

THAINÁ FERNANDA FILLIETAZ SAIA

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE REPRESSORA DE LIMYB MEDIADA POR
FOSFORILAÇÃO SOB ESTRESSES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Coorientadores: Virgílio Adriano Pereira Loriato
Christiane Eliza Motta Duarte

**VIÇOSA-MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S132r Saia, Thainá Fernanda Filletaz, 1997-
2022 Regulação da atividade repressora de LIMYB mediada por
fosforilação sob estresses / Thainá Fernanda Filletaz Saia. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (51 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 47-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.207>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Biologia molecular. 2. Fosforilação. 3. Proteínas.
4. Begomovírus. 5. Plantas – Efeito do stress. I. Fontes,
Elizabeth Pacheco Batista, 1957-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.
III. Título.

CDD 22. ed. 572.8

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552


THAINÁ FERNANDA FILLIETAZ SAIA

REGULAÇÃO DA ATIVIDADE REPRESSORA DE LIMYB MEDIADA POR
FOSFORILAÇÃO SOB ESTRESSES


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Thainá Fernanda Fillietaz Saia
Autora



Elizabeth Pacheco Batista Fontes
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e das oportunidades e perseverança.

Agradeço aos meus familiares, em especial meu avô Aberto Filletaz pelo suporte, e por sempre acreditar em mim.

Meus agradecimentos ao Leonardo Fioravante Gotardi pelo companheirismo, por me incentivar e pelo apoio diante das dificuldades enfrentadas.

Agradeço a Pf Dr^a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes pela oportunidade de poder participar de sua equipe e desenvolver pesquisa em seu laboratório, e por sua excelência em orientar.

Agradeço ao Dr^o Ruan Maloni Teixeira pela orientação das técnicas moleculares, e pelos conhecimentos teóricos.

Agradeço ao Dr^o Marco Aurélio Ferreira por auxiliar em procedimentos.

Agradeço à Gláucia por sempre nos ajudar mantendo a organização e limpeza do laboratório.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP), pela amizade, conversas e pelos momentos de lazeres.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa e por fim as agências de fomento CNPq, CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SAIA, Thainá Fernanda Fillietaz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022.
Regulação da Atividade Repressora de LIMYB Mediada por Fosforilação sob Estresses.
Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Virgílio Adriano Pereira Loriato e Christiane Eliza Motta Duarte.

LIMYB (*RPL10-INTERACTING MYB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN*), uma proteína nuclear que possui dois domínios MYB/SANT-like pertencente à família MYB, participa da via de defesa antiviral mediada por NIK1 (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN-INTERACTING KINASE 1*) contra begomovírus. NIK1 é ativada por meio da percepção de elicitores bióticos e abióticos. A ativação de NIK1 desencadeia uma cascata de sinalização resultando na fosforilação da proteína ribossomal L10 (RPL10) que, como consequência, direciona-se para o núcleo. No núcleo, L10 interage com LIMYB, que se liga aos promotores e reprime a expressão de genes da maquinaria de tradução e da fotossíntese. Apesar do progresso alcançado em decifrar os mecanismos de regulação da imunidade antiviral mediada por NIK1, a regulação da atividade repressora do componente a jusante LIMYB ainda não foi determinada. Nesta investigação, foram fornecidas diversas linhas de evidência demonstrando que fosforilação de LIMYB na serina posição 157 é induzida por ativação de NIK1 ou NIK2, modulando a atividade repressora do transfator. Inicialmente, foi demonstrado que a fosforilação em LIMYB é induzida pelos mesmos elicitores que ativam NIK1, incluindo ácidos nucleicos derivados de begomovírus, a PAMP bacteriana flg22, e calor. Por sua vez, LIMYB fosforilada reprimiu a expressão de genes relacionados com a maquinaria de tradução e fotossíntese da célula. A mutação no sítio de serina 157 por alanina atenuou o nível de fosforilação do mutante, afetando a repressão dos genes alvos de LIMYB estimulada por RNA preparado de plantas infectadas por begomovírus. Além disso foi demonstrado que fosforilação de LIMYB é induzida por ativação de NIK1 ou NIK2, já que LIMYB não foi fosforilada no mutante duplo *nik1nik2* e a expressão do mutante NIK1-T474D, constitutivamente ativado, induziu a fosforilação de LIMYB na ausência de estímulos. Coletivamente, estes resultados indicam que fosforilação de LIMYB é mediada pela via de imunidade antiviral mediada por NIK1, sendo um mecanismo de modulação da atividade repressora do transfator. Além disso, foi demonstrado que ácido salicílico e ABA induzem a fosforilação de LIMYB e regulam negativamente os genes marcadores da via de sinalização de NIK1. Embora ainda não avaliado, muito provavelmente,

NIK1 também é regulada pelos referidos hormônios, aumentando a extensão do hub de sinalização mediada por NIK1.

Palavras-Chave: Fosforilação. Modificação pós traducional. Sinalização Celular. LIMYB. NIK1. Transfator.

ABSTRACT

SAIA, Thainá Fernanda Fillietaz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Phosphorylation-mediated regulation of LIMYB repressing activity under stress conditions**. Advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Virgílio Adriano Pereira Loriato and Christiane Eliza Motta Duarte.

LIMYB (*RPL10-INTERACTING MYB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN*), a two-MYB/SANT-like domains-containing nuclear protein from the MYB family of transactors (TF), participates in the NIK1 (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN-INTERACTING KINASE 1*)-mediated antiviral signaling, which protects plants against begomoviruses. NIK1 is activated upon perception of biotic and abiotic elicitors. NIK1 activation leads to a signaling cascade resulting in the ribosomal protein L10 (RPL10) phosphorylation and subsequent translocation to the nucleus. Inside the nucleus, L10 interacts with LIMYB, which binds to target promoters and represses the expression of translation machinery- and photosynthesis-related genes. Despite the progress in deciphering the mechanisms underlying the NIK1-mediated antiviral immunity, the regulation of the downstream component LIMYB repressing activity remains to be determined. In this investigation, we provided several lines of evidence demonstrating that NIK1 or NIK2 activation induces LIMYB phosphorylation at Ser157 to modulate the repressing activity of the transactor. Initially, we demonstrated that LIMYB is phosphorylated in response to the same elicitors that activate NIK1, including begomovirus-derived nucleic acids, the bacterial PAMP flg122, and heat. Phosphorylated LIMYB repressed the expression of translation machinery- and photosynthesis-related genes. Replacement of Ser-157 with alanine attenuated stress-induced phosphorylation, which affected the LIMYB-mediated repression of target genes in response to RNA prepared from begomovirus-infected plants. Furthermore, we demonstrated that LIMYB phosphorylation is induced by NIK1 or NIK2 activation, as LIMYB was not phosphorylated in the double mutant *nik1nik2*, and expression of the constitutively activated NIK1-T474D induced LIMYB phosphorylation in the absence of elicitors. Collectively, these results indicate that LIMYB phosphorylation is regulated by the NIK1-mediated antiviral immunity, as a mechanism to modulate the repressing activity of the LIMYB transactor. In addition, we demonstrated that salicylic acid and ABA induce LIMYB phosphorylation and repress the expression of the NIK1 signaling-associated marker genes.

Although not yet evaluated, very likely NIK1 is regulated by these hormones enhancing the extent for the NIK1-mediated signaling hub.

Keywords: Phosphorylation. Post-translational modification. Cell signaling. LIMYB. NIK1. Transcription factor.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
	2.1 A família de transfatores MYBs.....	13
	2.2. Sistema de imunidade inata de plantas.....	15
3.	METODOLOGIA.....	18
	3.1 Ensaio de fosforilação por indução de flg22 e ácidos nucleicos de begomivirus	18
	3.2 Ensaio de fosforilação por indução aos hormônios, estresse no retículo endoplasmático.	18
	3.3 Ensaio de fosforilação por indução de calor	19
	3.4 Extração de proteína e western blotting	19
	3.5 Análise <i>in silico</i> dos possíveis sítios de fosforilação	20
	3.6 Construção dos oligonucleotídeos para mutagênese sítio dirigida.....	20
	3.7 Mutação das sequências de LIMYB e clonagem do mutante de LIMYB em vetores binários de transformação de plantas	20
	3.8 Plasmídeos recombinantes	21
	3.9 Ensaios de transativação de promotores em protoplastos de fosforilação de LIMYB intacta e mutante.	22
	3.10 Extração e RNA e análise da expressão gênica via RT-qPCR.....	23
	3.11 Produção de anticorpos específicos para proteína de LIMYB	23
	3.12 Extração de RNA de plantas infectadas com CaLCuV (<i>Cabbage leaf curl ilic</i>)	25
4.	RESULTADOS	26
	4.1 Sinais bióticos induzem a fosforilação de LIMYB	26
	4.2 LIMYB é diferencialmente fosforilada por estresses abióticos.....	28
	4.3 Repressão de genes alvos de LIMYB por calor	29
	4.4 Efeito de hormônios no status de fosforilação de LIMYB.....	31

	4.5 Tratamentos com ácido salicílico e ácido abscísico reprimem a expressão dos genes alvos de LIMYB	32
	4.6 Estrutura tridimensional de LIMYB e Identificação de sítio de fosforilação que regula a atividade repressora de LIMYB.....	35
	4.7 Confirmação da construção do mutante LIMYB-S157A.....	36
	4.9 Fosforilação da Ser-157 é necessária, mas não essencial para a atividade repressora de LIMYB	39
5	DISCUSSÃO	43
	5.1 LIMYB é fosforilada no resíduo de Ser-157 em resposta a estímulos que ativam a via de sinalização antiviral de NIK1.	43
	5.2 Respostas a Hormônios	44
	5.3 Respostas a Calor	45
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXOS.....	50

1. INTRODUÇÃO

As plantas corriqueiramente são expostas a estresses bióticos, como fungos biotróficos e necrotóficos, bactérias, oomicetos, nematoides, vírus e viróides, e abióticos ocasionados por calor, frio, seca, salinidade, entre outros fatores. (MANTRI *et al.* 2014; NEJAT & MANTRI, 2017). Esses efeitos podem ser imediatos ou duradouros, conseqüentemente, são fatores que influenciam a baixa produção e qualidade nas culturas agrônômica (MERTENS *et al.*, 2021). Para mitigar o efeito deletério dos estresses do meio ambiente, as plantas desenvolveram um sistema sofisticado de percepção de estresses, ligado a receptores específicos e fatores intermediários que transmitem entre eles os sinais de estresses intracelularmente resultando em respostas moleculares de defesa e adaptação. Neste circuito molecular de transmissão de sinais, os transfatores de transcrição (TF), frequentemente induzidos por estresses bióticos ou abióticos, controlam especificamente a expressão de um conjunto seletivo de genes, cujas proteínas codificadas possuem funções citoprotetoras atuando em processos antioxidativos, na manutenção da integridade de membranas e proteínas, canais de íons, defesa etc. As famílias de TFs mais expressivas em plantas que promovem reprogramação gênica em resposta a estresses múltiplos são NAC, WRKY, MYB, bHLH e bZIP (NG *et al.*, 2018).

A família de proteínas MYBs são caracterizadas como fatores de transcrição, devido ao domínio conservado MYB que se liga ao DNA. As proteínas MYBs são encontradas em uma ampla diversidade de plantas, sendo divididas em quatro classes R1, R2/R3, R3 e R4 MYB (DUBOS *et al.*, 2010). As proteínas MYBs possuem dois domínios, o domínio MYB na região N-terminal e a região C-terminal responsável pela atividade regulatória da proteína (AMBAWAT *et al.*, 2013). LIMYB (*RPL10-INTERACTING MYB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN*) é uma proteína nuclear constituída de dois domínios MYB/SANT-like, sendo pertencente à família MYB classificada na classe R2/R3. As proteínas que estão classificadas nessa classe estão envolvidas em processos fundamentais e específicos da planta como metabolismo primário e secundário processos de desenvolvimento e respostas a estresses abióticos e bióticos (DUBOS *et al.*, 2010). Especificamente, LIMYB foi inicialmente descrita como um componente a jusante de uma via de sinalização antiviral mediada por um receptor de membrana, designado NIK1 (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN-INTERACTING KINASE 1*) (ZORZATTO *et al.*, 2015).

O receptor de membrana NIK1 pertence à superfamília de RLK, sendo classificado na subfamília II, LRR-RLKs (*Leucine-rich repeat receptor-like kinase*), em que os membros possuem 5 motivos LRR no domínio extracelular e um domínio conservado do tipo serina/treonina cinase no C-terminal citoplasmático (SAKAMOTO *et al.*, 2012). NIK1 foi inicialmente identificada pela sua interação com a proteína de begomovírus, NSP (*nuclear shuttle protein*) (MARIANO *et al.*, 2004). NIK1 é ativada em resposta à infecção viral por fosforilação no resíduo de treonina na posição 474 em decorrência de homodimerização de NIK1 ou heterodimerização com outro receptor induzida por ácidos nucleicos derivados de begomovírus (SANTOS *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2019). A ativação de NIK1 leva à fosforilação de proteína ribossomal L10 (RPL10), um componente ribossomal da subunidade 60S, e ao ser fosforilada RPL10 dissocia-se do ribossomo e direciona-se para o núcleo, onde interage com LIMYB, promovendo a repressão de genes da maquinaria de síntese de proteínas, o que causa supressão global de tradução (CARVALHO *et al.*, 2008; ZORZATTO *et al.*, 2015). Os begomovírus não são capazes de escapar deste mecanismo regulatório de tradução das células hospedeiras; portanto, os mRNAs virais não são traduzidos eficientemente, comprometendo a infecção (ZORZATTO *et al.*, 2015; BRUSTOLINI *et al.*, 2015). Em interações compatíveis, a proteína NSP de begomovírus interage com o domínio cinase de NIK1, prevenindo fosforilação no sítio de ativação (Thr-474) e superando assim o mecanismo antiviral do hospedeiro (FONTES *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2009).

A ativação da via antiviral ocorre com reconhecimento de PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) virais, um processo que requer o receptor de membrana NIK1, sendo que esse reconhecimento pode ser feito através da indução de ácidos nucleicos de begomovírus (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Além de ácidos nucleicos derivados de begomovírus, a flagelina bacteriana ou seu peptídeo ativo Flg22 também é capaz de ativar NIK1 para iniciar a sinalização da via antiviral, em uma comunicação cruzada com a via PTI (*PAMP-triggered immunity*) (LI *et al.*, 2019). Tratamento de *Arabidopsis* com flg22 leva à formação de um complexo imune ativo entre o receptor de flagelina, FLS2 (*FLAGELLIN SENSING 2*), e seu correceptor BAK1 (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE ASSOCIATED KINASE 1*) (MA *et al.*, 2016). Ativação de BAK1 promove a fosforilação de NIK1, associada ao complexo imune FLS2-BAK1, no resíduo de Thr-474, crucial para ativação da proteína (LI *et al.*, 2019). NIK1 ativada intermedeia a fosforilação RPL10 e associação com LIMYB, formando um complexo ativo que funciona como repressor de transcrição de genes relacionados com o aparato de tradução. Entretanto, não se sabe se a ativação de LIMYB depende apenas da associação com

RPL10 ou se a proteína nuclear também depende de fosforilação induzida pela ativação da via antiviral.

As proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais, sendo que uma das regulações mais comuns em proteínas nos eucariotos superiores é adição de um grupo fosfato, que pode ocasionar mudança conformacional ativando ou desativando a proteína (ALBERTS *et al.*, 2017). Com isso a adição e a remoção de um grupo fosfato em proteínas específicas pode levar à respostas de sinais de mudanças no estado da célula, pois muitos dos sinais que medeiam as interações célula a célula são transmitidos da membrana plasmática para o núcleo por uma cascata de eventos de fosforilação de proteínas (ALBERTS *et al.*, 2017). Nesse contexto, o estudo dos mecanismos de controle da atividade repressora da proteína LIMYB, por meio da regulação de sítios de fosforilação em resposta a estresse biótico e abiótico é fundamental para compreensão da via antiviral mediado por NIK1.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A família de transfatores MYBs

Os fatores de transcrição (TFs) são proteínas que apresentam domínio de ligação com o DNA, direcionando a taxa de transcrição através da ativação ou repressão da expressão de genes específicos. Os TFs desempenham atividades essenciais em processos de desenvolvimentos e respostas a estímulos bióticos e abióticos. Algumas famílias de TFs são fundamentais na resposta imune de plantas, são elas, AP2/ERF, bHLH, bZIP, MYB, NAC e WRKY (TSUDA & SOMSSICH, 2015). TFs apresentam sítios específicos de ligação ao DNA, conhecidos como elementos cis regulatórios (CREs), frequentemente mapeados na região do promotor de genes independentes. São classificados de acordo com os motivos conservados em domínios de ligação ao DNA (DBDs). A configuração estrutural dos TFs normalmente engloba quatro domínios independentes, domínio de ligação ao DNA, região reguladora de transcrição, domínio de oligomerização e sinal de localização nuclear. (BALAGUER *et al.*, 2017; ABDULLAH-ZAWAWI *et al.*, 2021; MA *et al.*, 2022).

A família de fatores de transcrição MYB consiste em numerosas unidades moleculares evolutivas heterogêneas, de proteínas separadas que compartilham apenas sequências conservadas na região que se liga ao DNA (ROSINSKI & ATCHLEY, 1998). Essas sequências conservadas são caracterizadas em três motivos funcionais distintos, para ativação transcricional e regulação negativa ordenadas ao longo das sequências. São elas três repetições estruturais imperfeitas (R1, R2, R3) com 50-53 aminoácidos no qual 11 sítios de aminoácidos atuam na formação de núcleo hidrofóbico, devido a três resíduos de triptofano com intervalos regulares sobre 18 aminoácidos que ajudam a manter a estrutura; cada repetição é formada por três hélices bem definidas e compactadas (Fig.1). A terceira hélice de R2 e R3 está envolvida no reconhecimento de bases específicas no sulco maior do DNA, a presença de uma cavidade no núcleo hidrofóbico na região da R2, favorece uma mudança conformacional ao qual liga-se ao DNA (OGATA *et al.*, 1996).

A família MYB em plantas está entre as principais famílias que regulam vários processos de desenvolvimento, e resposta a estresse biótico e abiótico. Estudos sugerem que a família de TFs que apresenta maior diversidade é a família MYB e WRKY (ABDULLAH-ZAWAWI *et al.*, 2021). A família MYB em plantas é composta pelas repetições R2 e R3 (Fig.1) ao qual é dividida em quatro classes, R1, R2/R3, R3 e R4, de acordo com o número de

repetições adjacentes. A classe R2/R3, amplamente estudada em vegetais, representa a classe de genes que apresenta maior taxa de transcrição em plantas (ROSINSKI & ATCHLEY, 1998; JIANG *et al.*, 2004; DUBOS *et al.*, 2010).

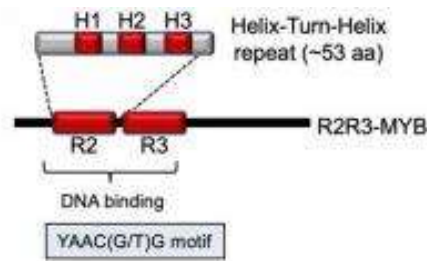


Figura 1. Diagrama do domínio R2/R3 MYB. O domínio MYB é formado por três repetições hélice-volta-hélice. Diferentes classes são caracterizadas a partir de 1 a 4 cópias desses motivos (NG *et al.*, 2018).

A classe R2/R3 compõe MYBs contendo a estrutura modular, sendo que na porção N terminal reside o domínio que se liga-se ao DNA, e a porção C terminal contém o domínio responsável pela ativação ou repressão da transcrição gênica. A porção C terminal é subdividida em C1 e C2, sendo o domínio C1 conhecido como o motivo de GIDP com atividade ativadora, e C2, designado motivo EAR, é o principal domínio de repressão. Além de C2, o motivo de repressão adicional TLLLFR pode ser encontrado em alguns MYB repressores (KRANZ *et al.*, 1998; MA *et al.*, 2022). Os TFs MYBs estão envolvidos no controle de processos específicos de plantas, como metabolismo primário e secundário, destino e identidade celular, processos de desenvolvimento, resposta de estresse biótico e abiótico (DUBOS *et al.*, 2010). Entre TFs MYBs, LIMYB tem sido caracterizada como um componente de uma via de sinalização ativada por infecção viral (ZORZATTO *et al.*, 2015).

LIMYB foi especificamente identificada em estudos realizados para encontrar parceiros da proteína RPL10, um componente ribossomal da subunidade 60S, que também participa da cascata de fosforilação mediada pela via de sinalização antiviral desencadeada por NIK1 (ROCHA *et al.*, 2008). A ativação da via antiviral promove a interação entre RPL10 e LIMYB que atua como regulador negativo em promotores de genes relacionado a maquinaria de tradução. LIMYB de *Arabidopsis* (At5g05800) possui dois domínios MYB/SANT, sendo uma proteína MYB nuclear inserida na classe R2/R3, apresenta 449 aminoácidos, com massa molecular de 52690 Da (ZORZATTO *et al.*, 2015).

Análises de Chip-seq e RNA-seq mostraram que o fator de transcrição LIMYB liga-se a promotores reprimindo genes relacionados a processos biológicos de metabolismo de

aldeído, fotossíntese, transcrição, tradução, e interage com promotores de genes de fatores de iniciação da tradução, como eIF2, EIF2C, eIF γ , EF1B e eIF $\beta\alpha$, e genes relacionados ao complexo de proteína E2 (*UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME*). LIMYB também se liga a promotores com o papel de ativar a transcrição como os genes envolvidos nos transportes de ânions, respostas de níveis de nutrientes, processo de biossíntese de fenilpropanoides. A identificação de *cis*-elementos conservados em promotores de genes alvos de LIMYB está relacionada com padrão de reconhecimento da família MYB, ao qual possivelmente apresenta um papel essencial na remodelação das funções celulares (TEIXEIRA, 2022). No entanto o mecanismo ao qual LIMYB é regulada ainda não foi estudado sendo objetivo dessa investigação.

2.2. Sistema de imunidade inata de plantas

O sistema de imunidade antiviral de plantas pode ser desencadeado via o modelo sistema imune clássico PTI, e via sinalização antiviral mediada por NIK1, além da comunicação cruzada entre ambos (MARIANO *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2019; FONTES *et al.*, 2021). PTI faz parte da primeira etapa da imunidade de planta, ao qual receptores, designados PRRs (*pattern recognition receptors*) atuam no reconhecimento de patógenos, por meio de ligação com padrão moleculares de patógenos (MAMPS ou PAMPs) como as flagelinas (JONES & DANGL, 2006). A ligação de PRRs com PAMPs promove a associação de PRRs com correceptores induzindo a fosforilação dos receptores o que leva à ativação que resulta em imunidade desencadeada por PAMP (PTI).

O modelo de imunidade inata preconizado seria em zigzag, constituindo de uma primeira fase, na qual PAMPs (ou MAMPS) são reconhecidos pelos PRRs, resultando em imunidade desencadeada por PAMP (PTI) podendo impedir a infecção. Na fase 2, patógenos bem sucedidos produzem efetores que contribuem à virulência do patógeno. Os efetores passam a primeira barreira de imunidade, inibindo PTI, o que resulta em suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Na fase 3, os efetores são reconhecidos por proteínas de ligação a nucleotídeos com domínio rico em repetição de leucina (NB-LRR), resultando em imunidade acionada pelo efector (ETI). O reconhecimento é indireto ou através do reconhecimento por NB-LRR. Na fase 4, a seleção natural impulsiona os patógenos para evitar o ETI, diversificando os efetores reconhecidos, ou adquirindo efeitos adicionais que suprimem o ETI. A seleção natural resulta em novas especificidades das proteínas de resistência para que o ETI possa ser acionado

novamente (JONES & DANGL, 2006). A combinação de resposta de PTI e ETI potencializa a resposta de defesa da planta (NGOU *et al.*, 2021).

A via de sinalização antiviral mediada por NIK1 ocorre a partir da percepção de PAMPs virais (ácidos nucleicos derivados de begomovírus) que promovem a fosforilação e ativação de NIK1. Entretanto, em interações compatíveis, a proteína NSP de begomovirus bissegmentados pertencente à família *Geminiviridae*, liga-se à alça de ativação do domínio cinase de NIK1 impedindo a sua sinalização, levando a planta à supressão da imunidade (MARIANO *et al.*, 2004). NIK1 é classificada como LRR-RLK, uma cinase do tipo serina e treonina, receptora transmembrana com propriedades de autofosforilação (FONTES *et al.*, 2004). O resíduo de treonina na posição 474 é um sítio conservado de atividade cinase para resposta antiviral, e quando fosforilado intermedeia uma cascata de fosforilação que regula o tráfego da proteína ribossomal RPL10 (SANTOS *et al.*, 2009). RL10 é fosforilada através de NIK1 (ROCHA *et al.*, 2008), desloca-se para núcleo onde interage com LIMYB, formando um complexo repressor de transcrição que regula negativamente genes relacionados à maquinaria de tradução, através da ligação ao seus promotores (ZORZATTO *et al.*, 2015).

Estudos mostram que DNA e RNA de begomovírus funcionam como PAMPs virais ativando a via de imunidade antiviral mediada por NIK1 ao qual leva a repressão de genes ribossomais como *RPL13* e *RPS25* (TEIXEIRA *et al.*, 2019) e de genes regulatórios de iniciação de tradução, resultado na supressão global da maquinaria de tradução. O mRNA viral não é capaz de escapar deste mecanismo regulatório de tradução das células hospedeiras, não sendo eficientemente traduzido, o que compromete o processo de infecção (ZORZATTO *et al.*, 2015).

A configuração semelhante entre NIK1 e membros da classe da subfamília de LRR II RLK que funcionam como correceptores de PRRs, levantou a hipótese de que NIK1 também poderia estar envolvida em PTI (MACHADO *et al.*, 2015). Estudos posteriores demonstraram que NIK1 participa da modulação da via PTI atuando negativamente na formação do complexo FLS2 e BAK1, prevenindo ativação de uma resposta auto-imune em condições normais. A presença de Flg 22 (um peptídeo ativo derivado da PAMP flagelina) liga-se ao receptor de membrana FLS2 e promove a sua associação com BAK1 o que leva à fosforilação e ativação do complexo FLS2- BAK1 que por sua vez fosforila NIK1 na posição T474, ativando assim a cascata de sinalização da via antiviral (LI *et al.*, 2019). Como resultado, RPL10 é fosforilado, redirecionado para o núcleo e se associa com LIMYB, formando um complexo ativo que funciona como repressor de transcrição de genes relacionados com o aparato de tradução (LI *et al.*, 2019). Consequentemente, a PAMP bacteriana flg22 é também capaz de ativar a via de

sinalização de NIK1, regulando a atividade repressora de LIMYB. Embora LIMYB tenha sido identificada e caracterizada como um repressor transcricional de genes envolvidos na maquinaria de tradução de células vegetais, ativada por sinais bióticos por meio de uma cascata de fosforilação via NIK1, não se sabe se a atividade repressora de LIMYB seria regulada por fosforilação e se responderia também a estresses abióticos.

3. METODOLOGIA

3.1 Ensaio de fosforilação por indução de flg22 e ácidos nucleicos de begomovirus

A análise da indução da fosforilação de LIMYB por ácidos nucleicos de begomovirus e flagelina (Flg22), foi realizado por ensaio *in vivo* com *Arabidopsis thaliana* superexpressando LIMYB 35S:LIMYB-L1 e 35S:LIMYB-L3 (TEIXEIRA, 2017), nocautes *limyb-32* (Salk_032054), obtidas do *Salk Institute for Biological Studies*, e genotipadas previamente (ZORZATTO *et al.*, 2015), além de linhagens *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0), obtidas no laboratório de biologia molecular de plantas/Bioagro/UFV. As sementes de Col-0, *limyb-32/35S:LIMYB* e *limyb-32* foram desinfestadas por 15 minutos em agitação com o uso de solução contendo, álcool absoluto, água destilada estéril e hipoclorito de sódio na proporção de 4:3:1 respectivamente, seguido de lavagem com álcool absoluto. Após a desinfestação e secagem das sementes, as mesmas foram plaqueadas separadamente em placas de petri contendo meio MS ½ força (MURASHIGE & SKOOG, 1962). As placas contendo as sementes foram acondicionadas a 4°C por 48 h, e após as plântulas foram cultivadas a 22°C por 10 dias, e aclimatizadas por um dia em placa petri contendo água destilada estéril, subsequentemente induzidas aos tratamentos, onde foram utilizados separadamente RNA extraído de plantas infectadas por begomovirus e não infectadas em concentração de 250 ng/μL, flg22 a 100 mM e água no volume final de 600 μL por poço em placa de cultivo celular, por um período de 3 horas.

3.2 Ensaio de fosforilação por indução aos hormônios, estresse no retículo endoplasmático.

As sementes de Col-0, *limyb-32/35S:LIMYB* e *limyb-32* foram plaqueadas separadamente em placas de petri contendo meio MS ½ força (MURASHIGE & SKOOG, 1962). As plântulas foram cultivadas a 22°C por 10 dias, aclimatizadas por um dia, e subsequentemente induzidas aos tratamentos de hormônio ácido abscísico (ABA) e ácido salicílico (AS). A concentração do ABA utilizado no tratamento foi de 1 μM diluído em água destilada, a concentração do ácido salicílico utilizado no tratamento foi de 0,5 mM juntamente com um inibidor de protease MG 32 a 0,09 mM, água destilada foi utilizada como controle negativo para tratamento com ABA e DMSO, para AS. As plântulas foram aclimatizadas em

poços de placas de crescimento por 24 h, e então tratadas com 1000 µl de solução dos hormônios ou controles por 3 horas.

Para a o tratamento de estresse no retículo foi utilizado tunicamicina (TM; Sigma-Aldrich) 2,5 µg/ml. As plântulas também ficaram sobre a indução por um período de três horas em poços contendo 1000 µl, sendo DMSO utilizada como controle.

3.3 Ensaio de fosforilação por indução de calor

As linhagens, conforme descritas nos ensaios anteriores, foram semeadas em sementeiras por 10 dias, depois transplantadas em vasos individuais em câmara de crescimento controlado com temperatura de 22°C por um fotoperíodo de oito horas. As plantas com 28 dias após transplante, foram induzidas ao tratamento de estresse por calor, em uma temperatura de 38 °C em BOD, por períodos de uma hora e três horas, para o controle as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 22°C.

3.4 Extração de proteína e western blotting

Para a extração de proteínas totais foi utilizado um tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, IGEPAL (NP-40) 1% v/v, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, além de coquetel inibidor de fosfatase, conforme recomendação do fabricante Roche®). A proteína recombinante YFP-LIMYB (82 kDa) transgene foi imunoprecipitada de extratos de proteínas totais com o anticorpo policlonal anti – GFP (α -GFP, life technologies, cat # A11122, 1:5000) por 16 h e a proteína endógena LIMYB (52 kDa) com anticorpos preparados específicos para LIMYB. Utilizou-se bead de agarose proteína-A (Pierce™) para purificação dos imunocomplexos. As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 10% (m/v) de poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose. A membrana foi sondada incubada com anticorpo anti-fosfoserina (α -phosphoserine peroxidase, Sigma-Aldrich, Cat # SAB5200087, 1:5000) por 16 horas e revelada pelo fotodocumentador ChemiDoc® (Bio-Rad™) através de reação quimioluminescente com o *kit* Clarity Western ECL Substrate®. Após a revelação da fosforilação, os anticorpos anti-fosfoserina foram dissociados com Tris-glicina, e a membrana re-incubada com o anticorpo anti-GFP primário e anti-IgG secundário (*goat anti-mouse* IgG-HRP, Santa Cruz, Cat # sc-2005, 1:10000).

3.5 Análise *in silico* dos possíveis sítios de fosforilação

A análise *in silico* de possíveis sítios de fosforilação foi obtido por meio da utilização da plataforma MusiteDeep via ferramenta de *Deep Learning* para predição de sítios de fosforilação. A estrutura em 3D da proteína foi obtida pela plataforma I-TASSER e os domínios da proteína, através da plataforma HMMER.

3.6 Construção dos oligonucleotídeos para mutagênese sítio dirigida

O oligonucleotídeo contendo as regiões de mutação foi desenhado na plataforma online NEBaseChanger de forma a promover a mutação no sítio de serina por uma alanina na posição 157, sendo AGC na sequência de LIMYB mutada para GCC, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeo com mutação no resíduo 157

Nome	Sequência (3'->5')
LIMYB_S->A 157_F	5'P-AGATAACCAAgccATGTGTAGTTCATC
LIMYB_S->A 157_R	5'P-TCATCTTCTTCCTCGTAAC

3.7 Mutação das sequências de LIMYB e clonagem do mutante de LIMYB em vetores binários de transformação de plantas

O plasmídeo recombinante pDONR201 (pUFV 1378) contendo o cDNA de LIMYB (At5g05800 ns obtido por BP 20ilico20i e propagado em DH5 α) foi utilizado como molde para obtenção da mutação sítio dirigida. A amplificação por PCR foi realizada com o uso da DNA-polimerase de alta-fidelidade Q5 (NEW ENGLAND BIOLABS). O segmento de DNA foi amplificado, utilizando os oligonucleotídeos mutados e fosforilados nas extremidades 5', que modifica a trica de bases AGC na sequência de LIMYB para GCC, ocasionando a mutação que resulta na substituição da Ser-157 por Ala na proteína mutada. O produto de amplificação foi purificado por coluna de afinidade (QIAquick®), circularizado por ligação com a T4 DNA-

ligase), e transformado em *Escherichia coli* estirpe DH5 α por eletroporação. A seleção de transformantes positivos foi feita em placas de petri contendo meio LB sólido suplementado com 21ílico21ina (100 mg.L⁻¹). Os transformantes foram confirmados por PCR com os oligonucleotídeos pDON201 e At5G05800BRVS, conforme descritos na Tabela 2. O plasmídeo dos transformantes positivos, resistentes a Canamicina foi extraído por mini-prep (QIAprep®), e o inserto transferido para o vetor de expressão pEarly 101 por recombinação utilizando LR 21ílico21i. Uma vez que pEarly 101 confere resistência a 21ílico21ina, utilizou-se enzima de restrição *ApaI*, que hidrolisa o vetor pDONR201. Foi realizado a transformação em *E. coli* estirpe DH5 α por eletroporação e os clones positivos confirmados por PCR com os oligonucleotídeos MC36 e At5G05800BRVS (Tabela 2), seguido de sequenciamento do inserto. O clone resultante foi designado pUFV3394 (S157A) e contém o cDNA mutado da proteína LIMYB no resíduo de serina 157 por uma Alanina, fusionado a GFP, sob o controle do promotor 35S. O clone pUFV3394 foi utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101, selecionada em Canamicina 100 mg.L⁻¹ e gentamicina 50 mg.L⁻¹ e confirmado por PCR com os oligonucleotídeos At5G05800BFWF e At5G05800BRVS que anelam em *LIMYB* (Tabela 2).

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados em PCR.

Sequência Alvo	Nome	Sequência
<i>LIMYB</i>	At5G05800BFWF	AAA AAGCAGGCTTCACAA TGAGGCCAAAAG
<i>LIMYB</i>	At5G05800BRVS	AGAAAGCTGGGTCCTATG TTGTAGTAGGAATAGG
FWD Promotor 35 S	MC36	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
FWD pDON201	pDON201	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

3.8 Plasmídeos recombinantes

O clone pK7F-NIK1T474D (pUFV 632), contendo o cDNA de NIK1-T474D fusionado a GFP e sob controle do promotor 35S foi previamente descrito (FONTES *et al.*, 2004). Assim também o plasmídeo recombinante AT5G05800-pK7FWG2 (pUFV1395), que expressa LIMYB fusionada ao N-terminal de GFP sob o controle do promotor 35S, foi obtido

previamente (ZORZATTO *et al.*, 2015). O clone prAt1g29970-Lucif-term-2X35S RlucifpH7M34GW (pUFV2231), contendo o cDNA de luciferase de vagalume sob o controle do promotor do gene RPL18A e o cDNA da luciferase de renilla sob o controle do promotor 35S, foi previamente descrito (ZORZATTO *et al.*, 2015). Estas construções de DNA foram utilizadas em ensaios de expressão transiente e transativação de promotores em protoplastos.

3.9 Ensaios de transativação de promotores em protoplastos de fosforilação de LIMYB intacta e mutante.

Protoplastos foram preparados de folhas das linhagens de *Arabidopsis thaliana limyb-32* (Salk_032054), Columbia (Col-0) e *nik1/nik2*, conforme descrito previamente (YOO *et al.*, 2007). As linhagens foram semeadas em sementeiras por 10 dias, transplantadas em vasos individuais e crescidas por três semanas em câmara de crescimento a 22°C e fotoperíodo de 10 h, folhas totalmente expandidas foram selecionadas para o preparo dos protoplastos. Os protoplastos de *limyb-32*, *nik1/nik2* e Col-0 foram transfectados com as construções de DNA por meio do protocolo DNA-PEG-cálcio, sendo utilizados 30 µl de DNA a 12 µg para 300 µl de protoplastos (YOO *et al.*, 2007).

Para os ensaios de transativação do promotor do gene marcador da via de sinalização de NIK1, *RPL18A*, os protoplastos de Col-0 foram transfectados com as seguintes combinações: proL18 (pUFV2231), LIMYB-GFP (pUFV1395) + proL18 (pUFV2231), LIMYB-S157A-GFP (pUFV3394) + proL18 (pUFV2231). Protoplastos de *nik1/nik2* foram transfectados com a construção proL18 (pUFV2231). Já os protoplastos de *limyb-32* foram transfectados com as seguintes construções; NIK1-T474D-GFP + LIMYB-GFP + proL18, NIK1-T474D-GFP + LIMYB-S157A-GFP + proL18, LIMYB-GFP + proL18, LIMYB-S157A-GFP + proL18.

Para os ensaios de fosforilação os protoplastos de Col-0 foram transformados com LIMYB-GFP ou LIMYB-S157A-GFP. Protoplastos da linhagem *nik1/nik2* foram transformadas apenas com LIMYB-GFP, enquanto protoplastos de *limyb-32* foram transformados com as combinações: NIK1-T474D-GFP + LIMYB-GFP, NIK1-T474D-GFP + LIMYB-S157A-GFP, LIMYB-GFP sozinho ou LIMYB-S157A-GFP sozinho. Após a transformação, os protoplastos foram incubados por 16 horas e então tratados com RNA preparado de plantas infectadas por begomovírus (InRNA) e RNA preparado de plantas não infectadas (UnRNA) em concentração de 250 ng/µl por um período de três horas. Os protoplastos foram coletados por centrifugação, e as proteínas totais extraídas para a realização

de imunoprecipitação de LIMYB-GFP por anti-GFP, exceto para os protoplastos transfectados com NIK1-T474D, os quais foram imunoprecitados com anti-LIMYB. A atividade de luciferase foi testada com o Sistema de Ensaio de Repórter Dual-Luciferase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

3.10 Extração e RNA e análise da expressão gênica via RT-qPCR

A extração de RNA do material vegetal foi realizada pelo método CTAB 2%, a integridade e do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, seguido de quantificação em espectrofotômetro (BioSpec-nano). Foram tratados com DNase livre de RNase (Thermo Fisher Scientific™), a integridade do RNA total isolado foi avaliado por eletroforese em gel de 1%, e utilizados para a síntese de cDNA por transcriptase reversa M-MLV (Thermo Fisher Scientific™), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de polimerização em cadeia em tempo real (RT-qPCR), foi realizada no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems™), conforme o manual do fabricante, utilizando o corante SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific™) e primers específicos para os genes avaliados. O método para quantificação da expressão gênica foi $2^{-\Delta CT}$ e análise estatística foi realizada pelo software *Rstudio*. O gene da actina 3 foi usado como controle endógeno.

3.11 Produção de anticorpos específicos para proteína de LIMYB

O clone (pUFV1834) com a construção 6xHis-LIMYB foi obtido previamente no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas. Colônias individuais de *E. coli* transformadas com o referido clone foram confirmadas por sequenciamento, incubadas em 5 mL de meio LB contendo o ampicilina à 37°C *overnight*. O DNA plasmidial foi extraído através do *kit Miniprep Extraction kit* (Qiagen) e uma alíquota foi utilizada para transformação de *E. coli* da estirpe C41(DE3), para expressão heteróloga de LIMYB fusionada a uma calda de histidina. As células competentes de *E. coli*, estirpe C41(DE3) foram transformadas pelo método de choque térmico com os plasmídeos de expressão pDEST17(1377.1) contendo LIMYB. A cultura foi plaqueada em meio LB sólido com o antibiótico de seleção ampicilina (100 mg/L).

Os transformantes selecionados foram usados para ensaio de expressão em larga escala. A expressão foi feita, utilizando-se como pré-inoculo 5 mL meio LB acrescido de ampicilina, e mantido sob agitação de 225 rpm por 16 horas a 37°C. O pré-inoculo foi diluído

1:100 em 100 mL de meio LB contendo o mesmo antibiótico e a cultura foi incubada a 37°C, sob agitação de 225 rpm até atingir densidade óptica (A_{600nm}) entre 0,6 e 0,8. Neste momento, a expressão da proteína foi induzida com 0,8 mM de IPTG (isopropilil- β -D-thiogalactopiranosídeo) e os tubos foram mantidos sob agitação a 225 rpm por quatro horas a 37°C. A solução do inóculo foi dividida em volumes e centrifugada a 7000 g por 10 minutos a 4°C para sedimentar as células, as células sedimentadas pela centrifugação foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até uso. Alíquotas de 250 μ L da cultura induzida também foram retiradas para avaliação do nível de expressão das proteínas, bem como identificação das proteínas recombinantes nas frações solúvel ou insolúvel. Para a extração de proteína com a calda de histidina, a lise foi feita em 4 mL de tampão Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, Imizadol 10 mM para cada porção de células sedimentadas por centrifugação oriundas de 100 mL de cultura. A purificação foi efetuada sob condições desnaturantes por adsorção em batelada com resina Ni-NTA agarose (Qiagen®). As proteínas purificadas bem como os lisados de bactéria antes e após indução com IPTG foram visualizadas após coloração com Comassie Blue R-250 [50 % metanol (v/v), 10 % ácido acético (v/v), 0,1 % Comassie Blue R-250 (m/v)]. Posteriormente, foram descoradas em 20 % metanol (v/v) e 10 % ácido acético (v/v) e então as bandas de interesse foram recortadas do gel com auxílio de um bisturi e utilizadas na imunização de camundongos para produção de anticorpos.

Foram utilizados 2 Camundongos BALB/c machos de quatro a oito semanas de idade para a imunização com a proteína. Os animais foram cedidos pelo professor Dr Leandro Licursi, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV, sendo mantidos e manuseados no biotério de experimentação do setor de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral – DBG/UFV, onde permaneceram em ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12 h e receberam água e alimento. Os animais foram imunizados por via intraperitoneal, a partir da aplicação de 200 μ L de solução preparada a partir de 3 a 4 bandas da proteína (LIMYB), recortadas do gel de poliacrilamida e trituradas com homogeneizador de tecidos em tampão PBS ao qual acrescentaram-se 50 μ g de saponina antes da imunização. O tratamento foi constituído de 3 doses com intervalos de 15 dias entre cada dose. Quatro semanas após a imunização, os camundongos foram eutanasiados. A eutanásia foi realizada pela técnica de deslocamento cervical. O sangue obtido dos animais foi mantido à temperatura ambiente por 45 minutos, tempo necessário para coagulação. A seguir o material foi centrifugado a 4000 g por 10 minutos, e o soro obtido foi transferido para um novo tubo. O soro hiperimune foi então aquecido em termobloco a 56 °C por 30 minutos para inativação das proteínas do complemento. Com o objetivo de se determinar a concentração mínima de anticorpo que ainda possibilitasse

a visualização de reação positiva com substrato, realizou-se um teste de *dot-blot*. Tiras de membrana de nitrocelulose foram sensibilizadas com 5 μ L de proteína purificada de bactéria para a qual se produziu o respectivo anticorpo e/ou extrato total de plantas super expressando as proteínas de interesse. As membranas sensibilizadas foram bloqueadas por 45 minutos com tampão TBS-T com adição de 3 % de gelatina, para minimizar a ocorrência de reações inespecíficas. Em seguida, as tiras foram incubadas por três horas com diferentes concentrações de anticorpo primário nas seguintes diluições 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 e 1:2000 em TBS-T acrescido de 1 % de gelatina. As tiras foram então lavadas por três vezes em TBS-T e incubadas por uma hora com anticorpo secundário anti-camundongo produzido em coelho e conjugado com HRP (sc-2005 Santa Cruz). Após a incubação, as membranas foram lavadas em TBS por três vezes. A reação quimioluminescente foi realizada utilizando o *kit* Clarity Western ECL Substrate®. As bandas resultantes foram observadas em fotodocumentador ChemiDoc®.

3.12 Extração de RNA de plantas infectadas com CaLCuV (*Cabbage leaf curl 25ilic*)

Plantas de *Arabidopsis* Col-0 foram germinadas em sementeira, e, após 10 dias, foram transferidas para o substrato em vasos individuais. Após 14 dias, as plantas foram inoculadas com os componentes A e B do genoma do vírus CaLCuV por meio de biobalística. Para isto, o DNA plasmidial dos clones CaLCuVA007 e CaLCuVB002, contendo repetições parciais de cada um dos componentes virais foram extraídos por meio de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). A qualidade, integridade do DNA e sua concentração foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v) contendo amostras de DNA viral e amostras com concentrações conhecidas a 50, 100, 150 e 200 ng/ μ L de DNA plasmidial. As imagens do gel de quantificação foram posteriormente analisadas com auxílio do *software* ImageLab®. Aproximadamente 3200 μ g de cada um dos componentes do DNA viral foram precipitados em micropartículas de tungstênio na presença de cloreto de cálcio (CaCl₂) 1,25 M e espermidina 15 mM e lavados com etanol. Cada preparação foi distribuída em cinco membranas, que foram encaixadas no acelerador de partículas, e lançadas, sob vácuo, contra as *Arabidopsis*. As plantas infectadas foram mantidas em câmaras de crescimento. A infecção viral foi diagnosticada por meio de PCR utilizando DNA molde extraído a partir das plantas infectadas de acordo com Dellaporta *et al.* (1983) e oligonucleotídeos para o gene *NSP* do componente B do genoma viral. O preparo do RNA infectado foi através da extração de ácidos nucleicos pelo método CTAB 2%, seguido de tratamentos com DNase livre de RNase 1U/ μ l (Thermo Fisher Scientific™) por 15 minutos

a 37°C e a proteinase k 1mg/ml (Thermo Fisher Scientific™) por 15 minutos a 37°C , seguido de avaliação por eletroforese em gel de 1%.

4.RESULTADOS

4.1 Sinais bióticos induzem a fosforilação de LIMYB

Foi demonstrado que NIK1 ativa uma cascata de fosforilação mediante a estresse biótico, resultando na repressão de genes ribossomais mediada pela interação entre os componentes jusante RPL10 fosforilado e LIMYB (ZORZATTO *et al.*, 2015). Mais recentemente, foi demonstrado que genes relacionados a fotossíntese são alvos adicionais da atividade repressora de LIMYB dependente de NIK1 (TEIXEIRA, 2022). Na presente investigação, foi avaliado se a atividade repressora de LIMYB também seria regulada por fosforilação. Inicialmente, foi investigado se LIMYB endógeno seria fosforilado em respostas a elicitores bióticos que ativam NIK1. O estado de fosforilação de LIMYB foi monitorado por meio da sondagem da proteína imunoprecipitada com anticorpo anti-fosfoserina (anti-pSer; Fig. 2). Tratamento de plântulas de *Arabidopsis Col-0* com RNA extraído de plantas infectadas (InRNA, PAMP viral) e o peptídeo ativo flagelina, flg22 (PAMP bacteriana) por três horas promoveu a fosforilação de LIMYB, conforme demonstrado pela sondagem de LIMYB, previamente imunoprecipitada com anti-LIMYB, com anti-fosfoserina (anti-pSer) (Fig. 2A). LIMYB não foi fosforilada em resposta a RNA preparado de plantas não infectadas (UnRNA) indicando que a via de fosforilação de LIMYB é induzida especificamente por RNA derivado de begomovírus. A proteína recombinante YFP-LIMYB, imunoprecipitada com anti-GFP, também foi fosforilada por PAMPs viral e bacteriano. Neste caso, linhagens transgênicas expressando YFP- LIMYB (L1 e L3) foram tratadas com InRNA, UnRNA (Fig. 2B) ou flg22 (Fig. 2C) por três horas e a proteína recombinante YFP-LIMYB, previamente imunoprecipitada (painel inferior), foi re-sondada com anti-pSer (painel superior). Foi constatado a detecção de epítomos fosforilados em YFP-LIMYB induzidos em resposta a InRNA e flg22, mas não a UnRNA, indicando que a proteína fusionada a YFP deve ser regulada por fosforilação similarmente a proteína LIMYB endógena. Consequentemente, os experimentos que se seguiram foram realizados utilizando a proteína recombinante YFP-LIMYB. Além disso, foi demonstrado que a expressão do mutante NIK1-T474D constitutivamente ativado induz a fosforilação de LIMYB, indicando que a fosforilação de LIMYB deve ser mediada pela via de

sinalização de NIK1. Esta hipótese foi adicionalmente examinada por meio de tratamentos com estresses abióticos que ativam NIK1.

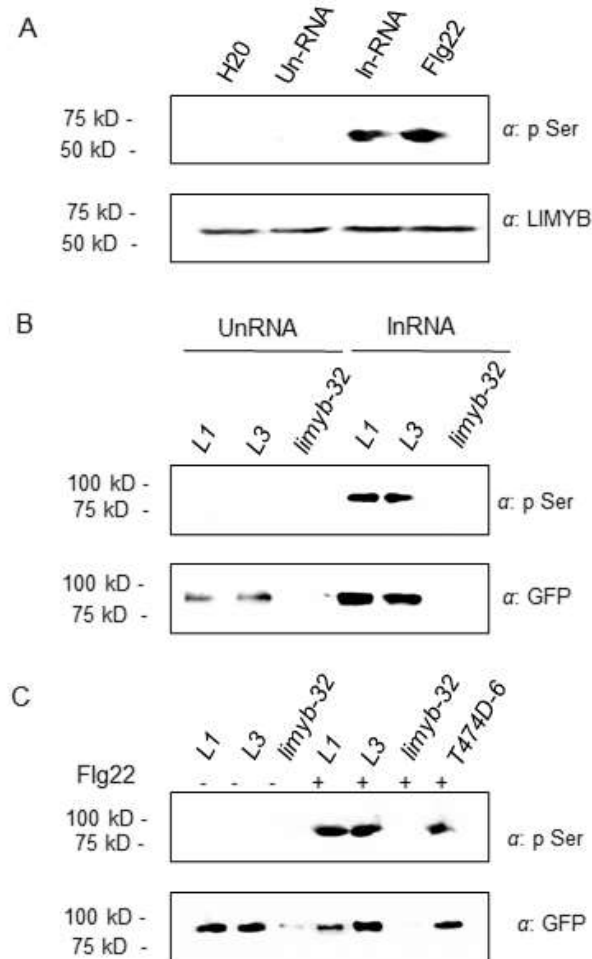


Figura 2. Sinais bióticos induzem a fosforilação de LIMYB. (A) Padrões moleculares viral e bacteriano promovem fosforilação de LIMYB endógena. Plântulas Col-0 foram incubadas com RNA preparado de plantas infectadas com begomovírus (InRNA), não infectadas (UnRNA), H₂O e flg22 100 nM por 3h. LIMYB Imunoprecipitada com anticorpo policlonal anti-LIMYB (blot inferior) foi sondada com anticorpos anti-phosphoserina (blot superior). (B) RNA viral estimula a fosforilação de YFP-LIMYB. Plântulas de linhagens silenciadas (*limyb-32*) e superexpressando (L1 e L3) YFP-LIMYB foram tratadas com RNA total preparado de plantas infectadas por begomovírus por 3 horas. YFP-LIMYB foi imunoprecipitada com anticorpo policlonal α: GFP (blot inferior) e sondada com o anticorpo α:pSer (blot superior). RNA preparado de plantas não infectadas foi usado como controle negativo. (C) O peptídeo flg22 (PAMP bacteriana) induz a fosforilação de YFP-LIMYB. Plântulas de linhagens silenciadas (*limyb-32*) ou superexpressando (L1 e L3) YFP-LIMYB foram tratadas com flg22 100 nM por 3h, seguido por imunoprecipitação de YFP-LIMYB com anticorpo policlonal α: GFP (blot inferior) e re-sondagem com o anticorpo α:pSer (blot superior). Água foi usada como controle negativo do tratamento, enquanto linhagens expressando o mutante constitutivamente ativado de NIK1, T474D, foi utilizado como controle positivo da ativação de NIK1.

4.2 LIMYB é diferencialmente fosforilada por estresses abióticos.

Recentemente foi demonstrado que a sinalização de NIK1 é induzida por altas temperaturas, o que leva à fosforilação de NIK1, seguida por fosforilação de RPL10 e repressão da expressão de genes marcadores da via de sinalização, alvos de LIMYB (Teixeira, 2022). Nesta investigação, foi demonstrado que YFP- LIMYB também é modulada por fosforilação em resposta a estresse por calor, sendo que maior intensidade de fosforilação ocorre após 1h de tratamento, enquanto, em 3h pós-tratamento, o sinal é mais atenuado (Fig. 3A). Em contraposição ao estresse por calor, a indução de estresse no retículo endoplasmático (RE) por tunicamicina por 3 h não promoveu fosforilação de YFP-LIMYB, demonstrando que LIMYB é diferencialmente fosforilada por estresses abióticos (Fig. 3B). Embora não completamente avaliado, resultados preliminares pelo nosso grupo de pesquisadores indicam que a via de sinalização de NIK1 não deve ser induzida por estresse no RE.

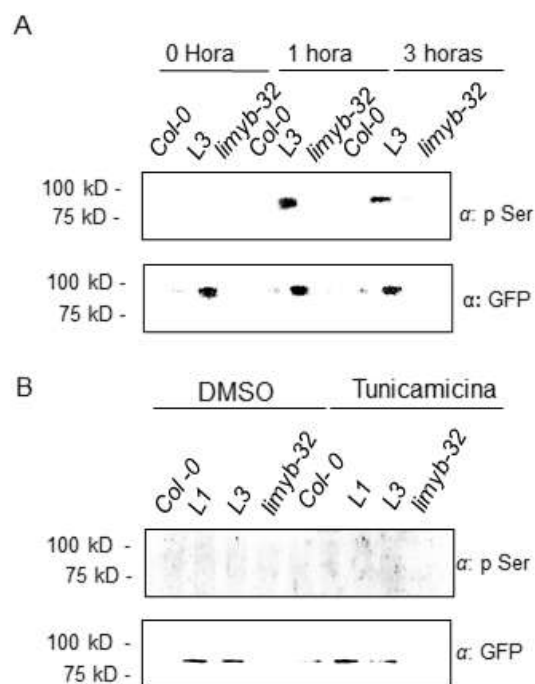


Figura 3. LIMYB é diferencialmente fosforilada por estresses abióticos. (A) Calor promove fosforilação de LIMYB. Plântulas dos genótipos indicados na figura foram expostas a 38°C por 0h, 1h e 3h. YFP-LIMYB imunoprecipitada com anticorpo policlonal α : GFP (blot inferior) foi sondada com o anticorpo α :pSer (blot superior). (B) LIMYB não é fosforilada por tunicamicina, agente indutor de estresse no retículo endoplasmático (RE). Plântulas dos genótipos indicados na figura foram tratadas com tunicamicina 2,5 μ g/ μ l e DMSO (controle negativo) por 3h e YFP- LIMYB foi imunoprecipitada com anticorpo policlonal α : GFP (blot inferior) foi sondada com o anticorpo α :pSer (blot superior).

4.3 Repressão de genes alvos de LIMYB por calor

Para analisar se a fosforilação de LIMYB regula sua atividade repressora de transcrição, foi avaliado o efeito de calor na expressão de genes alvos de LIMYB (Fig. 4). Para análise de expressão gênica, a integridade do RNA total extraído dos diferentes genótipos foi examinada por eletroforese (Fig. 4A) e a efetividade do tratamento por altas temperaturas foi avaliada pela indução de *HSP70*, gene marcador de choque térmico (Fig. 4B). Estes resultados indicam que calor foi mais efetivo 1h pós-tratamento, mostrando indução estatisticamente significativa do gene marcador de calor (Fig. 4B). Em condições normais, a superexpressão de LIMYB em L1 e L3 reprime a expressão de seus genes alvos *RPS25* (Fig. 4C), *EIF2-alfa* que codifica o fator de alongação (Fig. 4D) e o gene relacionado à fotossíntese *FD1* comparado com a expressão em Col-0 (Fig. 4E). Além disso, nas condições efetivas do estresse por calor (1h pós-tratamento) os genes alvos de LIMYB são reprimidos em Col-0, exceto nas linhagens de *limyb-32*. Estes resultados indicam que a repressão dos genes marcadores da via de sinalização de NIK1 por alta temperatura é dependente da função de LIMYB. Uma vez que calor induz fosforilação de LIMYB, é razoável supor que a atividade repressora de LIMYB é controlada por fosforilação.

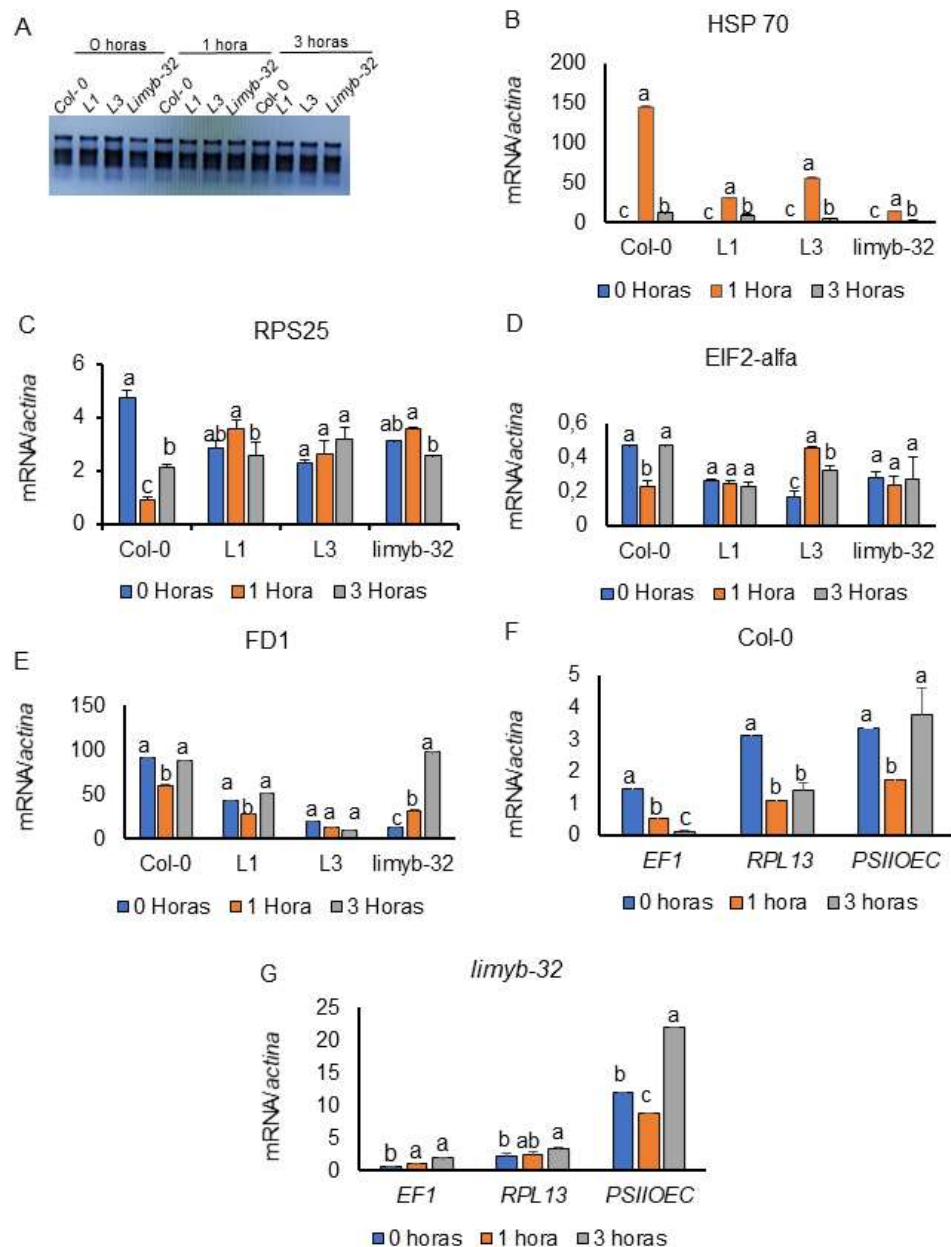


Figura 4. Repressão de genes alvos de LIMYB por calor (A) RNA total extraído de genótipos tratados por calor. As linhagens superexpressando LIMYB (L1 e L3), nocautes de LIMYB (*limyb-32*) e Col-0 foram expostas à temperatura de 38°C por 0h, 1h e 3h e RNA total foi extraído, separado por eletroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídeo. **(B)** Indução de gene marcador-associado a altas temperaturas. **(C, D, E e F)** Os genes alvos de LIMYB são reprimidos por choque térmico. **(G)** Os genes marcadores não são reprimidos em plantas de *limyb-32* em resposta ao choque térmico. A expressão gênica foi determinada pelo método $2^{-\Delta CT}$ (média \pm DP, n=3). E o gene actina foi utilizado como normalizador interno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey a 5% significância.

4.4 Efeito de hormônios no status de fosforilação de LIMYB

Para melhor compreensão da fosforilação de LIMYB em resposta a estímulos, foi avaliado se o uso de hormônio exógeno induz a fosforilação de LIMYB. Uma vez que foi demonstrado que estresses bióticos e abióticos induzem a fosforilação de LIMYB, foi analisado a resposta de LIMYB ao ácido salicílico (AS) que sinaliza em resposta a estresses bióticos e ABA, que sinaliza em resposta a estresses abióticos (Fig. 5). Plântulas das linhagens superexpressando YFP- LIMYB foram tratadas com ácido salicílico e MG32, inibidor de protease, por um período de três horas (Fig. 5A). O sinal de fosforilação foi detectado em YFP-LIMYB, previamente imunoprecipitada com anti-GFP (painel inferior) e re-sondada com anti-pSer (painel superior) em L1 e L3 tratada com ácido salicílico, mas não com DMSO, indicando que o ácido salicílico induz a fosforilação de LIMYB. Similarmente, as mesmas linhagens (L3, Col-0 e *limyb-32*) foram tratadas com ácido abscísico (ABA) por três horas e a fosforilação de YFP-LIMYB foi detectada somente na planta expressando YFP- LIMYB e tratada com ABA (Fig. 5B).

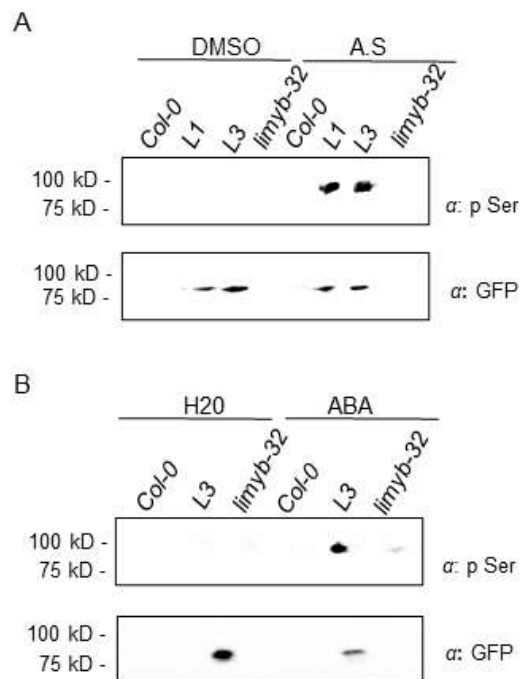


Figura 5. Efeito de hormônios no status de fosforilação de LIMYB. (A) Ácido salicílico (AS) induz fosforilação de LIMYB. Plântulas dos genótipos indicados na figura foram tratadas com AS 0,5 mM e MG 32 0,09 mM por 3 h. YFP- LIMYB foi imunoprecipitada com anticorpo policlonal α: GFP (blot inferior) e sondada com o anticorpo α:pSer (blot superior). DMS0 contendo MG32 foi usado como controle negativo. (B) LIMYB é fosforilada em presença de Ácido absícico (ABA). Plântulas dos genótipos indicados na figura foram tratadas com ABA 1μM por 3 horas. Fosforilação de LIMYB foi monitorada como descrito em A, exceto que o controle negativo foi H₂O.

4.5 Tratamentos com ácido salicílico e ácido abscísico reprimem a expressão dos genes alvos de LIMYB

Além de identificar que AS e ABA induzem fosforilação em LIMYB, foi avaliado se tratamentos com AS e ABA resultariam na repressão de genes alvos de LIMYB e marcadores da via de sinalização de NIK1, genes da maquinaria ribossomal e de fotossíntese (Fig. 6 e 7). A integridade do RNA total extraído dos genótipos examinados é mostrado na (Fig.6A e Fig.7A), enquanto a efetividade dos tratamentos com AS e ABA é demonstrada pela indução significativa do gene *PR1*, marcador da sinalização por AS, em todos os genótipos examinados (Fig. 6B), e pela indução de *ABI5*, marcador da sinalização de ABA, nos genótipos examinados, exceto *limyb-32* (Fig. 7B). Conforme já demonstrado anteriormente (ZORZATTO *et al.*, 2015), a superexpressão de LIMYB em L1 e L3 reprimiu o gene alvo *RPL13* comparado com Col-0 em condições normais (Fig. 6C). Tratamento com AS regulou negativamente a expressão de *RPL13* em Col-0, mas não em *limyb-32*, indicando que AS requer LIMYB para promover a repressão do gene *RPL13*. Similarmente, os demais genes da maquinaria de tradução e fotossíntese foram reprimidos por AS em Col-0 (Fig. 6D), mas não em *limyb-32* (Fig. 6E), demonstrando que AS requer a presença da proteína LIMYB para reprimir a expressão dos genes marcadores da via de sinalização de NIK1 (Fig.. 6F). Da mesma forma, tratamento com ABA levou à repressão do gene *EIF2*-alfa em Col-0 e L3, mas não em *limyb-32* (Fig. 7C). Assim também, ABA regulou negativamente a expressão dos genes da maquinaria de tradução e da fotossíntese em Col-0, (Fig.. 7D), mas não em *limyb-32* (Fig. 7E). Coletivamente estes resultados sugerem que AS e ABA ativam a via de sinalização de NIK1.

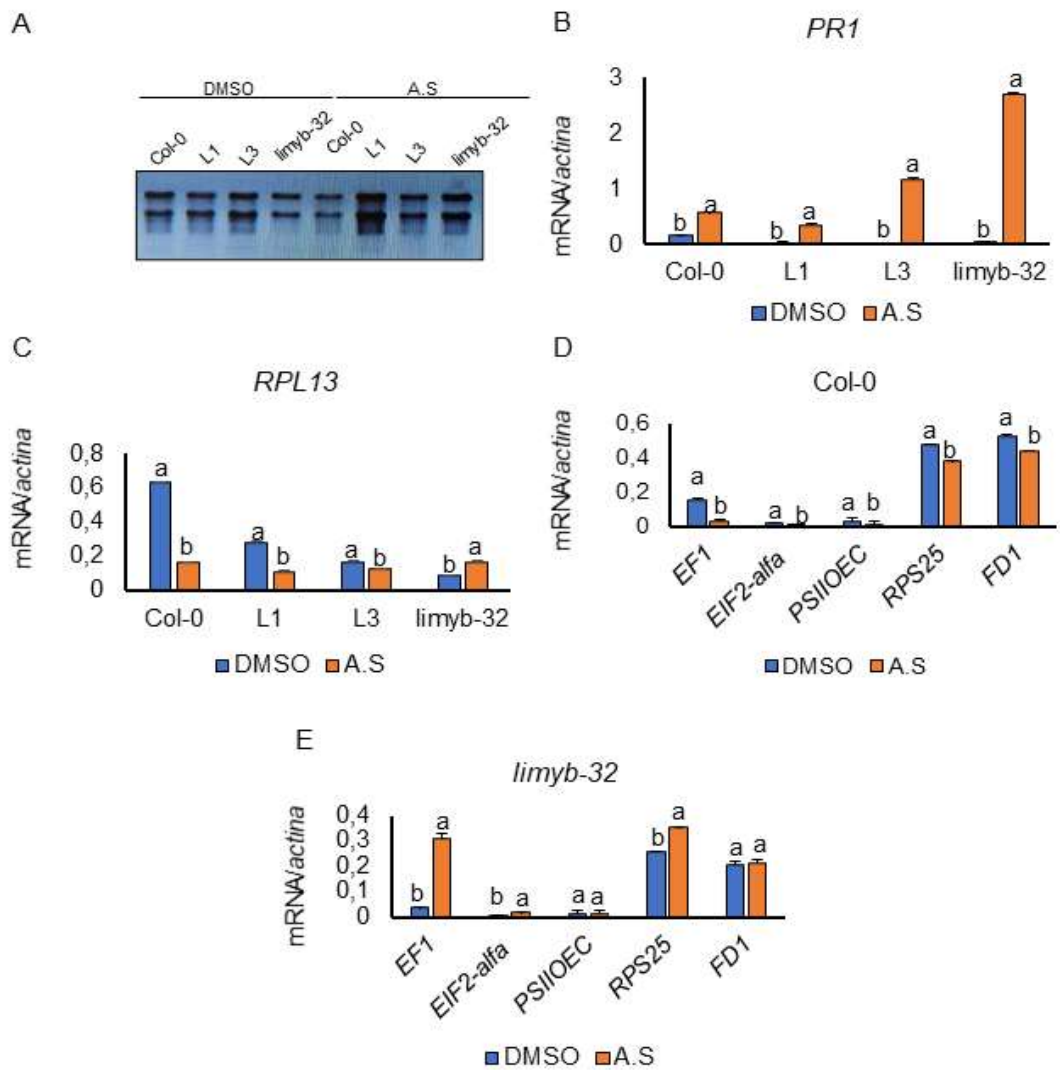


Figura 6. Repressão de genes alvos de LIMYB por A.S (A) RNA total extraído de genótipos tratados por A.S. Plântulas das linhagens superexpressando LIMYB (L1 e L3), nocautes de LIMYB (*limyb-32*) e Col-0 foram tratadas com AS por 3h e RNA total foi extraído, separado por eletroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídeo. (B) Indução de *PR1* mediada por AS. (C e D) Os genes alvos de LIMYB, conforme indicado na Figura, são reprimidos por AS. (E) regulação dos genes alvos por LIMYB em linhagem de *limyb-32*. A expressão gênica foi determinada pelo método $2^{-\Delta CT}$ (média \pm DP, n=3) e o gene actina foi utilizado como normalizador interno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey a 5% significância.

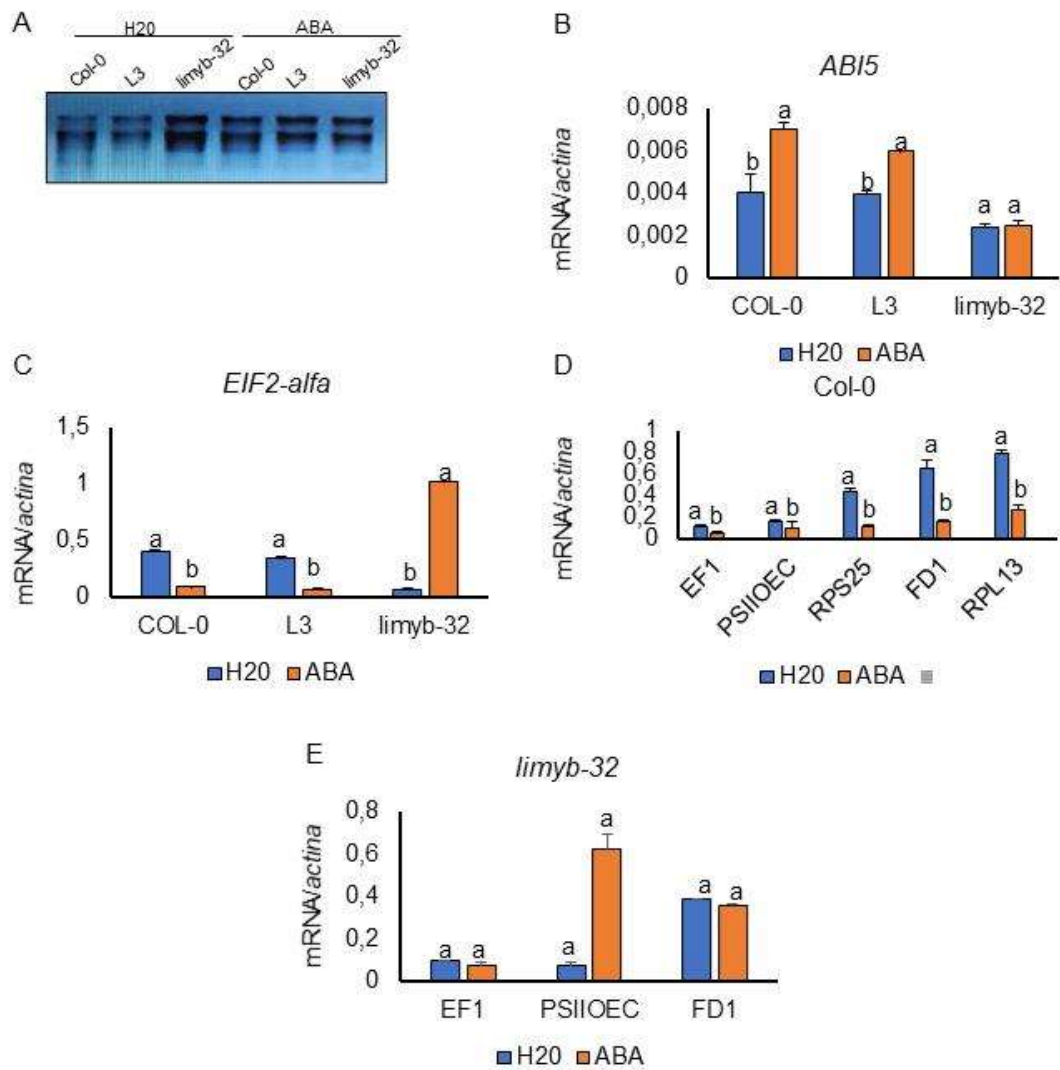


Figura 7. Tratamento com ABA reprime a expressão dos genes alvos de LIMYB (A) RNA total extraído de genótipos tratados por ABA. Plântulas das linhagens superexpressando LIMYB (L3), nocaute *limyb-32* e Col-0 foram tratadas com ABA por 3h. O RNA total foi extraído, separado por eletroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídeo. **(B)** Indução de *ABI5* por ABA. **(C-D)** Os genes alvos de LIMYB, são reprimidos por ABA. **(E)** regulação dos genes alvo por LIMYB em linhagem de *limyb-32*. A expressão gênica foi determinada pelo método $2^{-\Delta CT}$ (média \pm DP, n=3) e o gene actina foi utilizado como normalizador interno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey a 5% significância.

4.6 Estrutura tridimensional de LIMYB e Identificação de sítio de fosforilação que regula a atividade repressora de LIMYB

A identificação do sítio de fosforilação de LIMYB foi realizada através da análise *in silico* obtidas de predições de fosforilação, ao qual resulta em uma escala de 0 a 1. O sítio putativo de fosforilação encontrado foi a serina na posição 157, cuja predição encontra-se no valor 0.65 (Fig. 8D). De acordo com a predição do fator normalizador (BFP), a posição 157 encontra-se no motivo de superhélice aleatória, e o resíduo apresenta-se exposto, sendo que a predição de BFP para o resíduo é -0.19 mostrando-se estável em experimento de estrutura (Fig. 8B); (YANG *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2021). De acordo com o gráfico de cobertura, o resíduo 157 está fora da região do domínio MYB/SANT, já que as regiões que apresentam alta afinidade com o referido domínio é a região 6-96 e 169-263 de acordo com as análises feitas pela plataforma HMMER (Fig. 8C).

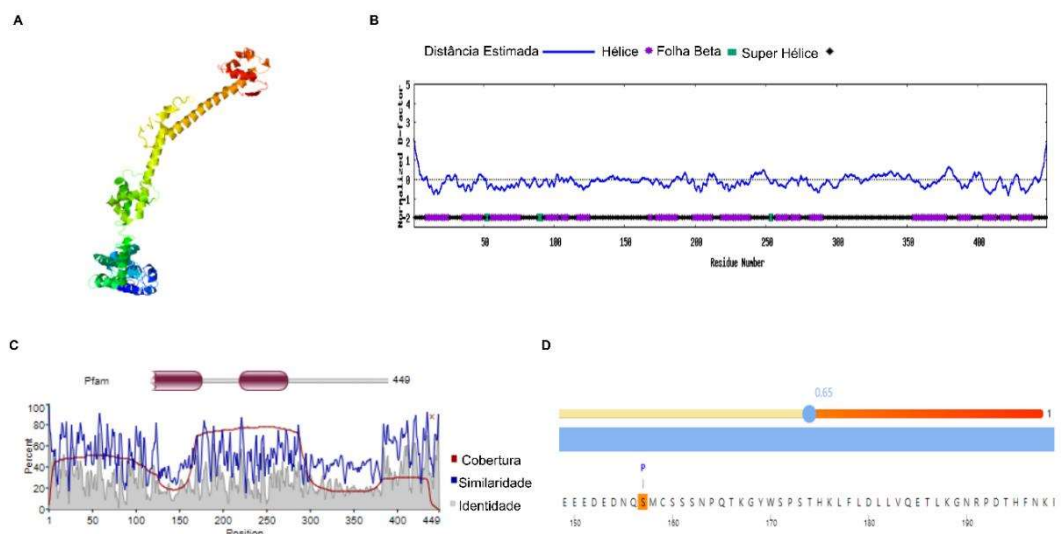


Figura 8. Predição de sítios de fosforilação de LIMYB (A) Estrutura 3 D da proteína LIMYB constituída de 7281 átomos, estimativa C-Score -1.92 em intervalo de -5 a 2. **(B)** O gráfico representa o fator B normalizador da proteína (BFP), os resíduos com valores superiores a 0 são menos estáveis em experimentos estruturais. **(C)** Gráfico de cobertura que fornece uma visão geral da sequência com o domínio correspondente, através do modelo de Markov de perfil oculto. **(D)** Análise *in silico* do sítio candidato de fosforilação, predição de fosforilação de 0.65 no sítio de serina na posição 157 em uma escala de 0 a 1.

4.7 Confirmação da construção do mutante LIMYB-S157A

A fim de avaliar se fosforilação está associada à regulação da atividade repressora de LIMYB, realizou-se mutação dirigida *in situ* com a mudança dos nucleotídeos AG para GC na posição 470 pb na sequência de nucleotídeos, levando à substituição do resíduo de Ser-157 para alanina. Após a obtenção do clone S157A (pUFV3394), a mutação na posição 470 na sequência de nucleotídeos foi confirmada por sequenciamento (Fig. 9).

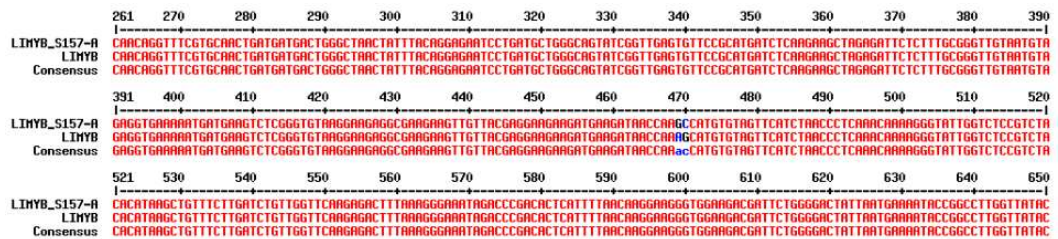


Figura 9. Sequenciamento do clone mutado pUFV3394. Na reação de mutação dirigida *in situ* a mudança dos nucleotídeos AG para GC (em azul) nas posições 469 e 470 causam a mudança do códon do aminoácido Ser para Ala.

4.8 Serina posição 157 é um possível sítio de fosforilação de LIMYB

Protoplastos foram utilizadas para validação do sítio de fosforilação que possivelmente controla a regulação de LIMYB. Protoplastos preparados da linhagem *limyb-32* são mostrados na Fig. 10 A. Protoplastos de *limyb-32* foram transformados com as combinações de construções expressando *NIK1-T474D + LIMYB-GFP*, *NIK1-T474D + LIMYB-S157A-GFP*, *LIMYB-GFP*, *LIMYB-S157A-GFP*, e tratados com UnRNA ou InRNA. Exceto UnRNA e H₂O, expressão de T474D e tratamento com InRNA induziram a fosforilação de LIMYB e S157A, mas com diferente intensidade. A fosforilação induzida em S157A foi atenuada, observando menor sinal de fosforilação (painel superior) e maior *input* da proteína (painel inferior) comparado com LIMYB sem mutação (Fig. 10B). Os ensaios de fosforilação do mutante S157A também foi repetido em protoplastos Col-0 (Fig. 10C) com similares resultados (Fig. 10D). InRNA, mas não UnRNA, promoveu fosforilação em LIMYB-GFP e LIMYB-S157A-GFP, porém em diferentes intensidades, indicando que a Ser-157 é um sítio de fosforilação de LIMYB, embora outros sítios de fosforilação contribuem para o nível de fosforilação do transfator.

Os protoplastos proveniente de *nik1/nik2* foram também transformados com LIMYB e tratados com InRNA e UnRNA, não ocorrendo fosforilação de LIMYB induzida por InRNA (Fig. 10D). Estes resultados indicam que fosforilação de LIMYB induzida por InRNA (PAMP

viral) requer a função NIK1e/ou NIK2. Foi também investigado a expressão dos genes da maquinaria de tradução e da fotossíntese, alvos do controle de LIMYB, em resposta a InRNA nos protoplastos *nik1/nik2* expressando LIMYB-GFP. Inativação dos genes NIK1 e NIK2 preveniu a repressão dos genes marcadores por InRNA, validando a necessidade da ativação da cascata de fosforilação de NIK1 para regular a atividade repressora de LIMYB por fosforilação (Fig. 10E).

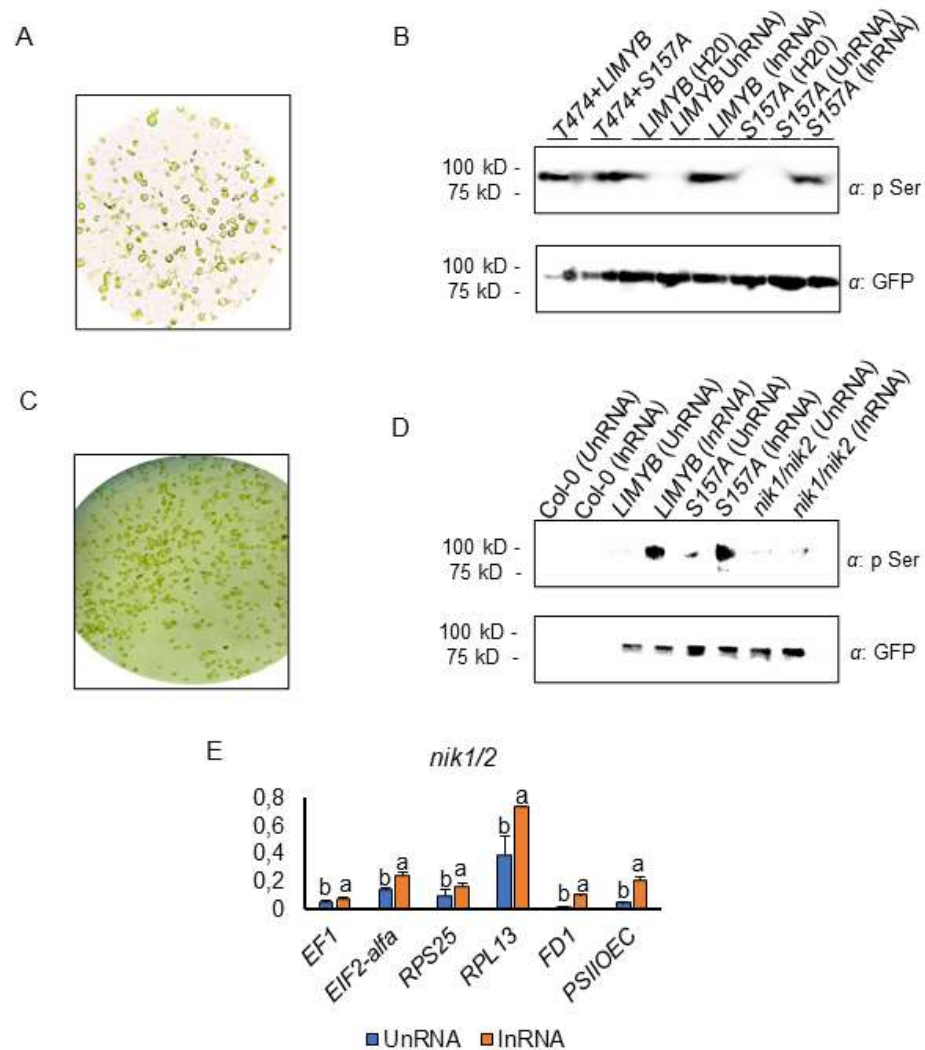


Figura 10. Ser posição 157 é um possível sítio de fosforilação de LIMYB. (A) Protoplastos preparados de folhas de *limyb-32*. Amplificação 10X. (B) O mutante LIMYB-S157A-GFP exibe um nível de fosforilação atenuado. Os protoplastos *limyb-32* foram transfetadas com as construções de DNA conforme indicado na figura e tratados com RNA preparado de plantas infetadas com begomovirus (InRNA) ou não infectadas (UnRNA). T474D foi utilizado como controle positivo para ativação de NIK1. Após 12h de transfecção, seguido de tratamento de 3h com UnRNA, InRNA ou H₂O, proteína total foi extraída, LIMYB-GFP foi imunoprecipitada com anticorpo policlonal α: GFP, exceto os materiais transformados com a construção T474D-GFP que foram imunoprecipitados com α: LIMYB (blot inferior) e sondada com o anticorpo α:pSer (blot superior). (C) Protoplastos preparados de folhas de Col-0. Amplificação 10X. (D) A fosforilação de LIMYB induzida por InRNA requer NIK1/NIK2. Protoplastos foram preparados de folhas de Col-0 ou *nik1/nik2* e transfetados com as construções de DNA indicadas na figura. Após 12h de transfecção, seguido de tratamento de 3h com UnRNA, InRNA, a proteína LIMYB-GFP foi imunoprecipitada com anticorpo policlonal α: GFP (blot inferior) a partir de extrato de proteína total e sondada com o anticorpo α:pSer (blot superior). (E) RNA total extraído de protoplastos de *nik1/nik2* transformados com LIMYB não levou a repressão de genes alvos por LIMYB. A análise da expressão gênica foi conduzida por RT-qPCR (média ±DP, n=3). A expressão gênica foi determinada pelo método 2^{-ΔCT} e o gene actina foi utilizado como normalizador interno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey a 5% significância.

4.9 Fosforilação da Ser-157 é necessária, mas não essencial para a atividade repressora de LIMYB

Para avaliar o efeito da mutação S157A na atividade repressora de LIMYB, a expressão de genes alvos de LIMYB foi avaliada em protoplastos *limyb-32* complementados com o mutante S157A e tratados com UnRNA e InRNA (Fig.11). Como demonstrado anteriormente, em protoplastos expressando transientemente LIMYB, o elicitor de fosforilação de LIMYB, InRNA, reprime a expressão do gene alvo *RPL13* em relação à expressão do gene em presença de UnRNA (Fig.11A). Entretanto, a expressão de S157A não complementou a função repressora de LIMYB induzida por InRNA e em células expressando S157A, InRNA não foi capaz de reprimir a expressão do gene marcador. Similarmente, a expressão de S157A em protoplastos *limyb-32* não foi efetiva para promover a repressão dos genes alvos de LIMYB por InRNA (Fig. 11B). Coletivamente, estes resultados demonstram que a mutação interferiu na atividade da proteína em reprimir os genes alvos, marcadores da ativação da via de sinalização de NIK1. Interessantemente, enquanto a atividade repressora de LIMYB endógena em protoplastos Col-0 é induzida por InRNA e promove repressão significativa na expressão dos genes marcadores (Fig. 12A), a expressão transiente de S157A parece interferir com a atividade de LIMYB endógena porque previne a repressão dos genes alvos de LIMYB induzida por InRNA (Fig.12B).

O efeito da mutação S157A na atividade repressora de LIMYB foi diretamente avaliada em ensaios de transativação de promotores em protoplastos transformados com luciferase sob o controle do promotor alvo do gene *RPL18* e LIMYB ou S157A. Inicialmente, protoplastos de *limyb-32* foram transformados com as combinações de construções de DNA NIK1-T474D + LIMYB + *pRPL18-Luciferase*, NIK1-T474D + LIMYB-S157A + *pRPL18-Luciferase*, LIMYB-S157A + *pRPL18-Luciferase*, LIMYB + *pRPL18-Luciferase*. Para todas as amostras, os promotores foram reprimidos na presença de InRNA, no entanto, LIMYB foi mais efetivo na repressão do promotor mediado por InRNA do que S157A. De fato, a redução da atividade do gene repórter luciferase foi significativamente maior pela expressão de LIMYB em relação a S157A (Fig. 13A). Em protoplastos Col-0, enquanto LIMYB endógeno é induzida por InRNA e reprime a atividade do promotor alvo, expressão de S157A interfere com a atividade repressora de LIMYB endógeno e a atividade do promotor alvo não é afetado significativamente por InRNA, uma propriedade característica de mutantes transdominantes negativos (Fig. 13B). O promotor alvo também não foi reprimido em protoplastos *nik1/nik2*

tratados com InRNA, indicando que LIMYB endógena requer ativação de NIK1 e ou NIK2 induzida por InRNA para regular a expressão dos genes alvos.

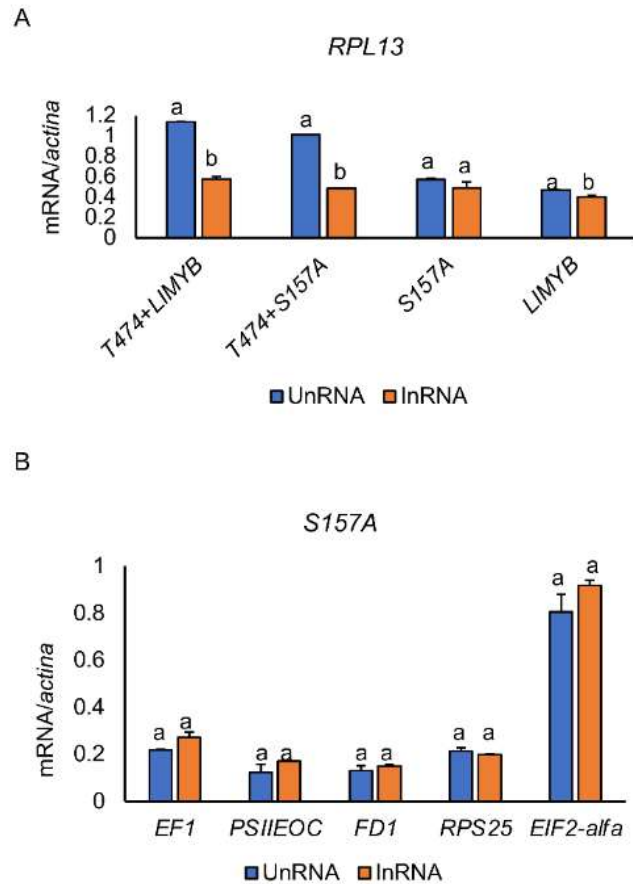


Figura 11. Fosforilação de LIMYB em Ser-157 contribui para regulação da atividade repressora de LIMYB (A) Mutação na Ser-157 para Ala compromete a atividade repressora de LIMYB. Protoplastos foram preparados de folhas de *limyb-32*, transfectados com as construções de DNA indicadas na figura e tratados com UnRNA e InRNA. O acúmulo do transcrito do gene *RPL13* foi determinado por RT-qPCR (B) Genes alvos de repressão por LIMYB, não são reprimidos por S157A em resposta a RNA infectado. LIMYB a análise da expressão por RT-qPCR (média \pm DP, n=3). A expressão gênica foi determinada pelo método $2^{-\Delta CT}$ e o gene actina foi utilizado como normalizador interno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey a 5% significância.

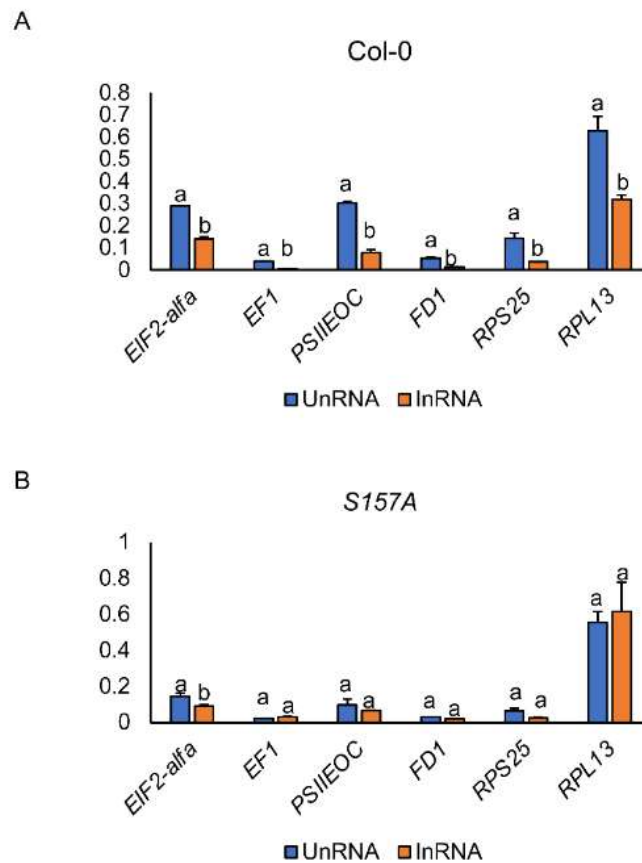


Figura 12. Atividade repressora de expressão de genes marcadores de S157A em comparação com LIMYB. (A) Atividade de LIMYB endógena em protoplasto reprime genes alvos. O acúmulo do transcrito dos genes foram determinado por RT-qPCR (B) S157A não reprime atividades dos genes alvos de LIMYB, exceto EIFe-alfa. Análise foi através de RT-qPCR A expressão gênica foi determinada pelo método $2^{-\Delta CT}$ e o gene actina foi utilizado como normalizador interno. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey a 5% significância.

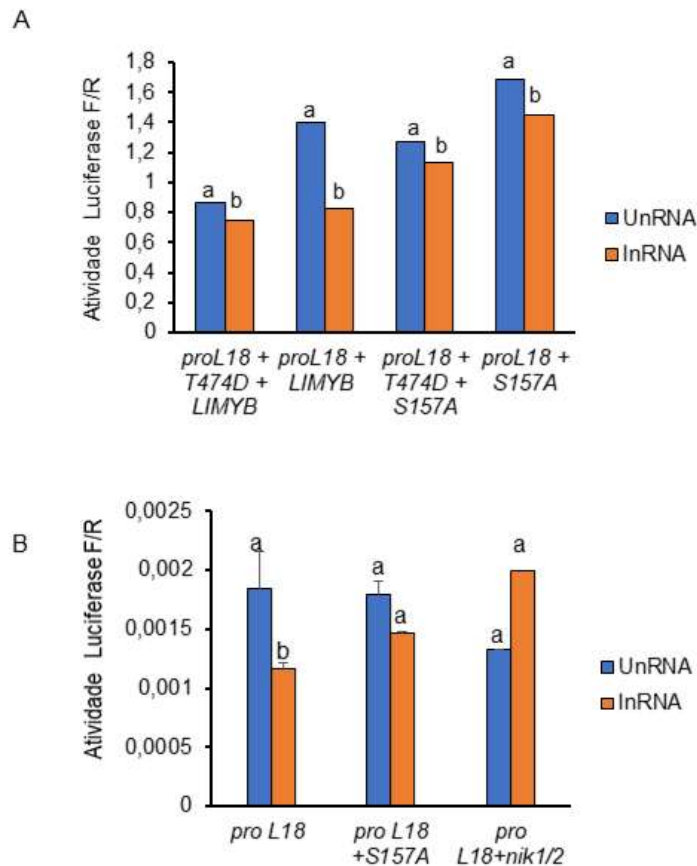


Figura 13. Atividade de repressão de promotores alvos de S157A . (A) A atividade repressora de promotores de LIMYB é afetada pela mutação S157A. Protoplastos da linhagem *limyb-32* foram transfectados com luciferase sob controle do promotor RPL18 e os transgenes indicados na figura por 12 horas e então tratados com RNA preparados de plantas não infectadas (UnRNA) e infectadas com begomovírus (InRNA). A atividade de redução da atividade do promotor *proL18* mediada por LIMYB-S157A na presença de RNA infectado foi menor do que LIMYB. **(B)** Ensaio de transativação em protoplastos Col-0, LIMYB-S157A não reprime o promotor *proL18* na presença do elicitor InRNAo. LIMYB não reprime atividade do promotor em protoplastos *nik1/nik2* tratados com InRNA. Dados obtidos da razão de luciferase/Renilla (média \pm DP, n=3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos e controle pelo teste de Tukey a 5% significâncias.

5 DISCUSSÃO

5.1 LIMYB é fosforilada no resíduo de Ser-157 em resposta a estímulos que ativam a via de sinalização antiviral de NIK1.

PAMPs derivados de ácidos nucleicos de begomovírus atuam como elicitores da via de sinalização antiviral mediada por NIK1, desencadeando uma cascata de sinalização por fosforilação (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Assim também, tem sido demonstrado que um peptídeo sintético de 22 aminoácidos de domínio conservado da Flagelina (Flg 22), um elicitore típico da via de PTI, ativa a via de imunidade antiviral mediada por NIK1 (LI *et al.*, 2019). Mais recentemente, foi demonstrado que estresses abióticos, como choque térmico e estresse osmótico, funcionam como estímulos de ativação de NIK1 (TEIXEIRA, 2022). Como componente a jusante da via antiviral de NIK1, nesta investigação, foi examinado se a atividade repressora de transcrição do transcritor LIMYB era regulada por fosforilação. Diversas linhas de evidências foram fornecidas demonstrando que fosforilação de LIMYB na posição 157 mediada pela via de sinalização de NIK1 regula positivamente a atividade repressora do transcritor de transcrição. Em primeiro lugar, foi demonstrado que os estímulos que ativam o módulo NIK1/RPL10 por fosforilação, incluindo ácidos nucleicos derivados de begomovírus, a PAMP bacteriana flg22 e choque térmico também induzem fosforilação de LIMYB e sua atividade repressora de transcrição. Além disso, foi demonstrado que a fosforilação de LIMYB mediada por estes sinais bióticos e abióticos é dependente da ativação de NIK1 e/ou NIK2. Inativação dos genes *NIK1* e *NIK2* no mutante duplo *nik1/nik2* previne fosforilação induzida de LIMYB e a expressão do mutante constitutivamente ativado NIK1-T474D, é capaz de promover a fosforilação de LIMYB, mesmo na ausência de estímulos. Finalmente foi demonstrado que substituição do resíduo Ser-157 de LIMYB para Ala compromete o nível de fosforilação induzida de LIMYB e reduz a atividade repressora do transcritor. O ensaio de complementação de função em protoplastos de *limyb-32* pela expressão do mutante defeutivo para fosforilação, LIMYB-S157A, demonstrou que o nível de fosforilação do mutante foi reduzido em resposta a indução de PAMPs de RNA preparado de plantas infectadas de *begomovirus*, indicando ser este um sítio crucial de fosforilação. Além disso, o mutante defeutivo não foi capaz de reprimir a expressão dos genes marcadores do módulo de sinalização por NIK1/RPL10/LIMYB e tampouco suprimiu eficientemente a atividade de promotores alvos em ensaios de transativação de promotores em protoplastos. Similar resultados foram obtidos em relação ao sítio de fosforilação correspondente ao resíduo Thr-474 da proteína de NIK1,

cuja mutação por alanina levou à redução da atividade da fosforilação em resposta a infecção por *begomovirus*. Estes resultados indicaram que Thr-474 é um sítio importante de fosforilação para ativação da via de imunidade antiviral mediada por NIK1 (SANTOS *et al.*, 2009).

A família MYB interage com outros fatores de transcrição para regular a expressão de genes alvos (YAN *et al.*, 2021). É possível que LIMYB forme complexos oligoméricos para atuar como repressor transcricional. Esta hipótese foi levantada porque expressão do mutante defeutivo para fosforilação S157A em protoplastos Col-0 parece interferir com a atividade da proteína endógena, indicando que LIMYB possivelmente interage com S157A, afetando a atividade da proteína, propriedade de mutações transdominantes negativas. Estudos posteriores deverão ser conduzidos para comprovar esta possibilidade.

5.2 Respostas a Hormônios

Ácido salicílico é um hormônio essencial em plantas relacionado à resistência contra patógenos virais, sendo um sinal para ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR). Tratamento com ácido salicílico induz a expressão do gene de *PR1* (MALAMY *et al.*, 1990). Tratamentos com ácido salicílico em plantas suscetível inibe a infecção de alguns vírus, e também limita a capacidade de certos vírus de invadir os tecidos atenuando os sintomas (CARR *et al.*, 2019; MURPHY *et al.*, 2020).

A superexpressão de AtMYB44 induz rapidamente a expressão do gene *PR1* sobre tratamento de ácido salicílico. AtMYB44 liga-se ao promotor de *WRKY70* ativando a sua transcrição gênica, e *WRKY70* ativa a expressão de *PR1* (SHIM *et al.*, 2013). Nesta investigação foi demonstrado que LIMYB é fosforilada em resposta a ácido salicílico e possivelmente regula positivamente a expressão do gene *PR1*, uma vez que a linhagem de superexpressão LIMYB-32-L3 apresentou maior indução do gene *PR1* em relação à planta selvagem. A linhagem *limyb-32* também exibiu altos níveis de expressão de gene *PR1*, indicando a existência de outros genes associados a regulação de *PR1* independente de LIMYB. Além de fosforilação de LIMYB induzida por ácido salicílico, os genes relacionados a maquinaria de tradução e fotossíntese foram reprimidos em resposta a este fitormônio, indicando que a via de imunidade antiviral mediada por NIK1 pode ser também ativada por ácido salicílico.

O hormônio ácido abscísico participa de uma série de vias de sinalização que possuem papéis cruciais no estágio de crescimento e desenvolvimento da planta, além de ser um fitormônio chave para regulação de estresses abióticos como estresse a seca e osmótico

(FINKELSTEIN *et al.*, 2002). AtMYB32 regula a indução de ABI3, ABI4 e ABI5 em resposta a ABA no período de inibição de germinação e no desenvolvimento precoce de plântulas (LI *et al.*, 2021). Análises de Chip-seq e RNA-seq mostraram que LIMYB regula positivamente genes envolvidos a resposta de ABA (TEIXEIRA, 2017). LIMYB é fosforilada por ABA, e tratamento com ABA reprime a expressão de genes da maquinaria de tradução e fotossíntese. Estes resultados sugerem que a via de imunidade antiviral mediado por NIK1 é ativada por ABA. Experimentos complementares devem ser conduzidos para se certificar da ativação de NIK1 induzida por ABA e ácido salicílico.

5.3 Respostas a Calor

Altas temperaturas afeta vários processos celulares em plantas, incluindo reações bioquímicas que ocorrem no cloroplasto, podendo até levar a morte celular de acordo com a severidade. A fotossíntese é altamente sensível a altas temperaturas, e danos causados pelo calor leva ao desequilíbrio da energia celular. O fotossistema PSII é diretamente afetado, a inibição do PSII leva a diminuição da taxa fotossintética e da eficiência fotossintética da planta. A regulação negativa de genes fotossintéticos nucleares é uma consequência da inibição da tradução plastidial (YU *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2020). O estresse de calor causado nas linhagens superexpressando LIMYB levou a sua fosforilação, indicando seu envolvimento nesse tipo de estresse, em seguida foi possível observar que os genes relacionados a fotossíntese foram reprimidos por LIMYB, no entanto a *limyb-32* também regulou negativamente esse processo, indicando que LIMYB não é a única proteína controlando a regulação desse genes, mas que também atua no processo.

O estresse por calor leva o aumento de expressão do gene de *HSP* que ativa *HSP* através de estímulos provenientes do protoplastos, a expressão desses genes ajuda a manter a integridade do cloroplasto (YU *et al.*, 2012). Estudo com MYB em trigo mostra que a superexpressão de TaMYB80 apresenta tolerância ao estresse de calor e seca e ainda induz um maior acúmulo de ABA, alguns TFs de MYB respondem a estresse abiótico através da sinalização de ABA (ZHAO *et al.*, 2017). Como LIMYB responde a ABA e a calor, provavelmente essa resposta de estresse possa estar relacionada com a sinalização de ABA, no entanto é necessário estudos comprovando essa interação.

6 CONCLUSÃO

LIMYB é um fator de transcrição que atua na repressão da maquinaria de tradução e de fotossíntese em resposta à ativação da imunidade antiviral mediada por NIK1 em plantas. Nesta investigação foi determinado que a regulação da atividade repressora de LIMYB se dá por meio de modificação pós traducional por fosforilação. Foi demonstrado que a fosforilação de LIMYB é dependente da sinalização desencadeada pelo receptor de membrana NIK1, uma vez que (i) foi induzida pelos mesmos sinais que ativam NIK1, (ii) pelo mutante ativado NIK1-T474 na ausência de estímulos mas (iii) não foi induzida por nenhum estímulo no mutante duplo *nik1/nik2*. Além disso, foram fornecidas evidências de que a fosforilação de LIMYB no resíduo Ser-157 controla a atividade repressora desse transfator. De fato, foi demonstrado que a mutação de Ser-157 para Ala atenuou o nível de fosforilação da proteína em resposta a RNA preparado de plantas infectadas por begomovírus e comprometeu a atividade repressora do mutante, LIMYB-S157A, sob genes marcadores da via de sinalização de imunidade antiviral mediada por NIK1.

Além de estímulos típicos que ativam NIK1, a fosforilação e atividade repressora de LIMYB foi modulada por hormônios exógenos como ácido abscísico e ácido salicílico. Estes resultados indicam que provavelmente NIK1 é ativada por estes hormônios. Todos os sinais, que influenciaram na mudança conformacional da proteína por fosforilação, intensificaram a atividade repressora de LIMYB nos genes alvos relacionados à maquinaria de tradução e fotossíntese, consistente com seu papel como transfator a jusante da via de imunidade antiviral mediada por NIK1. Portanto, os resultados dessa investigação adicionam um componente regulatório na via de sinalização por NIK1. A ativação de NIK1 mediada por estímulos típicos leva não somente à fosforilação de RPL10, mas também de LIMYB no resíduo Ser-157, modulando a atividade repressora do complexo RPL10-LIMYB, o que culmina na supressão de tradução e fotossíntese. Experimentos adicionais estão sendo delineados para se identificarem as cinases que fosforilam RPL10 e LIMYB em resposta à ativação de NIK1.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH-ZAWAWI, M. R. *et al.* Comparative genome-wide analysis of WRKY, MADS-box and MYB transcription factor families in Arabidopsis and rice. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2021.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. [s.l: s.n.]
- BALAGUER, M. A. D. L. *et al.* Predicting gene regulatory networks by combining spatial and temporal gene expression data in Arabidopsis root stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 36, p. E7632–E7640, 2017.
- CARR, J. P. *et al.* Plant defense signals: Players and pawns in plant-virus-vector interactions. **Plant Science**, v. 279, n. April 2018, p. 87–95, 2019.
- DUBOS, C. *et al.* MYB transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 10, p. 573–581, 2010.
- FINKELSTEIN, R. R. *et al.* Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **Plant Cell**, v. 14, n. SUPPL., p. 15–45, 2002.
- FONTES, E. P. B. *et al.* The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. **Genes and Development**, v. 18, n. 20, p. 2545–2556, 15 out. 2004.
- FONTES, E. P. B. *et al.* Plant virus-interactions: unraveling novel defense mechanisms under immune-suppressing pressure. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 70, p. 108–114, 2021.
- HU, S. *et al.* Sensitivity and Responses of Chloroplasts to Heat Stress in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. April, p. 1–11, 2020.
- JIANG, C. *et al.* Identification of conserved gene structures and carboxy-terminal motifs in the Myb gene family of Arabidopsis and Oryza sativa L. ssp. indica. **Genome biology**, v. 5, n. 7, p. 1–11, 2004.
- JONES, J. *et al.* The plant immune system. **Nature Publishing Group**, 16 nov. 2006.
- KRANZ, H. D. *et al.* Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 16, n. 2, p. 263–276, 1998.
- LEWSEY, M. G.; CARR, J. P. Effects of DICER-like proteins 2, 3 and 4 on cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus infections in salicylic acid-treated plants. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 12, p. 3010–3014, 2009.
- LI, B. *et al.* The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2019.
- LI, X. *et al.* AtMYB32 regulates the ABA response by targeting ABI3, ABI4 and ABI5 and

the drought response by targeting CBF4 in Arabidopsis. **Plant Science**, 2021.

MA, R. *et al.* Biological Function and Stress Response Mechanism of MYB Transcription Factor Family Genes. **Journal of Plant Growth Regulation**, n. 1996, 2022.

MA, X. *et al.* SERKing Coreceptors for Receptors. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 12, p. 1017–1033, 2016.

MALAMY, J. *et al.* SA in viral infection. **Science**, v. 250, n. 22, 1990.

MARIANO, A. C. *et al.* Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology**, v. 318, n. 1, p. 24–31, 2004.

MERTENS, D. *et al.* Predictability of Biotic Stress Structures Plant Defence Evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 36, n. 5, p. 444–456, 2021.

MURPHY, A. *et al.* An update on salicylic acid biosynthesis, its induction and potential exploitation by plant viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 42, p. 8–17, 2020.

NEJAT, N.; MANTRI, N. Plant immune system: Crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant defence. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 23, p. 1–16, 2017.

NG, D. W. K. *et al.* Regulating the regulators: The control of transcription factors in plant defense signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

NGOU, B. P. M. *et al.* Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. **Nature**, v. 592, n. 7852, p. 110–115, 2021.

OGATA, K. *et al.* 1996 2. **Nature Medicine**, v. 2, n. 4, p. 334–337, 1996.

ROCHA, C. S. *et al.* The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. **Virology**, v. 380, n. 2, p. 165–169, 2008.

ROSINSKI, J. A.; ATCHLEY, W. R. Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: Evidence for polyphyletic origin. **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, n. 1, p. 74–83, 1998.

SANTOS, A. A. *et al.* Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, 2009.

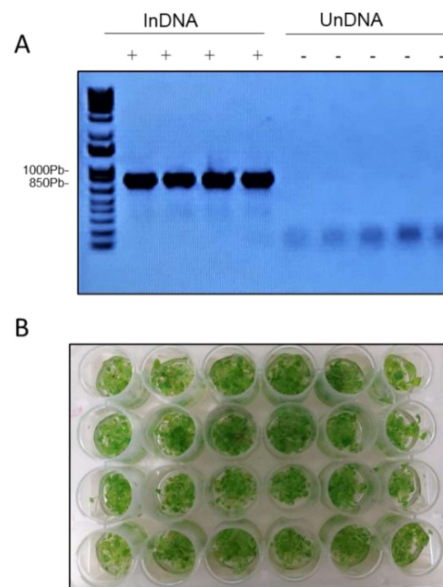
SHIM, J. S. *et al.* AtMYB44 regulates WRKY70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. **Plant Journal**, 2013. .

TEIXEIRA, R. M. Panorama Transcricional Sob Controle Da Proteína Limyb , Um Componente Da Via De Defesa. 2017.

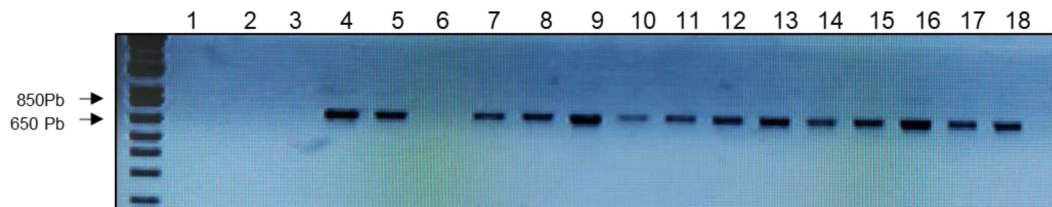
TEIXEIRA, R. M. *et al.* Virus perception at the cell surface: revisiting the roles of receptor-like kinases as viral pattern recognition receptors. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 9, p. 1196–1202, 2019.

- TSUDA, K.; SOMSSICH, I. E. Transcriptional networks in plant immunity. **New Phytologist**, v. 206, n. 3, p. 932–947, 2015.
- YAN, H. *et al.* Myb-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 1–28, 2021.
- YANG, J. *et al.* ResQ: An Approach to Unified Estimation of B-Factor and Residue-Specific Error in Protein Structure Prediction. **Journal of Molecular Biology**, 2016.
- YOO, S. *et al.* Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1565–1572, 2007.
- YU, H. D. *et al.* Downregulation of chloroplast RPS1 negatively modulates nuclear heat-responsive expression of HsfA2 and its target genes in Arabidopsis. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 5, 2012.
- ZHAO, Y. *et al.* Characterization of wheat MYB genes responsive to high temperatures. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2017.
- ZHENG, W. *et al.* contact maps with I-TASSER assembly simulations. v. 1, n. 3, p. 1–43, 2021.
- ZORZATTO, C. *et al.* NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 679–682, 2015.

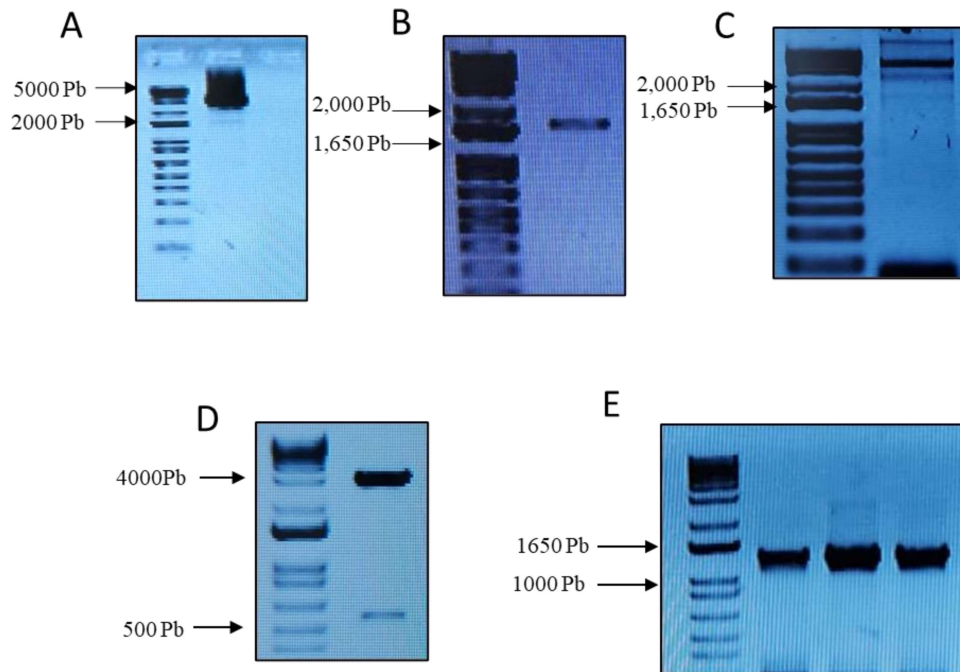
ANEXOS



Anexo A. Tratamento com elicitador de RNA preparado de plantas infectadas pelo begomovírus CabLCV (A) PCR de Confirmação de plantas infectadas com begomovírus e não infectado pela amplificação do gene *NSP* de CabLCV com o tamanho aproximadamente de 750 pb. Após a confirmação, RNA total foi extraído de plantas infectadas (InRNA) e plantas não infectadas (UnRNA) e foram tratados com DNase e protease. **(B)** Plântulas submetidas ao tratamento por 3 horas com elicitores, InRNA ou UnRNA.



Anexo B. PCR de confirmação de linhagem nocaute. Para confirmação das plantas nocautes de LIMYB, foi extraído o DNA genômico e a confirmação através de PCR com os primers de LBB1.3, Lp032054 e Rp 032054 que anelam na região T-DNA.



Anexo C. Inserção da mutação S157A usando oligonucleotídeos mutados. Oligonucleotídeos contendo a mutação dirigida foram usados para amplificação completa do plasmídeo recombinante pUFV 1378.2, de 3420 pb. B. Diagnóstico molecular do clone mutado obtido (pUFV3392). O fragmento amplificado contendo a mutação foi ligado com DNA ligase e, em seguida, utilizado para transformar *E. coli*. DNA foi purificado do transformante selecionado por antibiótico PCR e o inserto mutado amplificado com primers específicos. O clone resultando foi denominado pUFV3392. C. Clonagem de LIMYB mutado em pEarly101 (pUFV3394). O inserto do clone pUFV3392 foi transferido por recombinação para pEarly101 e o DNA purificado do transformante positivo amplificado com oligonucleotídeos específicos. D. Diagnóstico do clone obtido pUFV3394. DNA purificado de bactérias transformadas foi digerido com as enzimas de restrição EcoRV, que digere pEarly em um sítio único e HindII que digere LIMYB. Os produtos das reações foram separados por eletroforese em géis de agarose resultando em dois fragmentos, conforme indicado no gel de agarose. E. Transformação *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 com a construção de DNA, pUFV3394. A transformação foi confirmada pela amplificação do fragmento de LIMYB diretamente dos clones obtidos.