

**LILIAN HASEGAWA FLORENTINO**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA PERK  
QUINASE DE *Arabidopsis thaliana* QUE INTERAGE  
COM A PROTEÍNA NSP DE GEMINIVÍRUS**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F633c  
2006

Florentino, Lilian Hasegawa, 1981-  
Caracterização funcional de uma PERK quinase de  
*Arabidopsis thaliana* que interage com a proteína NSP  
de geminivírus / Lilian Hasegawa Florentino. – Viçosa :  
UFV, 2006.  
x, 59f. : il. ; 29cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de  
Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 50-59.

1. Ácido desoxirribonucléico - Transporte fisiológico.  
2. Proteínas - Análise. 3. Vírus de plantas. 4. Engenharia  
genética vegetal. 5. Plantas transgênicas. 6. *Arabidopsis  
thaliana*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.86

LILIAN HASEGAWA FLORENTINO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA PERK QUINASE  
DE *Arabidopsis thaliana* QUE INTERAGE COM A  
PROTEÍNA NSP DE GEMINIVÍRUS.**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2006

---

Prof. Francisco Murilo Zerbini Jr.  
(Conselheiro)

---

Prof.<sup>a</sup> Maria Cristina Baracat Pereira  
(Conselheira)

---

Prof.<sup>a</sup> Andréa Miyasaka de Almeida

---

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

---

Prof.<sup>a</sup> Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
(Orientadora)

À minha amada mãe, meu exemplo de força e coragem, dedico meu trabalho e minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal – UFV, pela oportunidade.

À CAPES, pelo financiamento de meu trabalho, através da concessão de bolsa.

À Prof.<sup>a</sup> Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela ótima orientação, pelo apoio e companheirismo.

Aos professores Francisco Murilo Zerbini Jr. e Maria Cristina Baracat Pereira pelo apoio científico e aos professores Andréa Miyasaka de Almeida e Marcelo Ehlers Loureiro, pela participação na banca de tese.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, em especial ao Serafim, por ser mais que um técnico, mas um amigo sempre disposto a ajudar.

Aos amigos e companheiros do Laboratório, que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho, em especial, a Anésia Aparecida dos Santos e Mariana Rodrigues Fontenelle, amigas para todos os momentos, sem as quais nada teria sido possível.

Aos amigos e companheiros de todos os momentos, Leonardo Carnevalli Dias, Eduardo Gusmão Pereira, Letícia Mascarenhas Pereira Barbosa, Fabrízio, Cândida, Fernanda Segatto e Daí, pela companhia e amizade em todos estes momentos.

Ao Ricardo, que sempre foi meu maior apoio aqui.

À minha irmã, que apesar de tudo sempre foi minha melhor amiga.

À minha mãe, que mesmo distante sempre me deu forças e inspiração para continuar meu trabalho.

A essas pessoas que tanto contribuíram para o meu sucesso e a minha felicidade, muito mais sincero agradecimento e reconhecimento.

## ÍNDICE

RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Morfologia, organização genômica e função gênica de geminivírus .....	4
2.2. Mecanismo de replicação de geminivírus .....	9
2.3. Movimento do genoma viral durante o processo de infecção .....	11
2.4. Interação de proteínas virais com proteínas do hospedeiro.....	13
2.5. Família PERK em plantas .....	15
III. OBJETIVO.....	17
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Material vegetal .....	18
4.2. Análises de seqüência e filogenética da família AtPERK.....	18
4.3. Construção de plasmídeos pDON .....	19
4.4. Identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com NSP de geminivírus .....	21
4.4.1. Obtenção de biblioteca de cDNA de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
4.4.2. Ensaio de Sistema Duplo Híbrido .....	22
4.5. Confirmação e caracterização da interação entre NSP e AtNsAK <i>in</i> <i>vitro</i> .....	23
4.5.1. Transcrição e tradução <i>in vitro</i> de NsAK .....	23

4.5.2. Expressão heteróloga e purificação da proteína fusionada GST-NSP .....	23
4.5.3. Ensaio de interação <i>in vitro</i> .....	24
4.5.4. Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> .....	24
4.6. Avaliação da ação de NsAK sobre a infecção viral .....	25
4.6.1. Obtenção e seleção de plantas <i>knock out</i> homozigotas <i>nsak</i> .....	25
4.6.2. Extração de RNA total de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
4.6.3. Análise da expressão de plantas mutantes <i>knock out</i> por RT-PCR .....	26
4.6.4. Ensaio de infectividade.....	27
4.7. Análise do padrão de expressão de <i>NsAK</i> .....	28
V. RESULTADOS.....	29
5.1. Identificação de uma PERK-like quinase que interage com NSP .....	29
5.2. NSP interage estavelmente com o domínio de quinase inativo de <i>NsAK in vitro</i> e pode atuar como substrato para <i>NsAK</i> .....	36
5.3. Os transcritos de <i>NsAK</i> são expressos de maneira ubíqua em <i>Arabidopsis</i> .....	40
5.4. A inativação do gene <i>NsAK</i> resulta na atenuação de sintomas e diminui a eficiência de infecção viral .....	42
VI. DISCUSSÃO.....	46
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

## RESUMO

FLORENTINO, Lilian Hasegawa, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Caracterização funcional de uma PERK quinase de *Arabidopsis thaliana* que interage com a proteína NSP de Geminivírus.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Maria Cristina Baracat Pereira e Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Geminivírus constitui um grande grupo de vírus de planta, cujo genoma é empacotado na forma de DNA circular fita simples em partículas icosaédricas geminadas e é convertido em uma forma fita dupla no núcleo de células diferenciadas de plantas. A maioria dos membros do gênero *Begomovirus*, como o *Cabbage leaf curl vírus* (CaLCuV), possuem dois componentes genômicos, DNA-A e DNA-B. O DNA-A apresenta o potencial para codificar cinco produtos gênicos (AV1, AC1, AC2, AC3, AC4) e está envolvido na replicação, ativação transcricional de genes virais e encapsidação do genoma viral. O DNA-B codifica duas proteínas de movimento, “*Movement Protein*” MP (BC1) e “*Nuclear Shuttle Protein*” NSP (BV1), ambas requeridas para o estabelecimento de uma infecção sistêmica. NSP transporta o DNA viral entre o núcleo e o citoplasma e então atua cooperativamente com MP para transportar o DNA viral de célula-a-célula através da parede celular. A localização de NSP e seu papel proposto no movimento célula-a-célula do DNA viral predizem que podem ocorrer interações com fatores do hospedeiro tanto no citoplasma quanto no núcleo. De fato, foi demonstrado que NSP interage com uma proteína receptora da membrana plasmática, designada NIK, e uma acetiltransferase nuclear. Através de ensaio de duplo híbrido, foi identificada, uma PERK quinase (“*proline-rich extensin-like receptor protein kinase*”) de *Arabidopsis thaliana* que

interage especificamente com NSP de CaLCuV e, também de geminivírus que infectam tomate, a qual foi designada NsAK (“*NSP-associated kinase*”) e é estruturalmente organizada em um domínio N-terminal rico em prolina seguido de um segmento transmembrana e de um domínio C-terminal de serina/treonina quinase. A proteína viral interagiu estavelmente com versões defectivas do domínio de quinase de NsAK, mas não com a enzima potencialmente ativa em um ensaio de ligação *in vitro*. NsAK traduzida *in vitro* aumentou o nível de fosforilação de NSP, indicando que NSP atua como substrato de NsAK. Estes resultados demonstram que NsAK é uma autêntica serina/treonina quinase e sugerem elo funcional para a formação do complexo NSP-NsAK. Esta interpretação foi corroborada por ensaios de infectividade *in vivo*, demonstrando que a perda de função de NsAK reduz a eficiência da infecção por CaLCuV e atenua o desenvolvimento dos sintomas. Estes dados implicam NsAK como um contribuidor positivo para a infecção por geminivírus e sugerem que NsAK pode regular a função de NSP.

## ABSTRACT

FLORENTINO, Lilian Hasegawa, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Functional characterization of an *Arabidopsis thaliana* PERK-like kinase that interacts with the Geminivirus NSP protein.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee members: Maria Cristina Baracat Pereira and Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Geminiviruses constitute a large group of plant virus whose genome is packed as single-stranded DNA circles in a small, twinned isometric particle and is converted to double-stranded forms in nuclei of differentiated plant cells. Members of the genus *Begomovirus*, such as *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), possess two genomic components, DNA-A and DNA-B. The DNA-A has the potential to code for five gene products (AV1, AC1, AC2, AC3, AC4) and is involved in replication, transcriptional activation of viral genes and encapsidation of the viral genome. The DNA-B encodes two movement proteins, the movement protein MP (BC1) and the nuclear shuttle protein NSP (BV1), both required for systemic infection. NSP shuttles the viral DNA between the nucleus and the cytoplasm and then acts cooperatively with MP to move the viral DNA cell-to-cell across the wall. The localization of NSP and its proposed role in cell-to-cell movement of the viral DNA predict that interactions with host factors may occur in both the cytoplasm and the nucleus. In fact, NSP has been demonstrated to interact with a plasma membrane receptor protein, designated NIK, and a nuclear acetyltransferase. A proline-rich extensin-like receptor protein kinase (PERK) was found to interact specifically with NSP of CaLCuV and of tomato-infecting geminiviruses, through yeast two-hybrid screening. The PERK-like protein, which we designated NsAK (NSP-associated kinase), is

structurally organized into a proline-rich N-terminal domain followed by a transmembrane segment and a C-terminal serine/threonine kinase domain. The viral protein interacted stably with defective versions of the NsAK kinase domain but not with the potentially active enzyme in an *in vitro* binding assay. In vitro translated NsAK enhanced the phosphorylation level of NSP, indicating that NSP functions as substrate for NsAK. These results demonstrated that NsAK is an authentic serine/threonine kinase and suggested a functional link for the NSP-NsAK complex formation. This interpretation was corroborated by *in vivo* infectivity assays showing that loss of NsAK function delays the onset of CaLCuV infection and attenuates symptom development. Our data implicate NsAK as a positive contributor to geminivirus infection and suggest it may regulate NSP function.

## I. INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* compreende um vasto e emergente grupo de vírus que infecta uma ampla gama de espécies vegetais economicamente relevantes, incluindo leguminosas, fumo, tomate, trigo e milho. Apesar disso, ainda não foi caracterizado nenhum mecanismo de resistência, baseado em técnicas biotecnológicas, o que proporciona forte interesse na área. Os geminivírus possuem uma morfologia única por apresentar capsídeos icosaédricos geminados, seu genoma é composto por DNA circular de fita simples (ssDNA), com 2500 a 3000 nucleotídeos (nt), sendo convertido em DNA de fita dupla (dsDNA), também circular, no núcleo de células infectadas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A família é subdividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* e *Begomovirus* (Rybicki *et al.*, 2000). Esta classificação é baseada no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros (monocotiledôneas ou dicotiledôneas), número de componentes do genoma viral e relacionamento filogenético (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Todos os geminivírus encontrados no Brasil estão classificados como *Begomovirus*, cujo representante típico é a espécie *Bean golden mosaic virus* (BGMV), os quais podem apresentar um ou mais componentes genômicos e são transmitidos para dicotiledôneas pela mosca-branca (Homoptera: Aleyrodidae). Membros do gênero *Begomovirus* possuem predominantemente dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B. O DNA-A codifica as proteínas envolvidas com a replicação e encapsidação da progênie viral; enquanto que o DNA-B contém os genes requeridos para o movimento do DNA viral do núcleo para o citoplasma e célula-a-célula. Ambos componentes estão envolvidos no estabelecimento da infecção sistêmica em plantas.

Doenças causadas por *Begomovirus* têm se tornado uma grande ameaça para agricultura brasileira, devido ao grande aumento populacional da mosca-branca, à introdução de um novo biótipo do inseto com grande capacidade

de colonização de tomateiros e à grande capacidade de recombinação do vírus (Galvão et al., 2003). Como consequência, vem sendo constatada no Brasil e, em particular no Estado de Minas Gerais, uma proliferação crescente e uma grande diversidade de *Begomovirus* em tomateiros, provavelmente oriundos de populações nativas de vírus presentes em plantas silvestres, que se adaptaram ao tomateiro após terem sido transmitidos pelo inseto vetor (Ambrozevicius et al., 2002; Ribeiro et al., 1998; 2003). O manejo atual para controle de doenças causadas por geminivírus é problemático e ineficiente, além de representar um grande risco para o ambiente e para o consumo humano, uma vez que é baseado no controle da população do inseto vetor por inseticidas. Sendo assim, o estabelecimento de um mecanismo de resistência que possa ser introduzido em espécies economicamente relevantes representaria ganhos não somente financeiros para os produtores, como também traria benefícios para o meio ambiente e para a saúde pública.

Proteção cruzada, a base conceitual de proteção mediada pela expressão da proteína do capsídeo de diversos vírus cognatos em plantas transgênicas (Beachy, 1988), não é um fenômeno bem documentado entre geminivírus. De fato, para o caso específico de geminivírus bipartidos, já foi demonstrado que esta estratégia aparentemente não produz resultados satisfatórios. Outras estratégias alternativas, baseadas na biologia molecular do vírus, já foram utilizadas, como a expressão de genomas virais defectivos em plantas transgênicas para a interferência na replicação do vírus (Stanley et al., 1990; Frischmuth e Stanley, 1991), e a expressão de genes anti-senso para a proteína Rep em plantas transgênicas. No entanto, a eficiência destas estratégias, de uma maneira geral, foi limitada, conseguindo-se no máximo o retardamento e a atenuação dos sintomas. O desenvolvimento de novas estratégias moleculares, fundamentadas no conhecimento básico dos mecanismos bioquímicos e moleculares que governam o ciclo de vida do vírus em células infectadas, torna-se imprescindível para a produção de plantas transgênicas que eficientemente venham conferir resistência a geminivírus.

Dentro desse contexto, é extremamente relevante que se detectem as funções do hospedeiro, moduladoras das atividades bioquímicas codificadas pelo genoma viral e envolvidas no estabelecimento do vírus na planta. Desta forma, a caracterização bioquímica e funcional de proteínas da planta hospedeira que interagem com proteínas virais auxilia na elucidação do mecanismo de infecção viral, bem como, na estruturação de um modelo da interação planta:patógeno, possibilitando o estabelecimento de estratégias de resistência. Esta caracterização já foi bem utilizada na identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com proteínas virais durante o processo de replicação de geminivírus (Gutierrez et al., 2004; Alberter et al., 2005; Malik et al., 2005). Porém, a maquinaria de transporte do hospedeiro que

possibilita a movimentação de geminivírus pela planta, possibilitando a instalação de uma infecção sistêmica, ainda é muito pouco elucidada. (Rojas *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), pois as bases moleculares das interações entre proteínas de movimento viral e de transporte do hospedeiro ainda não foram bem determinadas. Neste contexto, a proteína NSP (*"Nuclear Shuttle Protein"*) que facilita o transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma e, em cooperação com MP, para as células adjacentes, consiste em um excelente alvo para elucidação molecular das interações geminivírus-hospedeiro.

A via fundamental de NSP no movimento viral prediz que esta proteína viral pode interagir com fatores do hospedeiro em diferentes compartimentos subcelulares. De fato, foi demonstrado que NSP interage com uma acetilase nuclear de *Arabidopsis thaliana*, designada AtNSI (*"NSP interactor"*) (McGarry *et al.*, 2003), como também com uma quinase receptora da membrana plasmática, designada NIK (*"NSP-interacting kinase"*) de tomate, soja e *Arabidopsis* (Mariano *et al.*, 2004). Em *Arabidopsis*, NSP interage com três membros da família LRR-RLK, NIK1, NIK2 e NIK3, as quais já foram demonstradas como sendo autênticas serina/treonina quinases com propriedades bioquímicas consistentes com a função de receptor sinalizador (Fontes *et al.*, 2004). Dentro deste conceito, o objetivo principal deste trabalho foi a identificação e caracterização, bioquímica e funcional, de uma quinase, pertencente à subfamília PERK, a qual demonstrou-se é capaz de interagir com a proteína viral NSP.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Morfologia, organização genômica e função gênica de geminivírus.

A família *Geminiviridae* é caracterizada por apresentar seu genoma composto por um ssDNA circular, com aproximadamente 2,6 até 3,0 kb, o qual apresenta-se encapsidado em partículas icosaédricas geminadas e pode apresentar-se mono ou bissegmentado. A partícula viral apresenta uma construção simples, não sendo envelopado e seu capsídeo é alongado, exibindo uma simetria icosaédrica. É composto por 22 capsômeros, os quais são constituídos por um único tipo de proteína, denominada CP (“*Coat protein*”). O genoma viral codifica um único tipo de CP, a qual é responsável por formar toda a estrutura típica de partícula geminada (Townsend *et al.*, 1985; Mullineaux *et al.*, 1988; Kallender *et al.*, 1988; Sunter *et al.*, 1990;).

Além da encapsidação, a proteína CP de geminivírus monopartidos facilita a transferência do DNA viral infeccioso para o interior do núcleo das células do hospedeiro e é essencial para o movimento sistêmico do vírus (Lazarowitz *et al.*, 1989; Woolston *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1999; Boulton, 2002). Entretanto, em begomovírus bipartidos a proteína CP pode ser dispensável durante a transmissão sistêmica em algumas espécies de plantas (Gardiner *et al.*, 1988; Jeffrey *et al.*, 1996), indicando um envolvimento da proteína CP de *Begomovirus* na especificidade do hospedeiro (Stanley e Townsend, 1986; Gardiner *et al.*, 1988). A proteína CP também determina a especificidade do vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997, 2001) e protege o ssDNA viral contra degradação durante a transmissão pelo inseto vetor (Azzam *et al.*, 1994) ou inoculação mecânica (Frischmuth e Stanley, 1998).

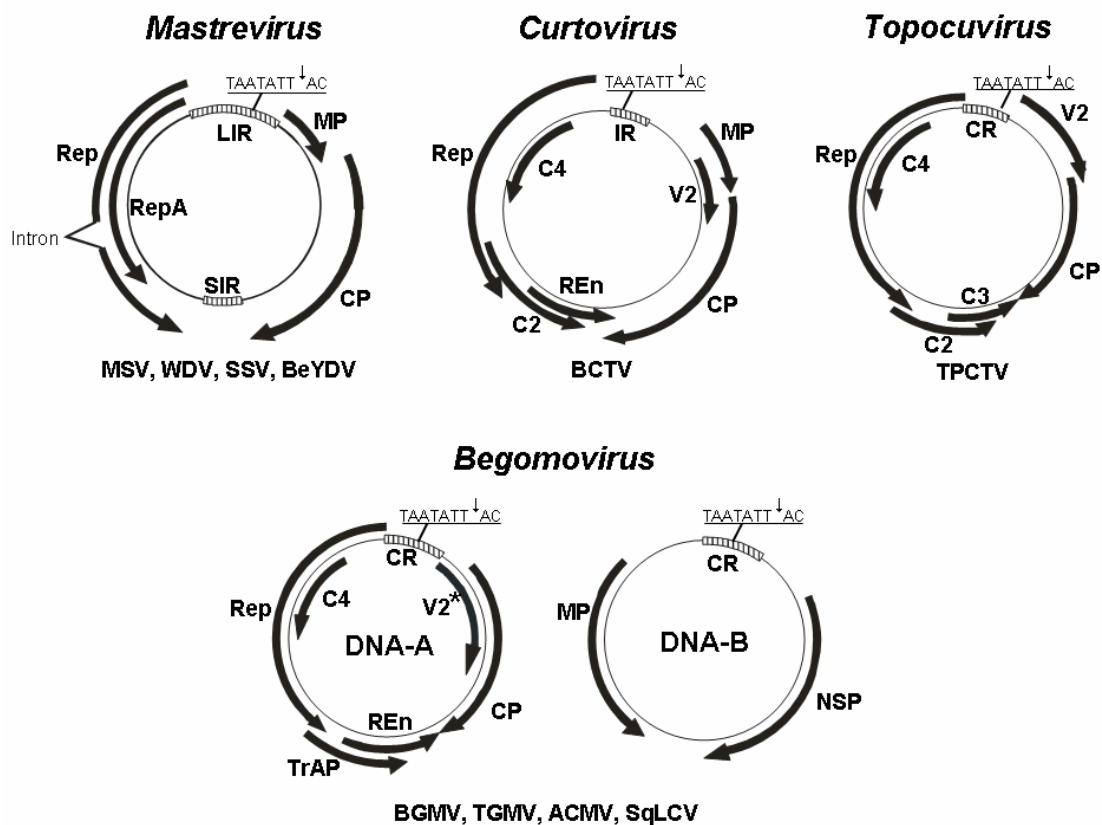
O genoma dos membros da família *Geminiviridae* pode ser organizado em um ou dois componentes genômicos, denominados de DNA-A e DNA-B. Tanto geminivírus mono quanto bipartidos apresentam uma região intergênica (IR (“*Intergenic Region*”) em monopartidos, CR (“*Common Region*”) em bipartidos), na qual ocorre o início da transcrição dos genes virais em ambas as fitas (Hamilton *et al.*, 1984; Lazarowitz *et al.*, 1992; Stanley e Gay, 1993). Assim, a CR ou IR delimita duas unidades de transcrição divergentes, uma na fita positiva ou viral (V-senso) e outra na fita complementar ou negativa (C-senso) do vírus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Os RNAs resultantes da transcrição das ORFs presentes no DNA viral são poliadenilados e iniciam-se “*upstream*” da seqüência consenso TATA ou de elementos iniciadores, o que indica que eles são realmente transcritos pela RNA polimerase II do hospedeiro (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

O gênero *Mastrevirus*, apresenta o genoma monopartido, o qual contém uma grande (LIR – *large intergenic region*) e uma pequena região intergênica (SIR – *small intergenic region*), as quais estão localizadas em lados opostos na molécula de DNA viral circular. Além disso, também é caracterizado por: (1) uma seqüência de DNA com aproximadamente 80 nt que está presente na partícula, anelada a partir da SIR; e (2) a ocorrência de eventos de excisão em ambos transcritos (Schalk *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1997) (Figura 2.1). Os representantes do gênero *Mastrevirus* (tal como *Maize streak virus*, MSV e *Wheat dwarf virus*, WDV) são transmitidos por cigarrinhas, insetos do gênero *Cidulina*, de uma maneira circulativa e não propagativa, e infectam principalmente espécies de monocotiledôneas. Alguns membros do gênero, como *Tobacco yellow dwarf virus* (TYDV) e *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), possuem a capacidade de infectar dicotiledôneas.

O membro característico do gênero *Curtovirus* é um vírus economicamente importante por infectar beterraba (*Beet curly top virus*, BCTV), e tem uma ampla gama de hospedeiros. Também são transmitidos por cigarrinhas de uma maneira circulativa não-propagativa, infectam dicotiledôneas e possuem o genoma monopartido, porém sua organização genética diferencia-se de *Mastrevirus*, sendo que seu DNA codifica seis ou sete proteínas. A fita viral codifica duas proteínas. A fita complementar contém quatro genes que estão envolvidos na replicação viral, dentre eles o gene C3 codifica a proteína Ren, análoga à proteína “*enhancer*” da replicação de begomovírus (Lazarowitz, 1992; Stenger, 1996) (Figura 2.1).

O gênero *Topocuvirus* possui apenas um representante, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV) com componente genômico único, sendo transmitido por *Micrutalis malleifera* (Membracidae), infecta dicotiledôneas e representa o mais recente e o menos caracterizado gênero da família (Pringle, 1999). Sua organização genética é similar a dos *Curtovirus* (Gutierrez, 2002). É o mais recentemente

identificado e menos caracterizado dos quatro gêneros, e apresenta características tanto de mastrevírus quanto de begomovírus (Bridson *et al.*, 1996). A CP apresenta características mais similares às de mastrevírus, entretanto a organização dos genes da fita complementar é similar a de begomovírus. Apresenta seis ORFs, sendo que quatro delas estão na fita complementar, e duas ORFs na fita viral (Figura 2.1).



**Figura 2.1:** Organização genética dos quatro gêneros da família *Geminiviridae*. Alguns dos membros mais estudados de cada gênero são utilizados como exemplo. *Mastrevirus*: MSV (*Maize streak virus*), WDV (*Wheat dwarf virus*); SSV (*Sugarcane streak virus*), BeYDV (*Bean yellow dwarf virus*). *Curtovirus*: BCTV (*Beet curly top virus*). *Topocovirus*: TPCTV (*Tomato pseudo-curly top virus*). *Begomovirus*: BGMV (*Bean golden mosaic virus*), TGMV (*Tomato golden mosaic virus*), ACMV (*African cassava mosaic virus*), SqLCV (*Squash leaf curl virus*), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*). Os códigos para as proteínas virais são: RepA, proteína associada com a replicação que interage com retinoblastoma; Rep, proteína de iniciação da replicação; REn, proteína “enhancer” da replicação; TrAP, proteína de ativação transcricional; MP, proteína de movimento; CP, proteína do capsídeo. Proteínas com funções não definidas estão nomeadas de acordo com sua posição no mapa genético. Regiões não codificadoras (ou parte delas) correspondem à grande região intergênica (LIR) e à pequena região intergênica (SIR) em mastrevírus, a região intergênica em curtovírus (IR) e à região comum (CR) para topocovírus e begomovírus. A seqüência invariável TAATATTAC, localizada na região intergênica está indicada juntamente com o sítio de iniciação (↓) para a replicação círculo rolante. Setas vermelhas indicam genes localizados na fita complementar e as setas azuis na fita viral.

Begomovírus monopartidos, como TYLCV (*“Tomato yellow leaf curl virus”*), possuem seis genes, quatro na fita complementar, os quais codificam proteínas envolvidas na replicação, transcrição e encapsidação do genoma viral, além de C4, que codifica uma proteína envolvida no desenvolvimento de sintomas sistêmicos (Jupin *et al.*, 1994; Desbiez *et al.*, 1995), e dois na fita viral, os quais estão envolvidos com movimento intracelular e célula-a-célula do genoma viral. Na fita viral, encontra-se o gene CP ou V1 que codifica a proteína do capsídeo. Os quatro genes da fita complementar são: C1 (proteína Rep - replicação), C2 (TrAP - proteína transativadora), C3 (REn – *“enhancer”* da replicação) e C4 (codifica uma proteína de 11 kDa) (Figura 2.1).

Em geminivírus bipartidos, as proteínas de replicação viral, encapsidação e as de movimento estão separados em dois componentes genômicos, designados DNA-A e DNA-B, sendo ambos necessários para o estabelecimento da infecção sistêmica. O DNA-A está envolvido nos processos de replicação e encapsidação do genoma viral e o DNA-B codifica os genes envolvidos no movimento sistêmico do vírus pela planta e desenvolvimento de sintomas. Ambos os componentes possuem tamanhos semelhantes, com cerca de 2600 nt, mas não apresentam homologia, exceto pela CR, com aproximadamente 200 nt que é altamente conservada, onde está localizada a origem de replicação e os promotores da síntese dos mRNAs virais (Lazarowitz *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994).

O DNA-A possui o potencial para codificar cinco genes (AV1, AC1, AC2, AC3 e AC4), sendo que AV1 ou CP é transcrito no sentido viral (Lazarowitz, 1992), e os genes AC1 (proteína Rep – replicação), AC2 (proteína TrAP – proteína de transativação) e AC3 (proteína Ren – ativadora da replicação) são transcritos no sentido complementar (Sunter *et al.*, 1990; 1992; Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994). Além disso, há também a ORF AC4, transcrita no sentido complementar, que apresenta função diferenciada. Nos monopartidos, está relacionada com o desenvolvimento de sintomas sistêmicos (Jupin *et al.*, 1994) e nos bissegmentados sua função é desconhecida, mas sabe-se que mutações nessa ORF não resultam em qualquer alteração no fenótipo de plantas infectadas (Gröning *et al.*, 1994). Em alguns vírus emergentes, como ToCMV (*“Tomato chlorotic mottle virus”*), é também verificada a presença de um novo gene AC5 no DNA-A, que é complementar ao gene AV1, e cuja função ainda não foi elucidada (Galvão *et al.*, 2003).

O DNA-B apresenta dois genes, BV1, na fita viral, e BC1, na fita complementar, que expressam proteínas que atuam de maneira cooperativa para mediar o movimento intra e intercelular do DNA viral (Lazarowitz *et al.*, 1999; Gafni *et al.*, 2002), uma vez que na ausência das mesmas, os vírus são incapazes de se movimentarem na planta hospedeira (Elmer *et al.*, 1988; Eteessami *et al.*, 1988). O

gene *BC1* codifica a proteína MP (“*Movement Protein*”), responsável pelo movimento célula-a-célula do vírus via plasmodesmas, e o gene *BV1*, codifica a proteína NSP (“*nuclear shuttle protein*”), responsável pelo movimento do DNA viral entre núcleo e citoplasma, sendo ambas necessárias para a patogenicidade de geminivírus bissegmentados (Ingham *et al.*, 1995).

Consistente com uma função de proteína de movimento clássica de vírus de plantas, foi demonstrado que a proteína MP de BDMV (*Bean dwarf mosaic virus*) é capaz de aumentar o limite de exclusão do plasmodesma, sendo capaz ainda de mediar o movimento do genoma viral para a célula adjacente (Noueiry *et al.*, 1994, Sanderfoot *et al.*, 1996). A proteína MP de SqLCV (*Squash leaf curl virus*) foi localizada na membrana plasmática (Pascal *et al.*, 1994). Entretanto, MP de SqLCV também foi detectada na mesma fração do retículo endoplasmático que a proteína BiP (“*Binding protein*”), a qual é residente do retículo endoplasmático (Ward *et al.*, 1997). Estas observações levaram estes autores a sugerir que MP é capaz de interagir com o RE, formando canais para o movimento intercelular.

A proteína de movimento NSP realiza o transporte viral através do envelope nuclear, atuando como “lançadeira” nuclear, apresenta um sinal de transporte nuclear (NES) e um sinal de localização nuclear (NLS) (Lazarowitz *et al.*, 1999). Experimentos realizados com a proteína MP e NSP de SqLCV demonstraram que a proteína MP realocaliza a proteína NSP na periferia da célula, enquanto que, na ausência da proteína MP, NSP localiza-se no núcleo (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995). Em SqLCV, foi demonstrado que MP e NSP sofrem modificações pós-traducionais, sendo fosforiladas durante o processo de translocação do genoma viral (Pascal *et al.*, 1994), e NSP apresenta atividade de ligação com o DNA (Pascal *et al.*, 1994, Rojas *et al.*, 1998). Entretanto, para o caso de BDMV, foi demonstrado que ambas as proteínas NSP e MP possuem a capacidade de ligar ao DNA de uma maneira dependente de forma e tamanho (Rojas *et al.*, 1998). Recentemente, a atividade de ligação ao DNA dessas duas proteínas virais foi revisada para AbMV (“*Abutilon mosaic virus*”), prevalecendo a idéia original de que, enquanto a proteína NSP interage fortemente com DNA, MP não exibe atividade de ligação ao DNA (Shuo *et al.*, 2001).

A proteína Rep (“*Replication associated protein*”) é a única proteína viral essencial para suportar o processo de replicação do genoma viral, na presença de fatores do hospedeiro (Stanley, 1995; Hanley-Bowdoin, 1996). É uma proteína multifuncional que tem atividade de ligação seqüência específica ao dsDNA (Fontes *et al.*, 1992; 1994a, 1994b), catalisa a clivagem e ligação do DNA durante a síntese do ssDNA (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995; Laufs *et al.*, 1995; Orozco e Hanley-Bowdoin, 1996), possui atividade repressora sobre a transcrição de seu promotor de forma vírus

específica (Eagle *et al.*, 1994) e induz a expressão de proteínas do hospedeiro (Nagar *et al.*, 1995).

A proteína REn (*“Replication Enhancer”*) está associada ao acúmulo de DNA viral durante o processo de infecção, podendo formar multímeros com a proteína Rep; entretanto, esta proteína não é essencial para a replicação do genoma viral (Sunter *et al.*, 1990; Settelage *et al.*, 1996). Mutações nesta proteína causam decréscimo na eficiência de replicação do genoma viral e atenuação de sintomas. Durante a infecção viral, a proteína REn acumula no núcleo em níveis similares aos observados para a proteína Rep, sugerindo uma ação conjunta durante o processo de replicação do genoma viral (Pedersen *et al.*, 1994; Nagar *et al.*, 1995). Consistente com esta observação, a proteína REn forma oligômeros com a proteína Rep.

A proteína TrAP (*“Transactivator Protein”*) possui a atividade de ativador transcricional, sendo importante na regulação da expressão de genes virais *NSP* e *CP* (Hayes e Buck, 1989; Sunter e Bisaro, 1992). Elementos conservados, presentes em promotores de genes de expressão tardia de muitos geminivírus têm sido identificados como alvos funcionais da proteína TrAP. Mutações nestes elementos mostram que eles perdem a capacidade de serem transativados por TrAP (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). TrAP também mostrou-se capaz de ativar promotores cromossomais influenciando a expressão de genes do hospedeiro (Sunter e Bisaro, 1994). Sabe-se que esta proteína tem a capacidade de se ligar a zinco e de sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação (Hartitz *et al.*, 1999). Além disso, TrAP é um determinante de patogenicidade dos begomovírus e funciona como supressor de PTGS (*“PostTranscriptional Gene Silencing”*).

A ORF AC4 é uma pequena ORF contida dentro da seqüência do DNA que codifica para Rep, porém, em diferente quadro de leitura. A ORF AC4 de begomovírus bipartidos possui o homólogo C4 em curtovírus, que codifica uma proteína de massa molecular de 10 kDa (Elmer *et al.*, 1988). Experimentos com plantas transgênicas contendo genes repórteres fusionados a promotores do gene Rep de TGMV (*“Tomato golden mosaic virus”*) mostraram que a expressão de Rep pode ser regulada por AC4 de begomovírus (Gröning *et al.*, 1994; Eagle *et al.*, 1997). Porém, mutações na ORF AC4 de TGMV não interferem no processo de infecção viral e, conseqüentemente, a função biológica da proteína permanece indeterminada (Pooma *et al.*, 1996).

## **2.2 – Mecanismo de replicação de geminivírus**

Os geminivírus replicam seu DNA via mecanismo de replicação círculo rolante no núcleo das células de plantas infectadas, onde o ssDNA é convertido em um dsDNA intermediário, também denominado de RF (Forma Replicativa). A RF serve

como molde para síntese de novos ssDNAs e para mRNA virais. O processo de síntese da fita complementar e conversão do genoma do vírus em dsDNA ainda é pouco elucidado. Entretanto, as evidências indicam que ela é realizada por fatores do hospedeiro, não contando, portanto, com a participação de nenhum produto viral (Palmer e Rybicki, 1998). Este mecanismo de replicação pode ser dividido em três etapas: a) conversão de ssDNA viral em dsDNA (RF); b) síntese de uma molécula de ssDNA no sentido viral, contendo várias unidades genômicas (multímero ou concatâmero), usando como molde a fita complementar da RF; e c) clivagem e religação das unidades genômicas do multímero, gerando moléculas circulares de ssDNA correspondentes ao genoma viral (Timmermens *et al.*, 1994; Laufs *et al.*, 1995).

A análise da seqüência de geminivírus mostra a existência de um nonanucleotídeo, 5'-TAATATTAC, conservado em todas as espécies, que se localiza dentro da IR. Esse nonanucleotídeo, também designado por elemento estruturalmente conservado (SCE – “*Structure Conserved Element*”), está localizado dentro de uma seqüência conservada de 30 nt, que correspondem a uma seqüência repetida invertida, com o potencial para a formação de uma estrutura em forma de grampo. A manutenção conformacional dessa estrutura conservada é necessária para a função da origem de replicação (Orozco e Hanley-Bowdoin, 1996). O SCE, flanqueado pelas seqüências repetidas invertidas ricas em CG, representa a alça (“*loop*”) da estrutura em forma de grampo, a qual representa o sítio de início da replicação da fita positiva (Fontes *et al.*, 1994b; Laufs *et al.*, 1995; Heyraud-Nitshck *et al.*, 1995; Orozco *et al.*, 1998).

Sendo assim, SCE contém o sítio de ligação específico para a proteína Rep sobre o qual atua, promovendo a clivagem específica na fita positiva do genoma viral para iniciar a replicação círculo rolante (Laufs *et al.*, 1995; Stanley, 1995), além de outros cis-elementos que contribuem para o reconhecimento específico da origem (Orozco *et al.*, 1998). A proteína Rep reconhece seqüências específicas na região 5' da estrutura do SCE, ligando-se a elas com alta afinidade e especificidade (Fontes *et al.*, 1994a; 1994b), sendo que, provavelmente, atinge o sítio de clivagem com o auxílio da proteína Ren e os fatores do hospedeiro (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

A proteína Rep exibe atividade de endonuclease seqüência-específica e hidrolisa SCE na posição indicada para o início da replicação – 5'-TAATATT<sup>(+1)</sup>AC – (Laufs *et al.*, 1995). Desse modo, a fita senso é estendida a partir da extremidade 3'-OH livre pela maquinaria replicativa da célula e uma atividade de helicase parece ser requerida para o deslocamento da fita senso clivada. Entretanto, a proteína não apresenta nenhuma homologia com nenhuma DNA polimerase conhecida e todas as evidências indicam que ela não tem atividade de DNA polimerase, a qual seria

proporcionada por enzimas do hospedeiro (Laufs *et al.*, 1995). Além disso, Rep atua de maneira vírus-específica, reconhecendo a origem de replicação cognata, através de interação específica com seu sítio de ligação (Fontes *et al.*, 1994a).

A proteína CP também participa do processo de replicação do genoma viral (Saunders *et al.*, 1991; Stenger *et al.*, 1991). Os produtos de replicação círculo rolante são acumulados tanto como dsDNA como ssDNA, porém, a ausência ou inativação de CP geralmente resulta na redução dos níveis de ssDNA sem que ocorra a redução no nível de dsDNA (Brough *et al.*, 1988; Briddon *et al.*, 1989). No caso de SqLCV, mutantes no sinal de localização nuclear (NLS) de CP também reduzem a acumulação de ssDNA (Qin *et al.*, 1998) e isto está ligado à sua incapacidade de se ligar ao ssDNA por descompartimentalização (Padidam *et al.*, 1999). Estes resultados claramente sugerem uma via na qual CP altera a natureza dos produtos da replicação do DNA viral.

Por causa de sua limitada capacidade codificante, os geminivírus fornecem apenas os fatores requeridos para iniciar a replicação por círculo rolante e usam a DNA polimerase da planta para amplificar seus genomas (Egelkorout *et al.*, 2001). Assim, é necessário que as células infectadas estejam sintetizando DNA, caso contrário, as enzimas responsáveis pela síntese não estarão presentes em concentrações suficientes para permitir a replicação dos vírus. Como consequência, esses vírus precisam induzir a síntese de enzimas hospedeiras (responsáveis pela síntese da RF) e de novas fitas de ssDNA de sentido viral, antes da replicação (Nagar *et al.*, 1995). Com isso, o processo de replicação de geminivírus contribui para o estudo dos mecanismos que mediam e regulam a replicação do DNA e o ciclo celular em plantas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

### **2.3. Movimento do genoma viral durante o processo de infecção**

O movimento do vírus célula-a-célula e o sistêmico são processos imprescindíveis para o estabelecimento de uma infecção produtiva. O movimento célula-a-célula é mediado por proteínas virais denominadas proteínas de movimento que alteram a arquitetura da célula infectada, possibilitando a superação da barreira intracelular, constituída pela parede celular. Pelo fato dos geminivírus apresentarem replicação nuclear, o transporte desses vírus requer uma etapa adicional, que é o deslocamento intracelular dos genomas virais recém replicados do núcleo para o citoplasma. Conseqüentemente, o transporte intracelular do genoma viral requer uma proteína de movimento adicional, designada NSP, além da proteína envolvida no transporte célula-a-célula, designada MP. Assim, o movimento do genoma viral é

facilitado pela ação cooperativa entre as duas proteínas de movimento NSP e MP (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995, 1996).

Nosso entendimento do movimento de geminivírus em plantas infectadas tem avançado com a caracterização genética e bioquímica das proteínas de movimento de SqLCV e BDMV. Em SqLCV, as proteínas de movimento NSP (*BV1*) e MP (*BC1*) possuem funções distintas e independentes no mecanismo responsável pelo movimento viral (Pascal *et al.*, 1993; 1994). As propriedades bioquímicas e localização subcelular dessas proteínas sugerem que, enquanto NSP participa do movimento do genoma viral do núcleo para o citoplasma, MP age na membrana plasmática e parede celular, a fim de facilitar o movimento viral entre células. Foi demonstrado que a proteína MP se move entre as células, aumentando o limite de exclusão dos plasmodesmas e facilitando o movimento do genoma viral (Noueiry *et al.*, 1994). As atividades de ligação ao DNA de MP e NSP de BDMV são dependentes da forma e do tamanho do fragmento de DNA (Rojas *et al.*, 1998).

A proteína de movimento NSP possui a capacidade de interagir especificamente com o ssDNA viral facilitando o seu transporte do núcleo para o citoplasma. Já foi demonstrado também que a proteína NSP se liga a ssDNA com alta afinidade, enquanto que a proteína MP parece ter baixa afinidade por ácidos nucleicos (Pascal *et al.*, 1994). Em begomovírus, a proteína NSP transporta o DNA viral através dos poros da membrana nuclear utilizando as vias normais de exportação/importação usadas por proteínas celulares, RNAs e ribonucleoproteínas.

Dois mecanismos distintos de transporte célula-a-célula do DNA viral, os quais basicamente diferem na natureza do complexo do DNA viral transportado para as células adjacentes não-infectadas, são suportados por estudos relevantes até o presente momento (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1996). No primeiro modelo, NSP facilita o movimento intracelular do genoma viral do núcleo para o citoplasma, onde é substituída por MP que transporta o DNA viral para as células adjacentes via plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998). No segundo modelo, como no caso do SqLCV floema-limitado, MP facilita o transporte intracelular mediado por NSP do DNA viral do núcleo para o citoplasma e então media o transporte do complexo NSP-DNA para as células adjacentes via túbulos derivados do ER induzidos pela infecção viral (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; 1996; Sanderfoot *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1997; Hehne *et al.*, 2004).

As proteínas CP de geminivírus estão envolvidas principalmente com o processo de encapsidação do genoma viral. Além disso, em geminivírus monopartidos esta proteína é absolutamente essencial para o movimento do vírus (Lazarowitz *et al.*, 1989; Boulton, 2000), mas, em bipartidos é dispensável para a infecção sistêmica em algumas espécies de plantas hospedeiras, indicando um envolvimento da CP de

begomovírus com a especificidade do hospedeiro (Stanley e Townsed, 1986; Gardiner *et al.*, 1988; Pooma *et al.*, 1996). O requerimento de CP é de fundamental importância para o movimento dos vírus pertencentes aos gêneros *Mastrevirus* e *Curtovirus* (Unsel *et al.*, 2001), uma vez que eles são limitados ao floema e dependem especificamente do fluxo de fotoassimilados para causarem infecção sistêmica no hospedeiro. Em mastrevírus e curtovírus, as proteínas CP e MP interagem especificamente realizando funções equivalentes à MP e NSP de begomovírus bipartidos (Liu *et al.*, 1999; Kotlizky *et al.*, 2000). Assim, CP liga ao ssDNA, transporta-o através da membrana nuclear e interage com a MP para mediar o movimento do complexo CP-ssDNA célula-a-célula via plasmodesmas (Palmer e Ribicki, 1998).

Além das proteínas virais, o transporte de geminivírus pode envolver a formação de microtúbulos em células recém-infectadas. Em células infectadas por SqLCV, foi observada a formação de túbulos, ausentes em plantas sadias ou inoculadas com mutantes de MP defectivos em movimento (Ward *et al.*, 1997). Durante a infecção por SqLCV, ocorre a formação do complexo NSP-ssDNA, o que propõe que seu genoma se move de uma célula a outra por meio de interações com túbulos que atravessam a parede de células meristemáticas do floema e cuja formação é induzida pelo vírus.

#### **2.4. Interação de proteínas virais com proteínas do hospedeiro**

Os geminivírus correspondem a vírus de planta que são altamente dependentes de fatores do hospedeiro para sua proliferação (Liu *et al.*, 1999), e utilizam a maquinaria celular do hospedeiro para executar as funções básicas de replicação e movimento para o estabelecimento de uma infecção produtiva. Portanto, o ciclo de infecção de geminivírus depende extensivamente de interações intermoleculares vírus-hospedeiro, as quais são requeridas tanto para a compatibilidade básica (Ach *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 2000; McGarry *et al.*, 2003; Castilho *et al.*, 2003; Bagewadi *et al.*, 2004; Carvalho e Lazarowitz, 2004; Selth *et al.*, 2005) quanto para modulação da infecção viral pela inativação de respostas de defesa (Hao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Fontes *et al.*, 2004; Mariano *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). A descoberta de cada nova interação entre fatores do hospedeiro e proteínas virais auxilia na elucidação das bases moleculares da patogenicidade (Whitham e Wang, 2004). É particularmente interessante o aspecto único do ciclo de infecção de geminivírus que requer uma função de movimento para facilitar o transporte do DNA viral do núcleo, onde é replicado, para o citoplasma (Lazarowitz e Beachy, 1999; Gafni e Epel, 2002;).

Experimentos realizados com BGMV demonstraram que esses vírus podem controlar o ambiente celular em células diferenciadas de maneira a propiciar condições para a replicação viral (Wang *et al.*, 1996). Com a utilização do sistema duplo-híbrido, foi possível detectar interações específicas entre a proteína Rep de WDV e a proteína retinoblastoma humana (Ach *et al.*, 1997), a qual está envolvida na regulação do ciclo celular, determinando a transição da fase G1 para a fase S. A identificação de proteínas homólogas a proteínas da família retinoblastoma em plantas, sugere uma estreita relação entre a regulação do ciclo celular de plantas e animais. Em *Arabidopsis*, a proteína Rep é capaz de interagir como a histona H3, o que é consistente com sua função durante o processo de replicação do DNA viral (Kong e Bowdoin, 2002). Esta interação pode alterar ou desfazer os nucleossomos, facilitando assim a replicação e transcrição do genoma viral. Rep também interage com a proteína GRIMP, a qual apresenta um domínio de quinase e um domínio central de ligação à ciclina (*cdc2*), o que sugere sua participação no processo de divisão celular (Bass *et al.*, 2000).

A via fundamental de NSP no movimento do vírus prediz que esta proteína viral pode interagir com fatores do hospedeiro em diferentes compartimentos subcelulares. Já foi demonstrado que NSP possui a capacidade de interagir com uma acetilase nuclear de *Arabidopsis thaliana*, designada AtNSI (“NSP interactor”), e também com uma quinase receptora da membrana plasmática, designada NIK (“NSP-interacting kinase”) de tomate, soja e *Arabidopsis* (Mariano *et al.*, 2004; McGarry *et al.*, 2003). Em *Arabidopsis*, NSP interage com três membros da família LRR-RLK, NIK1, NIK2 e NIK3, as quais já foram demonstradas como sendo autênticas serina/treoninas quinases com propriedades bioquímicas consistentes com a função de receptor sinalizador (Fontes *et al.*, 2004).

Apesar da interação de NSP com AtNSI e NIK, NSP não funciona como substrato para nenhuma destas enzimas do hospedeiro. De fato, AtNSI não acetila NSP, mas acetila CP (McGarry *et al.*, 2003). Durante a replicação círculo rolante do DNA viral, supõe-se que CP media a partição de ssDNA seqüestrando o ssDNA viral e o afastando da maquinaria de replicação, e tornando-o disponível para a ligação com NSP e exportação. A movimentação de CP entre o “pool” de ssDNA seqüestrado e o complexo de replicação foi proposta como sendo regulada por AtNSI através da interação com NSP (McGarry *et al.*, 2003). De acordo com este modelo, a superexpressão de AtNSI aumenta a infecção por CaLCuV (“Cabbage leaf curl virus”), e a diminuição da capacidade de NSP se ligar com AtNSI gera um defectivo mutante viral (McGarry *et al.*, 2003; Carvalho e Lazarowitz, 2004;). No caso da quinase receptora-like NIK, NSP inibe sua atividade de quinase suprimindo a resposta antiviral mediada por NIK (Fontes *et al.*, 2004), esta interação não é vírus-específica, pois

*AtNIK* é capaz de interagir com TGMV e TCrLYV (“*Tomato crinkle leaf yellows virus*”). A inativação do gene *NIK* aumenta a susceptibilidade dos mutantes diante da infecção viral (Fontes *et al.*, 2004).

## 2.5 – Família PERK em plantas

A família PERK (“*Proline-rich Extensin-like Receptor Kinase*”) de *Arabidopsis thaliana* é composta por 15 receptores transmembrana, que apresentam um domínio extracelular rico em prolina, cuja função biológica ainda é desconhecida (Shiu e Bleecker, 2003). Entretanto a supressão anti-senso de muitos membros da família *AtPERK*, em plantas transgênicas, resulta em vários defeitos de crescimento. A família *AtPERK* é relacionada com a *Brassica napus* PERK1 e apresenta homologia com proteínas associadas à parede celular de plantas (Silva e Goring, 2002).

Evidências mostram que a parede celular não contribui somente com a força mecânica e estruturação da célula. Mudanças na percepção e sinalização da parede celular ocorrem tanto durante o crescimento e desenvolvimento da planta quanto durante o ataque de patógenos e insetos (Pilling e Hofte, 2003). De fato, a *BnPERK1* é rapidamente induzida por ferimento (Silva e Goring, 2002), podendo responder a ataques de insetos (Pilling e Hofte, 2003). Foi demonstrada a influência de uma via para as quinases associadas à parede celular (WAKs – *Wall Associated Kinases*), as quais estão localizadas na membrana plasmática e fortemente associadas com a parede celular. Estas quinases são covalentemente ligadas à pectina, e a supressão anti-senso de genes da família WAK leva a uma diminuição da expansão celular (Kohorn, 2001; Verica e He, 2002). A família PERK pode representar um segundo grupo com função similar.

Estudos anteriores referentes à filogenia de quinases em *Arabidopsis* indicam que seu genoma codifica 19 quinases com domínios ricos em prolina (Shiu e Bleecker, 2001; Shiu e Bleecker, 2003), sendo que destas, quatro são RLCK (“*Receptor-Like Cytoplasmic Kinase*”) – *At1g70450*, *At5g56790*, *At1g55200*, *At3g13690*, enquanto 15 quinases são possíveis proteínas quinases receptoras de membrana com um domínio extracelular rico em prolina similar ao encontrado em *BnPERK1*, designadas *AtPERK* 1-15 (Silva e Goring, 2002). O comprimento do domínio extracelular de *AtPERK* é consideravelmente diferente entre os diferentes membros, sendo que alguns apresentam regiões ricas em prolina tanto no domínio extracelular quanto no citoplasmático. *AtPERK6* contém uma região rica em asparagina no domínio extracelular. Nenhum dos membros da família PERK, como *BnPERK1*, possui um peptídeo sinal no N-terminal, e possuem um domínio transmembrana interna, seguido por uma extensão de resíduos de aminoácidos

positivamente carregados. Esta organização possivelmente posiciona o domínio de quinase no lado citosólico da membrana plasmática. De acordo com estas predições baseadas na seqüência, foi demonstrado que *Bh*PERK1 está localizada na membrana plasmática (Silva e Goring, 2002).

### **III. OBJETIVOS**

O estudo dos mecanismos envolvidos na interação planta:patógeno são de extrema importância para se elucidar o desenvolvimento da doença e os prováveis mecanismos de resistência que são ativados durante a infecção por geminivírus. Desta forma, a caracterização de proteínas da planta hospedeira que interagem com proteínas virais corresponde a uma importante ferramenta na elucidação do mecanismo de infecção viral, bem como, na estruturação de um modelo da interação planta:patógeno, possibilitando o estabelecimento de estratégias de resistência. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi a caracterização bioquímica e funcional de uma serina/treonina quinase pertencente à subfamília de quinases receptoras de membrana, PERK, a qual interage com a proteína viral NSP, durante o curso da infecção viral.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

Em todos os experimentos que envolveram material vegetal, inclusive para a obtenção de mutantes, foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col Ø). As sementes foram esterilizadas e vernalizadas a 4°C por dois dias no escuro e então expostas à luz branca. As plântulas foram mantidas a 22°C em placas contendo meio MS ½ força (adaptado de Murashige e Skoog, 1962) por três semanas, e então transferidas para solo enriquecido com substrato vegetal na proporção 1:1. Plantas foram crescidas em câmara de crescimento a 22°C, sob condições de dia-longo (16 horas de luz/8 horas de escuro).

### 4.2. Análises de seqüência e filogenética da família AtPERK

As comparações de seqüências de nucleotídeos foram realizadas com o auxílio de programas computacionais encontrados no endereço eletrônico <http://www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html> (“Sequence Interpretation Tools”), onde estão os endereços dos programas: BLAST (<http://blast.genome.ad.jp/>) e CLUSTALW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>). A predição de domínios foi feita com o auxílio do programa PSORT (“Prediction of protein Sorting signals in amino acids sequences – <http://psort.nicbb.ac.jp>). As seqüências utilizadas para a análise de homologia

encontram-se listadas na Tabela 4.1. A tradução da seqüência de DNA foi feita com o auxílio do programa “*Translate toll*” (encontrado na *homepage*: ExPASy Proteomics Server – <http://www.expasy.org/>). A análise do potencial de fosforilação da proteína NsAK foi feita com o auxílio do programa NetPhos 2 – Prediction Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>). As análises filogenéticas foram conduzidas em matrizes de seqüências alinhadas com o auxílio do *software* DNAMAN 3.0, com a opção “*neighbor-joining and bootstrap*”. As seqüências foram obtidas a partir de TAIR *homepage* (<http://www.arabidopsis.org>). As fontes e os números de acesso ao “GenBank” das seqüências utilizadas são fornecidas na Tabela 4.1.

### 4.3. Construção de plasmídeos baseados no pDONR 201

O cDNA completo de *NsAK* (NM\_113366) foi obtido do *Arabidopsis Biological Resource Center*. Todos os outros plasmídeos recombinantes foram construídos através do sistema GATEWAY (Invitrogen Life Technologies, Inc.). Resumidamente, os fragmentos específicos de DNA foram amplificados por PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) com oligonucleotídeos específicos que introduziram extensões adaptadoras apropriadas, necessárias para a recombinação gênica, mediada pela enzima BP Clonase (Invitrogen Life Technologies, Inc.), que introduziu estes fragmentos no vetor de entrada pDONR201, a reação foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. O cDNA completo de *NsAK*, o domínio de quinase C-terminal de *NsAK* (KD, codificando os aminoácidos 238-652) e sua versão truncada ( $\Delta$ KD<sup>392-652</sup>) foram criados por amplificação por PCR com oligonucleotídeos específicos, respectivamente, *AtNsAKAFG* e *AtNsAKStG*, *NsAK712F-GA* e *AtNsAKStG*, *NsAK1174FMet-GA* e *AtNsAKStG* (Tabela 4.2), a partir do cDNA NM\_113366 e inseridos no vetor de entrada pDONR201.

Os plasmídeos obtidos foram transformados em DH5 $\alpha$  por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). A seleção foi realizada em placa contendo meio LB sólido com antibiótico seletivo, o vetor pDONR201 contém um gene de resistência a canamicina. Os transformantes foram confirmados por PCR (Sambrook *et al.*, 1989), com oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene de interesse. Os clones resultantes pDON-NsAK, pDON-KDNsAK e pDON- $\Delta$ KDNsAK, foram utilizados para transferir os respectivos fragmentos em vetores de expressão. A região codificadora

de *NSP* foi amplificada a partir do DNA-B de CaLCuV (Hill *et al.*, 1998) e inserida no vetor de entrada, conforme já descrito por Fontes *et al.* (2004).

**Tabela 4.1.** Sequências das proteínas utilizadas nas análises de homologia e filogenética

<b>Abreviação</b>	<b>Proteína</b>	<b>Número de Acesso no GenBank</b>
<i>Bn</i> PERK1	Proteína quinase receptora PERK1 ( <i>Proline-rich Extensin-like Receptor Kinase</i> de <i>Brassica napus</i> )	AY028699
<i>Os</i> PERK1	Putativa proteína quinase receptora PERK1 ( <i>Oriza sativa</i> )	NP_913464
<b><i>At</i>PERK1/ <i>At</i>NSAK</b>	<b>Putativa proteína serina/treonina quinase receptora PERK1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) – At3g24550</b>	<b>NM_113366</b>
<i>At</i> PERK2	Putativa proteína quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At3g24400	AY536853
<i>At</i> PERK3	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At3g24540	NM_113365
<i>At</i> PERK4	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At2g18470	NM_127403
<i>At</i> PERK5	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At4g34440	NM_119609
<i>At</i> PERK6	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At3g18810	NM_112767
<i>At</i> PERK7	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At1g49270	NM_103818
<i>At</i> PERK8	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At5g38560	NM_123217
<i>At</i> PERK9	Putativa proteína quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At1g68690	AY113877
<i>At</i> PERK10	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At1g26150	NM_102380
<i>At</i> PERK11	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At1G10620	NM_100938
<i>At</i> PERK12	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At1g23540	NM_102203
<i>At</i> PERK13	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At1g70460	NM_105714
<i>At</i> PERK14	Putativa proteína quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At4g32710	AY536857
<i>At</i> PERK15	Putativa proteína serina/treonina quinase receptora ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – At1g52290	NM_104108

**Tabela 4.2.** Oligonucleotídeos utilizados em ampliações específicas

Oligonucleotídeo	Seqüência	Região de anelamento
AtNsAKAFG Fwd	5'- <u>AAAAAGCAGGCTTCACAATG</u> tccacagcgccgtc attB1 parcial	Ponto +1 de NsAK
AtNsAKStG Rvs	5'- <u>AGAAAGCTGGGT</u> Cttaagagaggggccactata attB2 parcial	Região terminal de NsAK
NsAK712F-GA	5'- <u>AAAAAGCAGGCTTCACAATG</u> gagtagcagtggtg attB1 parcial	Nucleotídeo 412 de NsAK
NsAK1174FMetGA	5'- <u>AAAAAGCAGGCTTCACAATG</u> cctcatgaagattg attB1 parcial	Nucleotídeo 1174 de NsAK
NsAK-Fwd	5'-cagttcctcaactcgatctagtccc	Região flangeadora direita do T-DNA
NsAK-Rvs	5'-cctccaatggcgattcctacc	Região flangeadora esquerda do T-DNA
SALK LB1	5'- ggcaatcagctgtgcccgtctcactggtg	Região interna do T-DNA

\* Estão indicadas na tabela as seqüências parciais de recombinação.

#### 4.4. Identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com NSP de geminivírus

##### 4.4.1. Obtenção de biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*

Uma biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana* foi obtida a partir do mRNA total, o qual foi extraído pelo método TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Inc.). O cDNA foi sintetizado por reação de RT-PCR por meio do Kit SuperScript RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Inc.), segundo manual técnico do produto, utilizando-se oligonucleotídeo poli-dT como iniciador. As condições de reação adotadas consistiram de 2 horas a 45° C, 15 minutos a 75°C para inativação da transcriptase reversa, 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos (45 segundos a 94°C, 1 minuto e 30 segundos a 55°C e 2 minutos a 72°C), e posteriormente 10 minutos a 72°C.

Esta biblioteca de cDNA foi fusionada ao domínio de ativação de GAL4 no vetor pEXAD502 Leu<sup>-</sup> (Invitrogen Life Technologies, Inc.). O clone pBD-NSPCLCV, o qual contém o domínio de ligação ao DNA de GAL4 fusionado à seqüência de NSP de CaLCuV, já foi previamente descrito (Fontes *et al.*, 2004). Os plasmídeos recombinantes pBD-NSPTGMV, pBD-NSPTCrYLC, e pBD-NSPCLCV, contendo o domínio de ativação GAL4 fusionado a seqüências de NSP de TGMV (Fontes *et al.*, 1994b), TCrYLC (Galvão *et al.*, 2003) e CaLCuV (Hill *et al.*, 1998), respectivamente, já foram previamente descritos (Fontes *et al.*, 2004).

#### 4.4.2. Ensaio de Sistema Duplo Híbrido

A levedura utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem MaV203 (*MAT $\alpha$* , *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3200*, *ade2-101*, *gal4*, *gal80*, *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3UAS GAL1::HIS3@LYS2*, *can1R*, *cyh2R*), a qual é deficiente na produção de triptofano, leucina e uracila (Trp<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>). Células competentes de MaV203 foram seqüencialmente transformadas com pBD-NSPCLCV e 25  $\mu$ g da biblioteca de cDNA em pEXAD502, juntamente com 3  $\mu$ g de DNA carreador de esperma de salmão, pelo método acetato de lítio/poli(etileno)glicol (PEG). Os transformantes foram plaqueados em meio seletivo (SD, *Synthetic Dropout*) com deficiência em triptofano, leucina, uracila e histidina, mas suplementados com 3-aminotriazol 25 mM e crescidos por três a cinco dias a 30°C. As interações foram posteriormente confirmadas por ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase, a partir de extratos de levedura, como descrito em Uhrig *et al.* (1999). As células de leveduras foram coletadas na fase exponencial e ressuspensas em tampão de extração (fosfato de sódio 100 mM pH 7,0; KCl 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 1 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM e dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,05% (p/v)), e a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi medida com o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosose (ONPG, Sigma). Foram usados, como controle negativo, leveduras não transformadas e transformadas apenas com a construção de DNA e, como controle positivo, leveduras transformadas com pGAL4, expressando a proteína GAL4 completa.

Células transformadas com o vetor vazio foram usadas como controle negativo, leveduras transformadas com pGAL4 que expressa o transativador completo de GAL4 foram usadas como controle positivo. Leveduras transformadas somente

com as construções de cDNA foram usadas para testar se as proteínas codificadas pelos mesmos seriam capazes de transativar ou promover a complementação de ligação das proteínas recombinantes. Aproximadamente, foram obtidos  $5 \times 10^6$  transformantes, estimativa baseada no número de transformantes crescidos por placa de SD Trp<sup>-</sup> e Leu<sup>-</sup>. O DNA plasmidial foi recuperado de levedura e inserido em *E. coli* linhagem XL1 Blue (Stratagene) por eletroporação (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **4.5. Confirmação e caracterização da interação entre NSP e AtNsAK *in vitro***

##### **4.5.1. Transcrição e tradução *in vitro* de NsAK**

Para a transcrição e tradução *in vitro* das proteínas, a região codificadora de NsAK e os respectivos fragmentos KD<sup>238-652</sup> e  $\Delta$ KD<sup>392-652</sup> foram transferidos do vetor de entrada para o vetor de transcrição dependente da T7 RNA polimerase; pDEST14, por meio de uma reação de recombinação, com o auxílio da enzima LR Clonase (Invitrogen Life Technologies, Inc.), resultando nos clones pTR-NsAK, pTR-KDNsAK e pTR- $\Delta$ KDNsAK. Para expressar *in vitro* as versões intacta e truncadas de NsAK, 1  $\mu$ g de plasmídeo recombinante, contendo o inserto apropriado em pDEST14 (como descrito anteriormente) foi expresso em um sistema de transcrição e tradução *in vitro*, contendo células lisadas de reticulócitos de coelho, suplementado com [<sup>35</sup>S]-metionina e T7 RNA polimerase (Promega).

##### **4.5.2. Expressão heteróloga e purificação da proteína fusionada GST-NSP**

Células competentes de *Escherichia coli*, estirpe BL21::DE3 pLysS, foram transformadas com o plasmídeo de expressão pGST-NSPCLCV (Fontes *et al.*, 2004), contendo a seqüência de GST fusionada a região codificadora de NSP de CaLCuV, por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). A seleção foi realizada por plaqueamento em meio de cultura LB sólido contendo antibiótico seletivo (ampicilina). Os transformantes foram confirmados por PCR (Sambrook *et al.*, 1989) com oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse.

O clone pGST-NSPCLCV em bactéria *E. coli* BL21::DE3 pLysS, que contém um gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lac* (NOVAGEN)

foi crescido em 1 L de meio líquido seletivo LB, contendo ampicilina 100 mg.L<sup>-1</sup>, até A<sub>600</sub>= 0,6. O clone foi induzido com isopropil-β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) 0,4 mM e incubado a 20°C por 16 horas a 200 rpm. Após o período de indução, o nível de proteína produzida foi analisado por meio de extração de proteínas totais, solúveis e insolúveis (segundo manual Novagen), as quais foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecyl sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

A proteína recombinante fusionada GST-NSP foi purificada por cromatografia de afinidade, utilizando resina de GST-Sepharose (Amersham), de acordo com instruções do fabricante. A eficiência da purificação foi observada em SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

#### **4.5.3. Ensaio de interação *in vitro***

A interação específica entre NSP e NsAK foi demonstrada por ensaio de precipitação com GST (“GST pull-down”). As versões intacta e truncadas, domínio de quinase ativo, KD, e inativo, ΔKDNsAK, (sem o domínio de ligação a nucleotídeo (NBS)) traduzidas *in vitro* e marcadas com [<sup>35</sup>S]metionina, foram incubadas por 1 hora a 4°C com 50 μl de resina de Glutathione-Sepharose ligadas a GST e GST-NSP purificadas. As proteínas purificadas, GST-NSP ou GST. Os complexos resultantes foram isolados com resinas de Glutathione-Sepharose (Fontes *et al.*, 2004). As proteínas ligadas foram analisadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e foram visualizadas por auto-radiografia.

#### **4.5.4. Ensaio de fosforilação *in vitro*.**

Para o ensaio de fosforilação *in vitro*, 2 μg de plasmídeo recombinante contendo o inserto apropriado em pDEST14 (como descrito anteriormente) foi utilizado em um sistema de transcrição e tradução *in vitro* suplementado com T7 RNA polimerase (Promega). Uma alíquota (15 μL) da mistura de reação foi incubada sozinha ou juntamente com GST-NSP por 30 minutos a 25°C em 30 μL de tampão de quinase, contendo HEPES 18 mM pH 7,4; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; MnSO<sub>4</sub> 10 mM; DTT 1 mM; ATP 10 μM e [<sup>γ</sup>-<sup>32</sup>P]ATP 5 μCi. As fosfoproteínas foram analisadas em SDS-PAGE. O

gel foi corado com *Coomassie Brilliant blue* para verificar o carregamento de proteínas, seco e submetido à auto-radiografia. A radioatividade incorporada nas bandas de proteínas foi quantificada por *Phosphoimaging*. A banda correspondente à fosfoproteína de maior peso molecular foi utilizada como um controle interno para normalizar o sinal de radioatividade.

#### **4.6. Avaliação da ação de NsAK sobre a infecção viral**

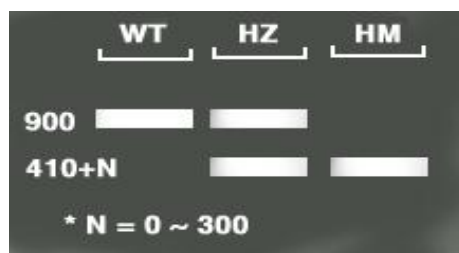
##### **4.6.1. Obtenção e seleção de plantas *knock out* homozigotas para NsAK**

O Salk Institute tem indexado um conjunto de mutantes, cuja seqüência do locus mutado é conhecida, e estes mutantes estão disponíveis através do ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*). Dentre estes mutantes foi selecionado o SALK\_008504, no qual o T-DNA está inserido na região 5' UTR do gene *At3g24550* (*NsAK*). As sementes obtidas foram semeadas em placa contendo meio MS (adaptado de Murashige e Skoog (1962)) e incubadas a 22°C, com fotoperíodo de 16 horas por 15 dias e depois transplantadas para vaso.

Para a seleção de plantas homozigotas, foi extraído o DNA genômico das plantas mutantes. Uma folha de cada planta mutante foi macerada em N<sub>2</sub> líquido, com adição de 200 µL tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; SDS 0,5% (p/v) e EDTA 25 mM) e a mistura foi homogeneizada em vortex por 5 min. Os restos celulares foram precipitados por centrifugação a 14.000 x g por 5 min à temperatura ambiente. O DNA foi precipitado com isopropanol 50% (v/v) por 10 min à temperatura ambiente, recuperado por centrifugação a 14.000 x g por 6 min e lavado com etanol 75% (v/v). O pellet foi seco em Automatic Environmental SpeedVac System AES1010 (Savant) por 5 min e ressuscitado em 30 µL de água mili-Q autoclavada.

A genotipagem de SALK\_008504 foi realizada por PCR. Alelos selvagens foram identificados com oligonucleotídeos específicos para *NsAK* (*NsAK-Fwd* e *NsAK-Rvs*) (Tabela 4.2), e para a detecção de alelos nulos foi utilizado o oligonucleotídeo *NsAK-Rvs* em combinação com o oligonucleotídeo SALK LB1. A reação de PCR foi confeccionada de acordo com Sambrook *et al.* (1989), entretanto, foram utilizados os

três oligonucleotídeos na mesma reação. A genotipagem é baseada no número e no tamanho das bandas resultantes do PCR (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Exemplo de genotipagem de plantas *knock out*. Os oligonucleotídeos são desenhados para possibilitar a diferenciação de plantas selvagens (WT), heterozigotas (HZ) e *knock out* homozigotas (HM).

#### 4.6.2. Extração de RNA total de *Arabidopsis thaliana*

O RNA total foi extraído de plântulas de *Arabidopsis* utilizando 100 mg de tecido vegetal macerado em N<sub>2</sub> líquido e homogeneizado com 1 mL do reagente TRIzol (SIGMA). Incubou-se a mistura à temperatura ambiente por 5 minutos e posteriormente foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada manualmente por 15 segundos, incubada à temperatura ambiente por 3 minutos e seguida por centrifugação a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, livre de RNase. O RNA foi precipitado com isopropanol 50% (v/v) à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000 x *g* por 10 minutos. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) (preparado com água livre de RNase) e centrifugado a 7.500 x *g* por 10 minutos. Em seguida, o RNA foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos, e ressuscitado com 20 µL de água livre de RNase e estocado a -80°C. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,05 M pH 8,0), corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.6.3. Análise da expressão de plantas mutantes *knock out* por RT-PCR

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria em espectrofotômetro DU 650 BECKMAN em A<sub>260</sub>, e a concentração foi expressa em µg.µL<sup>-1</sup>. A expressão do gene foi avaliada por RT-PCR. Para síntese do cDNA, foram utilizados 2 µg do

RNA total como molde, 0,5  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeo poli-dT, e 1U da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen Life Technologies, Inc.), seguindo as instruções do fabricante.

Para a reação de PCR, foram utilizados 5  $\mu\text{L}$  de cDNA e oligonucleotídeos específicos para *NsAK*, *NsAK1174FMet-GA* e *AtNsAKStG* (Tabela 3.2). Também foram utilizados oligonucleotídeos específicos para uma nucleoporina-like para avaliar a quantidade e qualidade do cDNA. As condições de reação adotadas foram de 3 min a 94° C, seguido de 30 ciclos (45 s a 94° C, 1 min e 30 s a 55° C e 2 min a 72° C), e posteriormente 10 min a 72° C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research Inc, USA) e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

#### 4.6.4. Ensaio de infectividade

Plasmídeos contendo repetições parciais em série do DNA-A, com mutação no gene que codifica a capa protéica, e do DNA-B de CaLCuV (1 e  $\frac{1}{2}$  cópia de cada um dos componentes) foram extraídos a partir de *E. coli*, utilizando-se o “Plasmid Midi Kit” (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade e a integridade do DNA foram analisadas em gel de agarose 1% (p/v) e a concentração foi avaliada por espectrofotometria a  $A_{260}$ .

Aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  de cada componente de DNA foram precipitados em micropartículas de tungstênio, na presença de  $\text{CaCl}_2$  1 M e espermidina 15 mM, e lavadas com etanol absoluto. Cada preparação foi distribuída em 5 membranas carreadoras. As membranas preparadas foram devidamente encaixadas no acelerador de partículas e lançadas, sob vácuo formado com gás hélio, com uma aceleração de 160 psi, de acordo com Schaffer *et al.* (1995). Como controle foram utilizadas plantas de ambas linhagens inoculadas apenas com tungstênio, sem DNA viral.

Logo após o bombardeamento, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 22° C, com 16 horas de fotoperíodo e observadas quanto ao aparecimento de sintomas até 20 dias após a inoculação. Para os experimentos de análise de infecção, foram utilizadas plantas selvagens Col Ø e mutantes *nsak*, no estágio de desenvolvimento correspondente a sete folhas. Em cada repetição, foram utilizadas 15 plantas de cada linhagem, que foram inoculadas com plasmídeos contendo repetições parciais em série do DNA-A e B de CaLCuV.

Durante a análise dos sintomas, as plantas inoculadas foram observadas em intervalos de dois dias e fotodocumentadas. Foram levados em consideração sintomas como: necrose foliar, clorose foliar, epinastia, enrolamento, enrugamento e

morte de folhas jovens e atraso no desenvolvimento e crescimento. Para confirmar a presença do genoma viral em plantas sintomáticas, o DNA total das plantas inoculadas foi extraído (de acordo com método já descrito no item 4.5.1) e usado como molde em reações de PCR utilizando oligonucleotídeos degenerados (Rojas *et al.*, 1993), que amplificam fragmentos específicos do DNA-B de geminivírus. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### **4.7. Análise do padrão de expressão de *NsAK*.**

Os diferentes órgãos de *Arabidopsis thaliana* da planta selvagem Col 0 (plântulas, flores, folhas e raízes) foram coletadas separadamente. Aproximadamente 200 mg de tecido vegetal foram macerados em  $\text{N}_2$  líquido e o RNA total foi extraído pelo método TRizol (SIGMA), descrito anteriormente. O RNA total foi quantificado por espectrometria em espectrofotômetro DU 650 BECKMAN com  $A_{260}$ , e a concentração foi expressa em  $\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ . A expressão do gene foi avaliada por RT-PCR, utilizando-se 2  $\mu\text{g}$  do RNA total como molde, 0,5  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeo poli-dT, e 1 unidade de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen Life Technologies, Inc.), seguindo as instruções do fabricante, para síntese do cDNA..

Para a reação de PCR foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  e os mesmos oligonucleotídeos específicos para o gene *NsAK*, *NsAK1174F*Met-GA e *AtNsAKStG*, e *NSP*. A quantidade e qualidade do cDNA foi avaliada, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene de uma nucleoporina-like na mesma reação de PCR. As condições de reação foram de 3 min a 94° C, seguido de 30 ciclos (45 s a 94° C, 1 min e 30 s a 55° C e 2 min a 72° C), seguindo 10 min a 72° C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research Inc, USA) e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## V. RESULTADOS

### 5.1. Identificação de uma PERK-like quinase que interage com NSP

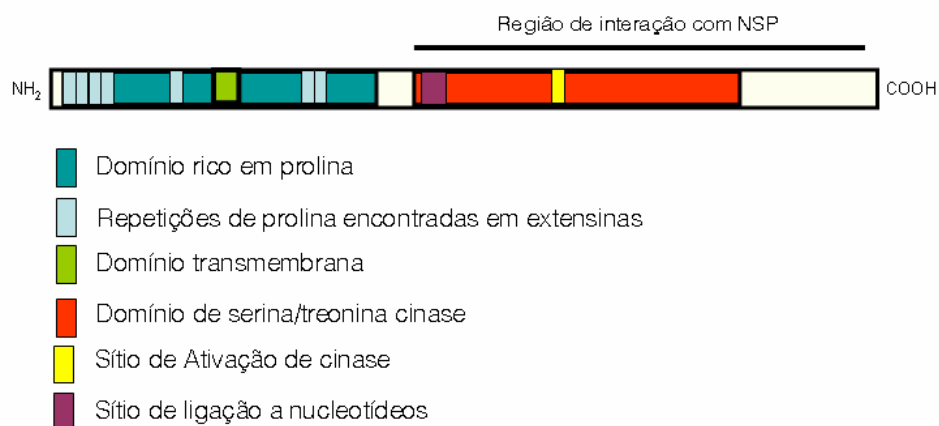
Para a identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com a proteína viral NSP foram realizados ensaios de duplo híbrido em levedura, os quais identificaram diversas proteínas, inclusive a já descrita AtNIK (“*NSP-interacting kinase*”) (Fontes *et al.*, 2004; Mariano *et al.*, 2004). A presente investigação descreve a caracterização de NsAK (“*NSP-associated kinase*”), uma PERK-like quinase com conformação característica de receptor transmembrana. De um total de  $5 \times 10^6$  duplo transformantes independentes que foram analisados por sua prototrofia para Ura e His e atividade de  $\beta$ -galactosidade (Figura 5.1), três clones positivos identificados codificam um domínio truncado de quinase do gene de *Arabidopsis* At3g24550, designado NsAK

A proteína NsAK deduzida contém 652 resíduos de aminoácidos (Mr 69,271 e pI 8,51) e é estruturalmente relacionada com a superfamília de receptores serine/treonine quinases RLK (“*Receptor-Like Kinase*”). Apresentando um domínio N-terminal composto por uma região rica em prolina, com repetições de hidroxiprolina semelhantes às encontradas em extensinas, as quais são caracterizadas pelo pentapeptídeo Ser(Hyp)<sub>4</sub>, onde ambos estão glicosilados. Este domínio é seguido por um segmento de 23 resíduos de aminoácidos, que correspondem a um possível domínio transmembrana hidrofóbico (<sup>138</sup>TGVVVGTAIGGVAILVILTLICL<sup>160</sup>), e, no C-terminal, um domínio catalítico de serina/treonina quinase, o qual apresenta os 11

subdomínios típicos da família de proteína quinases eucarióticas (Figura 5.2 e 5.3). Baseada na organização modular rica em prolina do seu domínio N-terminal, NsAK pertence à subfamília PERK-like (*“Proline-rich Extensin-like Receptor Kinases”*) da superfamília RLK (Shiu e Bleecker, 2001).

Isca	Presa	His-	Ura-	$\beta$ -Galactosidase
NSP	PERK-like kinase	+	+	
Vector	PERK-like kinase	-	-	

**Figura 5.1.** Interação de NsAK e a proteína NSP de CaLCuV em leveduras. Uma biblioteca de cDNA de *Arabidopsis* foi inserida no vetor pEXAD502, que contém o domínio de ativação de GAL4 e co-transformados em Mva203 com a proteína NSP de CaLCuV previamente fusionada ao domínio de ligação de GAL4 dentro do vetor pBDLeu. Células de levedura expressando ambas proteínas recombinantes foram plaqueadas em meio seletivo na ausência de leucina, triptofano e histidina ou uracila e crescidas por 3-5 dias a 30°C. As interações foram posteriormente confirmadas pelo ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase dos extratos protéicos de levedura com *o*-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosose.



**Figura 5.2.** Representação esquemática dos domínios conservados de AtNsAK. A região de interação com NSP, contida dentro do domínio de serina/treonina quinase, está indicada no diagrama. A estrutura desta proteína foi construída com base em sua anotação gênica, a qual foi obtida no banco de dados do TAIR web site.

```

NsAK      MSTAPSPGTTSPSPSPPTNSTTTTPPPAASSPPPTTTPSSPPSPSTNSTSPPPSSPL 60
BnPERK1  ..S.....G---.....S.....SA...--.....-...IP.....RS 54
OsPERK1  ..-----..S...PANQ.A....N-----QTAA...ASNNS.SP.A.G.L 42

NsAK      PPSLPPPSPPGSLTP----PLPQSPSPAPITP-SPPSPPTTSPNERSPPSPNQGPNTPS- 114
BnPERK1  TP.A.....TPS..GSEP.....P..T..G...A.V...-T.N..PSVE...SN..R 113
OsPERK1  ...LT..AA.-----..PS-T...-S.....----- 62

NsAK      -GSTPRTPSNTKPSPPSDSSDGLSTGVVVUGIAIGG--VAILVILTLCILCKKKRRRRHD 171
BnPERK1  E.GS..P.--S....P.....--..L..V.....-- 167
OsPERK1  -----AAAAAA..S..T.P....VV..LV.LL..TIL.V..FK...HHH.H 110

NsAK      DEAA-----YY---VPPPPPSGPKAGGPGYGGQQQYQQQNASRPSDNHVVTSLPPP-K 220
BnPERK1  E.D.-----..---.....P.....Q.R...TP...-.....P. 216
OsPERK1  PPPPPPHLLH..GHPP....PP.FK.DH...VY.N.Q.NGPPP.P.-..LK----- 163

NsAK      PPSFPRKPPPPPPFAFMSSSGSDYSDLF-VLFPSPGLVLGFSKSTFTYEELSRATNG 279
BnPERK1  A....Q.....-.....-.....A.... 274
OsPERK1  V..H.-S....A.LNVH.GGS..N..GGDSQ.LV...AA....RC....D..A..D. 222

NsAK      FSEANLLGQGGFGYVHKGILPSGKEVAVKQLKAGSGQGEREFQAEVEIISRVRHRLVSL 339
BnPERK1  .....V.....V..... 334
OsPERK1  ..D.....V..N.T.....RD.....K...T. 282

NsAK      IGYCMAGVQRLLVYEFVENNNLEFHLHGKGRPTMEWSTRLKIALGSAKGLSYLHEDCNPK 399
BnPERK1  .....AK.....L...E..... 394
OsPERK1  V...IS.GK.....Y...T..L...R.....P...R...A...A.....H.. 342

NsAK      IIHRDIKASNILIDFKFEARVADFLAKIASDTNTHVSTRVMGTFGYLAPEYAASGKLTE 459
BnPERK1  ..... 454
OsPERK1  .....SA...L.AR.....LT..N.....S..Q... 402

NsAK      KSDVFSFGVVLELITGRRPVDANNVYVDDSLVDWARPLLNRASEEGDFEGLADSKMGNE 519
BnPERK1  .....Q.....A..N.G 514
OsPERK1  .....M.....RS.QSQM.....MM...DD.NYDA.V.PRLGQE 462

NsAK      YDREEMARMVACAAACVRHSARRRPRMSQIVRALEGNVSLSDLNEGMRPGHSNVYSSYGG 579
BnPERK1  .....Q..... 574
OsPERK1  .NGN....I.....V.....D..D....V....RFLG..N- 521

NsAK      STDYDTSQYNDMIKFRMALGTQEYGTGGEYSNPTSQDYGLYPSGSSSEGQATREMEMGK 639
BnPERK1  .....S...E..K.....L.....NAT.....T..... 634
OsPERK1  .NE...GH..E.LK.....P.SGNLESSQQTQPTTEFVFNRSV.MGDARQIPET....S 581

NsAK      IKKTGGQYSGPSL--- 652
BnPERK1  .....--- 647
OsPERK1  L..D.DSNGTRDSQAS 597

```

**Figura 5.3.** Alinhamento da seqüência deduzida de NsAK com proteínas PERK-like. A seqüência de NsAK (*Af3g24550*), de *BnPERK1* e de *OsPERK1* foram obtidas a partir de banco de dados. Os pontos representam identidade com NsAK e os traços e brechas foram introduzidos pelo CLUSTALW para maximizar a identidade. A região rica em prolina está representada em negrito e o domínio transmembrana putativo em uma caixa. Os 11 subdomínios típicos da família de proteínas quinases eucarióticas estão sublinhados e identificados por números romanos.

Entre os 15 membros da subfamília PERK-like RLK de *Arabidopsis*, NsAK compartilha a maior identidade de seqüências com o produto do gene *At3g24400* (63% de identidade), seguido por *At3g24540* (62%) e *At1g52290* (54%) cujas funções são desconhecidas. A análise filogenética desta subfamília, bem como a organização estrutural deduzida de seus membros está representada na Figura 5.4. Estendendo a análise para banco de dados de proteínas de plantas em geral, NsAk é mais relacionada com a *Brassica napus* PERK1 (*BsPERK1*, número de acesso no GenBank AY028699, 85% de identidade de seqüência) (Figura 5.3). Também apresenta uma conservação significativa da estrutura primária com um homólogo em *Oriza sativa* (*OsPERK1*, NP\_913464, 57% de identidade) (Figura 5.3). Estas proteínas correspondem a possíveis proteínas serina/treonina quinases com conformação característica de receptor transmembrana, sendo que todas apresentam função desconhecida.

Também foi avaliada a capacidade de NsAK interagir com NSP de dois geminivírus que infectam tomateiros, TGMV e TCrLYV, pelo sistema duplo-híbrido. As proteínas-isca foram expressas fusionadas ao domínio de ligação de GAL4 (BD), e as proteínas-presa foram expressas fusionadas ao domínio de ativação de GAL4 (AD), em leveduras. Foi utilizado como isca o domínio de quinase C-terminal de NsAK ( $\Delta$ KD-NsAK), onde ocorreu a deleção do sítio de ativação (NBS) tornando-o inativo mas mantendo sua capacidade de se ligar a um possível substrato. A proteína de ligação a sacarose de soja, SBP (“*Sucrose Binding Protein*”), não relacionada com quinases, foi utilizada como controle negativo no ensaio de sistema duplo híbrido.

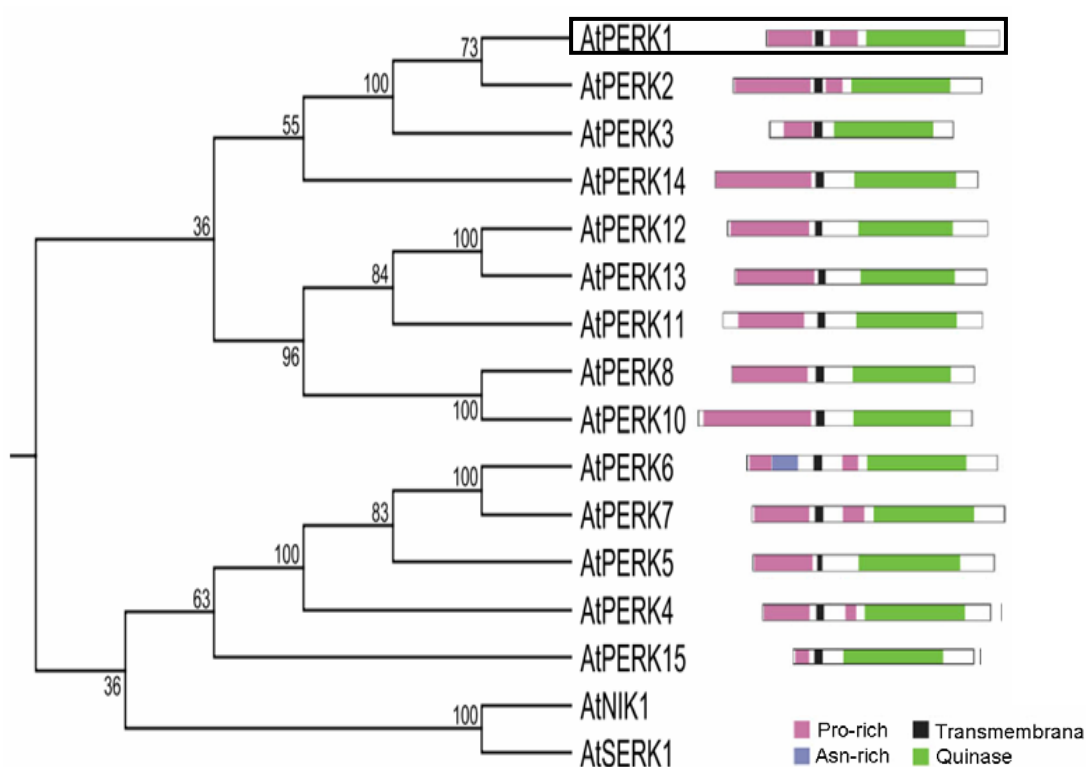
As interações foram monitoradas pela ativação dos genes repórteres, resultando em prototrofia a histidina e uracila e, posteriormente, foram confirmadas pela determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase em extratos de proteínas de levedura (Tabela 5.1). O domínio truncado de quinase de NsAK também interage com NSP de TGMV e TCrLYV indicando que a formação do complexo NsAK-NSP não é vírus-específica.

**Tabela 5.1.** Interação de NSP de Geminivírus que infectam *Arabidopsis* e tomate com NsAK em levedura

Presca	pAD-ΔKD-NsAK				pAD-SBP			
	+U +H	-H +3AT	-U	+β-Gal <sup>a</sup>	+U +H	-H +3AT	-U	+β-Gal
pBD-NSPCLCV	+	+	+	0.43 ± 0.07	+	-	-	0.0
pBD-NSPTGMV	+	+	+	0.37 ± 0.11	+	-	-	0.0
pBD-NSPTCrYLV	+	+	+	0.26 ± 0.05	+	-	-	0.0
pBD-Leu	+	-	-	0.0	+	-	-	0.0

<sup>a</sup>Valores para atividade são resultantes de quatro réplicas e são representados juntamente com seus desvios padrões (±).

(U) uracila; H (histidina); (3AT) 25 mM 3-aminotriazol; (β-Gal) atividade de β-galactosidase



**Figura 5.4.** Filogenia e organização dos domínios das quinases pertencentes à subfamília *AtPERK*. A árvore representa as relações filogenéticas dos diferentes membros da família. Também está representado o diagrama esquemático da estrutura de cada membro da família, destacando seus possíveis domínios. Além das quinases da família *AtPERK*, foram incluídas na homologia 2 quinases, *AtNIK1* e *AtSERK1* como seqüências “outgroup”.

Proteínas serina/treonina quinases do tipo receptores formam uma extensa família em plantas e são altamente conservadas tanto em animais quanto em plantas, mesmo entre diferentes subfamílias de proteínas quinases. A comparação da seqüência de aminoácidos do domínio de quinase de *AtNsAK* com *AtPERK*, *AtPERK2*, *AtPERK4*, *AtPERK5*, *AtPERK6*, pertencentes à família *AtPERK*, além de *AtNIK1* e *AtSERK1*, não pertencentes a esta família, comprovou uma grande homologia entre os domínios destas diferentes quinases, apresentando alguns aminoácidos conservados em todas as seqüências analisadas e alguns conservados somente dentro da família (Figura 5.5A).

Uma vez que a interação entre NSP e *AtNsAK* ocorreu na região carboxi-terminal de *AtNsAK*, onde se encontra o domínio de quinase, o potencial de fosforilação deste domínio também foi avaliado, com o auxílio do software NetPhos 2.0. A análise da seqüência de aminoácidos de *AtNsAK* demonstrou a ocorrência de resíduos de serina e treonina, em um contexto favorável para a fosforilação por quinase do tipo serina/treonina (Figura 5.5B), o que infere que esta quinase é possivelmente ativada através de fosforilação por outra quinase do mesmo tipo, ou até mesmo por um processo de autofosforilação. Entretanto esta hipótese não foi avaliada bioquimicamente.

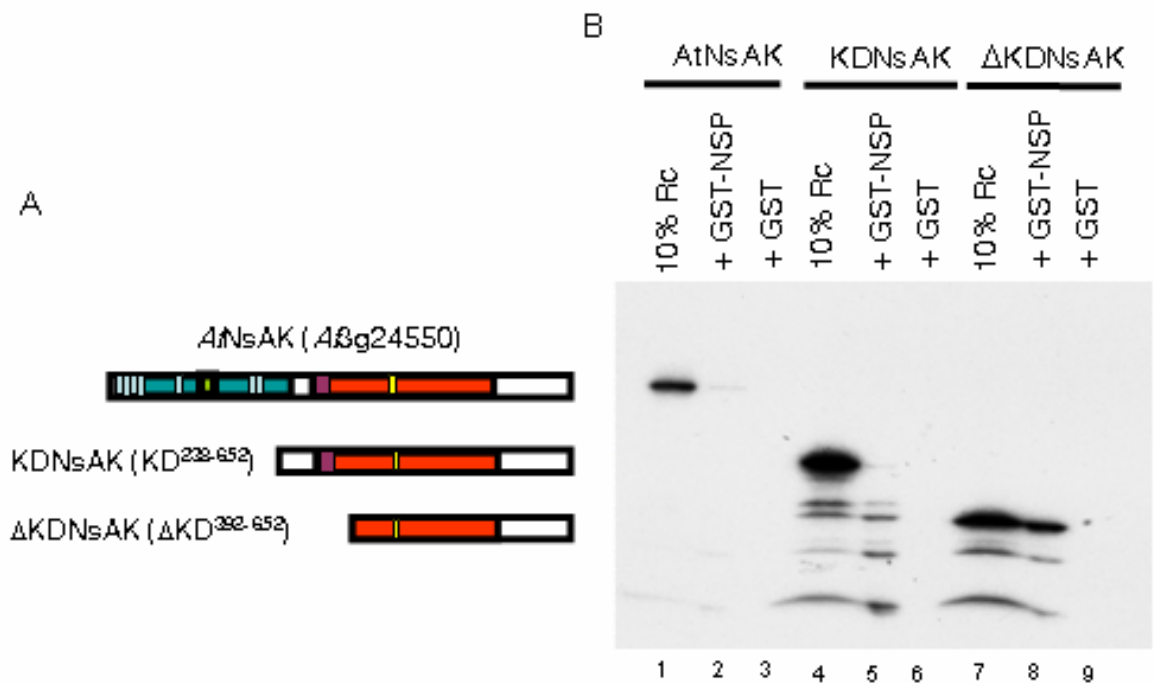


## 5.2. NSP interage estavelmente com o domínio de quinase inativo de NsAK *in vitro* e pode atuar como substrato para NsAK.

A interação específica entre NSP e NsAK também foi demonstrada por ensaio de precipitação com GST (“GST pull-down”). Proteínas purificadas, GST-NSP ou GST, foram incubadas com NsAK intactas traduzidas *in vitro* e marcadas com [<sup>35</sup>S] metionina, bem como o domínio de quinase (KD) ou o domínio de quinase inativo, sem o domínio de ligação a nucleotídeo (NBS), como indicado na Figura 5.6. Enquanto o C-terminal  $\Delta$ KD-NsAK, no qual os subdomínios I e II críticos para serina/treonina quinases foram deletados, interage estável e fortemente com NSP (linha 8), a interação da proteína viral tanto com o domínio de quinase potencialmente ativo (linha 5) quanto com a proteína  $\Delta$ NsAK intacta (linha 2) é dificilmente detectada no ensaio *in vitro*.

Este mecanismo para a formação do complexo NSP-NsAK se assemelha a uma interação enzima-substrato sob uma alta eficiência catalítica e pode indicar que NsAK fosforila a proteína viral. Neste caso, a inabilidade do domínio de quinase em executar sua atividade catalítica resultaria em uma interação não-produtiva do complexo enzima-substrato, aumentando a estabilidade da formação do complexo, como no caso da proteína truncada  $\Delta$ KDNsAK. Consistente com esta noção, polipeptídeos truncados de NsAK, os quais foram produzidos pela reação de transcrição e tradução *in vitro* de KDNsAK e  $\Delta$ KDNsAK, ligam-se a GST-NSP (linhas 5 e 8), mas não a GST sozinha, indicando que NSP específica e estavelmente interage com formas defectivas de NsAK truncada, mas não com o domínio de quinase de NsAK potencialmente ativo (Figura 5.6).

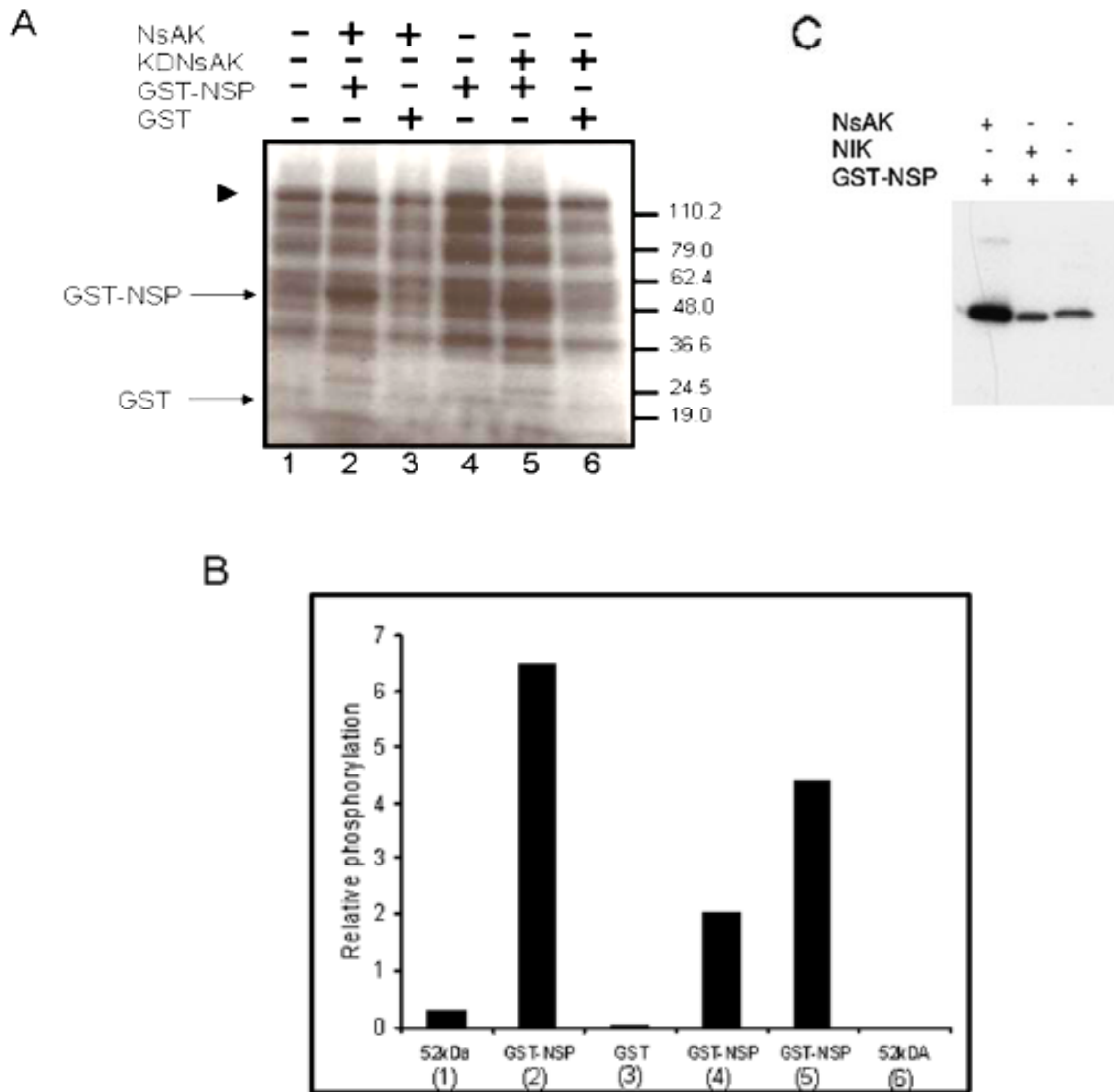
Alternativamente, esta incapacidade de interação entre a proteína NsAK, tanto a forma intacta quanto o domínio de quinase ativo, e a proteína viral NSP pode ser explicada pela presença, nestas construções, de seqüências e/ou domínios inibitórios; os quais não estariam presentes no domínio de quinase inativo,  $\Delta$ KDNsAK. Esta possibilidade não foi adequadamente explorada neste trabalho, representado uma possibilidade para trabalhos futuros, os quais podem ser baseados na construção de novas formas truncadas, nas quais estejam ausentes regiões do C-terminal.



**Figura 5.6.** Interação *in vitro* de NsAK e NSP. **A.** Representação esquemática das proteínas truncadas traduzidas *in vitro*. Diferentes formas truncadas do cDNA de *AtNsAK* foram clonados em um vetor de transcrição dependente da T7 RNA polimerase pDEST14. **B.** *Pull-down* da interação proteína-proteína *in vitro*. Proteínas transcritas e traduzidas *in vitro* e marcadas com <sup>35</sup>S, foram incubadas com GST e GST-NSP expressas em bactérias e ligadas com esferas de Glutathiona-Sepharose. Depois de extensivas lavagens das esferas, as proteínas retidas foram separadas por SDS-PAGE e visualizadas através de autoradiografia. O gel contém uma amostra (10% da reação) das respectivas reações de transcrição e tradução.

Para analisar a capacidade de NsAK de fosforilar NSP, inúmeras tentativas de expressar o domínio de quinase ativo de NsAK em *E. coli*, utilizando diversos sistemas de expressão em bactérias, foram realizadas. Similarmente, também tentativas de superexpressão de NsAK em *Arabidopsis*, tanto como proteína intacta ou fusionada a GFP (“*Green fluorescence protein*”) ou a uma cauda TAP (um truncamento da proteína A), foram conduzidas. Com exceção do domínio de quinase truncado e inativo  $\Delta$ KDNsAK, o qual é bem produzido em *E. coli*, todas as formas potencialmente ativas da quinase recombinante não foram produzidas nem em *E. coli* nem em plantas. Uma vez que, tanto a NsAK intacta quanto seu domínio de quinase potencialmente ativo foram eficientemente transcritos e traduzidos *in vitro* (Figura 5.6), o sistema de transcrição/tradução *in vitro* foi ajustado para a realização de ensaios de fosforilação *in vitro* (Figura 5.7).

Muitas proteínas endógenas dos reticulócitos são fosforiladas por quinases do reticulócitos (Figura 5.7A, linha 1), assim como a proteína fusionada GST-NSP (Figura 5.7A, linha 4), a qual exibiu um nível de marcação por [ $\gamma$ - $^{32}$ P] três vezes maior em relação a uma banda de 52 kDa (“*background*”), que co-imigra juntamente com GST-NSP (Figura 5.7B, comparar linhas 1 e 4). Todavia, a inclusão de NsAK transcrita e traduzida *in vitro* na reação de fosforilação promove um incremento de três vezes na marcação de GST-NSP por [ $\gamma$ - $^{32}$ P] (Figura 5.7B, linha 2) comparado com o sinal de fosforilação de GST-NSP por quinases do reticulócitos (linha 4). Igualmente, na presença de KDNsAK, a incorporação de sinal radioativo por GST-NSP é 12 vezes maior em comparação com GST-NSP fosforilada por quinases do reticulócito (Figura 5.7B, linhas 4 e 5) e 14 vezes maior que a correspondente banda de 52 kDa (Figura 5.7B, linha 1). A incorporação do fosfato radioativo ocorre na proteína NSP, pois GST sozinho não foi fosforilado nem por NsAK ou KDNsAK (Figura 5.7B, linhas 2 e 5). Para a melhor visualização do nível de fosforilação de NSP por NsAK, a proteína GST-NSP foi purificada a partir da reação de fosforilação (Figura 5.7C). Conjuntamente, estes resultados indicam que NsAK possui um domínio de quinase no C-terminal e NSP é fosforilada por NsAK *in vitro*.

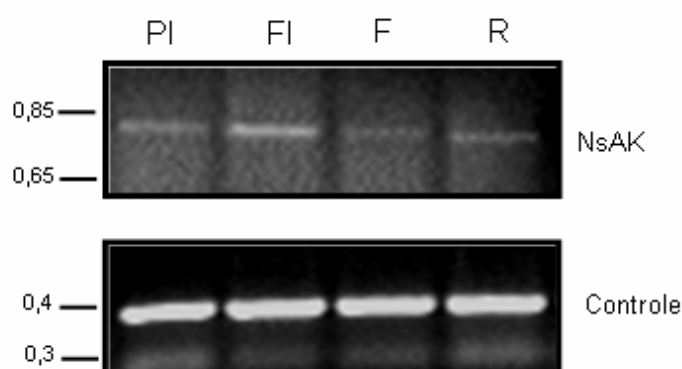


**Figura 5.7.** Ensaio de fosforilação *in vitro*. **A.** NsAK e KDNsAK foram transcritas e traduzidas *in vitro* e as misturas de reação foram incubadas com  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  e GST-NSP ou GST produzidas em *E. coli*. Depois da separação em SDS-PAGE, as fosfoproteínas foram visualizadas por autoradiografia. Na linha 1, uma mistura de reticulócitos lisados foi incubada com  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  na ausência de construções de DNA transcritas *in vitro*. **B.** Fosfoproteína GST-NSP (linhas 2, 4 e 5) foi quantificada por *Phosphoimaging* e normalizadas pelo sinal da fosfoproteína de maior peso molecular (controle interno) indicado pela triângulo em A. As linhas 1 e 6 mostram o sinal radioativo incorporado na banda de 52 kDa, expressa como porcentagem do sinal do controle interno. A linha 3 corresponde ao nível de fosforilação relativa das bandas co-imigrantes com GST. **(C)** NsAK and NIK were transcribed and translated *in vitro*, and the reaction mixtures were incubated with  $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  and purified GST-NSP. After the incubation period, the GST-NSP-phosphorylated protein was isolated on glutathione-Sepharose beads, separated by SDS-PAGE, and visualized by autoradiography.

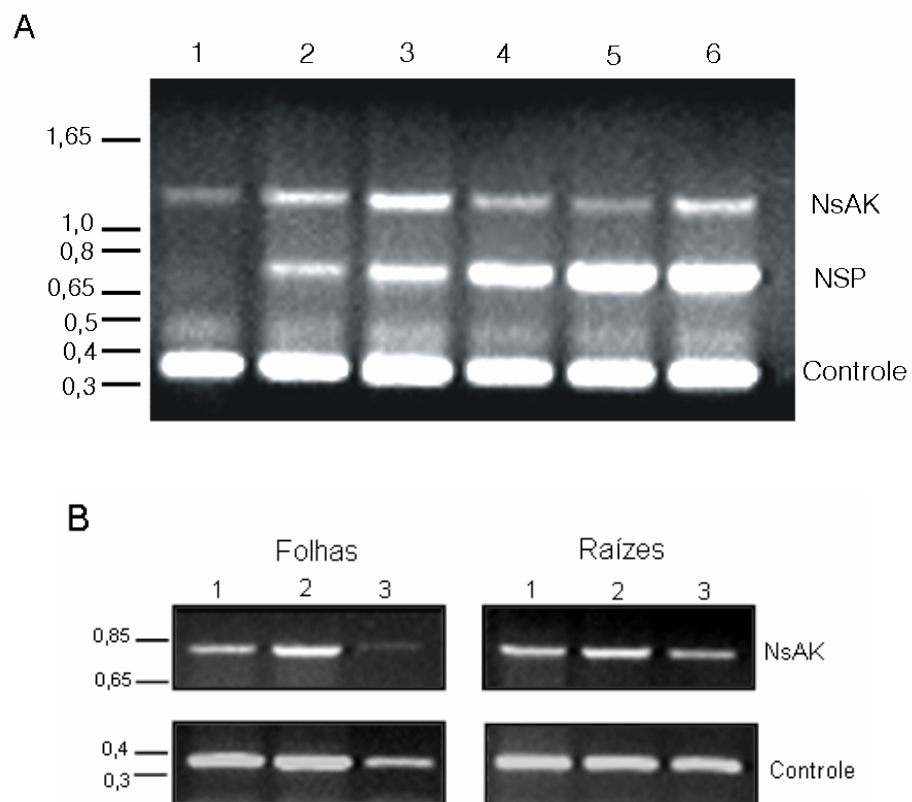
### 5.3. Os transcritos de *NsAK* são expressos de maneira ubíqua em *Arabidopsis*.

Para determinar o padrão de expressão do mRNA de *AtNsAK*, foi realizado um RT-PCR semi-quantitativo com o RNA total de diferentes tecidos de *Arabidopsis* (Figura 5.8). O mRNA de *NsAK* foi detectado em todos os tecidos investigados e seu nível de expressão apresentou variações entre os diferentes tecidos. Quando normalizados com a banda do controle, podemos inferir que o acúmulo de mRNA de *NsAK* é predominante em flores e raízes, apresentando uma menor expressão em folhas. Porém todos os tecido analisados apresentaram níveis intermediários de acúmulo de transcrito, inclusive plântulas, demonstrando que *NsAK* é expresso desde de o início do desenvolvimento da planta.

Recentemente foi demonstrado que a proteína REn de geminivírus induz a expressão de uma proteína associada no hospedeiro, da família NAC (Selth *et al.*, 2005). Desta forma, era de interesse determinar se a expressão de *NSP* poderia ter algum efeito sobre o acúmulo de transcritos de *NsAK*. Para isso, o mRNA total de folhas de *Arabidopsis* expressando *NSP* foi analisado por RT-PCR semiquantitativo (Figura 5.9A). Expressão *NSP* de CaLCuV (Figura 5.9A, linhas 2 e 3) ou de TCrLCV (Figura 5.9A, linhas 4, 5 e 6) induziu um maior acúmulo de transcritos de *NsAK* em folhas transgênicas. Entretanto, a infecção por geminivírus parece não afetar a expressão de *NsAK* em folhas e raiz de *Arabidopsis*. (Figura 5.9B).



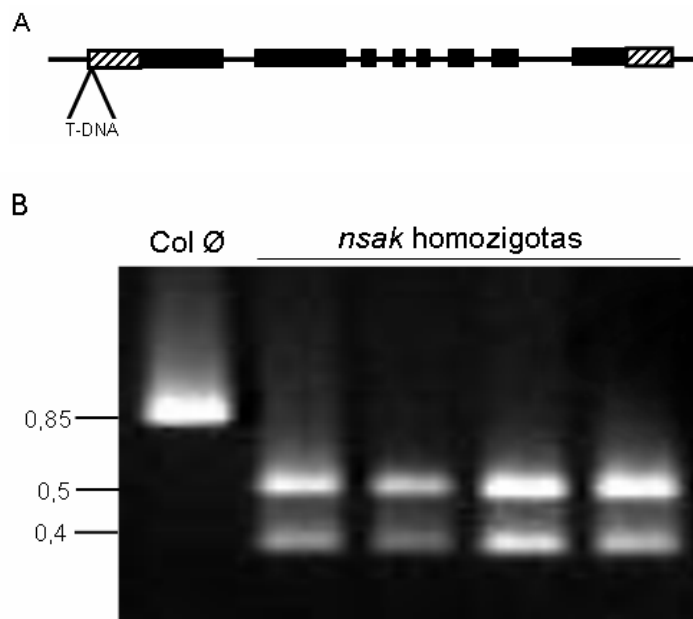
**Figura 5.8.** Transcritos de *NsAK* são expressos de forma ubíqua em *Arabidopsis*. A acumulação de transcritos de *NsAK* foi determinada por RT-PCR semiquantitativo em plântulas (PI), flores (FI), folhas (F) e raízes (R) de *Arabidopsis*. O controle corresponde ao produto de PCR do gene de uma nucleoporina-like, *AtNAP*, usado como padrão interno. As marcas do DNA padrão estão representadas no lado esquerdo da figura em kb (kilobase).



**Figura 5.9.** Análise do efeito da expressão de *NSP* no acúmulo de transcritos de *NsAK*. **A.** Análise da expressão de *NsAK* em plantas de *Arabidopsis* superexpressando *NSP*. O RT-PCR semiquantitativo foi realizado no mRNA total isolado de folhas de plantas selvagens (1), folhas de *Arabidopsis* transformadas com *NSP* de CaLCuV (2 e 3) e folhas de *Arabidopsis* transformadas com *NSP* de TCrLYV (4, 5 e 6) com oligonucleotídeos específicos para *NsAK* e *NSP*. O mRNA de uma nucleoporina-like foi utilizado como controle. **B.** Expressão de *NsAK* em plantas de *Arabidopsis* infectadas. O RT-PCR semiquantitativo foi realizado com RNA de folhas e raízes preparados a partir de plantas não infectadas (linha 1), infecção simulada (sem vírus) (2) ou infectadas (3) e oligonucleotídeos específicos para *NsAK*. O mRNA de uma nucleoporina-like foi utilizado como controle interno.

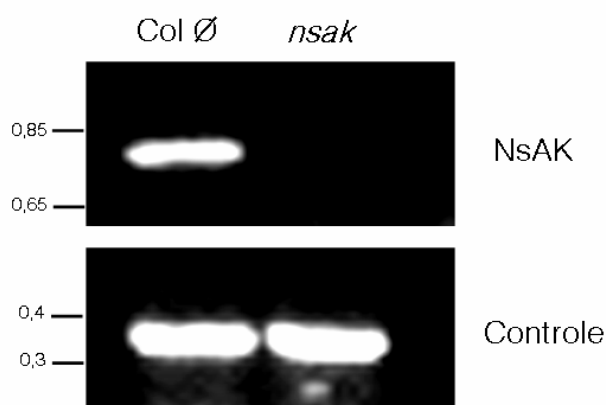
#### 5.4. A inativação do gene *NsAK* resulta na atenuação de sintomas e diminui a eficiência de infecção viral.

Para examinar diretamente o significado biológico da interação de NsAK-NSP *in vivo*, foram obtidas sementes de plantas contendo uma inserção mutacional de T-DNA no gene *At3g24550* (*NsAK*) (Figura 5.10A). Para a identificação de plantas homozigotas para a inserção do T-DNA, foi realizada uma genotipagem por PCR, (Figura 5.10B). A amplificação, com oligonucleotídeos específicos para as regiões flaqueadoras do T-DNA, produziu dois fragmentos pequenos (0,4 e 0,5 kb) nas plantas homozigotas, indicando que possivelmente houve a inserção de dois T-DNA muito próximos neste gene. Como controle foi utilizada uma planta selvagem, onde a amplificação produziu um fragmento de 0,9 kb. As plantas homozigotas identificadas tiveram suas sementes reunidas e estas foram utilizadas nos demais experimentos



**Figura 5.10.** Identificação de mutantes *nsak*. **A.** Anotação genômica do locus *NsAK* e diagrama da inserção do T-DNA. O gene está indicado na orientação 5'-3'. As caixas pretas representam os éxons. A inserção de T-DNA está indicada pelo triângulo e não está sob a escala. **B.** Seleção de linhagens homozigotas para a inserção do T-DNA em *NsAK*. O DNA isolado, a partir de plântulas de genótipo SALK\_008504 foi analisado por PCR para monitorar a presença do T-DNA. Col 0 corresponde às plantas selvagens. As marcas do DNA padrão estão representadas no lado esquerdo da figura em kb (kilobase).

Com a finalidade de comprovar o bloqueio da expressão de *NsAK*, foram conduzidos ensaios de RT-PCR com amostras de RNA de folhas de plantas de linhagens selvagens (Col Ø) e mutantes *nsak* (KO), utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *NsAK* (Figura 5.11). Enquanto o acúmulo dos transcritos de *NsAK* foi corretamente detectado nas linhagens Col Ø, não foram detectados nas plantas homozigotas para a inserção do T-DNA, confirmando a seleção do mutante *knock out* com os alelos *nsak* nulos.

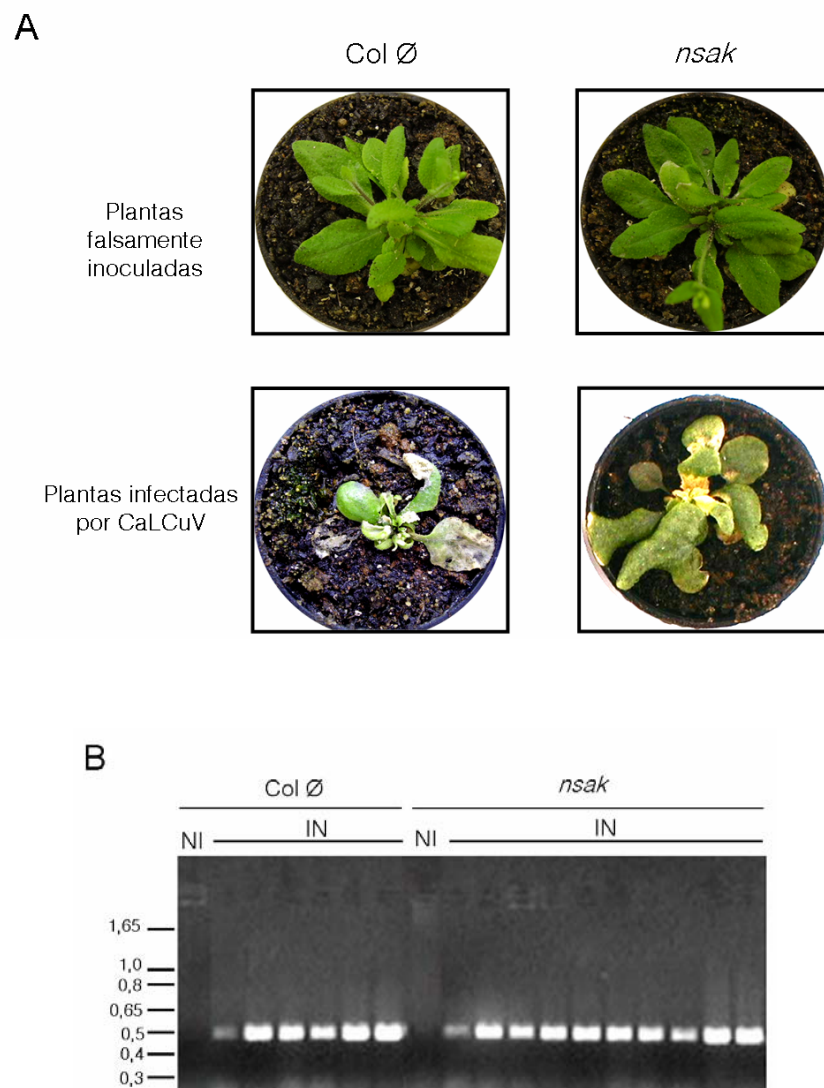


**Figura 5.11.** Análise dos transcritos de *NsAK*. O RT-PCR foi realizado com amostras de RNA de folhas de plantas Col Ø e mutantes *nsak* com oligonucleotídeos gene específicos. O mRNA de *AtNAP*, uma nucleoporina-like, foi utilizado com controle interno.

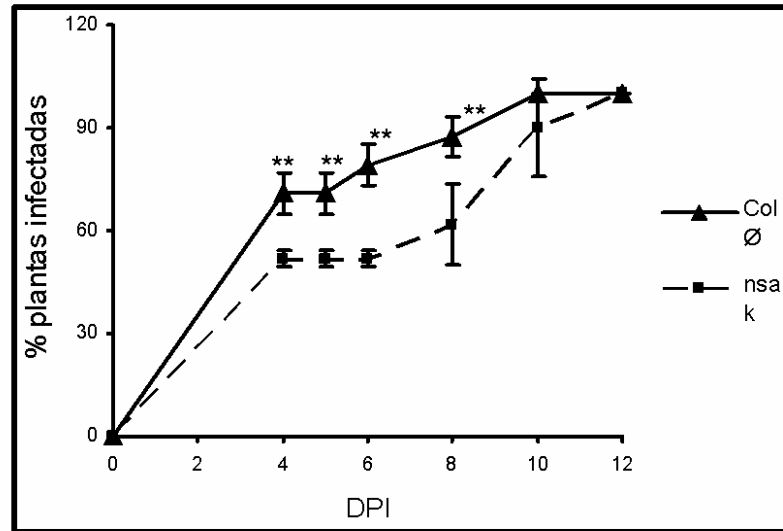
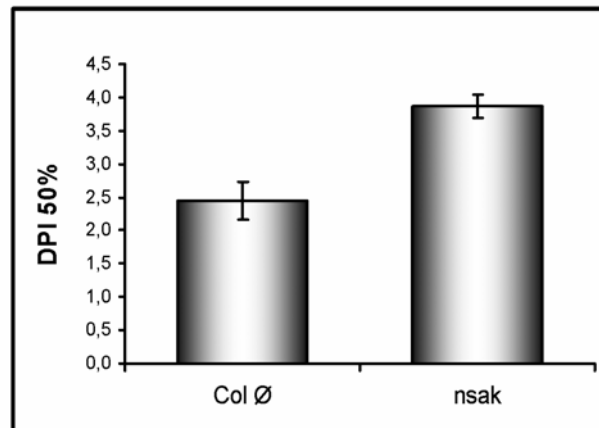
Plantas selvagens Col Ø e mutantes *nsak* foram inoculadas com o DNA-A e DNA-B de CaLCuV. Tanto plantas Col-Ø quanto *nsak* desenvolveram os sintomas típicos de infecção por CaLCuV, porém com intensidade distinta. De fato, os sintomas da infecção variaram gradativamente na severidade, de extrema redução no crescimento com clorose severa, evoluindo pra necrose sistêmica em Col Ø; para um moderado retardamento no crescimento com epinastia e clorose moderada, com pouca ou nenhuma incidência de necrose, em linhagens *nsak* (Figura 5.12A). Para a confirmação da infecção, o acúmulo do DNA viral foi detectado em plantas sintomáticas por PCR com oligonucleotídeos degenerados para begomovírus (Figura 5.12B).

O curso da infecção refletiu o fenótipo atenuado da infecção nas plantas *nsak*. De acordo com o aparecimento dos sintomas, a inativação dos alelos *NsAK*

atrasa o curso da infecção viral em comparação com plantas Col Ø, nas quais a taxa de infecção evoluiu rapidamente, atingindo o nível total de infecção em 10 dias, em média (Figura 5.13A). Os dados de infectividade também foram expressos como DPI50% (dias pós-inoculação necessários para atingir 50% de plantas infectadas), onde as plantas selvagens apresentaram um DPI50% de 2.5 dias e plantas mutantes de 3,9 dias, confirmando os resultados da atenuação (Figura 5.13B).



**Figura 5.12.** Linhagens *knock out* de *nsak* exibem um aumento na tolerância a infecção por CaLCuV. **A.** Sintomas associados com a infecção por CaLCuV em linhagens *knock out*. Repetições em tandem do DNA-A e DNA-B virais foram introduzidos nas plantas por biobalística. Acima, Col-Ø (esquerda) e *nsak* (direita) são plantas falsamente inoculadas, bombardeadas somente com partículas de tungstênio (W). Abaixo, Col-Ø e *nsak* são plantas infectadas por CaLCuV com 15 DPI (dias pós inoculação). **B.** Acúmulo do DNA viral em plantas infectadas. O DNA total foi isolado de plantas Col-Ø e *nsak* com 7 DPI e diagnosticado por PCR com oligonucleotídeos gene específicos. IN refere-se às plantas inoculadas com DNA viral e NI à plantas inoculadas somente com W.

**A****B**

**Figura 5.13** O processo de infecção é atrasado em plantas *nsak knock out*. **A.** Ecótipo Col-0 e *knock out nsak* foram infectadas com DNA de CaLCuV pelo método de biobalística. Os valores representam a porcentagem de plantas sistematicamente infectadas em diferentes dias pós inoculação (DPI) e é determinado o desvio padrão ( $\pm$ ) de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam diferenças significativas em  $P \leq 0,05$ . **B.** Taxa de infecção em alelos nulos *nsak*. A taxa de infecção está expressa com dias pós inoculação (DPI) para atingir 50% de plantas infectadas. Estes resultados diferem significativamente em  $P \leq 0,05$ . Os dados representam o desvio padrão de três experimentos independentes.

## VI. DISCUSSÃO

A proteína NSP de begomovírus transporta o DNA viral entre o núcleo e o citoplasma e coopera com MP para mover o DNA viral célula-a-célula através da parede celular. O tráfego facilitado de NSP indica que esta proteína viral interage extensivamente com fatores do hospedeiro para usurpar a maquinaria de transporte endógena do hospedeiro. Na presente investigação, é apresentada a identificação de NsAK, um novo parceiro de interação de NSP. A interação de NSP com um domínio de quinase inativo de NsAK foi identificada em levedura pelo sistema duplo-híbrido e, posteriormente, confirmada em um ensaio de interação *in vitro*. Este resultado *in vitro* sugere que a interação entre NSP e o domínio quinase inativo de NsAK seja estável e direta. Apesar disso, não foi possível detectar *in vitro* a interação de NSP com a proteína NsAK intacta. Como NsAK, transcrita e traduzida *in vitro*, foi capaz de fosforilar NSP, torna-se provável que uma alta eficiência catalítica ( $K_{cat}/K_m$ ) de NsAK sobre NSP como substrato poderia estar prevenindo a formação de um complexo enzima-substrato suficientemente estável para ser detectado no ensaio *in vitro*. Entre muitas outras possíveis razões, isto poderia explicar também porque não foi possível demonstrar a interação *in vivo* por um ensaio clássico de co-imunoprecipitação.

Já foi demonstrado que a proteína NSP se liga especificamente com três membros da família RLLII-RLK, designados NIK, através de seu domínio de serina/treonina quinase. Entretanto, ela se liga tanto em quinases ativas quanto em defectivas e não é fosforilada por estas proteínas, mas inibe fortemente a atividade destas quinases (Fontes *et al.*, 2004). A perda de função do gene *NIK* aumenta a suscetibilidade à infecção por geminivírus sugerindo que NSP atua com um fator de

virulência para suprimir as defesas antivirais mediadas por NIK. Os resultados aqui apresentados sugerem que a ligação de NSP com o domínio de quinase resulta em uma interação enzima-substrato produtiva que, em contraste com a interação NSP-NIK, pode regular a função de NSP. Consistentemente com esta hipótese, foi demonstrado que NSP de SqLCV é modificada pós-traducionalmente por fosforilação (Pascal *et al.*, 1994). Além disso, os resultados dessa investigação forneceram evidências para uma ligação funcional entre NSP e NsAK, uma vez que a perda de função de *NsAK* leva à atenuação da infecção por geminivírus. Este fenótipo mutante *nsak* implica que NsAK seria um contribuidor positivo para a infecção por geminivírus que provavelmente atua na regulação da função de NSP. Evidências na literatura indicam que o estado de fosforilação da proteína de movimento (MP) de vírus de plantas regula o transporte célula-a-célula do genoma viral (Citovsky *et al.*, 1993; Waigmann *et al.*, 2000). Estas proteínas de movimento são fosforiladas por uma proteína quinase associada aos plasmodesmas (Citovsky *et al.*, 1993). No caso de NSP, entretanto, como uma auxiliar tanto do movimento intracelular quanto do transporte intercelular mediado por MP do DNA viral, eventos de fosforilação podem igualmente ocorrer no núcleo, no envelope nuclear, citoplasma ou membrana plasmática. Assim, a determinação precisa da localização de NsAK fornecerá uma informação valiosa sobre o significado funcional da interação entre NsAK e NSP.

A análise de seqüência da proteína deduzida revela que NsAK pertence à subfamília PERK-like RLK e, como tal, é estruturalmente organizada em um domínio C-terminal de serina/treonina quinase. Nessa investigação, foi demonstrado que NsAK é uma autêntica serina/treonina quinase, pois a proteína traduzida *in vitro*, ou seu domínio carboxi, aumenta o nível de fosforilação de NSP no ensaio de tradução *in vitro*. Isto é consistente com a organização estrutural de NsAK, contendo na sua região C-terminal todos os 11 subdomínios conservados de proteínas quinases, além da presença de características específicas de serinas/treoninas quinases (Hanks e Hunter, 1995, Diévert e Clark, 2003). Isto inclui o possível sítio de ativação HrDvKssNxLLD no subdomínio VIb, o motivo DFG no subdomínio VII, o qual pode quelar íons  $Mg^{++}$  e o motivo APE no subdomínio VIII, o qual está envolvido no reconhecimento do substrato e na autofosforilação.

Como um membro da família PERK-like RLK, a porção N-terminal de NsAK é rica em prolina e apresenta similaridade de seqüência com proteínas da parede celular da família de extensinas (Shiu e Bleecker, 2001). O homólogo de PERK-like

RLK encontrado em *Brassica napus* está localizado na membrana plasmática e já foi demonstrado ser rapidamente induzido por estresses mecânicos (Silva e Goring, 2002). Por se tratar de uma proteína membro da família RLK, que tem sido amplamente implicada em uma via de transdução de sinal, e, ainda, por estar localizada na membrana plasmática e ser induzida por ferimento, tem sido proposto que o homólogo de *Brassica napus* esteja envolvido em um via de transdução de sinal estimulada por ferimento (Shiu e Bleecker, 2001; Silva e Goring, 2002). Vários estímulos de ferimento são gerados durante o processo de infecção de plantas por patógenos. Isto é particularmente verdadeiro no caso de geminivírus, transmitidos por insetos. Foi demonstrado aqui, entretanto, que o nível de transcritos de *NsAK* não se altera durante o curso da infecção por geminivírus, apesar de o método de inoculação por biobalística gerar estímulos de ferimento por injuriar mecanicamente às folhas. A taxa de expressão constitutiva e ubíqua de *NsAK* indica que esta serina/treonina quinase deva estar funcionalmente envolvida em processos celulares básicos e constitutivos.

Embora um *knock out* completo de *nsak* pela mutação por inserção de T-DNA resulte na atenuação na infecção por geminivírus, a inativação do gene não bloqueia totalmente a infecção, como seria esperado se *NsAK* fosse essencial na regulação da função de NSP. Todavia, este resultado não é totalmente inesperado, já que o genoma de *Arabidopsis* codifica 14 homólogos de *NsAK* da subfamília PERK-like RLK (Shiu e Bleecker, 2001; Silva e Goring, 2002), de forma que alguns poderiam substituir parcialmente a função de *NsAK* na infecção viral. Se tal dependência rígida de NSP por um gene específico contido em uma família de fatores do hospedeiro de fato existe, é razoável assumir que NSP evoluiu de forma a acomodar um certo grau de promiscuidade ao recrutar a atividade chave de quinase para regulação de sua função.

A interação específica de NSP com membros da subfamília RLLII-RLK, como supressor da atividade de quinase e defesas antivirais (Fontes *et al.*, 2004), e com um membro da subfamília PERK-like RLK, como substrato de quinase, sugere que a ligação de NSP com o domínio de serina/treonina quinase é uma propriedade inerente da proteína viral para suprir tanto funções de virulência quanto de compatibilidade básica. Funcionalmente, a ligação de NSP com NIK1 (RLLII-RLK) antagoniza a ligação com *NsAK* (PERK-like), uma vez que NSP inibe a atividade de quinase de NIK mas atua como substrato de *NsAK*. O sítio de ligação de NSP foi

mapeado em NIK1 e corresponde a uma extensão de 80 resíduos de aminoácidos que contém o possível sítio de ativação de serina/treonina quinase (subdomínio VIb – HrDvKssNxLLD) e a volta de ativação (A-Loop) (subdomínio VII – DFGAK/rx, mais o subdomínio VIII – GtxGyiaPEY) (Fontes *et al.*, 2004).

Como um substrato potencial para NsAK, pode-se antecipar que NSP se associa com NsAK através do sítio de ligação ao substrato que conceitualmente sobrepõe-se à região correspondente de interação de NSP com NIK (Hanks e Hunter, 1995; Johnson *et al.*, 1998). Todavia, a presença dos subdomínios conservados Vb, VII e VIII, por si, não é suficiente para promover uma ligação específica de quinase com NSP, porque NSP não interage estavelmente com outras serina/treonina quinases receptoras-like que contém estes subdomínios conservados, como BRI1 (*“Brassinosteroid Insensitive 1”*), e SERK (*“Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase”*) (Fontes *et al.*, 2004). É mais provável, que contatos discretos com resíduos divergentes do domínio catalítico de RLKs conferem a requerida especificidade para a ligação. Enquanto a identificação dos sítios de interação entre NsAK e NSP permitiria a construção de mutantes defeituosos para interação, a possível redundância funcional dos membros da família PERK-like RLK e o efeito antagônico da ligação de NSP com NIK ou NsAK complicarão o uso destes mutantes para avaliar o significado da interação NsAK-NSP no ciclo da infecção de geminivírus. Em contraste, a identificação e subsequente alteração dos sítios de fosforilação de NSP por mutagênese permitirão que se aborde a interação NSP-NsAK separadamente e, conseqüentemente, elucidar o papel da fosforilação na função de NSP

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACH, R.A.; DURFEE, T.; MILLER, A.B.; TARANTO, P.; HANLEY-BOWDOIN, L.; ZAMBRYSKI, P.C.; GRUISSEM, W. RRB1 and RRb2 encode Maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. **Molecular and Cellular Biology** 17, 5077–5086, 1997.
- ALBERTER, B.; ALI REZAIAN, M.; JESKE, H. Replicative intermediates of *Tomato leaf curl virus* and its satellite DNAs. **Virology** 331, 441– 448, 2005.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Molecular detection and phylogenetic analysis of tomato and weed infecting geminiviruses in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 27, 372-377, 2002.
- BAGEWADI, B.; CHEN, S.; LAL, S.K.; CHOUDHURY, N.R.; MUKHERJEE, S.K. PCNA interacts with *Indian mung bean yellow mosaic virus* Rep and downregulates Rep activity. **Journal of Virology** 78, 11890–11903, 2004.
- BASS, H.W.; NAGAR, S.; HANLEY-BOWDOIN, L.; ROBERTSON, D. Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. **Journal of Cell Science** 113, 1149-1160, 2000.
- BEACHY, R.N. **Virus cross-protection in transgenic plants**, In: **Temporal and Spatial Regulation of Plant genes**, Verma D. P. S. and Goldberg R. B. ed., Springer-Verlag, New York, 1988, 331 p.
- BECHTOLD, N.; PELLETIER, G. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. **Methods in Molecular Biology** 82, 259–266, 1993.
- BOULTON, M.I. Functions and interactions of *Mastrevirus* gene products. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 60, 243–255, 2002.

- BOULTON, M.I.; STEINKELLNER, H.; DONSON, J.; MARKHAM, P.G.; KING, D.I.; DAVIES, J.W. Mutational analysis of the virion-sense genes of *Maize streak virus*. **Journal of General Virology** 70, 2309–2323, 1989.
- BRIDDON, R.W.; WATTS, J.; MARKHAM, P.G.; STANLEY, J. The Coat Protein of *Beet curly top virus* is essential for infectivity. **Virology** 172, 628–633, 1989.
- BRIDDON, R.W.; LUNNESS, P.; BEDFORD, I.D.; CHAMBERLIN, L.C.L.; MESFIN, T.; MARKHAM, P.G. A streak disease of pearl millet caused by a leafhopper-transmitted geminivirus. **European Journal of Plant Pathology** 102, 379–400, 1996.
- BROUGH, CL.; HAYES R.J.; MORGAN, A.J.; COUTTS, R.H.A.; BUCK, K.W. Effects of mutagenesis *in vitro* on the ability of cloned *Tomato golden mosaic virus* DNA to infect *Nicotiana benthamiana* plants. **Journal of General Virology** 69, 503–514, 1988.
- CARVALHO M.F.; LAZAROWITZ, S.G. Interaction of the movement protein NSP and the *Arabidopsis* acetyltransferase AtNSI is necessary for *Cabbage leaf curl* geminivirus infection and pathogenicity. **Journal of Virology** 78, 11161–11171, 2004.
- CASTILLO, A. G.; COLLINET, D.; DERET, S.; KASHOGGI, A.; BEJARANO, E.R. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). **Virology** 312, 381–394, 2003.
- CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** 16, 735–743, 1998.
- DAY A.G.; BEJANARO, E.R.; BUCK, K.W.; BURRELL, M.; LICHTENSTEIN, C.P. Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus *Tomato golden mosaic virus*. **Proceedings of the National Academy of Science, USA** 88, 6721–6725, 1991.
- DESBIEZ, C.; DAVID, C.; METTOUCHI, A.; LAUFS, J.; GRONENBORN, B. Rep protein of TYLCV has an ATPase activity required for viral DNA replication. **Proceedings of the National Academy of Science, USA** 92, 5640–5644, 1995.
- EAGLE, P.A.; OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. **The Plant Cell** 6, 1157–1170. 1994.
- EAGLE, P.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. Cis elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. **Journal of Virology** 71, 6947–6955, 1997.
- EGELKROUT, E.M.; ROBERTSON, D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E<sub>2</sub>F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. **The Plant Cell** 13, 1437–1452, 2001.

- ELMER, J.S.; BRAND, L.; SUNTER, G.; GARDINER, W.E.; BLISARO, D.M.; ROGERS, S.G. Genetic analysis of *Tomato golden mosaic virus* II. Requirement for the product of the highly conserved AL1 coding sequence for replication. **Nucleic Acids Research** 16, 7043-7060, 1988.
- FONTES, E. P. B.; LUCKOWAND, V. A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **The Plant Cell** 4, 597-608, 1992.
- FONTES, E.P.B.; EAGLE, P.A.; SIPE, P.S.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **The Plant Cell** 6, 405-416, 1994a.
- FONTES, E.P.B.; GLADFELTER, H.J.; SCHAFFER, R.L.; PETTY, I.T.D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry** 269, 8459-8465, 1994b.
- FONTES, E.P.B.; SANTOS, A.A.; LUZ, D.F.; WACLAWOVSKY, A.J.; CHORY, J. The geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress an innate transmembrane receptor kinase-mediated defense signaling. **Genes and Development** 18 (20), 2545-2556, 2004.
- FRISCHMUTH, T.; STANLEY, J. *African cassava mosaic virus* DI DNA interferes with the replication of both genomic components. **Virology** 183, 539-544, 1991.
- GAFNI, Y.; EPEL, B. L. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60: 231-241, 2002.
- GALVÃO, R.M.; MARIANO, A.C.; LUZ, D.F.; ALFENAS, P.C.; ANDRADE, E.C.; ALMEIDA, M.R.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P.B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. **Journal of General Virology** 84, 715-726, 2003.
- GARDINER, W.E.; SUNTER, G.; BRAND, L.; ELMER, J.S.; ROGERS, S.G.; BISARO, D.M. Genetic analysis of *Tomato golden mosaic virus*: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. **EMBO Journal** 7, 899-904, 1988.
- GRÖNING, B.R.; HAYES, R.J.; BUCK, K.W. Simultaneous regulation of *Tomato golden mosaic virus* coat protein and *AL1* gene expression: Expression of the *AL4* gene may contribute to suppression of the *AL1* gene. **Journal of General Virology** 75, 721-726, 1994.
- GUTIERREZ, C. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60, 219-230, 2002.

- GUTIERREZ, C.; RAMIREZ-PARRA, E.; CASTELLANO, M.; SANZ-BURGOS, A.P.; LUQUE, A.; MISSICH, R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. **Veterinary Microbiology** 98, 111-119, 2004.
- HAMILTON, W.D.O.; STEIN, V.E.; COUTTS, R.H.A.; BUCK, K.W. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of *Tomato golden mosaic virus*: Potential coding regions and regulatory sequences. **EMBO Journal** 3, 2197-2205, 1984.
- HANKS, S.K.; HUNTER, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB Journal** 9, 576-596, 1995.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; EAGLE, P.A.; OROZCO, B. M.; ROBERTSON, D.; SETLAGE, S.B. **Geminivirus Replication: In Biology of Plant/Microbe Interactions**. Editors: Stacey, G.; Mullin, B.; Greeshof, P.M., 287-292, ASPP, St. Paul, MN, 1996.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGA, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR S.; ROBERTSON, D. Geminivirus models for plant DNA replication transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences** 1, .71-106, 1999.
- HAYES, R.J.; BUCK, K.W. Replication of *Tomato golden mosaic virus* in transgenic plant expressing ORFs of DNA-A. **Nucleic Acids Research** 17, 10213–10222, 1989.
- HAO, L.; WANG, H.; SUNTER, G.; BISARO, D.M. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. **The Plant Cell** 15,1034–1048, 2003.
- HARTITZ, M.D.; SUNTER, G.; BISARO, D.M. The Tomato golden mosaic virus Transactivator (TrAP) is a single strand DNA and zinc-binding phosphoprotein with an acid activation domain. **Virology** 263, 1-14, 1999.
- HEHNLE, S.; WEGE, C.; JESKE, H. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. **Journal of Virology** 78, 7698–7706, 2004.
- HEYRAUD-NITSCHKE, R.; SCHUMACHER, S.; LAUFS, S.; SCHAEFER, S.; GRONENBORN, B. Determination of origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep protein. **Nuclei Acids Research** 23, 910-916, 1995.
- HILL, J.E.; STRANDBERG, J.O.; HIEBERT, E.; LAZAROWITZ, S.G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of *Cabbage leaf curl virus* and *Squash leaf curl virus*: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. **Virology** 250, 283-292, 1998.
- HORVÁTH, G.V.; PETTKÓ-SZANDTNER, A.; NIKOVIES, K.; BILGIN, M.; BOULTON, M.; DAVIES, J.W.; GUTIÉRREZ, C.; DUDITS, D. Prediction of functional regions of the *Maize streak virus* replication-association protein by protein-protein interaction analysis. **Plant Molecular Biology** 38, 699-712, 1998.
- JEFFREY, J.L.; POOMA, W.; PETTY, I.T.D. Genetic requirements for the local and systemic movement of *Tomato golden mosaic virus* in infected plants. **Virology** 223, 208–218, 1996.

- JOHNSON, L.N.; LOWE, E.D.; NOBLE, M.E.M.; OWEN, D.J. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. **FEBS Letters**. 430, 1-11, 1998.
- JUPIN, I.; de KOUCHKOVSKY, F.; JOUANNEAU, F.; GRONENBORN, B. Movement of *Tomato yellow leaf curl geminivirus* (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. **Virology** 204, 82–90, 1994.
- KALLENDER, H.; PETTY, I.T.D.; STEIN, V.E.; PANICO, M.; BLENCH, I.P.; ETIENNE, A.T.; MORRIS, H.R.; COUTIS, R.H.A.; BUCK, K.W. Identification of the Coat Protein gene of *Tomato golden mosaic virus*. **Journal of General Virology** 69, 1351-1357, 1988.
- KOHORN, B.D. WAKs: cell wall associated kinases. **Current Opinion in Cell Biology**. 13, 529–533, 2001.
- KONG, L.J.; OROZCO, B.M.; ROE, J.L.; NAGAR, S.; OU, S.; FEILER, H.S.; DURFEE, T.; MILLER, A.B.; GRUISSEM, W.; ROBERTSON, D.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. **EMBO Journal** 19, 3485-3495, 2000.
- KOTLITZKY, G.; BOULTON, M.I.; PITAKSUTHEEPONG, C.; DAVIES, J.W.; EPEL, B. Intracellular and intercellular movement of *Maize streak geminivirus* V1 and V2 proteins transiently expressed as green fluorescent protein fusions. **Virology** 274, 32-38, 2000.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227, 680-685, 1970.
- LAUFS, J.; TRAUT, W.; HEYRAUD, F.; MATZEIT, V.; ROGERS, S.G.; SCHELL, J.; GRONENBORN, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicator initiator protein of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Proceedings of National Academy of Science USA** 92, 3879–3883, 1995.
- LAZAROWITZ, S.G.; BECHY, R.N. Viral movement proteins as probes for intracellular trafficking in plants. **The Plant Cell** 11, 535-548, 1999.
- LAZAROWITZ, S.G.; PINDER, A.J.; DAMSTEEGT, V.D.; ROGERS, S.G. *Maize streak virus* genes essential for systemic spread and symptom development. **The EMBO Journal** 8, 1023–1032, 1989.
- LAZAROWITZ, S.G.; WU, L.C.; ROGERS, S.G.; ELMER, J.S. Sequence-specific interaction with the viral ALI protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **The Plant Cell** 4, 799-809, 1992.
- LIU, H.; BOULTON, M.I.; THOMAS, C.L.; PRIOR, D.A.; OPARKA, K.J.; DAVIES, J.W. *Maize streak virus* Coat Protein is karyophilic and facilitates nuclear transport of viral DNA. **Molecular Plant Microbe Interactions**. 12, 894–900. 1999.

- MALIK, P.S.; KUMAR, V.; BAGEWADI, B.; MUKHERJEE, S.K. Interaction between coat protein and replication initiation protein of *Mung bean yellow mosaic india virus* might lead to control of viral DNA replication. **Virology** 337, 273–283, 2005.
- MARIANO, A.C.; ANDRADE, M.O.; SANTOS, A.A.; CAROLINO, S.M.B.; OLIVEIRA, M.L.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; BROMOSHENKEL, S.H.; FONTES E.P.B. Identification of a novel receptor- like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology** 318 24-31, 2004.
- McGARRY, R.C.; BARRON, Y.D.; CARVALHO, M.F.; HILL, J.E.; GOLD, D.; CHEUNG, E.; KRAUS, W.L.; LAZAROWITZ, S.G. A novel *Arabidopsis* acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. **The Plant Cell** 15,1605–1618, 2003.
- MOFFAT, A.S. Geminiviruses emerge as serious crop threats. **Science** 286, p. 1835, 1999.
- MORIN, S.; GHANIM, M.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H.; VERBEEK, M.; van den HEUVEL, J.F.J.M. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Virology** 256, 75-84, 1999.
- MORIN, S.; GHANIM, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H. The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and non-transmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. **Virology** 276, 404-416, 2000.
- MULLINEAUX, P.M.; BOULTON, M.I.; BOWYER, P.; VANDERRLUGT, R.; MARKS, M.; DONSON, J.; DAVIES, J.W. Detection of a nonfunctional protein of Mr.11000 encoded by the virion DNA of *Maize streak virus*. **Plant Molecular Biology** 11, 57–66, 1988.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15, 473-497, 1962.
- NAGAR, S.; PEDERSEN, T.; CARRICK, K.; HANLEY-BOWDOIN, L.; ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. **The Plant Cell** 7, 705–719, 1995.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell** 76, 965-932, 1994.
- OROZCO, B.M.; GLADFELTER, H.J.; SETTLAGE, S.B.; EAGLE, P.A.; GENTRY, R.N.; HANLEY-BOWDOIN, L. Multiple cis-elements contribute to geminivirus origin function. **Virology** 242, 346–356, 1998.
- OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **Journal of Virology** 70, 148–158, 1996.
- PALMER, K.E.; RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. **Advanced Virus Research** 50, 183–234, 1998.

- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. A phage singlestranded DNA (ssDNA) binding protein complements ssDNA accumulation of a geminivirus and interferes with viral movement. **Journal of Virology** 73, 1609–1616, 1999.
- PASCAL, E.; GOODLOVE, P.E.; WU, L.C.; LAZAROWITZ, S.G. Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. **The Plant Cell** 5, 795-807, 1993.
- PASCAL, E.; SANDERFOOT, A.A.; WARD, B.M.; MEDVILLE, R., TURGEON, R.; LAZAROWITZ, S.G. The geminivirus BR1 Movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. **The Plant Cell** 6, 995-1006, 1994.
- PILLING, E. e HOFTE, H. Feedback from the wall. **Current Opinion in Plant Biology** 6, 611–616, 2003.
- POOMA, W.; GILLETTE, W.K.; JEFFREY, J.L.; PETTY, I.T. Host and viral factors determine the dispensability of Coat Protein for bipartite geminivirus systemic movement. **Virology** 218, 264–268, 1996.
- PRINGLE, C. Virus taxonomy at the XI<sup>th</sup> International Congress of Virology, Sydney, Australia. **Archives of Virology** 144, 2065-2070, 1999.
- QIN, S.; WARD, B.M.; LAZAROWITZ, S.G. The bipartite geminivirus coat protein aids BR1 function in viral movement by affecting the accumulation of viral single-stranded DNA. **Journal of Virology**. 72, 9247–9256, 1998.
- RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J.; FARIA, J.C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease** 82, 830, 1998.
- ROHILA, J. S.; CHEN, M.; CERNY, R.; FROMM, M. E. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. **The Plant Journal** 38, 172-181, 2004.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSEL, D.R.; MAXWELL, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease** 77, 340–347, 1993.
- ROJAS, M.R.; JIANG, H.; SALATI, R.; ZARES, B.X; SUDARSHANA, M.R.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite Begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. **Virology** 291, 110-125, 2001.
- ROJAS, M.; NOUEIRY, A.O; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. *Bean Dwarf Mosaic Geminivirus* movement proteins recognize in a form- and size-specific manner. **Cell** 95, 105-113, 1998.
- RUIZ-MEDRANO, R.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; MONSALVE-FONNEGRA, Z.; HERRERA-ESTRELLA, L.R.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Identification of a sequence element involved in AC2-

- mediated transactivation of the *Pepper huasteco virus* coat protein gene. **Virology** 253, 162–169, 1999.
- RYBICKI, E.P.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; MAXWELL, D.P.; HARRISON, B.D.; MARKHAM, P.G.; BISARO, D.M.; ROBINSON, D.; STANLEY, J. **Geminiviridae**. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L. CARSTENS, E.; ESTES, M.K.; LEMON, S.; MANILOFF, J.; MAYO, J.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R. (Eds.) **Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Nova York: Academic Press, 2000. 285-297.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **The Plant Cell** 7, 1185–1194, 1995.
- SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology** 6, 353-358, 1996.
- SAUNDERS, K.; LUCY, A.; STANLEY, J. DNA forms of the geminivirus *African cassava mosaic virus* consistent with a rolling circle mechanism of replication. **Nucleic Acids Research** 19, 2325-2330, 1991.
- SCHALK, H.J.; MATZEIT, V.; SCHLLER, B.; SCHELL, J.; GRONENBORN, B. *Wheat dwarf virus*, a geminivirus of graminaceous plants, needs splicing for replication. **EMBO Journal** 8, 359-364, 1989.
- SELTH, L.A.; DOGRA, S.C.; RASHEED, M.S.; HEALY, H.; RANGLES, J.W.; REZAIAN, M.A. A NAC domain protein interacts with *Tomato leaf curl virus* replication accessory protein and enhances viral replication. **The Plant Cell** 17, 311–325, 2005.
- SETTAGLE, S. B.; MILLER, A. B.; HANLEY-BOWDOIN, L. Interactions between Geminivirus Replication Proteins. **Journal of Virology** 70, 6790–6795, 1996.
- SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceedings of the National Academic Science, USA** 98, 10763-10768, 2001.
- SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Expansion of the receptor-like kinase/pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 132, 530–543, 2003.
- SILVA, N.F.; GORING, D.R. The Proline-rich, Extensin-like Receptor Kinase-1 (PERK1) Gene is Rapidly Induced by Wounding. **Plant Molecular Biology** 50, 667-685, 2002

- STANLEY, J. Analysis of *African cassava mosaic virus* recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology** 206, 707–712, 1995.
- STANLEY, J.; GAY, M.R. The nucleotide sequence of *Cassava latent virus* DNA. **Nature** 301, 260, 1993.
- STANLEY, J.; FRISCHMUTH, T.; ELLWOOD, S. Defective Viral DNA Ameliorates Symptoms of Geminivirus Infection in Transgenic Plants. **Proceedings of the National Academic Science, USA** 87, 6291-6295, 1990.
- STANLEY, J.; TOWNSEND, R. Infectious mutants of *Cassava latent virus* generated *in vivo* from intact recombinant DNA clones containing single copies of the genome. **Nucleic Acids Research** 14, 5981–5998, 1986.
- STENGER, D.C.; OSTROW, K.M. Genetic complexity of a *Beet curly top virus* population used to assess Sugar beet cultivar response to infection. **Phytopathology** 86, 929– 933, 1996.
- STENGER, D.C.; REVINGTON, G.N.; STEVENSON, M.C.; BISARO, D.M. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. **Proceedings of the National Academic Science, USA** 88, 8029–8033, 1991.
- SUNTER, G.; BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **The Plant Cell** 4: 1321-1331, 1992.
- SUNTER, G.; HARTITZ, M.D.; HORMUDZI, S.G.; BROUGH, C. L.; BISARO, D.M.. Genetic analysis of *Tomato golden mosaic virus*: ORF AL2 is required for Coat Protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology** 179, 69-77, 1990.
- SUNTER, G.; STENGER, D.C.; BISARO, D.M. Heterologous complementation by geminivirus *AL2* and *AL3* genes. **Virology** 203, 203–210, 1994.
- TIMMERMANS, M.C.P.; DAS, O.P.; MESSING, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Biochemistry and Molecular Biology** 45, 79–112, 1994.
- TOWNSEND, R.; STANLEY, J.; CURSON, S.J.; SHORT, M.N. Major polyadenylated transcripts of cassava latent virus and location of the gene encoding coat protein. **EMBO Journal** 4, 33, 1985.
- UNSELD, S.; FRISCHMUTH, T.; JESKE, H. Short deletions in the nuclear targeting sequences of *African cassava mosaic virus* coat protein prevent geminivirus twined particle formation. **Virology** 318, 89–100, 2004.
- UNSELD, S.; HOHNLE, M.; RINGEL, M.; FRISCHMUTH, T. Sub cellular targeting of the coat protein of *African cassava mosaic* geminivirus. **Virology** 286, 373–383, 2001.

- Van REGENMORTEL, M.H.V., BISHOP, D.H.L., FAUQUET, C. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, San Diego. 2000.
- VERICA, J.A.; HE, Z.H. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. **Plant Physiology** 129, 455–459, 2002.
- WAIGMANN, E.; CHEN, M.H.; BACHMAIER, R.; GHOSHROY, S; CITOVSKY, V. Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein. **EMBO Journal** 19, 4875– 4884, 2000.
- WANG, H.; BUCKLEY, K.J.; YANG, X.; BUCHMANN, R.C.; BISARO, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal of Virology** 79, 7410–7418, 2005.
- WANG, H.; GILBERTSON, R.L.; LUCAS, W.J. Spatial and temporal distribution of *Bean dwarf mosaic geminivirus* in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. **Phytopathology** 86, 1204-1214, 1996.
- WANG, H.; HAO, L.; SHUNG, C.Y.; SUNTERAND, G.; BISARO, D.M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. **The Plant Cell** 15, 3020–3032, 2003.
- WARD, B.M.; MEDVILLE, E.; LAZAROWITZ, S.G.; TURGEON, R. The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-derived tubules in developing phloem cells. **Journal of Virology** 71, 3726-3733, 1997.
- WHITHAM, S.A.; WANG, Y. Roles for host factors in plant viral pathogenicity. **Current Opinion in Plant Biology** 7, 365-371, 2004.
- WOOLSTON, C.J., REYNOLDS, H.V., STACEY, N.J., MULLINEAUX, P.H. Replication of *Wheat dwarf virus* DNA in protoplasts and analysis of coat protein mutants in protoplasts and plants. **Nucleic Acids Research** 17, 6029– 6041, 1989.
- WRIGHT, E.A.; HECKEL, T.; GROENENDIJK, J.; DAVIES, J.W.; BOULTON, M. I. Splicing features in *Maize streak virus* virion- and complementary-sense gene expression. **The Plant Journal** 12, 1285-1297. 1997.
- ZHANG, S.C.; WEGE, C.; JESKE, H. Movement Proteins (*BC1* and *BV1*) of *Abutilon Mosaic Geminivirus* are Cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. **Virology** 290, 249–260, 2001.