-se $1\text{ }\mu\text{L}$ de DNA do *mini-prep* do vector (a concentração de DNA do *mini-prep* deve ser até $100\text{ ng}/\mu\text{L}$). Pipetou-se a mistura para a cuvette de electroporação e colocou-se no electroporador BioRad® e seguiram-se as instruções do fabricante ($25\text{ }\mu\text{F}$, $400\text{ }\Omega$ para pulsos de $2,5\text{ kV}$ com $8\text{-}9\text{ ms}$). Adicionou-se 1 mL de meio YM à temperatura ambiente na solução electroporada. Transferiu-se a solução para um tubo esterilizado e agitou-se a 225 rpm durante 3 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Centrifugou-se a cultura durante 2 minutos a 12000 g e ressuspendeu-se o sedimento em $200\text{ }\mu\text{L}$ de YM. Inoculou-se $50\text{ }\mu\text{L}$ e $150\text{ }\mu\text{L}$ da cultura em placas com YM suplementado com espectinomicina ($100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) e canamicina ($50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubaram-se a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação durante 2,5 dias.

Mini-prep do Agrobacterium

A preparação do *mini-prep* do *Agrobacterium* foi realizada segundo o procedimento de Hooykaas (1994): Inoculou-se *Agrobacterium* em 5 mL de YM com espectinomicina ($100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) e canamicina ($50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) e foi a incubar a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ com agitação durante 6 horas. Centrifugou-se $1,5\text{ mL}$ das culturas a 12000 g num tubo *ependorf* durante 10 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em $100\text{ }\mu\text{L}$ de solução de suspensão celular (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA pH 8,0). E adicionou-se $8\text{ }\mu\text{L}$ de lisozima ($50\text{ mg}/\text{mL}$), mexeu-se e incubou-se a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. De seguida, juntou-se $200\text{ }\mu\text{L}$ de solução de lise celular ($0,2\text{ M}$ NaHO, SDS $1,0\text{ }\%$ (m/v)), mexeu-se completa e gentilmente por inversão do tubo. Adicionou-se $50\text{ }\mu\text{L}$ de fenól equilibrado com 2 volumes de solução de lise celular e vortexou-se. Juntou-se $200\text{ }\mu\text{L}$ de solução de neutralização (3 M acetato de sódio (pH 5,2)) e inverteu-se o tubo para misturar completamente a solução. Centrifugou-se a 12000 g durante 5 minutos, transferiu-se o sobrenadante para outro *ependorf* e adicionou-se 2,5 volumes

de etanol a 95% (v/v) e colocou-se no gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se novamente a 12000 g durante 5 minutos para sedimentar o DNA/RNA e misturou-se 400 μL de TE (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA (pH 7,8)) e precipitou-se novamente com etanol a 95% (v/v) e 10 minutos no gelo. Fez-se nova centrifugação, descartou-se o sobrenadante e colocou-se a secar ao ar. Como o fenol ainda não tinha sido completamente removido houve necessidade de lavar novamente o sedimento com 250 μL de etanol a 70% e centrifugou-se a 12000 g durante 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar ao ar. Ressuspendeu-se o sedimento em 50 μL de água esterilizada. Como o DNA demorou a dissolver na água, colocou-se a 65 °C no *heating block* mexendo de 5 em 5 minutos, até um máximo de vinte minutos. O que não ficar dissolvido é “lixo”. Fazer um centrifugação rápida e utilizar o sobrenadante.

De seguida, efectuou-se uma reacção de restrição para linearizar o plasmídeo. Para um volume final de 20 μL , juntou-se 16 μL de água estéril, 2 μL de REACT 2 (Life Technologies™) 1 μL de pCAMBIA (*mini-prep*) e 1 μL de *Hind* III. Colocou-se a mistura a 37 °C durante uma hora. Adicionou-se mais 1 μL da enzima e deixou-se decorrer a reacção mais uma hora. Fez-se a mesma reacção para um plasmídeo pCAMBIA original (*stock*) para comparar os resultados.

Para a electroforese em gel de agarose 0,8% (m/v), adicionou-se 1 μL de tampão de amostra (mistura de glicerol com azul de bromofenol) em cada uma das reacções, utilizando como marcador o Fago λ cortado com *Hind* III. A electroforese decorreu até uma migração de mais ou menos dois terços do gel numa voltagem de 65V.

TRANSFORMAÇÃO DO TABACO:

Preparação das secções de folha e Co-cultura.

Cortaram-se secções de folhas (1 mm²) da cultura de gomos de 4 a 5 semanas com uma tesoura esterilizada de modo a caírem directamente na cultura de *Agrobacterium*, tendo o cuidado de as secções estarem inteiramente submergidas por vários segundos.

Secaram-se as secções num papel de filtro esterilizado e inocularam-se em meio SM (tabela 6), 20 secções por placa de Petri.

Taparam-se as placas de Petri com *parafilm* e incubaram-se no local de crescimento durante 3 dias com pouca luz (tapadas com papel).

Após os três dias, transferiram-se as secções para o meio SM suplementado com Higromicina B (50 µg/mL) (GIBCO), para seleccionar as transformadas e Augmentin (400 µg/mL) que mata o *Agrobacterium* e para meio MSB5 contendo BA numa concentração de 1 mg/L, Higromicina B (50 µg/mL) (GIBCO), e Augmentin (400 µg/mL).

Taparam-se as placas com *parafilm* e incubaram-se no local de crescimento iluminado. Nas duas primeiras semanas, mudaram-se os explantes para meio fresco de dois em dois dias.

Quando os gomos atingiram 10-15 mm de comprimento, removeram-se com o bisturi esterilizado e colocaram-se em frascos de vidro com meio MSB5 suplementado com Higromicina B (50 µg/mL) e Higromicina B (25 µg/mL) para enraizamento, mantendo-se a selecção durante cerca de 1 mês. Após este tempo, as plantas foram transferidas para meio MSB5 sem antibióticos.

Tabela 6- Meio SM (Gamborg, 1995) ligeiramente alterado, a hormona p-CPA foi substituída por NAA. Ajustar pH 5,7-5,8 com KOH 1 M. Para meio sólido adicionar agar a 0,8% (m/v).

Nutrientes do meio		mg/L
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2 H ₂ O	439
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	Fe-EDTA	40
	H ₃ BO ₃ (mg)	6,20
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,01689
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,025
KI	8.3	
Nutrientes orgânicos	Ácido nicotínico	1
	Piridoxina-HCl	1
	Tiamina-HCl	10
	Mio-inositol	100
	NAA	0,1
	2 IP	7,5
	Sacarose	30000

Análises para confirmar a transgenia

Isolamento de DNA e RNA

Para a detecção do cDNA através de vários métodos foi necessário recorrer à extracção de RNA total e DNA genómico .

A extracção de RNA e DNA foi efectuada com o reagente TRIZOL (GIBCO) seguindo procedimento anexo ao mesmo.

O TRIZOL é um reagente que consiste numa solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina e permite o isolamento de RNA de modo rápido. Este procedimento foi desenvolvido por Chomezynki e Sacchi.

O método tem a vantagem de se obter grandes quantidades da substância requerida sem qualquer tipo de contaminação, a partir de pequenas porções (50-100 mg) de tecido fresco. Após este método, o RNA pode ser utilizado em RT-PCR, bem como outras técnicas de análise.

A extracção do RNA total consiste basicamente em provocar a lise celular com TRIZOL mantendo a integridade do RNA. A adição de clorofórmio seguido de uma centrifugação, separa a solução em duas fases: fase aquosa e a fase orgânica. O RNA encontra-se na fase aquosa. Após transferência desta, o RNA é recuperado por precipitação com isopropanol, mas em vez de 10 minutos como consta no procedimento, a precipitação ocorreu durante a noite a 4 °C. Depois da remoção da fase aquosa, o DNA e as proteínas podem também ser recuperadas por precipitação sequencial. A precipitação com etanol recupera o DNA da interfase e uma precipitação adicional com isopropanol recupera as proteínas da fase orgânica.

Análise do DNA

Para detectar a presença do cDNA da GFP no genoma da planta efectuou-se uma reacção de PCR.

A reacção de PCR ocorreu num volume de 50 µL contendo 1 µL do iniciador *GFPlleft* cuja sequência é: 5'-CATGGCCAACACTTGTC-3', 1 µL do iniciador *GFPright* com a sequência 5'-ATCCTGTTGACGAGGGTGTC-3', 5 µL de tampão de PCR 10X, 1,5 µL MgCl₂ 50 mM, 1 µL dNTP's mix 10 mM e 5 µL de DNA (planta não

transformada e plantas transgênicas A e B) e 35,25 µL de água estéril. O PCR consiste na seguinte sequência: 94 °C durante 3 minutos, 35 ciclos (94 °C, 1 minuto; 50 °C 1 minuto; 72 °C, 2 minutos) e a extensão ocorre a 72 °C durante 7 minutos. A Taq polimerase (0,25 µL) foi adicionada após o passo da desnaturação (3 minutos a 94 °C).

Os produtos do PCR (10 µL) foram separados no gel de agarose a 0,8% (m/v) com brometo de etídio.

Análise do RNA

Para se efectuar a análise do RNA primeiro efectuou-se uma electroforese para verificar se o RNA estava em boas condições.

A tina da electroforese sofreu um tratamento prévio: lavagem com detergente (*extran*) e água durante 10 minutos, passagem por álcool e lavagem de 10 minutos com água com DEPC.

O RNA foi separado num gel de agarose a 1% (m/v) com brometo de etídio. Para verificar a presença de mRNA foi efectuado um RT-PCR com *Ready-To-Go™ RT-PCR beads* (Amersham pharmacia). Este produto é uma pré-mistura que contém todos os reagentes necessários, excepto iniciadores e o molde, para efectuar um RT-PCR num único passo num volume de 50 µL. Cada reacção (0,2 mL) contém aproximadamente 2 unidades de Taq DNA polimerase, 10 mM Tris HCl (pH 9,0), 60 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada um dos dNTP, M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Vírus), Transcriptase reversa (FPLCpure™), Inibidor da ribonuclease RNAGuard™ e estabilizadores, incluindo Rnase/Dnase livre de BSA. Em cada reacção foi adicionada 1 µL de cada iniciador utilizado no PCR e 5 µL de RNA total, perfazendo o volume com água com DEPC.

Os produtos do RT-PCR (10 µL) foram separados no gel de agarose a 0,8% (m/v) com brometo de etídio.

Observação de fluorescência

Para observação de fluorescência as plantas foram excitadas com luz UV num transiluminador com comprimento de onda de 312 nm.

Além disso, observaram-se preparações extemporâneas de folhas inteiras e de cortes de caule e folha da planta ao microscópio de fluorescência (LEICA, modelo DMLB).

Efectuaram-se cortes dos órgãos da planta com um 1 cm de comprimento e incubaram-se no fixador Histochoice™ MB (Amresco). Estes fragmentos foram colados a um suporte de um vibratom Leica VT 1000V e seccionados imersos em PBS com uma espessura entre 50-60 μm . Os cortes foram observados no microscópio de fluorescência (LEICA, modelo DMLB) utilizando o meio de montagem anti-oxidante (TBS-T 50%, glicerol 50% e DABCO 2 mg/mL). As imagens foram documentadas usando filme kodak 400ASA (máquina LEICA) com filtros FITC.

Resultados e Discussão

Numa época em que é exigida uma *ciência rápida e fidedigna* recorreu-se ao uso de estratégias/metodologias que rapidamente obtenham resultados fiáveis. A transformação de plantas não pode passar ao lado da tecnologia do DNA recombinante e, por isso, hoje em dia a transformação de plantas é um meio para estudos científicos que de outro modo é difícil o acesso, revelando-se também uma óptima estratégia em aplicações na agricultura e ecologia. Assim, o uso da GFP como gene repórter é importante, pois pode ser observado macroscopicamente e *in vivo*, bem como a observação de padrões de fluorescência da GFP nos diferentes órgãos da planta e em diferentes idades.

Antes da transformação de *N. tabacum* foi necessária a sua multiplicação *in vitro* que ocorreu por enraizamento de ápices caulinares e a partir de explantes de folha (figura 6).

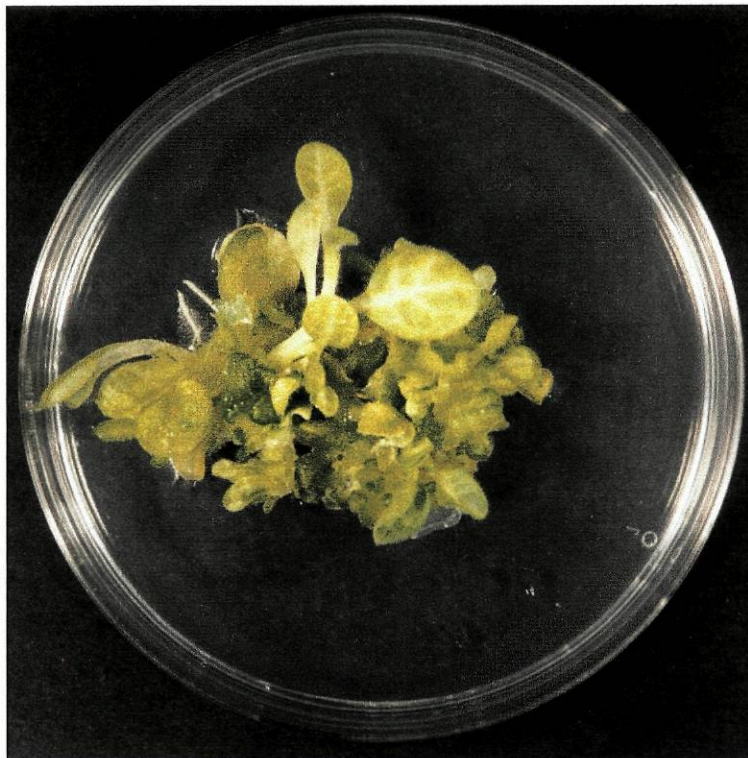


Figura 6- Proliferação de gomos de *N. tabacum* em meio MSB5/BA. (1X)

Na figura 6 pode observar-se a proliferação de gomos a partir de explantes de folha em meio MSB5 suplementado com BA (1 mg/L). Este meio revelou-se mais eficiente para a regeneração do tabaco em termos de rapidez relativamente ao meio que continha 2 IP. Após algum crescimento dos gomos, estes foram transferidos para meio MSB5 (figura 7), tendo o cuidado de se retirar todo o tecido caloso que se formou.

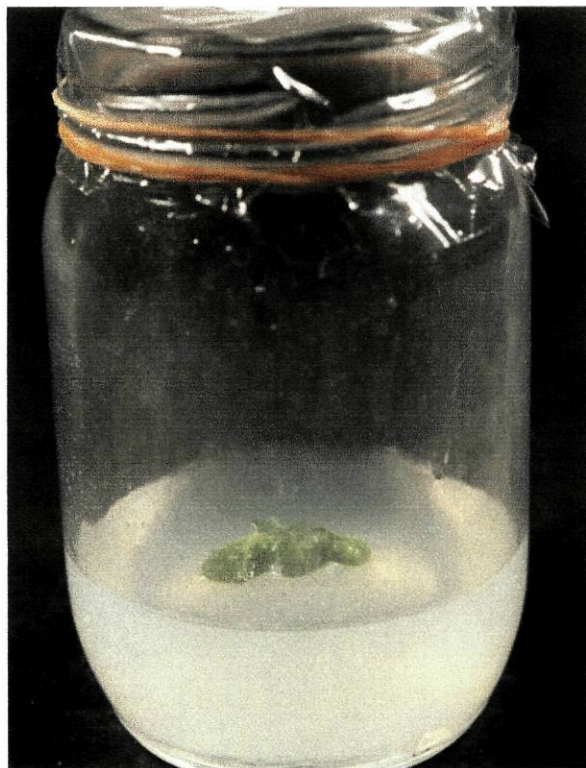


Figura 7- Enraizamento dos gomos em MSB5. (1X)

Na figura 7 observam-se os gomos em meio MSB5. Este meio não tem qualquer adição de hormonas, mas revelou-se eficiente para o processo de enraizamento.

Para a transformação das plantas, foi ainda necessário transformar o *Agrobacterium* com o vector pCAMBIA1302 (mantido para propagação em *E. coli*).

Inicialmente a transformação de *Agrobacterium* foi realizada pelo método químico por ser um método relativamente fácil de aplicar (choque térmico), embora tenha uma eficiência de transformação baixa. Por isso, o método teve de ser repetido algumas vezes para se obter *Agrobacterium* transformado em quantidade suficiente e efectiva na transformação.

Como a transformação do *Agrobacterium* foi difícil de obter, recorreu-se ao método por electroporação embora também não tenha tido grande eficiência de transformação, o que normalmente não se verifica. Depois de transformado o *Agrobacterium* foi seleccionado no meio LB com canamicina (50 µg/mL).

Durante o crescimento do *Agrobacterium* no meio LB por vezes formavam-se agregados celulares, por isso o meio foi substituído por YM. Mas, segundo Lin et al.(2000), é normal ocorrer a formação de agregados no meio LB quando o número de células ultrapassa as 10^8 e que o meio YM previne a formação dos mesmos.

A transformação de *Nicotiana tabacum* mediada pelo *Agrobacterium* ocorreu com sucesso após várias tentativas (figura 8).

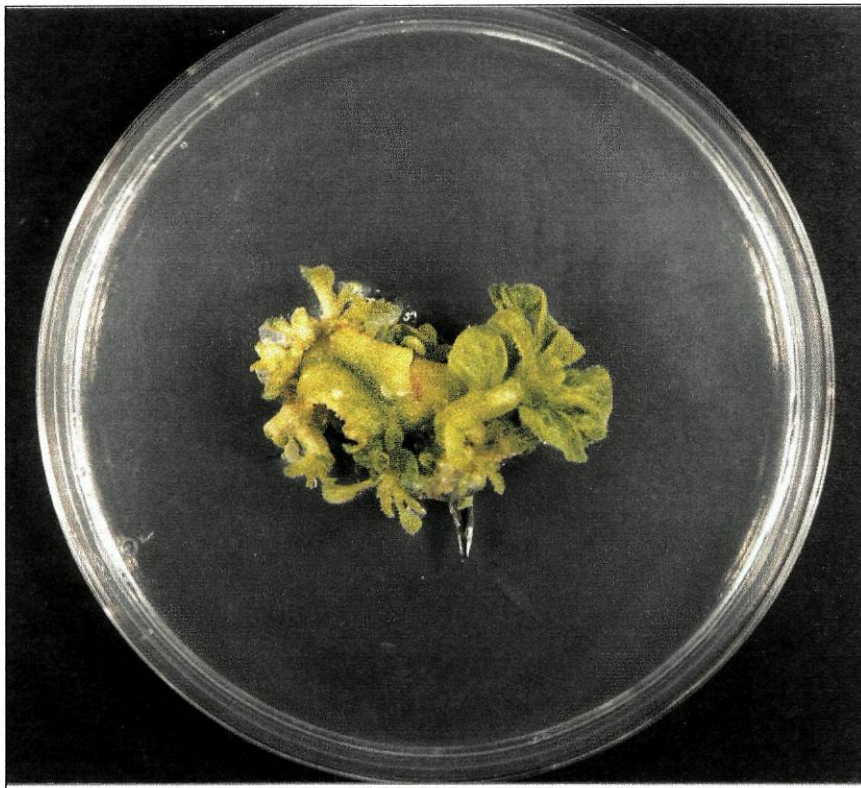


Figura 8 -Proliferação de gomos de *N. tabacum* em meio MSB5/BA depois de sujeito ao método de transformação com o *Agrobacterium*. (1X)

Na figura 8 observa-se a proliferação de gomos de explantes de folha que sofreram transformação. Os meios utilizados para este processo foram os meios SM e MSB5 suplementado com BA (1 mg/L). Este último promoveu a proliferação mais rapidamente.

Comparando os gomos não transformados da figura 6 com os gomos sujeitos ao método de transformação da figura 8 podemos observar que estes últimos têm um desenvolvimento menor.

Os gomos transformados foram inicialmente seleccionados em meio SM suplementado com Higromicina B (50 µg/ mL) e meio MSB5 suplementado com BA e Higromicina B (50 µg/ mL). Nestes meios, alguns gomos morriam passadas duas semanas enquanto outros sobreviviam apenas cerca de um mês. Os gomos que morriam rapidamente não estão transformados porque não manifestam resistência ao antibiótico. Os outros gomos que sobrevivem mais algum tempo, sugerindo que estão transformados, foram transferidos para os meios com Higromicina B mas numa concentração inferior (25 µg/mL). Mesmo assim algumas plantas continuaram a morrer passado pouco tempo e outras demonstraram um desenvolvimento muito lento e acabaram por morrer quando permaneciam mais de um mês no meio.

A maior parte dos procedimentos da literatura consultada não refere o tempo de selecção para as plantas transformadas. Contudo, para Bevan, 1984, a selecção deve ser mantida durante 6 a 8 semanas. No presente trabalho, no entanto, não foi possível manter as plantas vivas tanto tempo no meio com antibiótico, mesmo sendo transformadas. Pode inferir-se, então, que o intervalo de tempo que as plantas permanecem no meio com antibiótico é crucial para manter sobreviventes as plantas transformadas. Perante este facto, passado um mês as plantas sobreviventes foram colocadas em meio MSB5 sem antibiótico. No entanto, as plantas continuaram a manifestar um desenvolvimento muito lento. Estes dados sugerem que ou o antibiótico interfere no próprio metabolismo da planta, ou o DNA estranho interfere no metabolismo normal da planta, ou então pode ocorrer uma elevada produção de GFP que pode ser prejudicial à planta, pois o cDNA está sob um promotor forte, o CaMV 35S.

A GFP quando excitada liberta radicais livres que são citotóxicos em doses elevadas (Davis, 1998). Mankin et al. (2001) verificaram que as plantas de *Arabidopsis* transformadas com GFP tinham um desenvolvimento mais lento do que as

transformadas com LUC e ainda Colby e Mereth (1990) referem que o antibiótico retarda a diferenciação celular bem como o seu desenvolvimento.

Para observar-se a fluorescência da GFP colocaram-se folhas das plantas num transiluminador e iluminaram-se com luz UV (figura 9).

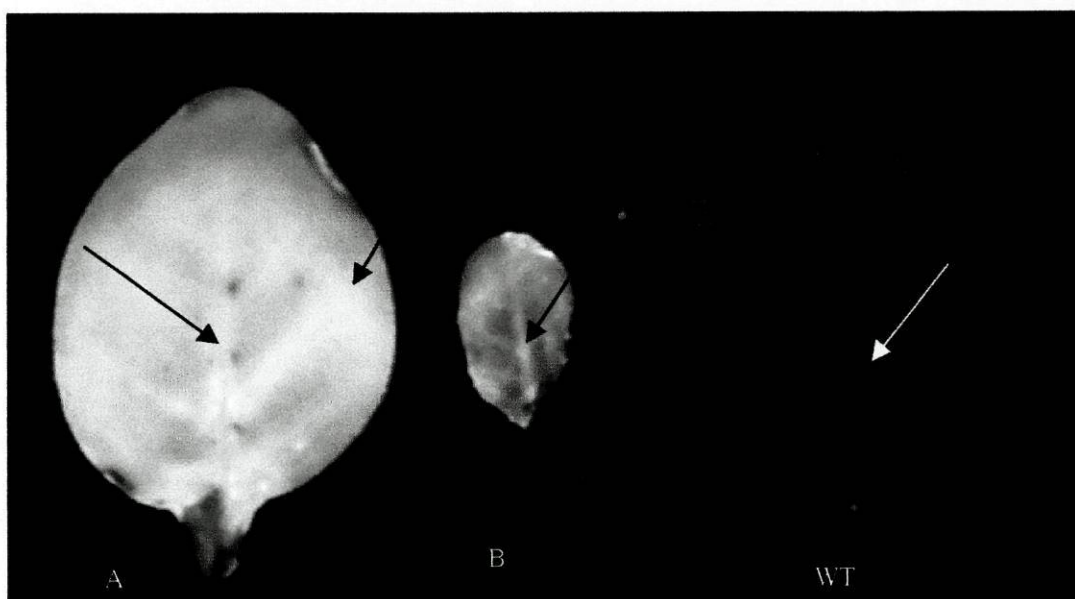


Figura 9- Observação da página superior de *Nicotiana tabacum* quando excitada com UV ($\lambda = 312$ nm) durante 2 segundos no transiluminador. A e B representam *N. tabacum* transgênica e WT *N. tabacum* não transformada. As setas indicam local de visualização de fluorescência.

Na figura 9 pode observar-se fluorescência da GFP quando excitada com UV apenas nas plantas A e B, que representam plantas de *N. tabacum* transgênicas. A fluorescência é mais intensa nas nervuras do que no mesófilo. A elevada fluorescência na nervura pode ser devido à autofluorescência da lenhina da parede secundária do xilema. A planta *N. tabacum* não transformada, WT, mostra alguma fluorescência na nervura. Esta fluorescência deve-se à autofluorescência da lenhina da parede secundária do xilema.

Como se pode observar na figura 9, as duas plantas transgênicas A e B mostram fluorescência quer no mesófilo quer a nível das nervuras, local onde se observa maior intensidade de fluorescência. A planta *N. tabacum* não transformada (WT) não emite fluorescência como a que se observa nas outras plantas, mas nota-se também alguma autofluorescência na nervura principal. Contudo comparando a fluorescência das duas nervuras, verifica-se que há uma maior intensidade de fluorescência a nível das plantas transgênicas.

Ainda para observar a fluorescência da planta transgênica efectuaram-se cortes e observaram-se ao microscópio de fluorescência onde forem excitados com luz UV (figuras 10-19 nas páginas seguintes).

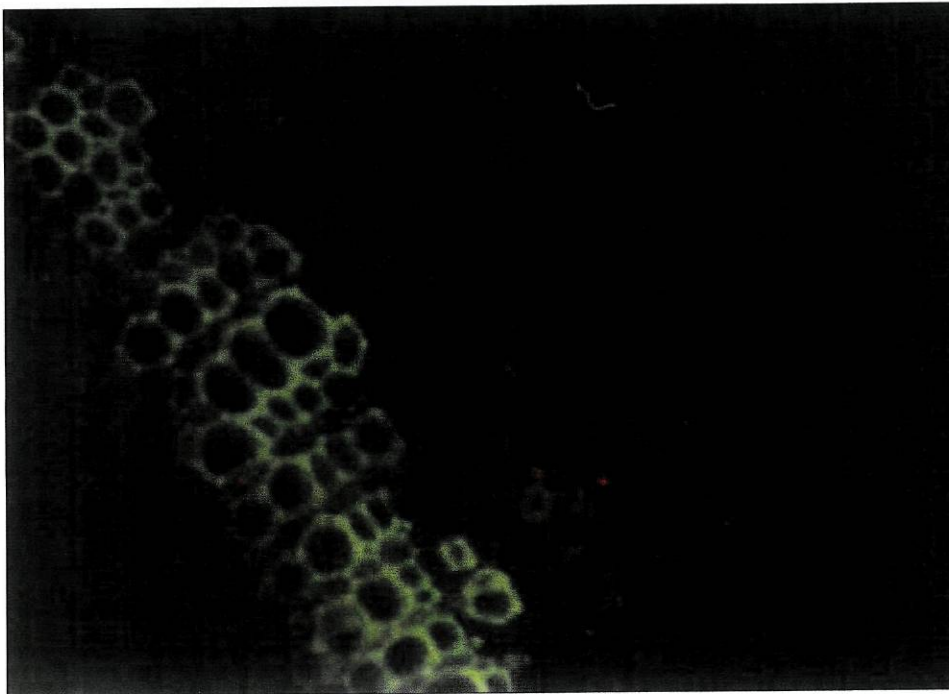


Figura 10 –Secção transversal de caule de *N. tabacum* não transformada. Filtro FITC. (224 X)

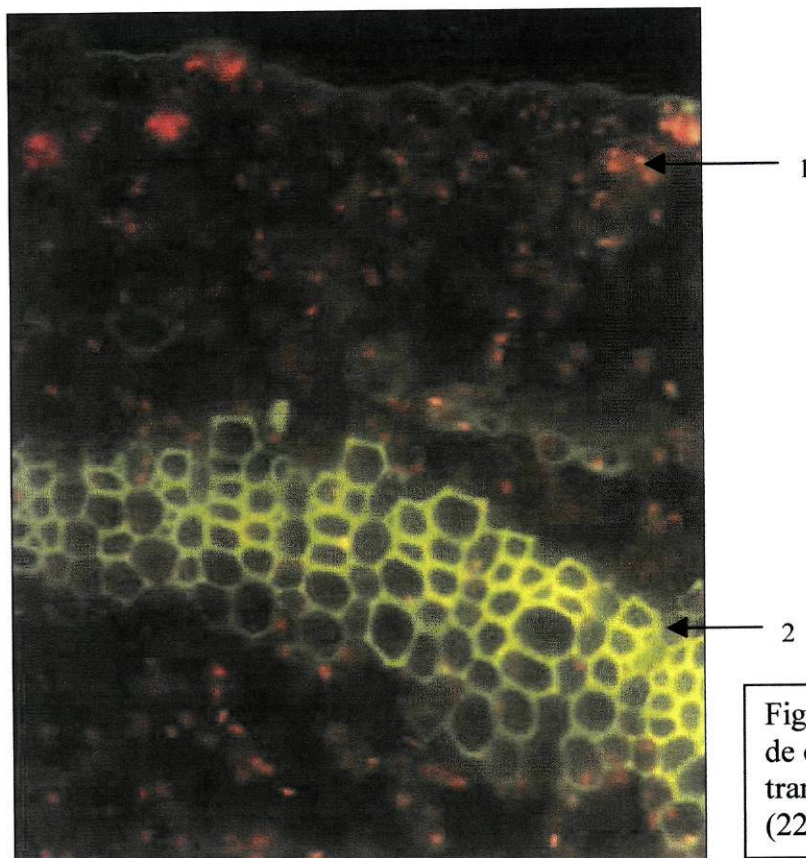


Figura 11 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* transgênica. Filtro FITC. (224 X)

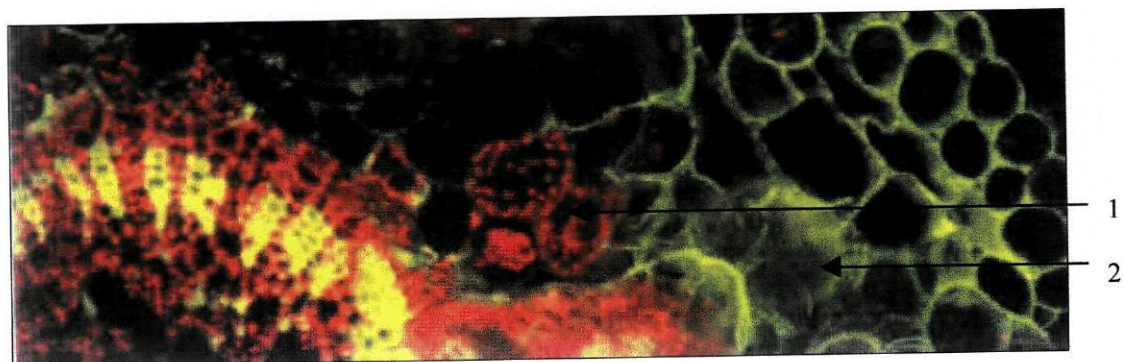


Figura 12 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* transgênica. Filtro FITC.
(112 X)

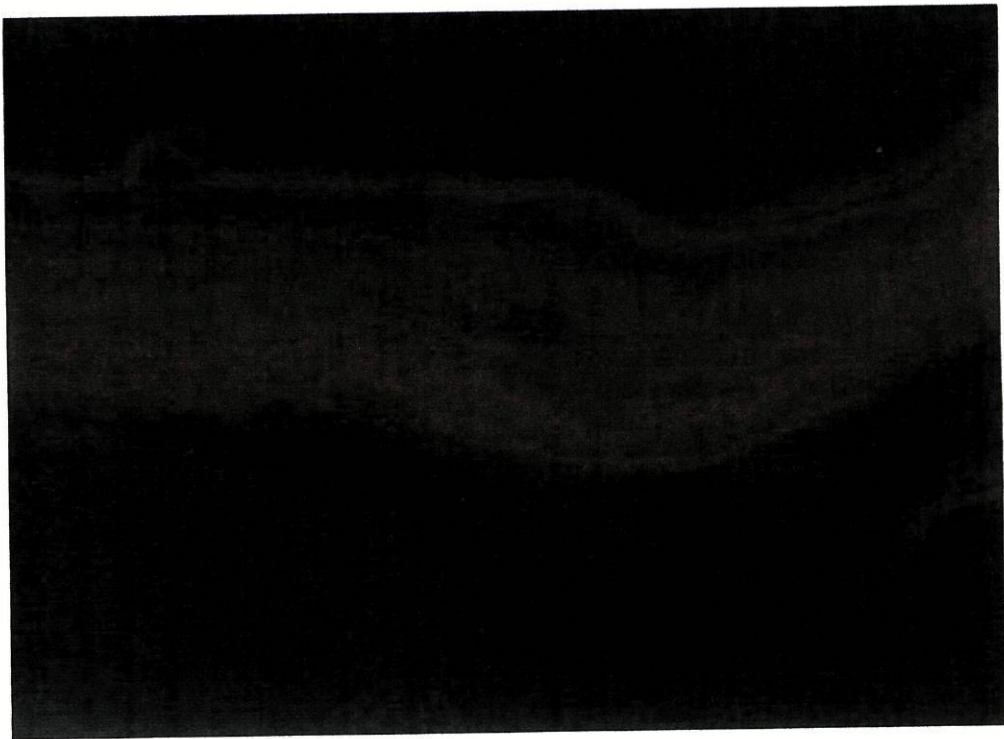


Figura 13- Folha de *N. tabacum* não transformada. Filtro FITC .(112X)

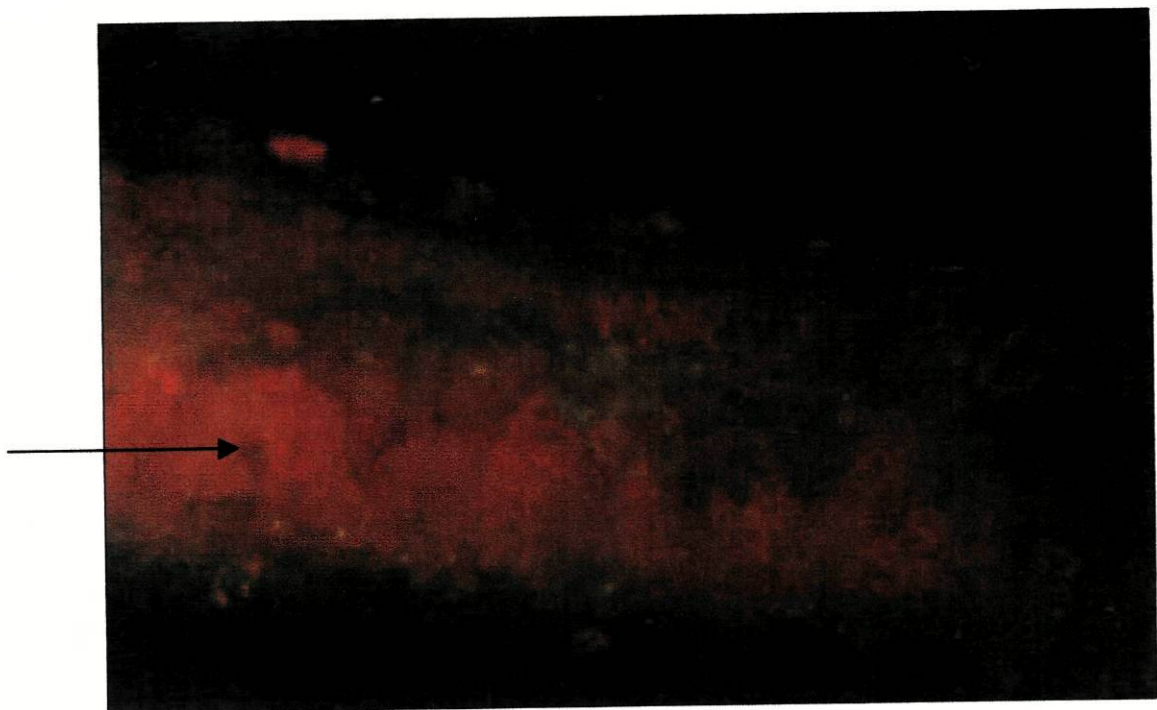


Figura 14 - Secção transversal de folha de *N. tabacum* transgênica. Filtro FITC. (112X)

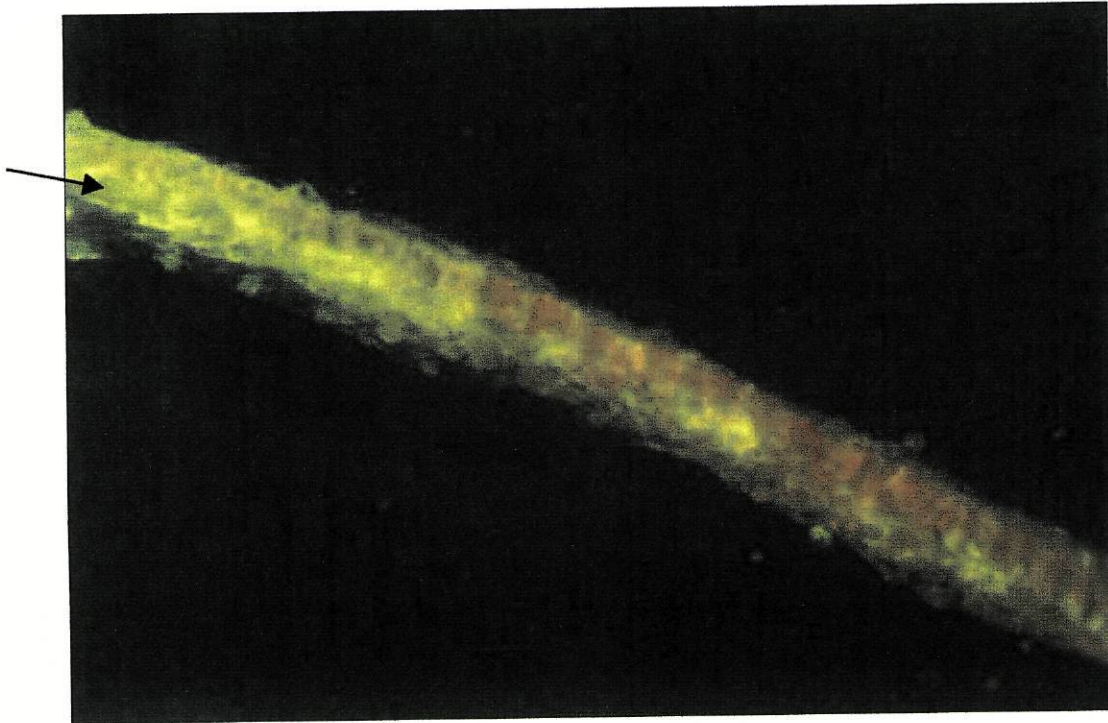


Figura 15- Aspecto da folha de *N. tabacum* transgênica seccionada manualmente. Filtro FITC. (112 X)

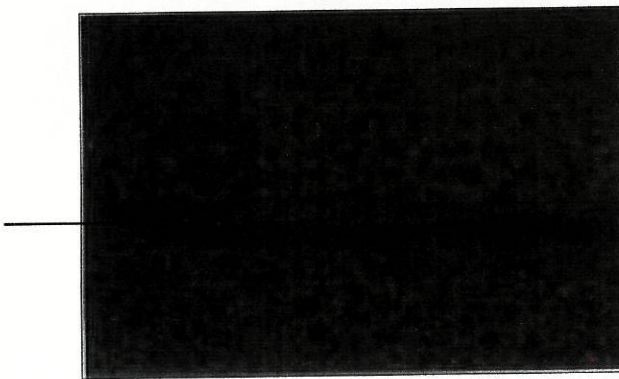


Figura 16- Pormenor da nervura de folha de *N. tabacum* não transformada. Filtro FITC. (64 X)

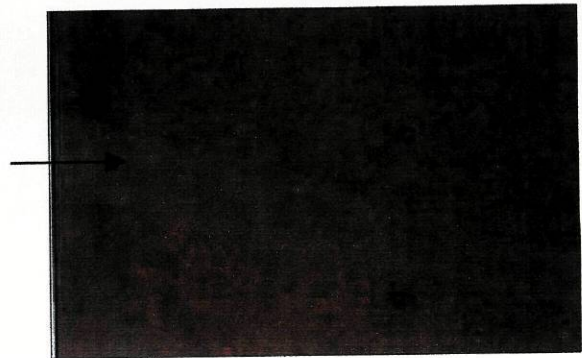


Figura 17- Pormenor da nervura de folha de *N. tabacum* transgênica. Filtro FITC. (64 X)

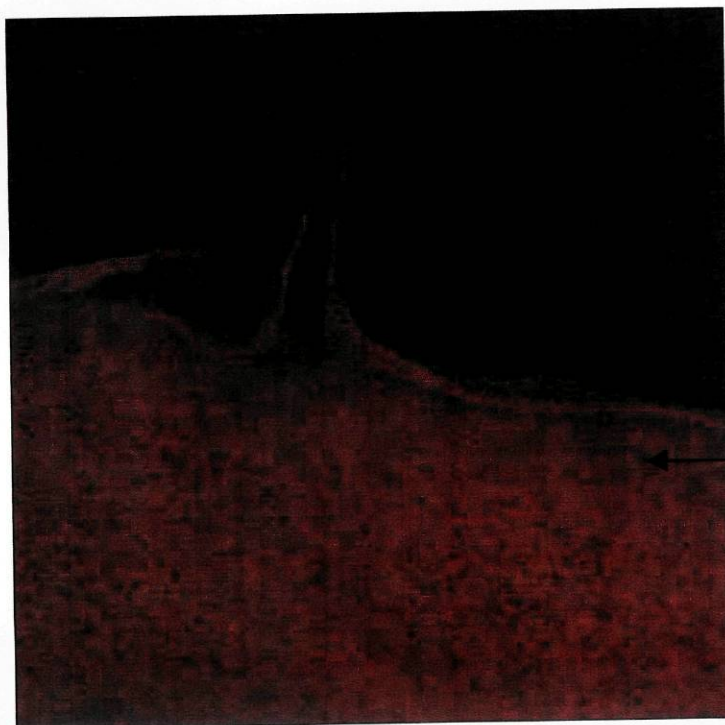


Figura 18- Pormenor de um tricoma de *N. tabacum* não transformada seccionada manualmente. Filtro FITC. (112 X)

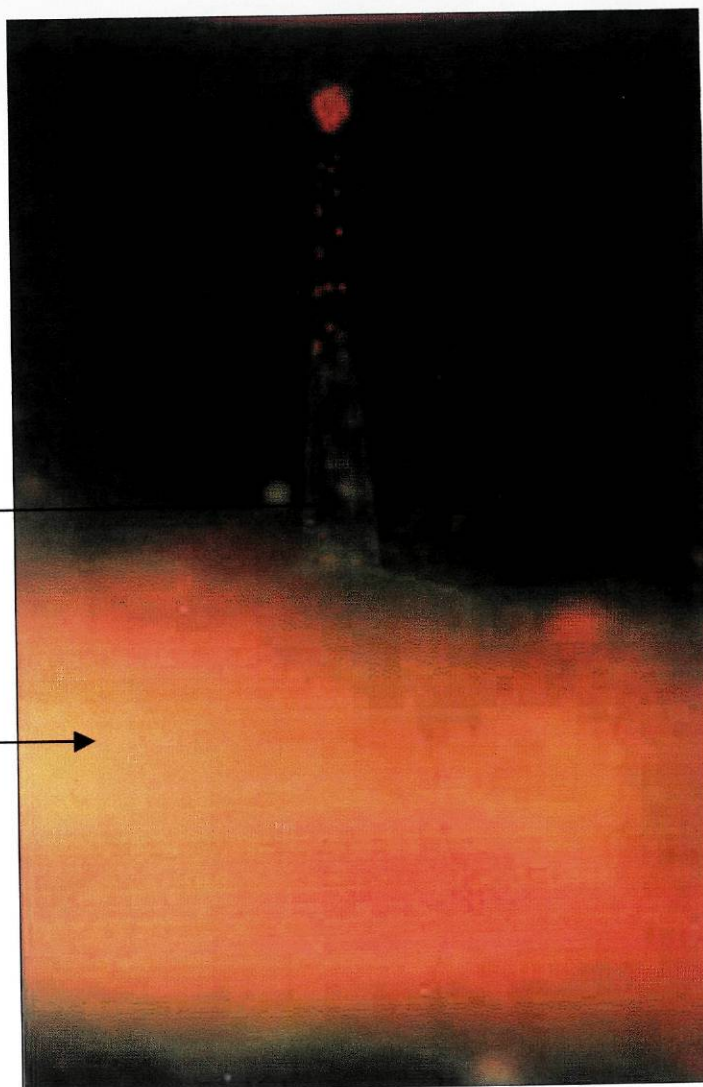


Figura 19 - Pormenor de um tricoma de *N. tabacum* transgênica seccionada manualmente. Filtro FITC. (112 X)

A clorofila quando excitada com o filtro UV fluoresce de vermelho e a GFP fluoresce de verde, no entanto quando ambas estão presentes no mesmo local, a fluorescência aparece amarela (Gabaragi et al., 2000).

Nas figuras 10, 13, 16 e 18 observam-se cortes de órgãos de *N. tabacum* não transformada. Nestas imagens não se observa qualquer sinal de fluorescência verde, à exceção da autofluorescência da lenhina da parede secundária do xilema.

Na figura 11 observa-se uma cor alaranjada nas células do parênquima (seta 1), esta cor resulta da combinação de fluorescência da GFP e da clorofila. O aparecimento de fluorescência (seta 2) com uma tonalidade mais forte em relação à da figura 10 comprova que a GFP também se manifesta nos tecidos vasculares. A figura 12 mostra fluorescência verde a nível do citoplasma de algumas células (seta 2) bem diferente da fluorescência vermelha (seta 1) da clorofila. A figura 14 evidencia um corte transversal de folha de *N. tabacum* transgênica e mostra uma cor alaranjada (seta) quando comparada com a folha de *N. tabacum* não transformada (figura 13), o que significa que também tem fluorescência verde no mesófilo, podendo inferir-se que a GFP está presente no citoplasma das células do mesófilo.

A figura 15 mostra uma folha de *N. tabacum* transgênica (o corte apresenta-se bastante espesso por ter sido seccionado manualmente) onde a fluorescência verde aparece abundantemente. A figura 17 evidencia um pormenor de uma nervura (seta) de *N. tabacum* transgênica que quando comparada com a figura 16 de *N. tabacum* não transformada (seta) a sua cor é mais alaranjada, indicando mais uma vez a maior fluorescência na nervura que se deve à presença da GFP. A figura 19 mostra fluorescência verde na célula basal do tricoma (seta 1) de *N. tabacum* transgênica, que não aparece em *N. tabacum* não transformada (figura 18), e todo o mesófilo alaranjado (seta 2) que também é diferente do mesófilo vermelho (seta 2) de *N. tabacum* não transformada, mostrando a presença da GFP quer a nível do mesófilo, quer a nível de tricomas.

Mesmo havendo fluorescência natural no xilema, a fluorescência verde aparece mais nos tecidos vasculares do que no mesófilo. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Harper et al. (2000) no estudo efectuado em *N. tabacum*. Neste estudo as plantas que cresceram sob luz UV mostra que os níveis de fluorescência da GFP foi maior no tecido vascular e nas folhas mais jovens. Os caules e raízes têm uma

concentração de GFP mais alta do que as folhas, mas semelhante à dos tecidos vasculares.

A maior localização de fluorescência de GFP nos tecidos vasculares pode ser devido à real diferença nos níveis de expressão do promotor CaMV35S entre os tipos de células. Foi argumentado que este promotor é preferencialmente activo em células durante a fase S do ciclo celular (Jefferson, 1987).

Padrões de expressão semelhantes foram descritos quando se usou CaMV 35S em *Nicotiana tabacum* utilizando o GUS como gene repórter. Usando este sistema, Jefferson et al. (1987) encontraram maiores níveis de actividade de GUS em raiz e caule relativamente à folha. Os elevados níveis de expressão vascular parecem ser consistentes com a actividade do CaMV 35S (Jefferson et al., 1987).

A presença da proteína observada nas figuras 11, 12, 14, 15, 17 e 19 indica que ocorreu uma correcta tradução do mRNA. No entanto, a observação da GFP poderia ser melhorada se se recorresse à microscopia confocal, pois esta técnica suprime o problema da espessura dos cortes durante a observação, uma vez que os cortes foram realizados no vibratom com uma espessura de 50-60 μm e outros foram feitos manualmente.

A transgenia das plantas foi também confirmada com PCR do DNA genómico (figura 20 na página seguinte) e RT-PCR do RNA total (figura 21 na página seguinte).

A figura 20 mostra a electroforese onde foram separados os produtos do PCR. Pode observar-se uma banda com 200 bp (seta) nas plantas A e B e que não aparece na planta não transformada (WT). Esta banda corresponde a um fragmento do gene da proteína GFP uma vez que os iniciadores utilizados amplificam o fragmento do gene com 202 bp.

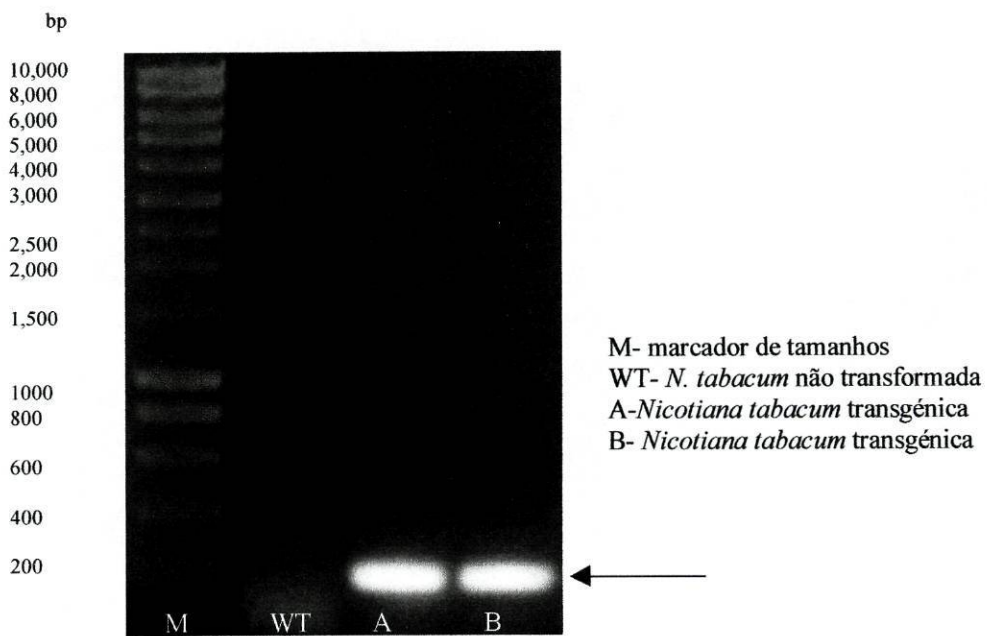


Figura 20 - Gel de agarose 0,8% (m/v) dos produtos de PCR de amplificação de um DNA genômico

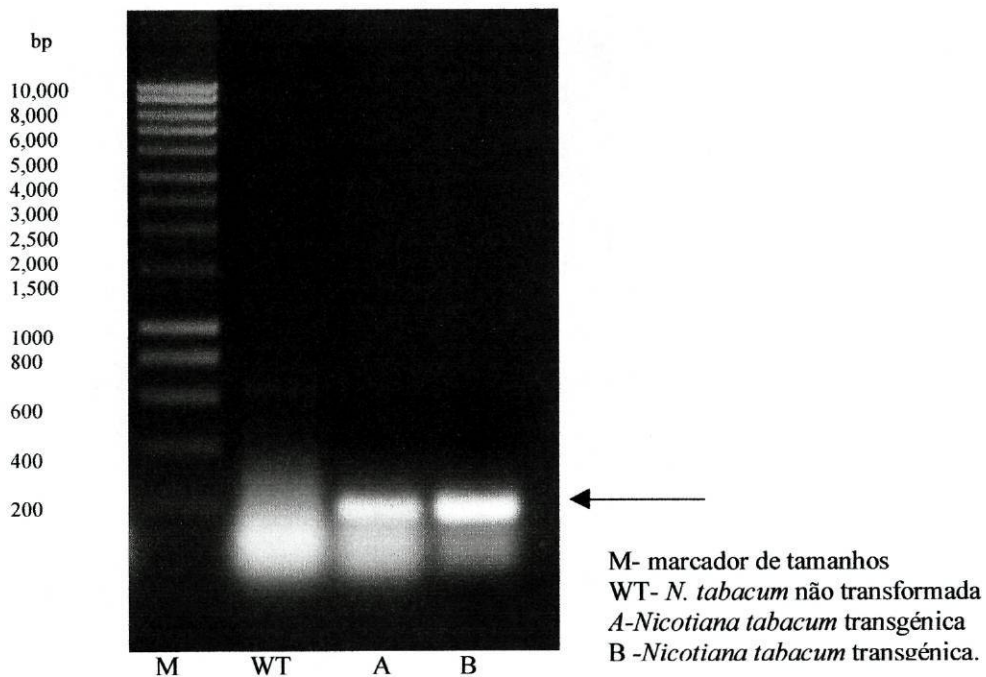


Figura 21- Gel de agarose 0,8% (m/v) dos produtos de RT-PCR.

A figura 21 mostra a electroforese do RT-PCR. Observa-se também uma banda com 200 bp (seta) nas plantas transgénicas A e a B o que não se verifica na planta não transformada (WT). Pode também afirmar-se que esta banda corresponde ao fragmento do gene da GFP já que se utilizaram os mesmos iniciadores.

Todos estes dados confirmam que o gene foi integrado no genoma da planta e que ocorreu a sua transcrição.

Mais uma vez se demonstra que a GFP é um bom gene repórter já que permitiu seleccionar facilmente as plantas transformadas.

Capítulo Três: Cardosina A

Introdução

As plantas transgênicas promovem avanços no conhecimento científico porque permitem o estudo da expressão de um gene de interesse. No presente trabalho é efectuado um estudo em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* L. transformadas com o cDNA de cardosina A do cardo (*Cynara cardunculus* L.). A cardosina A é uma proteinase aspártica que tem suscitado interesse de estudo por ser utilizada na indústria alimentar.

Segundo Davies (1990) as proteinases aspárticas (PAs - *aspartic proteinase*) encontradas nos animais, plantas, fungos, algumas bactérias e vírus, constituem uma das quatro distintas superfamílias de enzimas proteolíticas.

As PAs são uma classe de enzimas (EC 3.4.23) que estão envolvidas num número de processos fisiológicos e patológicos tais como regulação da pressão arterial (renina), infecção retroviral (proteínase do HIV-1), degradação de hemoglobina na malária (plasmepsina), proteólise intracelular (catepsina D) e digestão (pepsina). (Davies, 1990). Estas PAs encontram-se bem caracterizadas. Adicionalmente, as PAs têm um importante papel na indústria alimentar, nomeadamente a indústria do queijo. Inibidores de enzimas PAs têm um potencial significado terapêutico para tratamento de hipertensão, SIDA, tumores invasivos e doenças de úlceras pépticas (Frazão, 1999).

As PAs mostram um pH ótimo ácido para a sua actividade, inibição pela pepstaina A (hexapeptídeo de *Streptomyces*), especificidade preferencial para clivagem nas pontes peptídicas entre os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e homologias de estrutura primária, particularmente no que respeita às duas tríades catalíticas DTG e DSG.

As PAs que existem nas plantas distribuem-se pelas Gimnospérmicas e Angiospérmicas, mono- e dicotiledóneas. A maioria das PAs estão localizadas nas sementes, ou no estado quiescente ou na germinação. Pensa-se que participam na clivagem das proteínas armazenadas, que são necessárias na germinação. Podem

também encontrar-se em folhas de algumas plantas, onde estão implicadas nos mecanismos de defesa contra agentes patogénicos.

As PAs das plantas partilham elevada homologia de sequência e estrutura, bem como propriedades gerais bioquímicas, com as PAs de animais e microbianas (Egas, 2000). A única característica exclusiva presente na maioria das PAs das plantas é um domínio proteico extra de cerca de 100 aminoácidos, geralmente designado por fragmento específico das plantas – PSI (*plant-specific-insert*), que não tem homologia com qualquer outra sequência de PAs. O PSI está presente nos precursores das PAs das plantas mas está ausente na forma madura das enzimas. A função deste segmento ainda não está clara. Contudo, tem sido proposto um papel importante no direccionamento vacuolar dos precursores das PAs. Também tem sido sugerido uma interacção directa com a membrana, onde poderia actuar como sinal de direccionamento, ou por interacção de possível região ligada à membrana, ou com o receptor no aparelho de Golgi. E ainda tem sido sugerido que o PSI poderia interactuar com a membrana provavelmente do retículo endoplasmático como um pré-requisito para o sinal das PAs das plantas no interior do vacúolo, porque trabalhos prévios identificaram uma sequência possível de direccionamento vacuolar na extremidade C-terminal da PA- Cardosina (Egas, 2000).

A sequência do PSI é altamente similar à das saposinas, enzimas lisossomais das células de mamíferos.

Todas as PAs não virais são sintetizadas como precursor inactivo (zimogénio), no qual o propéptido N-terminal está ligado à fenda do centro activo, prevenindo assim a degradação indesejável durante o transporte e secreção intracelular (Kervinen, 1999).

As cardosinas são PAs das flores de *Cynara cardunculus* L. que são utilizadas na coagulação do leite na manufactura tradicional do queijo em Portugal desde a Era Romana (Frazão, 1999).

As cardosinas (A e B) de cardo (*Cynara cardunculus* L.) foram purificadas de flores (Veríssimo et al., 1996). As cardosinas são activas a pH 2,0-pH 7,0, apresentando o máximo de actividade a pH 5,0-5,5. São activas a temperaturas até cerca de 60 °C.

A cardosina A localiza-se principalmente nos pistilos, acumulando-se em vacúolos de armazenamento de proteínas em células das papilas de estigma. Encontra-se também, embora em menor quantidade, em vacúolos de células epidérmicas do estilete (Pissarra et al., 1998).

As cardosinas são sintetizadas como uma cadeia única (zimogénio inactivo) de 64 kDa que sofre processamento posterior originando duas cadeias maduras.

A sequência de cDNA da cardosina A de 1515 bp codifica a enzima sob a forma preproenzima, com uma sequência pré (sinal) responsável pelo direccionamento para o lúmen do retículo, com cerca de 24 aminoácidos. A sequência pró é constituída por 42 aminoácidos e está eventualmente envolvida na inactivação da enzima durante a biossíntese. Os restantes 438 aminoácidos constituem a cadeia de 31 kDa na região N-terminal e a cadeia de 15 kDa na região C-terminal, intercaladas com o PSI. As tríades com os resíduos de aspartato reactivo DTG e DSG, localizam-se na cadeia de 31 kDa.

As duas moléculas de proteinases aspárticas independentes são glicosiladas. Duas sequências consenso de N-glicosilação estão presentes na sequência de aminoácidos Asn-Gly-Thr e Asn-Val-Ser (Faro, 1998). O conteúdo glicosil é constituído por 19 anéis de açúcar ligados às proteínas. Os açúcares estão localizados na superfície molecular, distribuídos entre 2 locais de glicosilação um em cada molécula, isto é, um local de glicosilação para cada cadeia polipeptídica (figura 22).

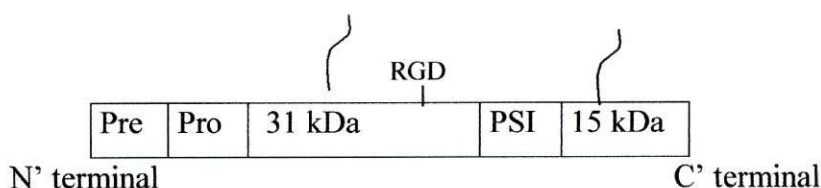


Figura 22- Esquema da preprocardosina A.

O primeiro local de glicosilação é Asn67 de 5 a 6 resíduos de monossacarídeos enquanto que o segundo local de glicosilação se encontra no resíduo Asn257, e tem apenas quatro anéis de monossacarídeos. Análises de difracção de raio-X mostram que os locais de glicosilação estão longe do centro activo, sugerindo assim que os oligossacarídeos não tem um papel importante na actividade e especificidade da enzima. Contudo, os locais de glicosilação são provavelmente importantes para a estabilidade e/ou processamento correcto para a sua actividade.

Estudos a nível de microscopia electrónica realizados por Pissarra et al. (1998) demonstram que a cardosina A também é sintetizada no invólucro nuclear e que a glicosilação da cardosina pode ocorrer no retículo endoplasmático rugoso, sendo transportada directamente para os vacúolos de armazenamento de proteínas.

Um modelo de processamento proteolítico da cardosina A (figura 23) é apresentado por Ramalho-Santos et al. (1998). Os dados obtidos a partir de um estudo realizado em *Cynara cardunculus* sugerem que o primeiro corte ocorre entre a cadeia 31 kDa e o PSI, entre os aminoácidos Arg68 e Asp69. Os cortes seguintes são entre o Pro e

a cadeia de 31 kDa e entre o PSI e a cadeia 15 kDa, entre os aminoácidos Ans309 e Gly310 e entre Ser414 e Thr415, respectivamente.

O PSI é completamente removido e sofre processamento adicional ou é degradado.

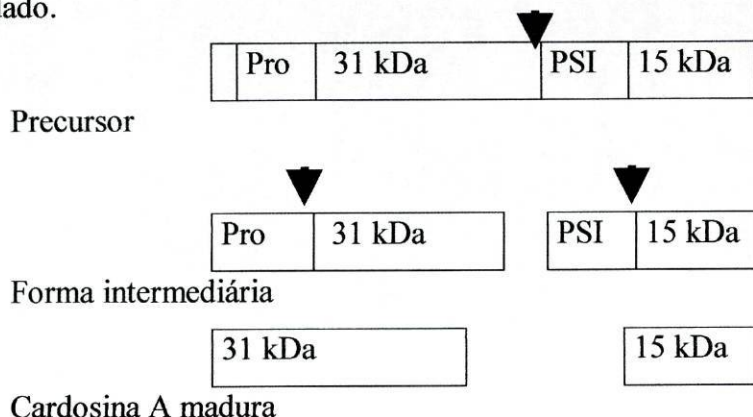


Figura 23 – Modelo proposto para o processamento proteolítico da cardosina A. As setas indicam locais de corte.

A estrutura tridimensional da cardosina A foi determinada por cristalografia de raios X, com uma resolução de 2,05Å, por Faro et al., 1999 (figura 24).

A estrutura geral é típica das PAs, com dois domínios sensivelmente simétricos e com grande quantidade de folha β separadas por uma fenda catalítica. Foram identificadas três pontes dissulfeto na estrutura, mas nenhuma entre as duas cadeias de cardosina A.

O centro activo, em comum com outras PAs, da cardosina A está localizado entre dois lobos da molécula, acima da grande fenda. Esta contém os dois aspartatos catalíticos (Asp32 e Asp215)-DTG e DSG- que são essenciais para a actividade catalítica.

A cardosina A é a única entre as PAs que têm um motivo RGD. Esta sequência está localizada no anel que liga as duas cadeias β e projecta-se na superfície molecular, entre os resíduos 246 e 248.

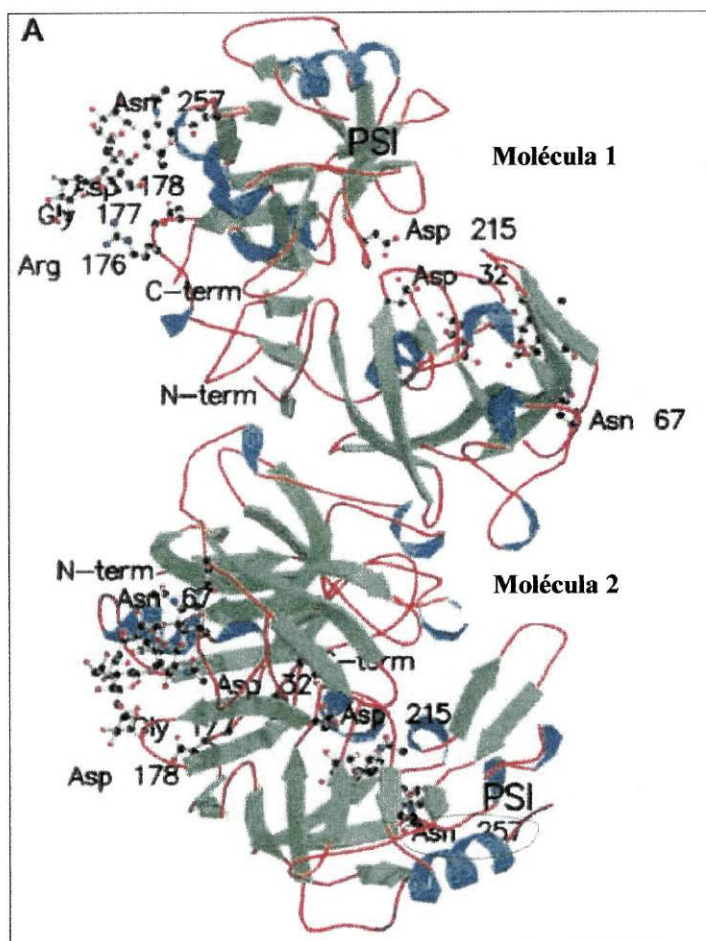


Figura 24- Representação esquemática das duas moléculas de cardosina A na unidade assimétrica. Os dois locais de glicosilação estão ligados ao Asn67 e Asn257. O motivo RGD está representado no local Arg176, Gly177 e Asp178. O domínio PSI ausente está indicado próximo da sua cadeia terminal. (Adaptado de Frazão, 1999)

Pressupõe-se que uma proteína de 100 kDa do pólen interaccua especificamente com a sequência de RGD na cardosina A, porque a cardosina A é abundantemente expressa nas papilas estigmáticas e o seu receptor putativo está presente no pólen, sendo provável que este reconhecimento seja dependente do RGD e possa ser activo na interacção pólen-pistilo (Faro, 1999).

O motivo RGD é conhecido como uma sequência ligada à integrina nos tecidos de mamíferos nos quais facilita a função e reconhecimento de muitas células, como adesão, migração, sinalização, diferenciação e crescimento.

Tem sido proposto que as funções primárias para a cardosina A é estar envolvida nas interacções pólen-pistilo que ocorre durante a reprodução sexual da planta e intervir

na defesa contra agentes patogénicos e/ou insectos. A função secundária está relacionada com a senescência das flores.

Materiais e Métodos

Material vegetal

As sementes de *Nicotiana tabacum* L. transgénica foram cedidas gentilmente pelo Doutor Carlos Faro da Universidade de Coimbra que as transformou pelo método de biobalística com o cDNA da cardosina A.

Seleção das plantas transgénicas.

As sementes de *Nicotiana tabacum* L. transgénica e *Nicotiana tabacum* L. não transformada foram desinfectadas segundo o método descrito por Gamborg et al. (1995): as sementes de *Nicotiana tabacum* L. foram submersas em água destilada com duas gotas de Tween 20 (Sigma) e agitadas durante 2 minutos. De seguida foram enxaguadas com água destilada para retirar o detergente, cobertas com etanol a 70% (v/v) (Merck) e agitadas durante 1 minuto. Decantou-se o etanol e cobriram-se as sementes com uma solução de lixívia comercial a 20% (v/v) e duas gotas de Tween 20. Agitou-se durante 20 minutos. Na câmara de fluxo laminar, decantou-se a solução e efectuaram-se 5 lavagens com água esterilizada.

Para a germinação, as sementes foram colocadas no meio MSB5 (já utilizado na experiência anterior) suplementado com canamicina numa concentração de 100 µg/mL sólido em placas de Petri (tabela 3, referida anteriormente). Este antibiótico permite seleccionar as plantas transformadas uma vez que só estas permanecem verdes, as restantes ficam brancas.

Algumas sementes desinfectadas também foram colocadas numa caixa de Petri com papel de filtro esterilizado humedecido com uma solução de água e canamicina na mesma concentração descrita acima.

Após germinação, as plântulas verdes foram colocadas em meio MSB5 suplementado com canamicina na mesma concentração, mas como o seu desenvolvimento se manifestava muito lento foram transferidos para o meio MSB5 sem antibióticos.

Multiplicação de *N. tabacum*

A multiplicação *in vitro* foi conseguida a partir de ápices caulinares que foram colocados em meio MSB5 anteriormente descrito e a partir de explantes de folhas que sofreram o mesmo tratamento que os explantes de *N. tabacum* L da experiência anterior.

Após a formação de caules, estes foram cortados com bisturi esterilizado e, em condições de esterilização, transferidos para frascos de vidro com meio MSB5 para a enraizamento. Os frascos foram tapados com uma película de plástico e presos com um elástico.

Análises para verificar a transgenia

Isolamento de DNA, RNA e proteínas

Para a detecção do cDNA da cardosina A através de vários métodos foi necessário recorrer à extracção de RNA total, DNA genómico e proteínas.

A extracção de RNA, DNA e proteínas foi efectuada com o reagente TRIZOL (GIBCO) cujo método foi descrito anteriormente.

A extracção de proteínas também foi efectuada segundo o seguinte procedimento: num almofariz fresco e no gelo adicionou-se 2 mL de tampão de extracção (25 mM Tris -HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; glicerol 10% (v/v); Triton X-100 0,05% (v/v); PVP insolúvel 5 % (m/v)) a 1 g de tecido fresco. Para ajudar a macerar colocou-se 0,5 g de areia de quartzo. Depois de bem triturado, recolheu-se a mistura para um tubo *ependorf* e centrifugou-se 1300 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Aproveitou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente a 1300 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Recolheu-se o sobrenadante para outro tubo.

Para o tratamento das proteínas adicionou-se 20 µL de tampão de amostra (Tris 0,3345 M, glicerol 50% (v/v), SDS 5% (m/v) e azul de bromofenol 0,2% (m/v), água e pH 6,8) e 6 µL β- mercaptoetanol por cada 94 µL de extracto.

A quantificação das proteínas foi feita através do método de Bradford, usando BSA como referência proteica *standard*. As proteínas foram diluídas 25X. Para a leitura a 595 nm no espectrofotometro adicionou-se 1 mL de reagente de Bradford e 100 µL de proteínas diluídas e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. As proteínas foram armazenadas a -20 °C.

O isolamento de DNA também ocorreu segundo o método de Doyle, Doyle & Hortorium : pré-aqueceu-se 7,5 mL de tampão de isolamento CTAB (CTAB 2% (m/v), 1,4 M NaCl, β-mercaptoetanol 0,2% (m/v), 20 mM EDTA e 100 mM Tris-HCl pH 8,0) num tubo *Falcon* de 15 mL a 60 °C. Ao mesmo tempo moeu-se 1,0 g de tecido foliar fresco (*Nicotiana tabacum* não transformada e duas transgênicas denominadas A e B), eliminando as nervuras, a pó fino com a ajuda de azoto líquido num almofariz previamente arrefecido e passado por clorofórmio. Transferiu-se o pó directamente para o tampão pré-aquecido e vortexou-se durante 15 segundos. Incubou-se a mistura a 60 °C durante 30 minutos com agitações suaves de 5 em 5 minutos. Extraiu-se o DNA com uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1 (v/v)), por agitação leve durante 30 minutos. Centrifugou-se a 1600 g à temperatura ambiente durante 10 minutos. Removeu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se 2/3 de volume de isopropanol. Agitou-se suave e manualmente para precipitar os ácidos que formam normalmente um novelo. Retirou-se o novelo com uma ponta estéril e cortada e transferiu-se para 20 mL de tampão de lavagem (etanol 76% (v/v) e 10 mM de acetato de amónia) onde permaneceu durante a noite com agitação suave à temperatura ambiente. Transferiu-se o novelo para um tubo *ependorf* e centrifugou-se a 1600 g durante 10 minutos. Eliminou-se cuidadosamente o sobrenadante e deixou-se secar o sedimento à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o sedimento em água estéril.

Análise do DNA

Para detectar a presença do cDNA da Cardosina A no genoma da planta efectuou-se uma reacção de PCR. Esta reacção ocorreu num volume de 50 µL contendo 1 µL do iniciador F626 cuja sequência é 5'-CTCGGCCTTTCATTTCAAACG-3', 1 µL do iniciador R1022 com a sequência 5'-CCGATCTAAGATACAACCTG-3', 5 µL de tampão de PCR 10X, 1,5 µL MgCl₂ 50 mM, 1 µL dNTP's mix 10 mM e 5 µL de DNA (não transformada e transgênicas A e B) e 35,25 µL de água estéril. O PCR consiste na

seguinte sequência: 94 °C durante 3 minutos, 35 ciclos (94 °C, 1 minuto, 50 °C 1 minuto e 72 °C, 2 minutos) e a extensão ocorre a 72 °C durante 7 minutos. A Taq polimerase (0,25 µL) foi adicionada após o passo de desnaturação (3 minutos a 94 °C).

Os produtos do PCR foram separados no gel de agarose a 0,8% (m/v) com brometo de etídio.

Análise ao RNA

RT-PCR

Para se efectuar a análise do RNA primeiro efectuou-se uma electroforese para verificar se o RNA estava em boas condições. A tina da electroforese sofreu um tratamento prévio: lavagem com detergente (*extran*) e água durante 10 minutos, passagem por álcool e lavagem de 10 minutos com água com DEPC.

O RNA foi separado num gel de agarose a 1% (m/v) com brometo de etídio.

Para verificara presença de mRNA foi efectuado uma reacção de RT-PCR.

A reacção de RT de *N. tabacum* não transformada e transgénicas ocorreu num volume de 20 µL contendo 1 µL de iniciador da primeira cadeia, R1022 numa concentração de 2 pmol (ver sequência acima), 4 µL de solução de extracção da planta não transformada, 8 µL de água com DEPC. No caso das plantas transgénicas A e B utilizou-se 3 µL de solução de extracção e 7 µL de água com DEPC (os volumes das soluções foram calculados com base numa electroforese). Aqueceu-se as reacções a 70 °C durante 10 minutos e depois foram colocadas no gelo. Adicionou-se 4 µL de tampão *Superscript* (Life Technologies™), 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de dNTP's mix 10 mM e incubou-se a 42 °C durante 2 minutos. Adicionou-se 1 µL de *Superscript* e colocou-se a 42 °C durante 50 minutos. Inactivou-se a reacção a 70 °C durante 15 minutos. A reacção do PCR decorreu como a descrita para o DNA utilizando 5 µL do produto de reacção do RT.

Hibridação *in situ*

Para a detecção do RNA também se recorreu à hibridação *in situ*.

Efectuaram-se cortes com um 1cm de comprimento do caule das plantas transgênicas e não transformada e incubaram-se num fixador Histochoice™ MB (Amresco). Estes fragmentos foram colados a um suporte de um vibratom Leica VT 1000V e seccionados imersos em PBS com uma espessura entre 50-60 μm . De seguida foram colocadas em placas ELISA e colocaram-se a pré-hibridar numa solução de hibridação constituída por 2xSSC, 10% de sulfato de dextrano e 25% de formamida, previamente aquecida a 50 °C. Os cortes foram incubados a 50 °C durante 30 minutos. Findo este tempo, os cortes foram incubados numa solução de hibridação suplementada com um sonda (0,1 ng/ μL e 1 ng/ μL) com a sequência 5'-AAC AAT AGC CGT TGG ACC TG-3' conjugada com digoxigenina, durante a noite a 42 °C. Efectuaram-se 4 lavagens com TPBS durante 15 minutos cada. Passou-se à incubação dos cortes com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fluoresceína (Roche) numa diluição de 1:4 da solução *stock* (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em PBS durante 1 hora. Procedeu-se a 4 lavagens de 10 minutos cada em PBS com agitação suave e montaram-se os cortes no meio de montagem anti-oxidante (TBST 50%, glicerol 50% e DABCO 2 mg/mL). Estes foram observados ao microscópio de fluorescência (LEICA). Os cortes foram excitados com luz UV e utilizaram-se filtros FITC. As imagens foram documentadas usando filme kodak 400ASA (máquina LEICA).

Para todos os cortes foi feito um controlo que sofreu o mesmo tratamento, excepto a incubação com a sonda.

Análise das proteínas

Análise por *Western blotting*

Para SDS-PAGE as proteínas foram fervidas durante 2 minutos e centrifugadas 14000 rpm durante 3 minutos.

O SDS-PAGE foi realizado na unidade de electroforese Hoefer MiniVE e segundo Laemmli (1970). Montou-se a unidade consoante manual anexo e colocou-se o gel separador de acrilamida a 12,5% e o gel concentrador de acrilamida a 5%. Um volume de cada amostra contendo 20 μg de proteína foi carregado no gel e o marcador

utilizado foi o *Prestained SDS-PAGE standards broad range* (BioRad). A electroforese decorreu a 12,5 mA com o máximo de 300 V.

Para a imunodeteccção as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando a unidade de transferência Hoefer MiniVE. A montagem da transferência foi realizada consoante as instruções do fabricante utilizando a solução de transferência de acordo com Towbin (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 10% (v/v) e perfazer o volume com água. Arrefecer a solução em gelo).

A deteccção da proteína foi realizada com um *kit* da ECLTM (Amersham Pharmacia Biotech, UK). O procedimento foi realizado segundo as instruções do fabricante.

Este método consiste num método não reactivo que emite luz para a deteccção de antigenes específicos imobilizados, conjugado directa ou indirectamente com anticorpos ligados à peroxidase.

No procedimento utilizou-se sempre a solução PBST (PBS e Tween 20 0,05% (v/v)). Para as lavagens adicionou-se leite em pó magro (Molico) numa concentração de 0,5% (m/v) ao PBST. O primeiro anticorpo utilizado foi o anti-cardosina A produzido para a sequência polipeptídica TSSEELQVDCNT numa diluição de 1:400 e incubou-se durante a noite. O segundo anticorpo utilizado não é biotinilado e é anti-coelho, fornecido no *kit*. O filme para a exposição é kodak.

A deteccção da cardosina A também decorreu de acordo com o seguinte procedimento: as membranas foram bloqueadas com uma solução de leite em pó magro 5% (m/v) e PBST durante uma hora e com agitação. Incubaram-se as membranas com o primeiro anticorpo numa diluição de 1:400 na solução de bloqueio durante 12 horas a 4 °C. Lavaram-se (3x 10 minutos) com PBST contendo leite em pó magro 0,5% (m/v).

Segui-se a incubação do segundo anticorpo anti-IgG de coelho feito em cabra e conjugado com peroxidase (Vector, UK) diluído 1:1000 em PBST contendo leite em pó magro 0,5% (m/v), durante uma hora com agitação e à temperatura ambiente. De seguida, efectuaram-se 2 lavagens em PBST de 10 minutos cada e 2 lavagens com PBS também de 10 minutos. A revelação no escuro foi efectuada com uma solução de 100 mL de PBS contendo 50 mg de diaminobenzidina (DAB) ao qual se adicionaram 33 µL de H₂O₂.

Detecção imunológica de cardosina A em impressões de tecidos em membranas de nitrocelulose (*Tissue Printing*)

A localização das proteínas foi efectuada através de *tissue printing*. Assim, começou por pressionar-se, evitando deslocações, secções de tecidos obtidos na altura com lâmina de bisturi estéril, contra uma membrana de nitrocelulose, durante aproximadamente 15 segundos. Em seguida lavou-se com PBS com NP-40 0,1% (v/v) durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação. Prosseguiu-se ao bloqueio das peroxidases endógenas em ácido per-iódico 1% (m/v) durante 30 minutos com agitação. Lavou-se novamente em PBS.

Seguidamente bloqueou-se a membrana de nitrocelulose com uma solução de leite em pó magro (Molico) a 5% (m/v) em PBS com NP-40 (0,1% (v/v) e incubou-se durante 1 h com agitação à temperatura ambiente. Procedeu-se então à incubação da membrana com o anticorpo primário, com a sequência anteriormente descrita, diluído 1:400 em PBS contendo 5% (m/v) de leite em pó magro e NP-40 0,1%, decorreu durante 4 horas com agitação suave. Lavou-se a membrana (3x 10 minutos) com a solução de PBS com NP-40 0,1% (v/v). Seguidamente incubou-se a membrana com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho feito em cabra e conjugado com peroxidase (Amersahm, Vector, UK) na diluição de 1:1000 em PBS com NP-40 0,1% (v/v) e leite em pó 0,5% (m/v), durante 1 hora com agitação suave e à temperatura ambiente. Novas lavagens (3x 10 minutos) da membrana com PBS e NP-40 0,1% (v/v).

A revelação da membrana foi efectuada com uma solução de 100 mL de PBS e 50 mg de DAB ao qual se adicionaram 33 µL de H₂O₂, na obscuridade.

Para todas as membranas foi feito um controlo que sofreu o mesmo tratamento, excepto a incubação com o primeiro anticorpo.

Imunocitoquímica

A detecção da proteína também foi feita através da imunocitoquímica com cortes a fresco. Esta técnica foi realizada com HISTOSTAIN™-PLUS da ZIMED.

Efectuaram-se cortes do caule das plantas transgénicas e não transformadas com um 1 cm de comprimento e incubaram-se num fixador Histochoice™ MB (Amresco). Estes fragmentos foram colados a um suporte de um vibratom Leica VT 1000V e

seccionados imersos em PBS com uma espessura entre 50-60 μm . De seguida foram colocadas em placas ELISA e submergidos em solução de bloqueio de soro (reagente A do *kit*) durante 30 minutos. Retirou-se solução e incubaram-se os cortes com o anticorpo primário (utilizado na técnica anterior) numa diluição de 1:400 durante a noite a 4 °C. Efectuaram-se três lavagens de 2 minutos cada com TBST 500 (Trizma Base 0,01 M, NaCl 500 mM e Tween 20 a 0,2%). Os cortes foram novamente incubados no anticorpo secundário biotilado (reagente B do *kit*) durante 20 minutos. Passado este período os cortes foram lavados (3x2min) com TBST 500. Submergiram-se novamente os cortes com fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (reagente C do *kit*) durante 20 minutos. Novas lavagens (3x2min) com TBST 500. Aplicou-se uma solução de substrato cromogénico (solução obtida por dissolução de uma tablete (Roche) de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato)/ NBT (sal de nitroazul tetrazólio) em TBST 500 com PVA (polivinilálcool) a 10% até aparecer uma cor arroxeadada. Lavaram-se bem os cortes com água destilada. A montagem dos cortes foi efectuada com mesma solução anti-oxidante utilizada anteriormente e foram observados ao microscópio óptico.

Para todas os cortes foi feito um controlo que sofreu o mesmo tratamento, excepto a incubação com o primeiro anticorpo.

Resultados e Discussão

As plantas transformadas foram seleccionadas durante a germinação das sementes através do antibiótico canamicina (100 mg/mL). Apenas foram transferidas para o meio MSB5 suplementado com canamicina (100 mg/mL) as plântulas que mantinham as folhas verdes. Neste meio as plantas tinham um fraco desenvolvimento e por isso foram transferidas para o meio MSB5 sem qualquer adição de antibiótico. Nestas condições, as plantas já começaram a ter um desenvolvimento mais acentuado. Mais uma vez, se verificou que o antibiótico, e neste caso a canamicina, interfere com o desenvolvimento normal das plantas.

Contudo, além da selecção através do antibiótico, a transgenia foi confirmada por técnicas bioquímicas. Para tal começou por realizar-se um PCR do o DNA genómico e a sua análise foi feita a partir de uma electroforese (figura 25 e figura 26).

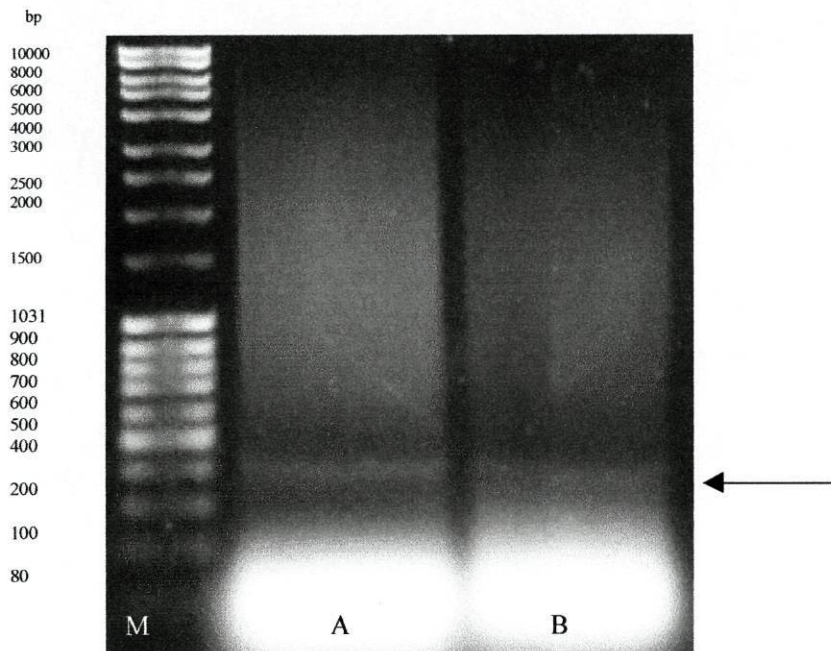


Figura 25- Gel de agarose 0,8% (m/v) dos produtos de PCR da amplificação de DNA genómico

M- marcador de tamanhos

A- *Nicotiana tabacum* transgénica

B- *Nicotiana tabacum* transgénica

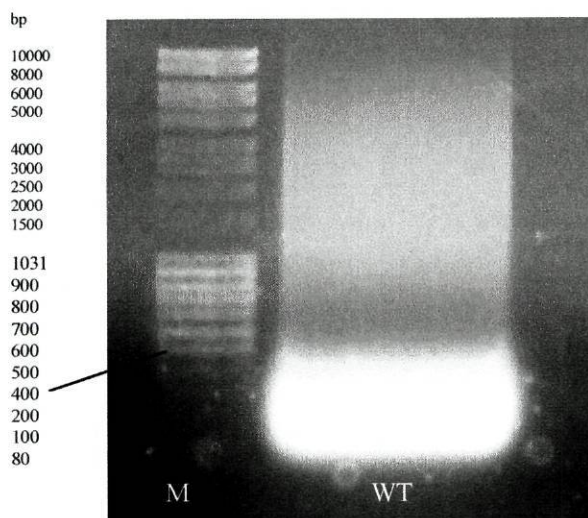


Figura 26-Gel de agarose 0,8% (m/v) dos produtos de PCR
M- marcador de tamanhos
WT- *N. tabacum* não transformada

Como se pode observar na figura 25 há uma amplificação de uma banda de 400 bp nas plantas transgênicas A e B que não aparece na planta não transformada representada por WT (figura 26).

Os 400 bp representam um fragmento do cDNA da cardosina A já que se utilizaram iniciadores específicos que amplificam um fragmento deste tamanho. Assim, pode inferir-se que o cDNA da cardosina A foi integrado no genoma da planta.

Outra técnica utilizada foi o RT-PCR do RNA total, recorrendo-se a uma electroforese para posterior análise (figura 27 e figura 28 na página seguinte).

Pode observar-se que também existe a amplificação de um fragmento de 400 bp (setas) nas plantas transgênicas A e B das figuras 27 e 28 que não ocorre na planta não transformada (WT). Como se utilizaram os mesmos iniciadores da técnica anterior, pode afirmar-se que se trata do cDNA da cardosina A. Perante este dado, pode referir-se que ocorreu a transcrição do cDNA da cardosina A para o RNA mensageiro.

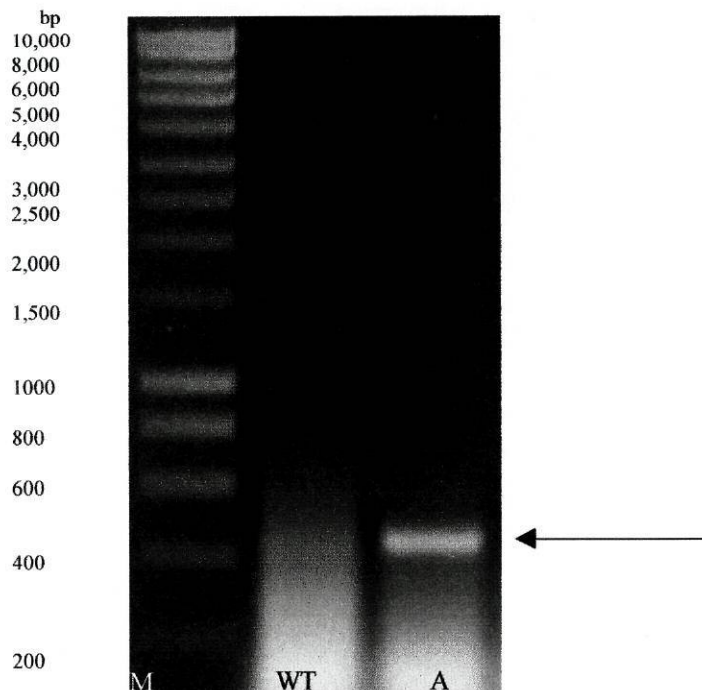


Figura 27 - Gel de agarose 0,8% (m/v) dos produtos de RT-PCR.
 M- marcador de tamanhos
 WT- *N. tabacum* não transformada
 A- *Nicotiana tabacum* transgênica

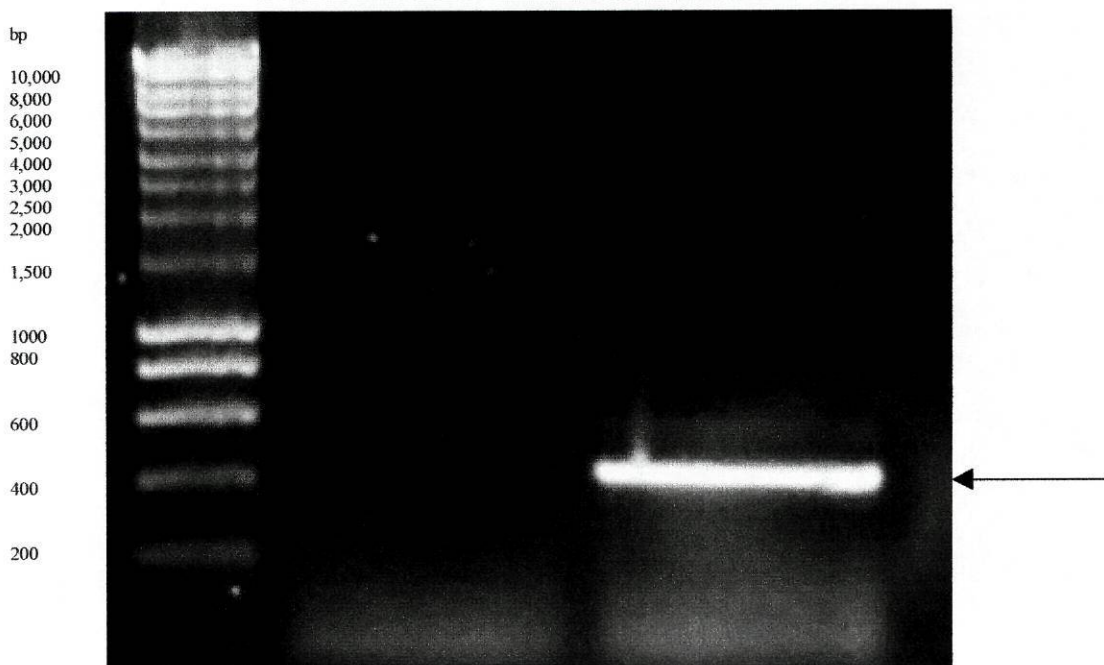


Figura 28 - Gel de agarose 0,8% (m/v) dos produtos de RT-PCR
 M- marcador de tamanhos
 WT- *N. tabacum* não transformada

Para a localização espacial dos transcritos de cardosina A realizou-se a hibridação *in situ*. Nesta técnica utilizou-se uma sonda que consistia num oligonucleótido específico conjugado com digoxigenina para detecção do RNA e um anticorpo anti-dig conjugado com a fluoresceína que quando excitada com luz UV fluoresce de verde, para se obter uma melhor visualização e localização do RNA.

Os cortes obtidos na hibridação foram observados ao microscópio de fluorescência (LEICA, modelo DMLB) e excitados com luz UV e com filtro FITC. As figuras 29-38 mostram os resultados obtidos (páginas seguintes).

Nas figuras 29, 30 e 31 é possível observar cortes de planta não transformada. A figura 29 mostra a planta incubada sem sonda e as figuras 30 e 31 mostram os cortes da planta tratada com a sonda específica na concentração de 0,1 ng/ μ L e 1 ng/ μ L, respectivamente. Em qualquer um destes casos não se observa sinal de fluorescência verde, à excepção do xilema devido à autofluorescência natural da lenhina das paredes secundárias.

As figuras 32 e 35 representam plantas transgênicas A e B, respectivamente, não incubadas com a sonda específica. Nestes cortes também não se observa fluorescência além da do xilema.

A figura 33 mostra um corte de caule de planta transgênica A incubado com a sonda numa concentração de 0,1 ng/ μ L. Nesta imagem pode observar-se fluorescência verde nos núcleos das células dos parênquimas medular e cortical (setas 1 e 2, respectivamente). Ainda no parênquima medular observa-se fluorescência no citoplasma de algumas células (seta 3 e 4). A figura 34 mostra corte de caule de planta transgênica A incubado com a sonda numa concentração de 1 ng/ μ L, onde se pode observar fluorescência a nível dos núcleos (setas 1, 2 e 3).

As figuras 36 e 37 representam a planta transgênica B, incubadas com a sonda em concentrações de 0,1 ng/ μ L e 1 ng/ μ L, respectivamente. Nestes cortes observa-se fluorescência nos núcleos (setas). A figura 38 também se refere a uma planta transgênica B tratada com sonda numa concentração de 1 ng/ μ L onde se evidencia um pormenor do câmbio. Nesta também se observam núcleos que fluorescem de verde (seta 1 e 2) e trabéculas de citoplasma (seta 3) que mostra alguma fluorescência verde nos seus limites. No câmbio também está evidenciada a fluorescência verde (seta 4). Este aparecimento de fluorescência está consentâneo com a actividade do promotor CaMV 35S, discutida anteriormente.

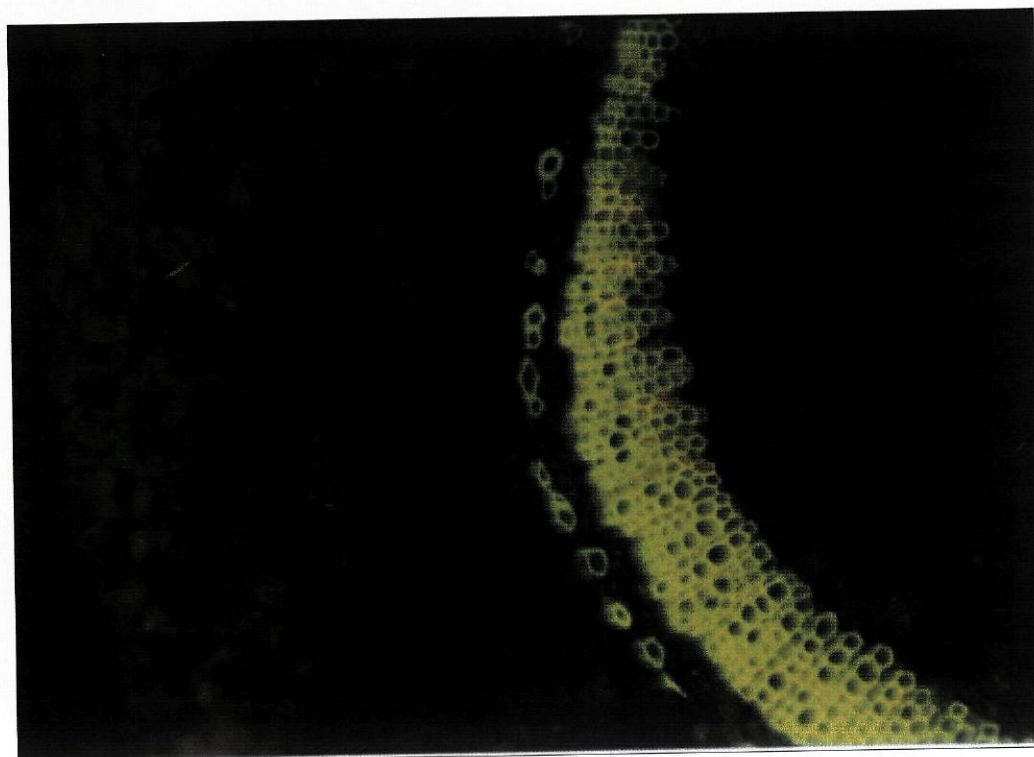


Figura 29 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* não transformada com tratamento sem sonda. Filtro FITC. (112X)

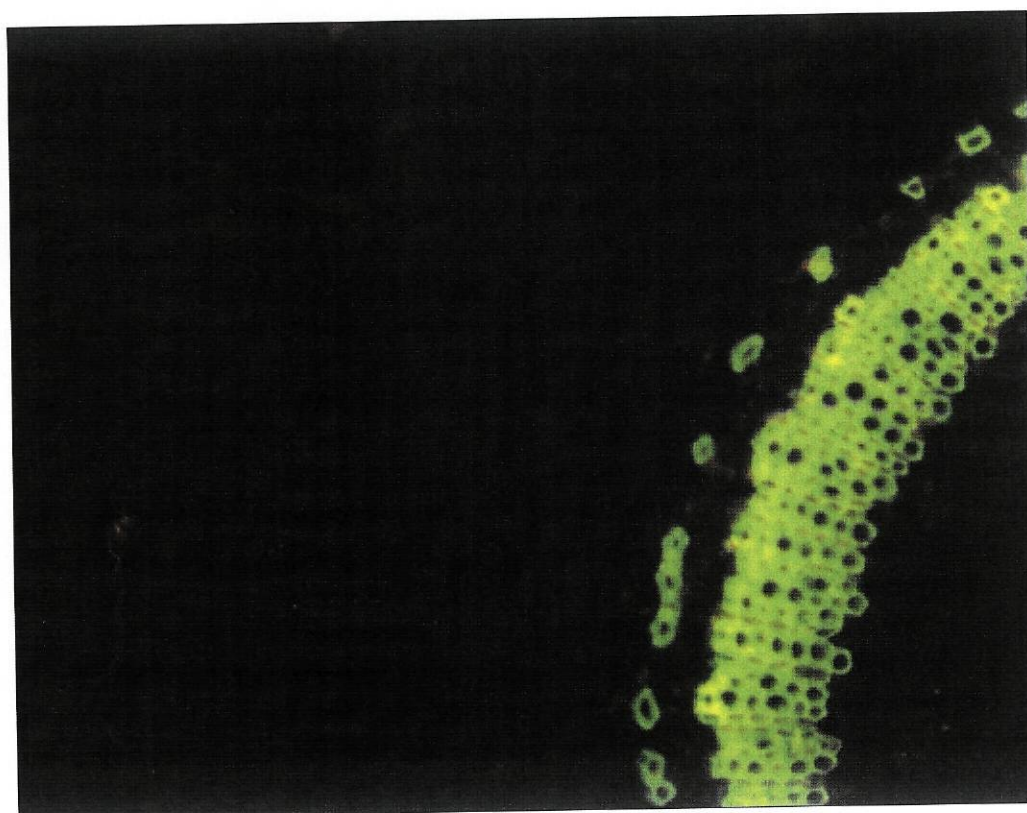


Figura 30 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* não transformada com tratamento com sonda na concentração de 0,1 ng/ μ L. Filtro FITC. (112X)



Figura 31– Corte transversal de caule de *N. tabacum* não transformada com tratamento com sonda na concentração de $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Filtro FITC. (224X)

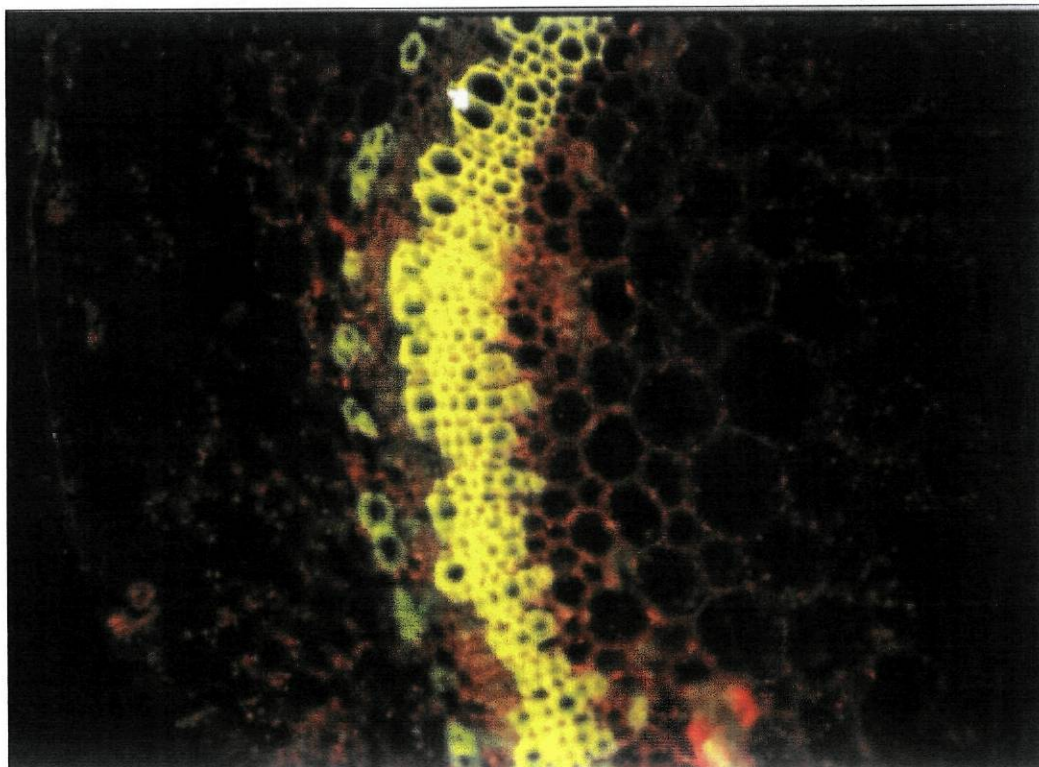


Figura 32 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* transgênica A com tratamento sem sonda. Filtro FITC. (112X)

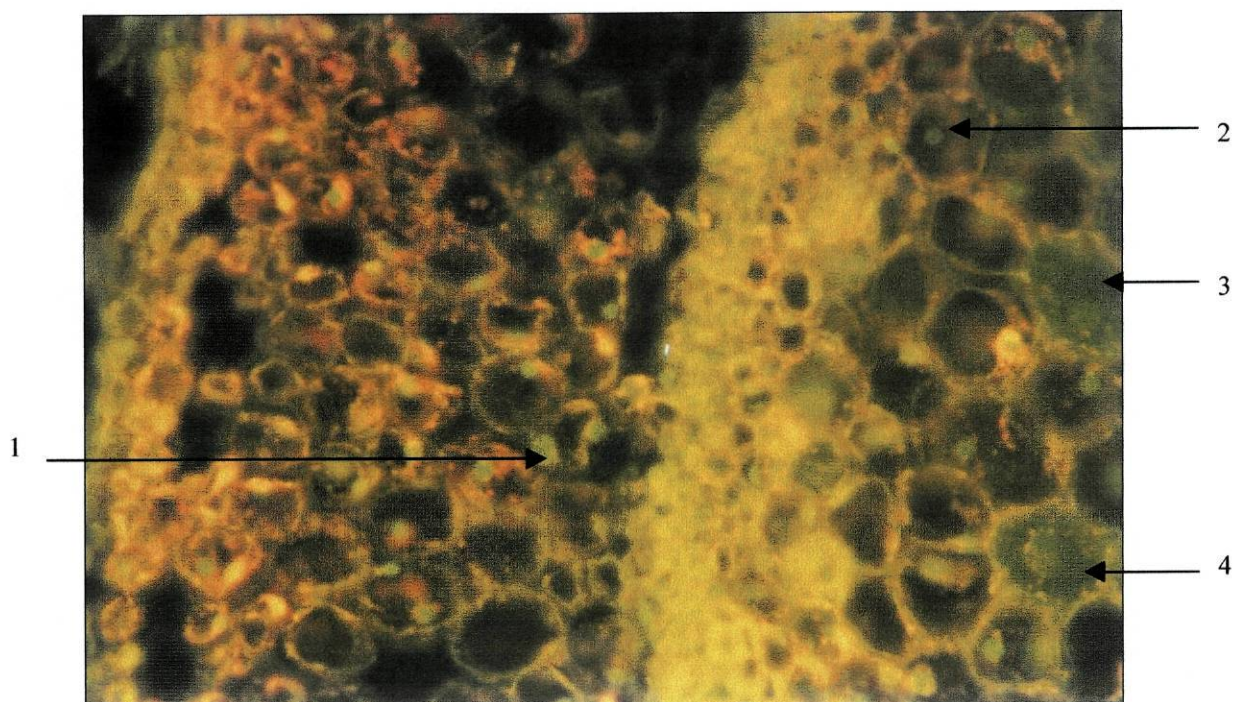


Figura 33 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* transgênica A tratamento com sonda na concentração 0,1 ng/μL. Filtro FITC. (224X)

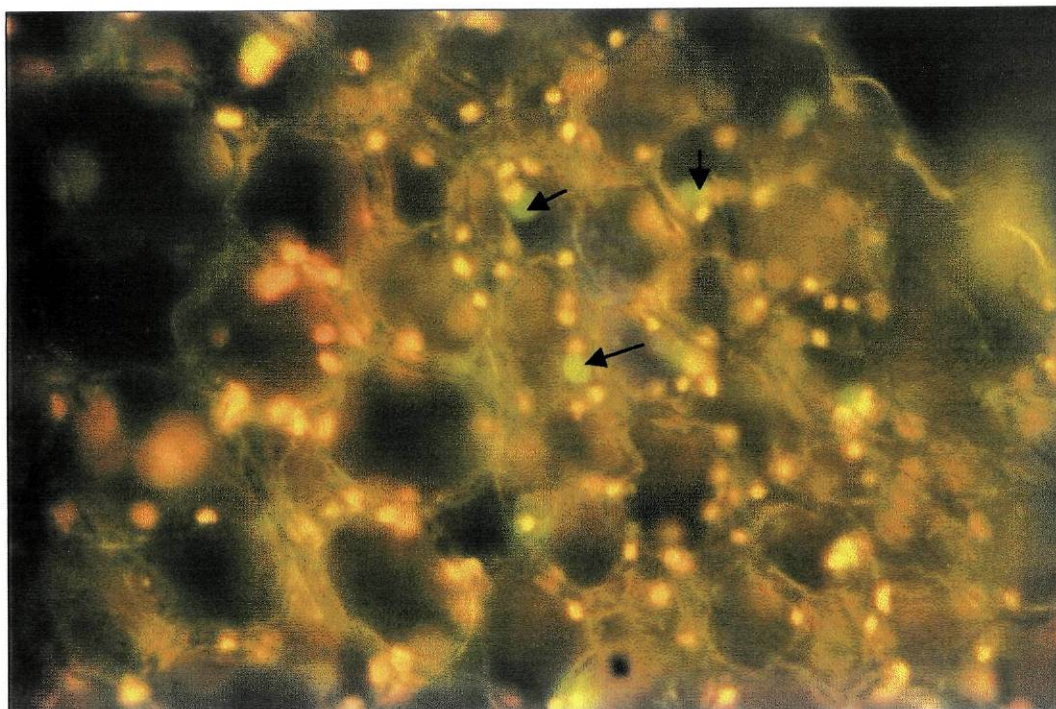


Figura 34 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* transgênica A com tratamento com sonda na concentração 1 ng/ μ L. Filtro FITC. (455X)

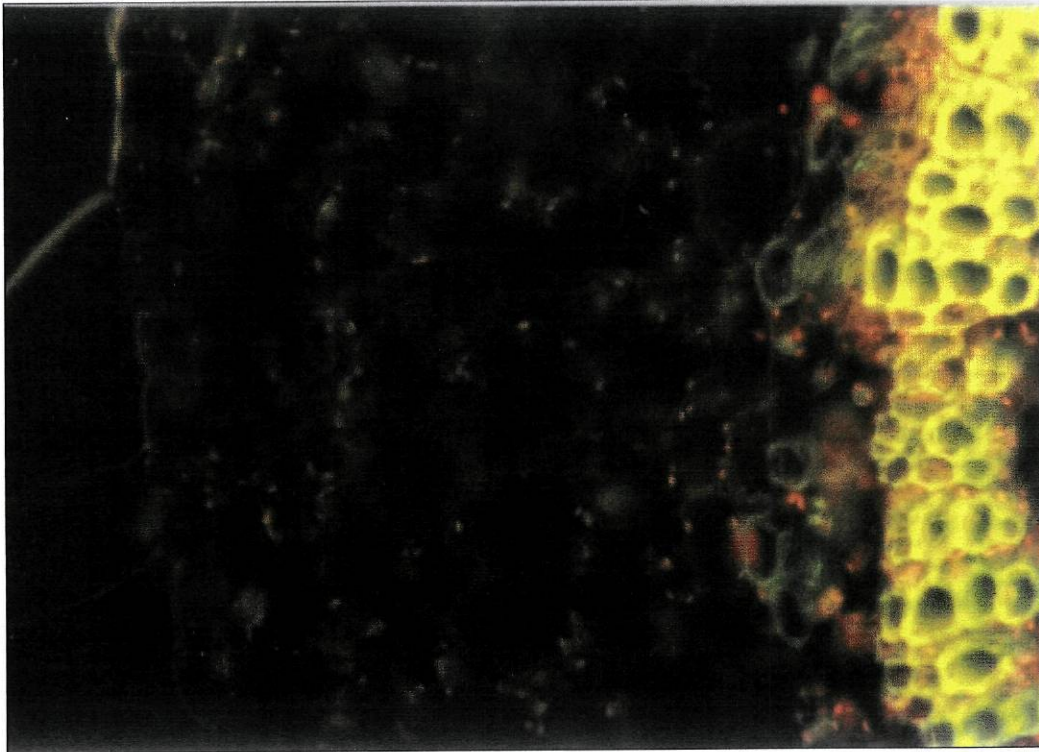


Figura 35 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* transgênica B com tratamento sem sonda . Filtro FITC. (224X)

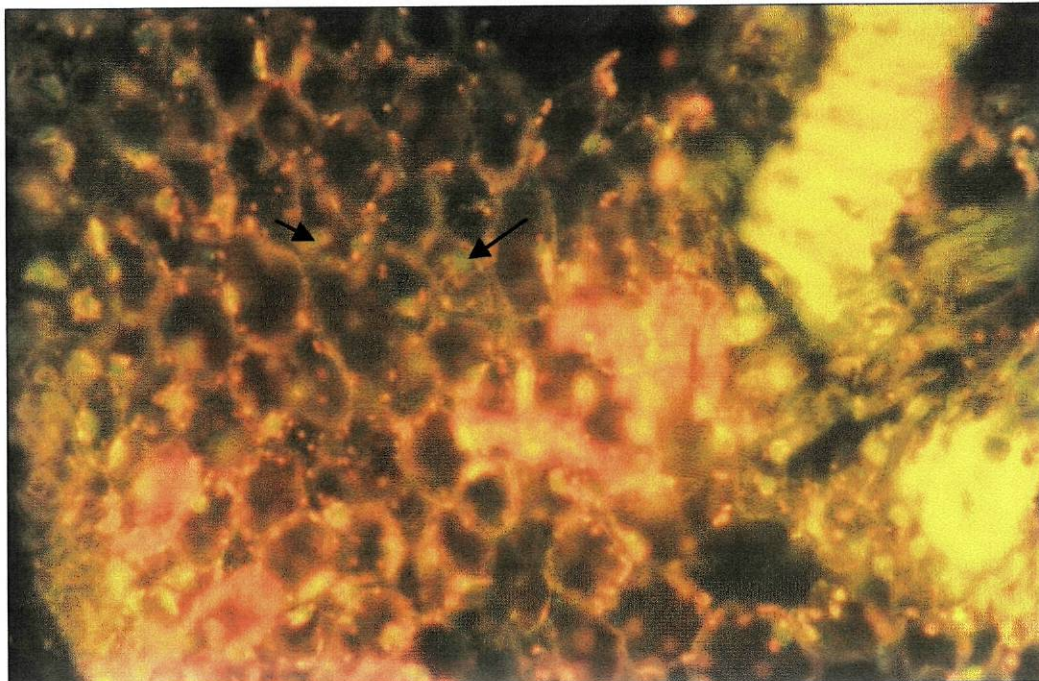


Figura 36 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* transgênica B com tratamento com sonda na concentração 0,1 ng/ μ L. Filtro FITC. (112X)

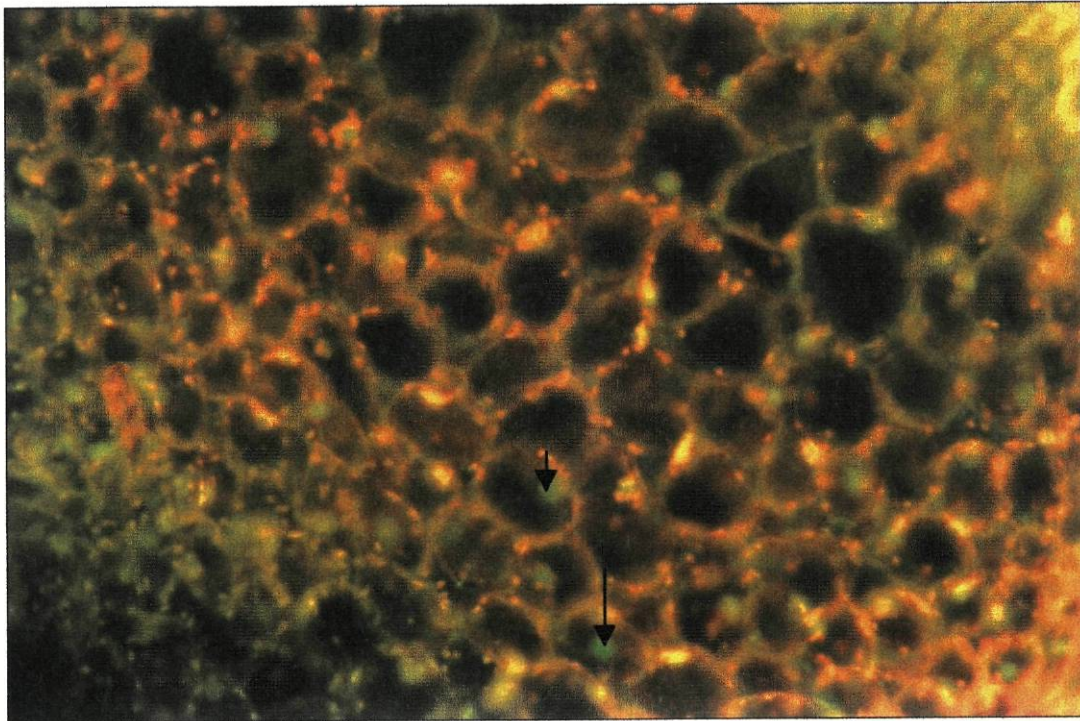


Figura 37– Corte transversal de caule de *N. tabacum* transgênica B com tratamento com sonda na concentração de 1 ng/μL. Filtro FITC. (112X)

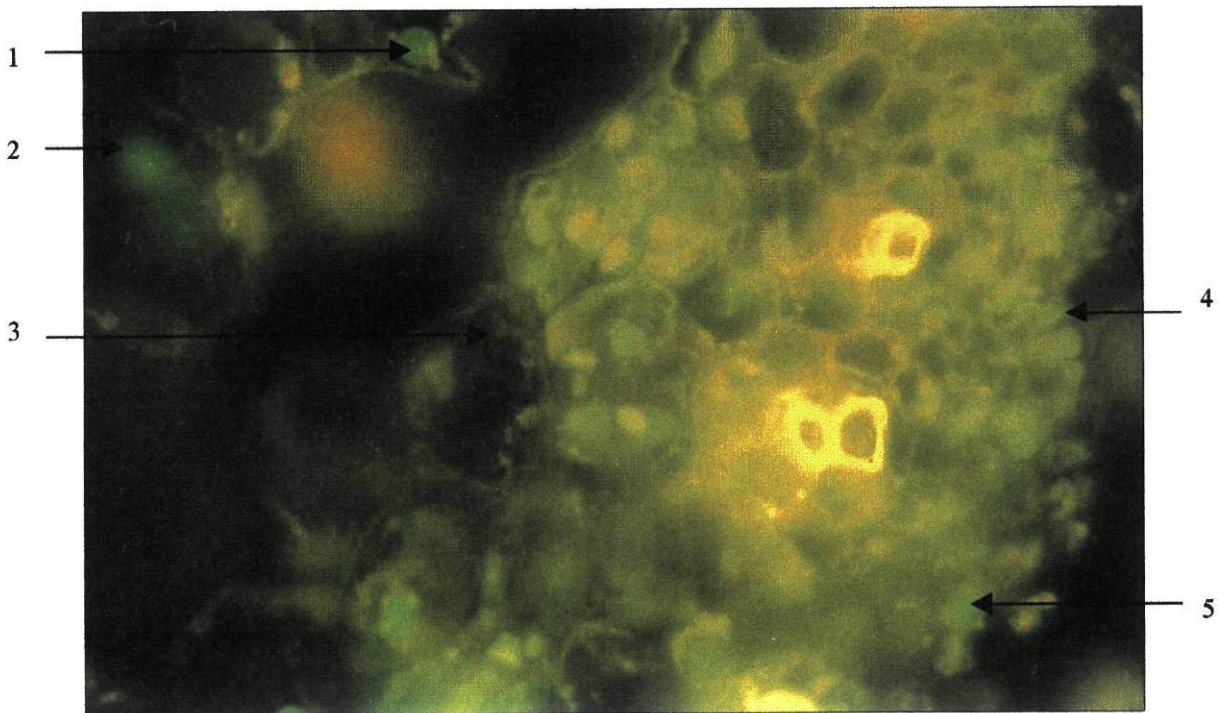


Figura 38 – Corte transversal de caule de *N. tabacum* transgênica B com tratamento com sonda na concentração 1 ng/μL. Pormenor do câmbio. Filtro FITC. (455X)

Aparentemente, não há qualquer diferença apreciável no nível de fluorescência apresentada entre as duas concentrações de sonda 0,1 ng/ μ L e 1 ng/ μ L. Pode dizer-se que a concentração da sonda de 0,1 ng/ μ L foi suficientemente sensível para a técnica e não será necessário aumentar a sua concentração, já que aparentemente uma maior concentração não implica maior sinal de fluorescência.

Portanto, nesta técnica também se confirma que ocorreu a transcrição do cDNA, uma vez que os núcleos fluorescem de verde implicando a presença da RNA pré-mensageiro. Enquanto que todos os núcleos aparecem fluorescentes, apenas alguns citoplasmas fluorescem de verde, indicando a presença de RNA mensageiro em pouca quantidade.

Depois de se verificar que ocorreu integração e transcrição do cDNA foi necessário confirmar se ocorreu tradução do RNA mensageiro e conseqüente síntese da proteína, cardosina A, recorrendo-se a três técnicas: *Western blotting*, imunocitoquímica e *tissue printing*. Qualquer uma destas técnicas é utilizada para detectar a presença da proteína através da ligação de anticorpos específicos para a proteína. Contudo, em nenhuma das técnicas se detectou a presença da proteína e por isso não se incluíram os resultados obtidos. Assim, verifica-se que ou a proteína é produzida em tão pouca quantidade sendo insuficiente para ser detectada com estas técnicas, ou não ocorreu a tradução do RNA mensageiro (mRNA) e por isso não houve produção de proteína.

A primeira hipótese poderia ser confirmada pela presença de fluorescência a nível do citoplasma correspondente à presença de RNA mensageiro (mostrada na técnica anterior). No entanto, como a fluorescência que aparece nos citoplasmas é tão pouca não se detecta a proteína nas outras técnicas.

Se considerarmos a última hipótese, pode dizer-se que a planta gere um mecanismo que impede a síntese da proteína.

É sabido que as plantas têm um mecanismo de defesa contra os vírus ou genes estranhos que é designado de *silenciamento do gene pós transcrição* (PTGS- *Post-transcriptional gene silencing*) ou co-supressão que consiste na degradação de um RNA mensageiro específico, reduzindo a expressão desse gene específico (Hamilton et al. 1999). A degradação do RNA mensageiro pode ocorrer devido à síntese de RNA polimerase dependente do RNA que produz moléculas pequenas de RNA que são complementares ao RNA mensageiro do transgene com o qual hibridam. Esta hibridação potencia a sua degradação que pode ser mediada por várias enzimas (Waterhouse et al., 1999). Outro fenómeno que pode estar associado com a degradação

do mRNA é a metilação da citosina. A presença de cópias múltiplas pode também levar a níveis baixos de expressão ou pode suprimir os genes homólogos. As cópias múltiplas estão associadas a métodos de transformação por biobalística, que foi o método utilizado para transformar as plantas.

Se considerarmos que nas plantas onde se efectuou este trabalho ocorre degradação do RNA pré-mensageiro provavelmente esta ocorre no citoplasma, pois verifica-se a presença acentuada de RNA pré-mensageiro no núcleo e pouco mRNA no citoplasma.

Assim, supondo que a planta gere especificamente qualquer um destes mecanismos, a descoberta do processo de co-supressão de *N. tabacum* constituirá, sem dúvida, um objectivo a alcançar em futuras investigações.

Capítulo quatro: Conclusão

Conclusão:

As plantas transgênicas são um instrumento de estudo para a expressão de certos genes de interesse, além da importância a nível da saúde mundial e no ambiente.

Um exemplo de estudo de expressão de genes é o estudo de *Nicotiana tabacum* transformada com o cDNA da cardosina A. Embora a expressão final do gene (presença da proteína) não tenha sido identificada não deixou de ser importante verificar que ocorreu integração do cDNA no genoma da planta e que ocorreu a sua transcrição.

A transformação de *Nicotiana tabacum* na qual se utilizou a GFP permitiu instalar o sistema no laboratório que promoverá a progressão para novas pesquisas, como por exemplo a fusão entre a GFP e a cardosina A. No presente trabalho, a GFP permitiu seleccionar as plantas transgênicas.

Como já foi referido, a GFP mostrou-se eficaz por não necessitar de substrato e acima de tudo poder observar-se macroscopicamente e *in vivo* sem perturbar grandemente o equilíbrio metabólico da planta.

Não há dúvida de que a GFP é um óptimo gene repórter na transformação de plantas, aliado ao entusiasmo de ser utilizada e vista como o primeiro exemplo de uma proteína repórter com fluorescência intrínseca.

Por todo este conjunto de características, a GFP tem sido útil em variadíssimos estudos quer a nível estrutural, quer a nível molecular. Mas, o conhecimento de mecanismos de trajectos de metabolitos e macromoléculas que se movem através da célula aperfeiçoando processos reguladores ou bioquímicos está ainda incompleto. Por isso, métodos baseados na GFP constituirão instrumentos para aprender mais sobre a função da compartimentação e como a organização é atingida. A grande escala, projectos de genoma e proteoma permitirão, em breve, prever sequências das proteínas presentes nas células das plantas de várias espécies. As diferentes mutações da GFP que têm vindo a surgir poderão permitir um conhecimento infindável que originará uma figura mais complexa da orgânica funcional da célula da planta.

Relativamente à cardosina A, os dados obtidos (integração do cDNA no genoma da planta e sua transcrição) abrem perspectivas de estudo tais como a identificação de possíveis sequências de endereçamento da cardosina A através da fusão entre a GFP e

fragmentos da cardosina A. A fusão da GFP com prováveis sequências de endereçamento da cardosina A permitirá descobrir o paradigma do trajecto da cardosina A, ou seja, verificar se a cardosina A passa ou não pelo complexo de Golgi durante o sua dinâmica intracelular.

É possível observar directamente e *in vivo* este tipo de processos porque a criação de fusões da GFP que contém sequências de localização específica resulta na retenção da GFP nesses organelos e sistemas endomembranares (Blancaflor e Gilroy, 2000).

Capítulo cinco: Referências e Bibliografia

Referências

Alves, A.; Quecini, V.; Vieira, M. (1999) Plant transformation: advances and perspectives. *Sci. Agric.* 56 (1).

Berger, F.; Haseloff, J.; Schiefelbein, J.; Dolan, L. (1998) Positional information in root epidermis is defined during embryogenesis and acts in domains with strict boundaries. *Current Biology* 8: 421-430.

Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*.12 (22): 8711-8721.

Blancaflor, E.; Gilroy, S. (2000) Plant Cell Biology in the new Millennium: new tools and new insights. *American J. of Botany* 87 (11) 1547-1560.

Brand, A. (1995) GFP in *Drosophila*. *TIG* 11:8 :324- 325. Elsevier Science Ltd.

Chalfie et al. in Haseloff, J.; Siemering, K. The use of GFP in plants. GFP: Green fluorescence protein strategies and applications. ONLINE

Chen, L.; Li, C.; Nester, E. (2000) Transferred DNA (T-DNA)-associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of *virB*. *PNAS*. 97: 13: 7545-7550

Colby e Mereth (1990) in Alves, A.; Quecini, V.; Vieira, M. (1999) Plant transformation: advances and perspectives. *Sci. Agric.* 56 (1).

Davies, D. (1990) The structure and function of the aspartic proteinase. *Annu. Rev. Biophys biophys Biochem.* 19: 189-215.

Davis, S.; Vierstra, R. (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 36: 521-528.

Egas, C., Lavoura, N., Resende, R., Brito, R., Pires, E., Pedrosa de Lima, M., Faro, C., (2000) The Saposin-like Domain of the Plant Aspartic Proteinase Precursor Is a Potent Inducer Of Vesicle Leakage, *The J. of Biological Chemistry*, 275 (49): 38190-38196.

Faro, C., Ramalho -Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simões, I., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, X., Tang, J., Pires, E. (1999) Cloning and Characterization of cDNA Encoding Cardosin A, an RGD-containing Plant Aspartic Proteinase, *J. B. Chemistry*, 274 (40): 228724-28729.

Faro, C.; Ramalho-Santos, M.; Veríssimo, P.; Pissarra, J.; Frazão, C.; Costa, J.; Tang, J., Pires, E. (1998) Structural and functional aspects of cardosins. *Aspartic Proteinases*. Plenum Press, New York, 423- 433.

Frazão, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C., Veríssimo, P., Faro, C., Pires, E., Cooper, J., Carrondo, M. (1999) Crystal Structure of Cardosin A, a Glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing Aspartic Proteinase from the Flowers of *Cynara cardunculus* L. *The J. of Biological Chemistry*. 274 (39): 27694- 27701.

Gamborg, O.; Phillips, G. (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Springer. N. York.

Garabagi, F.; Strommer, J. (2000) Green fluorescent protein as an all-purpose reporter in *Petunia*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 219- 226.

Glathe, S., Kervinen, J., Nimitz, M., Li, G., Tobin, G., Copeland, T., Ashford, D., Wlodawerf, A., Costa, J. (1998) Transport and Activation of the Vacuolar Aspartic Proteinase Phytpepsin in Barley (*Hordeum vulgare* L.) *The J. of Biological Chemistry*. 273 (47): 31230-31236.

Glick, B.; Thompson, J. (1993) *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press, Inc. USA.

Hamilton, A.; Baulcombe, D. (1999) A species of a small antisense RNA in Posttranscriptional Gene silencing in Plants. *Science*. 286: 250-252.

Haseloff, J.; Simering, K.; Prasher, D.; Hodge, S. (1997) Removal of cryptic and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plant brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 2122-2127.

Haseloff, J.; Amos, B. (1995) GFP in plants. *TIG* 11(8).

Heim, R.; Tsiem, R. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*. 6: 178-182.

Heinlein, M.; Padgett, H.; Gens, J.; Pickard, B.; Casper, S.; Epel, B.; Beachy, R. (1998) Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *The Plant Cell*. 10: 1107-1120.

Hellens, R.; Edwards, E.; Leyland, N.; Bean, S.; Mullineaux, P. (2000a) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42: 819-832.

Hellens, R.; Mullineaux, P. (2000b) a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in plant science* 5 (10): 446-451.

Herrera-Estrela, L.; Simpson, J. (1988) Foreign gene expression in plants. *Plant molecular biology. A practical approach*. C.H.Shaw. UK.

Hooykaas, P.; Mozo, T. (1994) *Agrobacterium* molecular genetics. *Plant Mol. Biol. Manual* B3:1-9.

Jefferson, R.; Kavanagh, T.; Bevan, M. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.

Karlsson, C.; Pines, J. (1998) Green fluorescent protein. Cell Biology: a laboratory handbook. Second edition. Vol. 4. Academic Press.

Kiegle, E.; Gilliam, M.; Haseloff, J.; Tester, M. (2000) Hyperpolarisation-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. The Plant J. 22 (2): 225-229.

Kiegle, E.; Moore, C.; Haseloff, J.; Tester, M.; Knight, M. (2000) Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. The Plant J. 23 (2): 267-278.

Kervinen, J., Tobin, G., Costa, J., Waugh, D., Wlodawer, A., Zdanov, A., (1999) Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. The EMBO J. 18, 14, 3947-3955.

Lin, J.; Fike, R.; Assad-Garcia, N. (2000) Improved regeneration of plant tissues: a novel medium format and membrane-based liquid culture system. Focus 17(3): 95-97.

Maliga, P. et al. (1995) *Methods in plant molecular biology. A laboratory course manual*. Cold spring Laboratory Press. USA.

Mankin, S.; Thompson, W. (2001) New green fluorescent protein for plant transformation: intron-containing, ER- localized, and soluble-modified. Plant Mol. Biol. Rep. 19: 13-26.

Mantis, J.; Tague, B. (2000) Comparing the utility of β -glucuronidase and green fluorescent protein for detection of weak promoter activity in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. Rep. 18: 319-330.

Nester, E.; Deng, W.; Lee, L., Doty, S.; Gordon, M. (1997) Recent studies on the mechanism of plant cell transformation by *Agrobacterium*. Proceedings of the MAPMBS Meeting.

Pissarra, J.; Costa, Y.; Pereira, L.; Pereira, S.; Ramalho-Santos, M.; Veríssimo, P.; Pires, E.; Faro, C. (1998) Subcellular localization of cardosin A (aspartic proteinase) in immature florets of *Cynara cardunculus* L. Electron microscopy. pp 183- 185.

Prasher, D. (1995) Using GFP to see the light . TIG 11:8 : 320-323.

Ramalho-Santos, M.; Veríssimo, P.; Cortes, L.; Samyn, B.; Van Beeumen, J.; Pires, E.; Faro, C. (1998) Identification and proteolytic processing of procardosin A. Eur. J. Biochem. 255: 133-138.

Ratcliff, F.; Martin-Hernandez, A.; Baulcombe, D. (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. The Plant J. 25 (2): 237-245.

Reichel, C.; Mathur, J.; Eckes, P.; Langenkemper, K.; Koncz, C.; Schell, J.; Reiss, B.; Maas, C. (1996) Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 5888-5893.

Rizzuto, R.; Brini, M.; De Giorgi, F.; Rossi, R.; Heim, R.; Tsien, R.; Pozzan, T. (1995) Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants *in vivo*. Current biology 6:2: 183-188.

Rizzuto, R.; Brini, M.; Pizzo, P.; Murgia, M.; Pozzan, T. (1996) Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. Current Biology 5: 635-642.

Siemering K.; Golbik, R.; Sever, R.; Haseloff, J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. Current Biology 6: 1653- 1663.

Schenk, P.; Elliot, A.; Manners, J. (1998) Assessment of transient gene expression in plant tissues using green fluorescent protein as a reference. Plant Mol. Biol. Rep. 16: 313- 322.

Veríssimo, P.; Faro, C.; Moir, A.; Lin, Y.; Tang, J.; Pires, E. (1996) Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. Eur. J. Biochem. 235: 762-768.

Walkerpeach, C.; Velten, J. (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. Plant Mol. Biol. Manual B1: 1-19.

Waterhouse, P.; Smith, N.; Wang, M. (1999) Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. Trends in plant science. 4 (11): 452-457.

Xiang, C.; Han, P.; Oliver, D. (1999) In *solium* selection for *Arabidopsis* transformants resistant to kanamycin. Plant Mol. Biol. Rep. 17: 59-65.

Zupan, J.; Zambryski, P. (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. Plant Physiol. 107: 1041-1047.

Zupan, J.; Muth, T.; Draper, O.; Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. Plant J. 23 (1): 11-28

Bibliografía

- Amoah, B.; Wu, H.; Soarks, C.; Jones, H. (2001) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *J. Experimental Botany*, 52 (358): 1135-1142.
- Asakura, T., Matsumoto, I., Funaki, J., Arai, S., Abe, K. (2000) The plant aspartic proteinase-specific polypeptide insert is not directly related to the activity of oryzasin. *Eur. J. Biochem* 267, 5115-5122
- Baird, G.; Zacharias, D.; Tsien R. (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 11241-11246.
- Bent, A. (2000) *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiology* 124:1540-1547.
- Bent, A.; Clough, S. (1998) *Agrobacterium* germ-line transformation: transformation *Arabidopsis* without tissue culture. *Plant Mol. Biol. Manual* B7:1-14.
- Carvalho, M., Arcy-Lameta, A., Roy-Macauley, H., Gareil, M., Maarouf, H., Pham-Thi, A., Zuily-Fodil, Y. (2001) Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) : enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS letters* 492, 242-246.
- Clark, M. (1997) *Plant molecular biology. A laboratory manual*. Springer. USA.
- Cordeiro, M.; Pais, S.; Brodelius, P. (1994) Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum* . 92: 645 – 653.

Costa, J.; Ashford, D.; Nimtz, M.; Bento, I.; Frazão, C.; Esteves, C.; Faro, C. Kervinen, J.; Pires, E.; Verissimo, P.; Wlodawer, A.; Carrondo, M. (1997) The glycosylation of the aspartic proteinases from barley (*Hordeum vulgare* L.) and cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *Eur. J. Biochem.* 243: 695- 700.

Cutler, S.; Ehhardt, D. Griffiths, J.; Somerville, C. (1999) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at high frequency. *PNAS* 97:7

Dodds, J.; Roberts, L. (1982) *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. N. York.

Domingos, A.; Cardoso, P.; Xue, Z.; Clemente, A., Brodelius, P.; Pais, M. (2000) Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *Eur. J. Biochem.* 67, 6824-6831

Grebenok, R.; Pierson, E.; Lambert, G.; Gong, F.; Afonso, C.; Haldeman-Cahill, R.; Carrington, J.; Galbraith, D. (1997) Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *The Plant J.* 11 (3):573-586.

Hanson, M.; Köhler, R. (2001) GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J. of Exp. Bot.* 52; 356.

Harper, B.; Stewart JR, C. (2000) Patterns of green fluorescent protein expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 141a-141i.

Haseloff, J. GFP variants for multispectral imaging of living cells. ONLINE.

Haseloff, J.; Siemering, K. The use of GFP in plants. GFP: Green fluorescence protein strategies and applications. ONLINE.

Haseloff, J.; Dormand, E.; Brand, A. Methods in Molecular Biology: Protocols in Confocal microscopy. ONLINE

Horsch, R.; Fry, J.; Hoffmann, N.; Eichholtz, D.; Rogers, S.; Fraley, R. (1985) a simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229- 1231.

Ludin, B.; Matus, A. (1998) GFP illuminates the cytoskeleton. *Cell biology*. 8: 72- 77. Elsevier Science Ltd.

Katavic, V.; Haughn, G.; Reed, D.; Martin, M.; Kunst, L. (1994) In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 245: 363-370.

Kushikawa, S.; Hoshino, Y.; Mii, M. (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. *Plant Science* 161: 953-960.

Matzke, M.; Matzke, A.; Eggleston, B. (1996) Paramutation and transgene silencing: a common response to invasive DNA? *Trends in plant science*. 1 (11): 382-388.

Mol, J.; Blokland, R.; Lange, P.; Stam, M.; Kooter, J. (1994) post-transcriptional inhibition of gene expression: sense e antisense genes. *Homologous recombination and gene silencing in plants*. Kluwer academic Publishers. Pp 309-334.

Montgomery, M.; Fire, A. (1998) Double-stranded RNA as a mediator in sequence – specific genetic silencing and co-suppression. *TIG*. 14 (7):255-258.

Murakami, S., Kondo, Y., Nakano, T., Sato, F. (2000) Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS letters* 468, 15-18.

Nakano, T.; Murakami, S.; Shoji, T.; Yishida, S. Yamada, Y.; Sato, F. (1997) A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *The Plant Cell*. 9: 1673-1682.

Pires, E.; Faro, C.; Macedo, I.; Esteves, C.; Morgado, J.; Veríssimo, P.; Pereira, D.; Gomes, D. (1994) Flor do Cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Química*. 54.

Ramalho-Santos, M.; Pissarra, J.; Veríssimo, P.; Pereira, S.; Salema, R.; Pires, E.; Faro, C. (1997). Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta*. 203- 212.

Ramalho-Santos, M.; Pissarra, J.; Pires, E.; Faro, C. (1998) Cardosinogen A- The precursor form of the major aspartic proteinase from Cardoon. *Aspartic Proteinaes*. Plenum Press, New York, pp:253-258.

Runeberg-Roos, P., Saarma, M., (1998) Phytepsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. *The Plant Journal*, 15, 1, 139-145.

Takeuchi, M.; Ueda, T.; Sato, K.; Abe, H.; Nagata, T.; Nakano, A. (2000) A dominant negative mutant of Sar1 GTPase inhibits protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells. *The Plant J*. 24(4):517-525.

Urwin, P.; Moller, S.; Blumsom, J.; Atkinson, H. (1999) Continual green fluorescent protein monitoring of promoter activity in plants. *Methods in Enzimology*. 302: 316-328.

White, P., Cordeiro, M.C., Arnold, D., Brodelius, P., Kay, J. (1999) Processing, Activity, and Inhibition of Recombinant Cyprosin, an Aspartic Proteinase from Cardoon (*Cynara cardunculus*). *The J. of Biological Chemistry* 274, 24, 16685-16693.

Wilson, T.; Hastings, J. (1998) Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 197-230.

Ye, G.; Stone, D.; Pang, S.; Creely, W.; Gonzalez, K.; Hinchee, M. (1999) *Arabidopsis* ovule is a target for *Agrobacterium* in planta vacuum infiltration transformation. *Plant J*. 19 (3): 249-257.

Zhao, Z.; Cai, T.; Tagliani, L.; Miller, M.; Wang, N.; Pang, H.; Rudert, M.; Schroeder, S.; Hondred, D.; Seltzer, J.; Pierce, D. (2000) *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Mol. Biol.* 44: 789-798.