



Indícios apontam que TOR tenha um papel central no metabolismo de amido em plantas, sendo que há acúmulo de amido em plantas com a quinase TOR inibida. O amido é um composto de reserva em plantas, sendo negativamente correlacionado com a biomassa. Ou seja, quando o carbono fotoassimilado é direcionado para a síntese de amido, menos carbono é direcionado para a produção de biomassa, o que leva a um maior acúmulo de reserva energética e pode resultar num menor crescimento da planta. A AGPase (ADP-Glucose Pyrophosphorylase) é uma proteína formada por 2 dímeros e controla a síntese de amido em plantas. Quando dois desses dímeros estão ligados por pontes dissulfeto, a AGPase está inativa. Já quando essa ponte é desfeita, as proteínas aparecem com perfis diferenciados por meio da análise de Western Blot: bandas de maior ou menor massa molecular. A compreensão dos níveis de produção e do estado conformacional de AGPase nas plantas pode auxiliar na investigação se as alterações do metabolismo de amido em plantas com inibição de TOR estão relacionados à atuação da própria TOR ou da AGPase.

A fim de gerar energia para o metabolismo celular, o malato é um dos produtos da degradação do amido em plantas. A enzima malato desidrogenase (MDH) é ativada pela luz e catalisa a oxidação de L-malato a oxaloacetato na presença de NADH<sup>+</sup> como cofator, ou seja, utiliza o malato como substrato. Os níveis de malato, intermediário do ciclo do TCA, são mais altos em plantas mutantes com TOR inibida (Caldana et al., 2013). No entanto, uma vez que há acúmulo de amido quando TOR está inibida e que há também um aumento do produto de sua degradação, a maltose, investiga-se a hipótese de que a TOR possa estar envolvida no bloqueio do metabolismo da MDH. No entanto, esta relação poderá ser melhor delineada por meio da análise dos níveis de concentração dessas proteínas em diferentes períodos.

Para se estudar a ação de determinada proteína, um dos mecanismos mais utilizados é o “knockout” gênico e avaliação do perfil fenotípico e do metabolismo das plantas resultantes. No entanto, a inibição de TOR em plantas mutantes mostrou-se letal. Outra forma, é a utilização de inibidores aplicados de forma exógena, como é o caso do AZD-8055: uma molécula que inibe a ação da TOR porque se acopla a ela no sítio de ligação de ATP, impedindo sua atividade. Com isso, é possível analisar o que acontece com as proteínas acessórias e relacionadas quando TOR está inibida ou ativa.

De modo que a atividade da quinase TOR parece estar relacionada com a assimilação de carbono e nitrogênio em plantas, o entendimento de como a TOR é regulada ou regula outras vias, por meio da atuação de proteínas, pode ser um possível alvo para o aumento da produção de biomassa vegetal.

## 2 Objetivos

- Realizar uma análise semi-quantitativa, por meio da técnica de Western Blotting, das proteínas: TOR, S6, S6P, MDH e AGPase de amostras controle e submetidas a tratamento com AZD, em diferentes períodos do ciclo diurno da planta-modelo *Arabidopsis thaliana*. Com esses resultados, será possível esclarecer dúvidas quanto aos períodos de maior produção dessas proteínas, relacionando-as com os mecanismos de ação da quinase TOR, e, conseqüentemente, no metabolismo energético nas plantas.

## 3 Metodologia

Por meio da técnica de Western Blotting, será possível realizar uma análise semi-quantitativa das proteínas TOR, S6 e S6P, MDH e AGPase em tratamentos diferentes: controle e com aplicação de AZD em diferentes momentos do ciclo diurno de plântulas de *A. thaliana* cultivadas em hidroponia. Essas amostras já foram coletadas em experimentos anteriores.

Nos casos de S6, S6P, MDH e AGPase, a extração proteica será realizada com o uso de tampão Laemmli 2x (Laemmli, 1970). Já para obtenção de TOR, as amostras serão submetidas a uma extração fenólica (adaptada de Delaplace et al., 2006). As proteínas serão quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e então aplicadas em SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970), transferidas para membrana de PVDF a fim de se realizar a análise de Western Blotting com os respectivos anticorpos. Para S6, S6P (Dobrenel et al., 2016b) e MDH será utilizado o método de Western Blotting semi-seco e para TOR e AGPase o molhado.

Como controle endógeno da proteína TOR será utilizada a proteína tubulina, e para as outras proteínas será utilizada a actina, a fim de se realizar a análise semi-quantitativa (software ImageJ: [www.imagej.net](http://www.imagej.net)).

#### 4 Cronograma de atividades

	Ago - Set 17	Out-Nov17	Dez 17-Jan 18	Fev – Mar 18	Abr – Mai 18	Jun - Jul 18
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X
Western Blot S6/S6P	X	X				
Western Blot TOR		X	X			
Western Blot MDH			X	X		
Western Blot AGPase				X	X	
Discussão e Análise de dados					X	X
Redação de Relatório e Publicações						X

#### 5 Referências

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7; 72:248-54.
- Caldana, C.; Li, Y.; Leisse, A., et al. (2013). Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 73:897–909.
- Dobrenel, T.; Caldana, C.; Hanson, J. et al. (2016a). TOR signaling and nutrient sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 67:261-85.
- Dobrenel, T.; Mancera-Martínez, E.; Forzani, C., et al. (2016b). The Arabidopsis TOR kinase specifically regulates the expression of nuclear genes coding for plastidic ribosomal proteins and the phosphorylation of the cytosolic ribosomal protein S6. *Front. Plant Sci.* 7; 1611.
- González, A.; Shimobayashi, M.; Eisenberg, T., et al. (2015). TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE* 10:e0120250.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-85.