

ANDRÉA CRISTINA MARIANO

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO HOSPEDEIRO QUE
INTERAGEM COM A PROTEÍNA NSP DO GEMINIVIRUS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

ANDRÉA CRISTINA MARIANO

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO HOSPEDEIRO QUE
INTERAGEM COM A PROTEÍNA NSP DO GEMINIVIRUS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 8 de outubro de 2002.

Prof. Sérgio H. Brommonschenkel
(Conselheiro)

Dra. Eunize Maciel Zambolim
(Pesquisadora)

Profa. Márcia Rogéria de Almeida

Dr. Rogério Lopes Brandão

Profa. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento- UFV pela oportunidade

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A prof Elizabeth P. B. Fontes pela orientação no decorrer do curso.

Aos Professores Sérgio H. Brommoshenkel, Márcia Rogéria de Almeida, Rogélio L. Brandão e Eunize M Zambolim pela participação na banca de defesa de tese.

Aos amigos dos laboratórios de Virologia Vegetal, Patologia Florestal e Virologia Animal e em especial aos amigos do laboratório de Biologia Molecular de Plantas onde este trabalho foi desenvolvido.

Aos amigos Soninha, Rafaelo, Andréia, Maxuel, Leo, Joci, Camila, Fabiene, Dani, Simone, Raquel e Zinho pela amizade e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A minha família pelo apoio.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Organização genômica dos geminivírus e função gênica	4
2.2. Movimento do genoma viral durante o processo de infecção.....	11
2.3. Interação de proteínas virais com proteínas do hospedeiro	13
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Clonagem dos genes virais nos vetores pADGAL4 e pBDGAL4 Cam.....	21
4.1.1. Clonagem do gene <i>REn</i> em pBDGAL4 Cam	21
4.1.2. Clonagem dos genes MP e NSP	24
4.2. Propagação dos clones em <i>S. cerevisiae</i> estirpe YRG-2.....	24
4.3. Determinação da atividade de ativação transcricional e/ou atividade de ligação ao DNA de proteínas virais.....	26
4.4. Identificação da interação entre a proteína nsp e proteínas do hospedeiro	26
4.4.1. Construção da biblioteca de cDNA de tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	26
4.4.2. Interação entre a proteína viral NSP e proteínas do tomateiro	27

4.4.3. Caracterização molecular do clone pUFV371, identificado no ensaio de interação com NSP	29
4.4.4. Análise das seqüências.....	29
4.5. Expressão da proteína cinase de tomate.....	31
4.5.1. Clonagem da seqüência parcial da proteína cinase de tomate no vetor de expressão pET16B (Novagen).....	31
4.5.2. Indução da versão truncada da proteína cinase de tomateiro.....	31
4.5.3. Purificação da versão truncada da proteína cinase de tomateiros..	32
4.6. Obtenção do anticorpo contra a proteína cinase de tomate.....	33
4.6.1. Imunização de coelhos	33
4.6.2 Verificação da especificidade do anticorpo	33
4.6.3. Extração de proteínas e “immunoblotting”	34
5. RESULTADOS	35
5.1. A proteína REn complementa o domínio de ativação transcricional de GAL4.....	35
5.2. Oligomerização da proteína viral MP detectada pelo sistema duplo-híbrido	37
5.3. Interação entre as proteínas de movimento NS e MP	39
5.4. Identificação de fatores do hospedeiro que interagem com a proteína NSP de TGMV	40
5.5. Caracterização molecular do clone pUFV364	44
5.6. O homólogo de soja da proteína NIK possui domínios característicos de receptores de membrana e genes de resistência	47
5.7. GmNIK interage com a proteína NSP de geminivírus.....	49
6. APÊNDICE	53
6.1. Obtenção de anticorpos contra o carboxi-terminal de LeNIK.....	53
7. DISCUSSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

RESUMO

MARIANO, Andréa Cristina, D.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2002. **Identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com a proteína NSP do Geminivirus.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Prof. Sérgio H. Brommonschenkel e Francisco Murilo Zerbini Jr.

A família *Geminiviridae* é uma família de vírus de planta constituída por vírus compostos por genoma circular de DNA fita simples que utilizam fatores do hospedeiro tanto para sua replicação quanto para a translocação do genoma viral no hospedeiro. Com a finalidade de identificar fatores do tomateiro que interagem com as proteínas virais do geminivírus TGMV (*Tomato golden mosaic virus*), foi utilizado o sistema duplo híbrido para escrutínio de proteínas positivas quanto à interação. As regiões codificadoras das proteínas MP, NSP e REn foram amplificadas e inseridas, individualmente, no vetor pBDGAL4 Cam, fusionadas ao domínio de ligação ao DNA do gene *GAL4*. Paralelamente foi construída uma biblioteca de cDNA de tomateiro, propagada em vetor de *S. cerevisiae* derivados de lambda ZAPII. O escrutínio da biblioteca de cDNA assim como os ensaios funcionais de identificação de interação entre proteínas geminivirais foram conduzidos no sistema duplo-híbrido de leveduras. Ao contrário das proteínas MP e NSP, a proteína viral REn apresentou a capacidade de ativar a transcrição quando

fusionada ao domínio de ligação ao DNA, o que impossibilitou seu uso como isca em ensaios de interação proteína-proteína por esse sistema. A expressão correta das proteínas de movimento MP e NSP, direcionada pelos vetores do sistema duplo-híbrido, foi comprovada pela capacidade das proteínas recombinantes em interagirem ativando os genes repórteres. A interação entre MP e NSP, identificada no presente trabalho, está coerente com os modelos propostos para movimento de geminivírus no hospedeiro, os quais sugerem a interação entre essas duas proteínas durante o processo de translocação do genoma viral. A proteína NSP foi então utilizada como isca nos ensaios de interação proteína-proteína, utilizando como alvo as proteínas codificadas pela biblioteca de cDNA de tomateiro. Como resultado do escrutínio da biblioteca de cDNA de tomateiro, foram identificados cinco cDNAs que codificam proteínas capazes de interagir com NSP com diferentes intensidades, conforme demonstrado em ensaios quantitativos da atividade do gene repórter β -galactosidase. A análise de sequência e do padrão de restrição desses clones demonstraram que quatro deles eram idênticos e codificavam um domínio conservado de quinase serina/treonina, sendo denominado NIK (NSP - Interacting Kinase). Evidências indicam que, provavelmente, a interação entre NIK e NSP seja funcional. Análise da estrutura primária de NSP demonstrou a presença de resíduos de serina e treonina em contexto favorável para fosforilação. Além disso, NIK não foi capaz de interagir com outras proteínas virais e com controles, pelo sistema duplo híbrido, confirmando a especificidade da interação NSP-NIK. A análise comparativa da sequência parcial do cDNA de NIK com sequências de cDNAs de uma biblioteca de semente de soja mostrou que a proteína NIK possui cerca de 92% de similaridade de sequência, na região carboxiterminal, com uma proteína quinase de soja. A quinase identificada em soja, denominada GmNIK (*Glicine max* NIK), contém 623 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular estimada em 68586,10 kDa e foi capaz de interagir com NSP por meio do sistema duplo híbrido. GmNIK possui, além do domínio de quinase ⁴¹⁹IIHRDVKAANILL⁴³¹, um domínio de ligação a ATP ³⁰⁹LGKGFGNVYKKGVFPDGLVAVKK³³²,

uma hélice transmembrana, provavelmente responsável pela inserção da proteína na membrana plasmática, e regiões ricas em leucina, como ⁹⁶LTNQIVLLQNNNISGPISELGKLKLTQLDLSNNFFSGGIPPSLGHL¹⁴⁴ e ¹⁶⁷MTQLNFLDLSYNNLSGPVPRILAKS¹⁹². Os domínios encontrados em GmNIK são característicos de proteínas codificadas por genes de resistência e de receptores de membrana envolvidos em programas de desenvolvimento. A predição do modelo topológico de GmNIK baseado em sua estrutura modular, similar àquela da proteína codificada pelo gene de resistência *Xa21*, sugere a posição intracelular do domínio de quinase e do domínio de ligação a nucleotídeo, enquanto que as regiões ricas em leucina são voltadas para o meio extracelular. A posição intracelular do domínio de quinase está coerente com a hipótese de interação funcional entre GmNIK e NSP, uma vez que NSP localiza-se no meio celular interno. Ensaios adicionais deverão ser conduzidos para confirmar se a proteína viral NSP é fosforilada por NIK *in vitro* e *in vivo*.

ABSTRACT

MARIANO, Andréa Cristina, D.S., Universidade Federal de Viçosa, October 2002. **Identification of host proteins which interact with the geminivirus NSP protein.** Advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee Members: Prof. Sérgio H. Brommonschenkel and Francisco Murilo Zerbini Jr.

Geminiviridae is a family of plant viruses comprised by viruses with a circular single stranded DNA genome that utilizes host factors for replication and viral genome translocation. In order to identify factors in tomato plants which interact with viral proteins of the geminivirus TGMV (*Tomato golden mosaic virus*), the yeast two-hybrid system was used to screen for proteins with a positive interaction. Coding regions of the proteins MP, NSP and REn were amplified and inserted, individually, within the vector pBDGAL4 Cam, and merged to the DNA binding domain of the *GAL4* gene. Additionally, a library of tomato cDNA was obtained and propagated in a *S. cerevisiae* vector derived from lambda ZAPII. The cDNA library screening and all functional assays developed to identify the interaction among geminiviral proteins were carried out in the yeast two-hybrid system. Differently from the MP and NSP proteins, the REn viral protein was able to activate the transcription when merged to the DNA binding domain. Therefore, it was impossible to use the REn viral protein as an bait in protein-protein interaction assays by this system. The correct expression

of the movement proteins MP and NSP, directed by the two-hybrid vectors, was demonstrated by the interaction capacity of recombinant proteins, activating its reporting genes. The interaction between MP and NSP, identified in the present work, is consistent with the models that describe the geminivirus movement within the host, which suggest the interaction between these two proteins during the viral genome translocation. The NSP protein was utilized as bait in the protein-protein interaction assays, using as target proteins codified by the tomato cDNA library. The screening of the library resulted in the identification of five cDNAs that code for proteins capable of interacting with NSP with different intensities, according to the quantitative assays of the reporter gene β -galactosidase. Analyses of the sequence and the restriction patterns of these clones demonstrated that four of them were identical and code for a conserved serine/threonine kinase domain, named NIK (NSP - Interacting Kinase). Evidence indicates that the interaction between NIK and NSP is probably functional. The analysis of the NSP primary structure showed the presence of serine and threonine residues suitable to phosphorylation. Besides, NIK was not able to interact with other viral proteins and with controls using the two-hybrid system, corroborating the specificity of the NSP-NIK interaction. The comparative analysis of the NIK's cDNA partial sequence with cDNAs provided from a soybean library showed that the NIK protein has a sequence similarity of about 92% with a kinase protein from soybean, in the carboxy-terminal region. The kinase identified in soybean, named GmNIK (*Glicine max* NIK), has 623 amino acid residues, a molecular mass around 68586.10 kDa and showed the ability of interact with NSP using the two-hybrid system. The GmNIK has a kinase domain ⁴¹⁹IIHRDVKAANILL⁴³¹, an ATP binding domain ³⁰⁹LGKGFGNVYKKGVFPDGLVAVKK³³², a transmembrane helix, which is probably responsible for the introduction of the protein in the plasmatic membrane, and leucine-rich regions, such as ⁹⁶LTNQIVLLQNNNISGPISELGKLKLTQLDLSNNFFSGGIPPSLGHL¹⁴⁴ and ¹⁶⁷MTQLNFLDLSYNNLSGPVPRILAKS¹⁹². Domains found in GmNIK are characteristic of proteins encoded by resistance genes and of membrane receptors

involved in developmental programming. The prediction of a topological model of GmNIK based on its modular structure, similar to the protein encoded by the resistance gene *Xa21*, suggests an intracellular position of the kinase and nucleotide binding domain, while the leucine-rich regions are located in the extracellular environment. The intracellular position of the kinase domain is consistent to the hypothesis of functional interaction between GmNIK and NSP, since NSP is located inside the cell. Additional assays will be carried out in order to confirm whether the NSP viral protein is phosphorylated by NIK *in vitro* and *in vivo*.

1. INTRODUÇÃO

A família Geminiviridae é composta por vírus de plantas cujo genoma é constituído de DNA de fita simples e circular que replica no núcleo de células infectadas via uma forma intermediária de DNA dupla fita e é encapsulado em partículas icosaédricas . Os geminivirus são vírus transmitidos por insetos, sendo em sua maioria restritos ao floema (LAZAROWITZ, 1992).

Taxonomicamente, a família Geminiviridae encontra-se subdividida em quatro gêneros com base em seu inseto vetor (mosca branca ou cigarrinha), tipo de planta infectada (monocotiledôneas ou dicotiledôneas) e organização do genoma. O gênero *Topocuvirus* possui apenas um representante com componente genômico único, sendo transmitido por *Micrutalis malleifera* (Membracidae) e infecta dicotiledôneas. O gênero *Curtovirus* é representado por espécies que possuem apenas um componente genômico, infectam monocotiledôneas e são transmitido pela mosca branca. O gênero *Mastrevirus* possui representantes com um único componente genômico, sendo, entretanto, transmitidos por cigarrinha, inseto do gênero *Cicadulina* e infectam monocotiledôneas. O gênero *Begomovirus* é composto por vírus que infectam dicotiledôneas e são transmitidos pela mosca-branca (Família Aleurodidae), sendo representado por vírus que possuem um ou dois componentes, designados componentes A e B (RYBICKY, 1998). O componente A codifica todas as proteínas envolvidas com

a replicação e transcrição do DNA viral - AC1 (Rep), AC2 (TrAP), AC3 (REn) e a proteína da capa AV1 (CP). O componente B codifica as proteínas envolvidas com o movimento sistêmico BV1 (MP) e movimento célula a célula BC1 (NSP) do vírus na planta (RUIZ-MEDRANO *et al.*, 1999).

Coletivamente, os geminivírus infectam uma variedade de culturas agronomicamente importantes causando grandes restrições à produtividade agrícola, particularmente em regiões tropicais e subtropicais (ANDERSON & POLSTON, 1997). Doenças causadas por geminivírus, transmitidos por mosca branca, têm se tornado uma grande ameaça para a agricultura brasileira devido ao grande aumento populacional da mosca branca e à introdução de um novo biótipo do inseto com grande capacidade de colonização de tomateiros. Consistente com esta observação, tem sido constatado no Brasil uma proliferação crescente de geminivírus que infectam tomateiros.

Entretanto, o interesse científico em geminivírus não está limitado à sua importância como fitopatógeno. Por causa de sua genoma simples e dependência extensiva da maquinaria biossintética do hospedeiro para replicação, os geminivírus constituem excelentes modelos para análise de replicação, transcrição e transporte inter e intracelular em plantas. Devido a sua relevância científica e agrônômica, alguns geminivírus têm sido intensamente caracterizados molecularmente (HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 1999). Apesar dos avanços alcançados na biologia molecular do vírus, pouco se sabe a respeito das interações entre geminivírus e as células hospedeiras.

Os geminivírus são altamente dependentes de fatores do hospedeiro para sua proliferação (LIU *et al.*, 1999). Interações entre fatores do hospedeiro e proteínas dos geminivírus têm sido caracterizadas nos últimos anos, tendo sido identificados fatores do hospedeiro que interagem com proteínas codificadas pelos vírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Africa cassava mosaic virus* (ACMV) e *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (KONG & HANLEY-BOWDOIN, 2002; MORIN *et al.*, 2000; SETTLAGE *et al.*, 2001). Entretanto, estes estudos foram limitados à identificação de fatores do hospedeiro que interagem com a proteína de replicação de geminivírus. Da mesma forma que o

processo de replicação do genoma viral, o movimento do genoma viral célula a célula e, em alguns casos, o movimento sistêmico na planta hospedeira é dependente também de interações com fatores do hospedeiro (HEATON & LIN, 2001). Entretanto, os fatores do hospedeiro que interagem com as proteínas de movimento dos geminivírus não foram identificadas.

O estudo dos mecanismos envolvidos na interação patógeno:hospedeiro torna-se, portanto, de extrema importância para se entender o desenvolvimento da doença e os prováveis mecanismos de resistência que são ativadas durante a infecção por geminivírus. Sendo assim, o propósito principal dessa investigação foi o isolamento de fatores do hospedeiro que interagem com a proteína NSP de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) por meio do sistema duplo-híbrido de leveduras. Além disso, interações entre as diferentes proteínas virais proteínas virais foram avaliadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Organização genômica dos geminivírus e função gênica

Geminivírus são vírus de DNA fita simples com aproximadamente 2,6 Kb, organizados em um ou dois componentes, denominados A e B. Os vírus com apenas um componente possuem cerca de seis a sete quadros abertos de leitura (“ORF, open reading frame”), que codificam as proteínas envolvidas na replicação, movimento e encapsidação do genoma viral (Figura 1).

Nos curtovírus, cujo membro típico é o monossegmentado *Beat curl top virus* (BCTV), são observados sete ORFs: C1, C2, C3 e C4 na unidade de transcrição da fita complementar e V1, V2 e V3 na unidade senso (LAZAROWITZ, 1992). Os produtos das ORFs da fita complementar estão envolvidos na replicação e na transativação das ORFs da unidade senso, que por sua vez, estão envolvidas no desenvolvimento de sintomas sistêmicos e empacotamento do genoma viral (BRIDDON *et al.*, 1989 e STENGER *et al.*, 1996). Os curtovírus têm a particularidade de serem provavelmente originados da fusão por recombinação da unidade de transcrição à esquerda do componente A dos begomovírus com a unidade localizada à direita do componente genômico dos mastrevírus. Análises de comparação de sequência e homologia de função dos genes virais reforçam esta hipótese (RYBICKY, 1994).

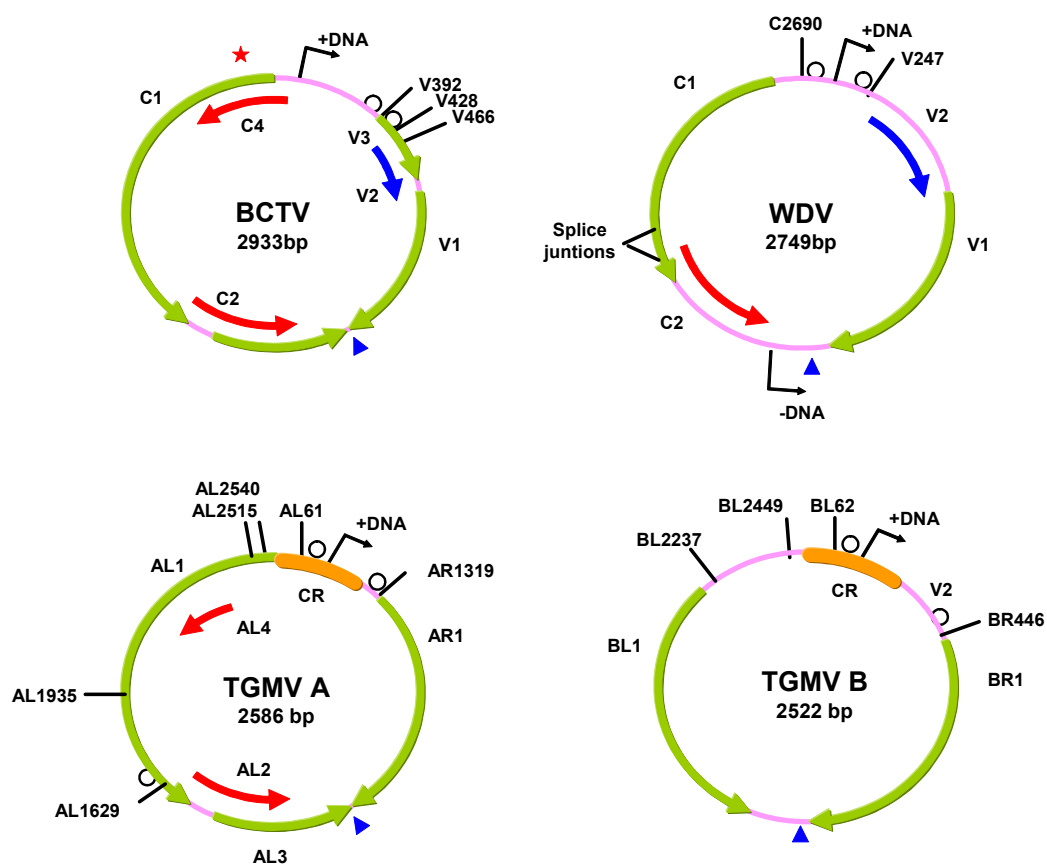


Figura 1. Organização genômica de representantes da família Geminiviridae. A organização genômica dos componentes A (TGMV A) e B (TGMV B) do vírus *Tomato golden mosaic virus* é mostrada na parte superior da Figura, representando o gênero *Begomovirus*. *Beet curly top vírus* (BCTV) representa o gênero *Curtovirus*, *Tomato pseudo curl top vírus* (TPCTV), o gênero *Topocuvirus* e *Wheat dwarf vírus* (WDV), o gênero *Mastrevirus*. As setas indicam a direção da transcrição e a extensão relativa dos genes indicados, RC indica a região comum.

O único componente genômico do *Maize Streak Virus* (MSV), membro típico do gênero *Mastrevirus*, codifica quatro ORFs denominadas V1, V2 (na fita do virion) e C1, C2 (na fita complementar) (Figura 1). Os produtos das ORFs da fita senso estão envolvidos no desenvolvimento de sintomas sistêmicos e no empacotamento, enquanto que os da fita complementar, na replicação. Além da região intergênica maior (LIR- “Large Intergenic Region”), os geminivírus desse gênero possuem a chamada região intergênica menor (SIR - “Small Intergenic Region”) ao final das unidades transcricionais divergentes (STANLEY, 1993; BOULTON *et al.*, 1993 e RYBICK, 1994).

O recém criado gênero *Topocuvirus* é representado pela espécie *Tomato pseudo curly top virus* (TPCTV) (BRIDDON *et al.*, 1996). O genoma deste vírus possui seis ORFs. A unidade transcricional da fita complementar ao vírion possui quatro ORFs sobrepostas denominadas C1, C2, C3, e C4, assim como ocorre nos vírus dos gêneros *Curtovirus* e *Begomovirus*. Na fita do sentido viral, o TPCTV possui duas ORFs, V1, a capa protéica e V2, a proteína de movimento, numa organização similar a que ocorre no BCTV. Entretanto, ao nível de sequência, as ORFs de TPCTV divergem significativamente de suas correspondentes nos demais geminivírus.

Os begomovírus possuem as proteínas de replicação e movimento em componentes genômicos separados (Figura 1). O componente A contém os genes que codificam para as proteínas Rep (AC1) e REn (AC3) envolvidas com a replicação do genoma viral, a proteína TrAp (AC2), relacionada à transativação dos gene CP (AR1) e NSP (BV1) e a proteína CP (AR1) formadora do nucleocapsídeo (LAZAROWITZ, 1992). O componente B possui os genes que codificam para as proteínas de movimento NSP (BV1) e MP (BC1). Esses componentes possuem uma região denominada região intergênica ou região comum (CR ou IR) praticamente idêntica entre os componentes de um mesmo vírus (FONTES *et al.*, 1994a e 1994b, OROZCO *et al.*, 1996 e 1998) .

Na região comum (RC), ocorre o início da transcrição dos genes virais em ambas as fitas, viral e complementar (STANLEY & GAY, 1983, HAMILTON *et al.*, 1984). Essa região contém sequências promotoras que são

reconhecidas pela RNA polimerase II, responsável pela transcrição divergente dos genes virais e a origem de replicação da fita positiva (OROZCO *et al.*, 1996). A região comum contém uma sequência repetida inversa, conservada em todos os geminivírus, que tem a capacidade de formar uma estrutura em forma de grampo, que é requerida para a replicação do genoma viral. Na alça dessa estrutura, encontra-se a sequência conservada 5'-TAATATTAC, que contém o sítio sobre o qual a proteína Rep atua promovendo a clivagem específica na fita positiva do genoma viral para iniciar a replicação círculo rolante (LAUFS *et al.*, 1995; STANLEY, 1995). Mutações na sequência conservada causam uma inibição da replicação do DNA viral *in vivo* (OROZCO & HANLEY-BOWDOIN, 1996). A região comum contém ainda o sítio de ligação específico para Rep, além de outros cis-elementos que contribuem para o reconhecimento específico da origem (OROZCO *et al.*, 1998).

A região comum também delimita duas unidades de transcrição divergentes, uma na fita viral e outra na fita complementar do vírion. Os RNAs resultantes da transcrição das ORFs presentes no DNA viral são poliadenilados e iniciam-se “upstream” da sequência 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).

Os geminivírus replicam seu DNA via o mecanismo de círculo rolante no núcleo de células de plantas infectadas, sendo a proteína Rep (“Replication associated protein”) a única proteína viral essencial para suportar o processo de replicação do genoma viral na presença de fatores do hospedeiro (STANLEY *et al.*, 1995, HANLEY-BOWDOIN, 1996). A proteína Rep é uma proteína multifuncional que tem atividade sequência-específica de ligação ao DNA dupla fita (FONTES *et al.*, 1992; 1994a e 1994b), catalisa a clivagem e ligação do DNA durante a síntese de ssDNA (HEYRAUD-NITSCHKE *et al.*, 1995; LAUFS *et al.*, 1995), 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). Recentemente, os domínios responsáveis pelas diversas funções da proteína Rep têm sido mapeados. Experimentos com

versões truncadas da proteína Rep do *Wheat dwarf virus* (WDV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e TGMV demonstraram que a região aminoterminal da proteína é capaz de realizar a clivagem e a ligação do DNA *in vitro* (HEYRAUD-NITSCHKE *et al.*, 1995; OROZCO *et al.*, 1997). O domínio de oligomerização de Rep de TGMV, assim como o domínio de ligação desta proteína à proteína viral REn também foram mapeados e encontram-se entre os aminoácidos 132 a 180 (OROZCO *et al.*, 2000; SETTLAGER *et al.*, 2001). Já a região carboxi-terminal da proteína Rep contém o domínio de ATPase, localizado entre os aminoácidos 182 a 352 (OROZCO *et al.*, 1997). Estudos bioquímicos revelaram que a proteína Rep de geminivírus exibe atividade de endonuclease sequência-específica necessária para o início de replicação da fita positiva (HEYRAUD-NITSCHKE *et al.*, 1995; LAUFS *et al.*, 1995; OROZCO & HANLEY-BOWDOIN, 1996). 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). O sítio de ligação da proteína Rep foi mapeado no genoma de TGMV e consiste de um elemento de 13 pb com duas sequências repetidas diretas (FONTES *et al.*, 1994b), sendo este domínio requerido não só para o reconhecimento da origem de replicação como para a regulação negativa da transcrição de seu gene (EAGLE *et al.*, 1994).

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; SETTLAGER *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). Experimentos realizados com proteínas REn heterólogas demonstraram que esta proteína não contribui de maneira significativa para a especificidade de replicação do genoma de geminivírus (SUNTER *et al.*, 1994). A região que codifica para as proteínas TrAP e REn,

denominada AL23, de *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e TGMV também foi caracterizada como sendo uma das regiões responsáveis pela especificidade de hospedeiro; porém, o mecanismo pelo qual este evento ocorre ainda não foi elucidado (GILLETTE *et al.*, 1998).

A proteína TrAP (“Transactivator protein”) possui a atividade de ativador transcricional, sendo importante na regulação da expressão de genes virais *NSP* e *CP* (HAYES & BUCK, 1989; SUNTER & BISARO, 1992). Elementos conservados, presentes em promotores de genes de expressão tardio de muitos geminivírus têm sido identificados como alvos funcionais da proteína TrAP transativador (TrAP) geminiviral. Mutações nestes elementos mostram que eles perdem a capacidade de serem transativados por TrAP (RUIZ-MEDRANO *et al.*, 1999). Além disso, durante a infecção por *African cassava mosaic virus* (ACMV), a proteína TrAP é capaz de ativar um transgene que encontra-se sob o controle do promotor de *CP* (HONG *et al.*, 1996). TrAP também mostrou-se capaz de ativar promotores cromossomais influenciando a expressão de genes do hospedeiro (SUNTER & BISARO, 1994). Embora o mecanismo de atuação da proteína TrAP não tenha sido elucidado, sabe-se que a proteína TrAP tem a capacidade de se ligar a zinco e de sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação (HARTITZ *et al.*, 1999). Análises de sequência mostraram que TrAP contém ainda um domínio ácido na região carboxi-terminal responsável pela ativação da transcrição e experimentos, utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura, confirmaram a função de ativador transcricional exercida pela proteína TrAP (HARTITZ *et al.*, 1999).

A ORF AC4 é uma ORF pequena contida dentro da sequência do DNA que codifica para proteína Rep, porém, em diferente quadro de leitura. A ORF AC4 de begomovírus bissegmentados 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 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 interfere no processo de infecção

viral e, consequentemente, a função biológica da proteína permanece indeterminada (POOMA *et al.*, 1996).

As proteínas codificadas pelo componente B estão envolvidas com o movimento do vírus durante a infecção, uma vez que na ausência dessas proteínas, os vírus são incapazes de se movimentarem na planta hospedeira (ELMER *et al.*, 1988; ETESSAMI *et al.*, 1988). As proteínas MP (‘Movement protein’) e NSP (‘Nuclear shuttle protein’) parecem atuar conjuntamente facilitando o movimento do genoma viral (SANDERFOOT & LAZAROWITZ, 1995; PASCAL *et al.*, 1994). O gene *MP* (BC1) codifica a proteína responsável pelo movimento célula-célula do vírus, sendo necessária também para a patogenicidade de geminivírus bissegmentados (INGHAM *et al.*, 1995).

A proteína MP de *Squash leaf curl virus* (SqLCV) foi localizada na membrana plasmática por meio de experimentos de imunolocalização (PASCAL *et al.*, 1994). A proteína MP de *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) é capaz de aumentar o limite de exclusão do plasmodesma quando introduzida em células por meio de microinjeção, sendo capaz ainda de mediar o movimento do genoma viral para a célula adjacente (NOUEIRY *et al.*, 1994).

A proteína MP de SqLCV foi também detectada na mesma fração do retículo endoplasmático pela sua co-localização com a proteína BiP (‘Binding protein’), que é uma proteína residente do retículo endoplasmático (WARD *et al.*, 1997). Baseado nessas observações foi proposto que a MP é capaz de interagir com o retículo endoplasmático, formando canais para o movimento intercelular.

A proteína de movimento NSP apresenta sinal de transporte nuclear (NES), e um sinal de localização nuclear (NLS), atuando como ‘nuclear shuttle protein’ (LAZAROWITZ *et al.*, 1999). Essa proteína possui a capacidade de interagir com o DNA viral fita simples facilitando o seu transporte do núcleo para o citoplasma. Experimentos realizados com a 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 & LAZAROWITZ, 1995). Tem sido demonstrado que as

proteínas MP e NSP de SqLCV sofrem modificações pós-traducionais, sendo fosforiladas durante o processo de translocação do genoma viral (PASCAL *et al.*, 1994). Consistente com o envolvimento dessas proteínas com o movimento do genoma viral, MP e NSP exibem atividade de ligação ao DNA (PASCAL *et al.*, 1994, ROJAS *et al.*, 1998). No caso de SqLCV, ensaios de ligação ao DNA *in vitro* demonstraram que NSP liga a ssDNA com alta afinidade, enquanto que a proteína MP parece ter baixa afinidade por ácidos nucleicos (PASCAL *et al.*, 1994). No entanto, as proteínas MP e NSP de BDMV exibem afinidade e especificidade de interação ao DNA similares, caracterizada pelo reconhecimento dependente de forma e tamanho do DNA (ROJAS *et al.*, 1998).

2.2. Movimento do genoma viral durante o processo de infecção

Para que os vírus de planta produzam uma infecção produtiva é necessário que eles se movimentem célula-à-célula e sistemicamente no hospedeiro. O movimento célula-à-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. Estudos detalhados em vários vírus que relicam no citoplasmática sugerem que as proteínas de movimento interagem com os componentes do citoesqueleto (HEATON & LIN, 2001) e com o sistema de transporte intercelular para permitir o movimento viral (SOELICK *et al.*, 2000). Pelo fato dos geminivírus apresentarem replicação nuclear, o transporte desses vírus requer uma etapa adicional que é o deslocamento dos genomas virais recém replicados do núcleo para o citoplasma. O transporte intracelular do genoma viral requer uma proteína de movimento adicional, designada NSP, além da proteína envolvida no transporte célula-à-célula, designada MP. Assim, o movimento do genoma viral é facilitado pela ação cooperativa entre as duas proteínas de movimento NSP e MP (Figura 2) (SANDERFOOT & LAZAROWITZ, 1995; SANDERFOOT & LAZAROWITZ, 1996).

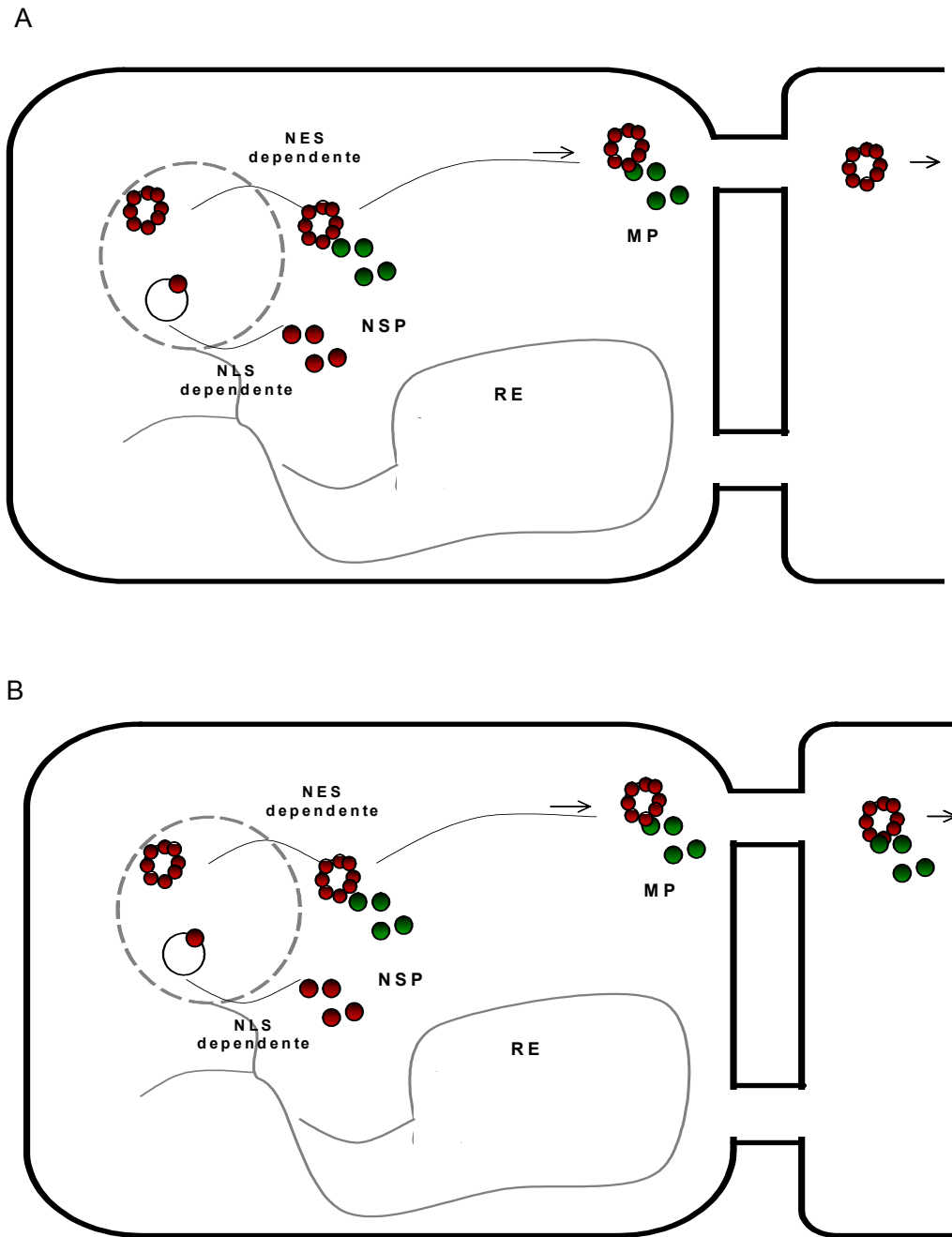


Figura 2. Modelos para o movimento intercelular dos geminivírus na planta hospedeira. **A.** A proteína NSP forma, inicialmente, um complexo com o DNA viral, este complexo sai do núcleo em direção ao citoplasma, onde, na presença da proteína de movimento MP é translocado para periferia celular. A MP aumenta então o limite de exclusão do plasmodesma possibilitando a passagem do complexo NSP-DNA viral de uma célula a outra. **B.** A proteína NSP forma um complexo com o DNA viral e juntamente com a proteína de movimento MP se move de uma célula a outra por meio do tubo formado a partir do RE.

Além das proteínas virais, o transporte de geminivírus pode envolver a formação de microtúbulos em células recém infectadas. Em células infectadas por SqLCV, foi observado a formação de túbulos, ausentes em plantas saudáveis ou inoculadas com mutantes de MP defectivos em movimento (WARD *et al.*, 1997). Experimentos de marcação evidenciaram a ligação da proteína MP a esses túbulos, assim também a foi co-localização da proteína BiP (“Binding protein”). O fato da proteína BiP ser um chaperone molecular residente no retículo endoplasmático sugere que estes túbulos são originários do RE (WARD *et al.*, 1997). PASCAL *et al.* (1994) observaram a formação do complexo NSP-ssDNA e propuseram que o genoma de SqLCV 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 (Figura 2B). Entretanto, os experimentos de microinjeção realizados por NOUEIRY *et al.* (1994) mostraram que a proteína MP de BDMV aumenta o limite de exclusão do plasmodesma, atuando como mediadora do movimento intercelular do genoma viral, independentemente de estruturas tubulares. No contexto desse modelo de movimento, tem sido sugerido que após a formação do complexo NSP-DNA, a proteína NSP transfere o genoma viral para a proteína MP e o complexo MP-DNA se move de uma célula a outra. Recentemente, experimentos realizados com os genes MP e NSP fusionados a genes repórteres e utilizadas em ensaios de biobalística, demonstraram que o complexo NSP-DNA e não MP-DNA, é que se move de uma célula a outra (Figura 2A) (ZHANG *et al.*, 2001).

2.3. Interação de proteínas virais com proteínas do hospedeiro

O processo de infecção de vírus de plantas depende do processo de replicação do genoma viral, do movimento célula-célula do vírus na planta hospedeira e do movimento sistêmico, que geralmente são dependentes de fatores do hospedeiro (HEATON & LIN, 2001). A família *Geminiviridae* é composta por vírus que são altamente dependentes de fatores do hospedeiro para sua

proliferação (LIU *et al.*, 1999). 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).

Fatores do hospedeiro são possivelmente inibidos ou ativados durante a infecção viral por proteínas produzidas pelo patógeno. Análises de interações proteína-proteína têm sido feitas com a utilização do sistema duplo-híbrido de leveduras, capaz de identificar proteínas do hospedeiro que são capazes de interagir com proteínas virais (Figura 3). O sistema duplo-híbrido envolve a expressão de proteínas quiméricas em leveduras, onde a proteína "isca" é fusionada ao domínio de ligação do fator transcricional GAL4 de leveduras. Sequências que codificam a proteína "alvo", são fusionadas à sequência do domínio de ativação do fator transcricional GAL4. A restauração funcional da proteína GAL4 é mediada pela interação das proteínas "isca" e "alvo" posicionando os domínios de ligação e ativação de GAL4 no promotor alvo (FEILOTTER *et al.*, 1994).

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). As retinoblastomas são proteínas que alteram o ciclo celular, podendo participar da regulação de um dos eventos que determinam a transição da fase G1 para a fase S. A identificação de proteínas homólogas à proteínas da família retinoblastoma em plantas, sugere uma estreita relação entre a regulação do ciclo celular de plantas e animais. O domínio de ligação a Rb, LXCXE, está presente em proteínas associadas à replicação de alguns vírus de plantas, como o WDV, *Maize streak virus* (MSV) e *Digitaria streak virus* (DSV) (HORVÁTH *et al.*, 1998). A proteína RB humana interage ainda com a proteína DNA5 do *Banana bunch top virus* (BBTV), um vírus de ssDNA que infecta plantas e possui seis componentes genômicos (WANITCHAKORN *et al.*, 2000).

Embora a proteína Rep de TGMV não possua o domínio clássico de interação a Rb (LXCXE), foi demonstrado que esta proteína interage com a

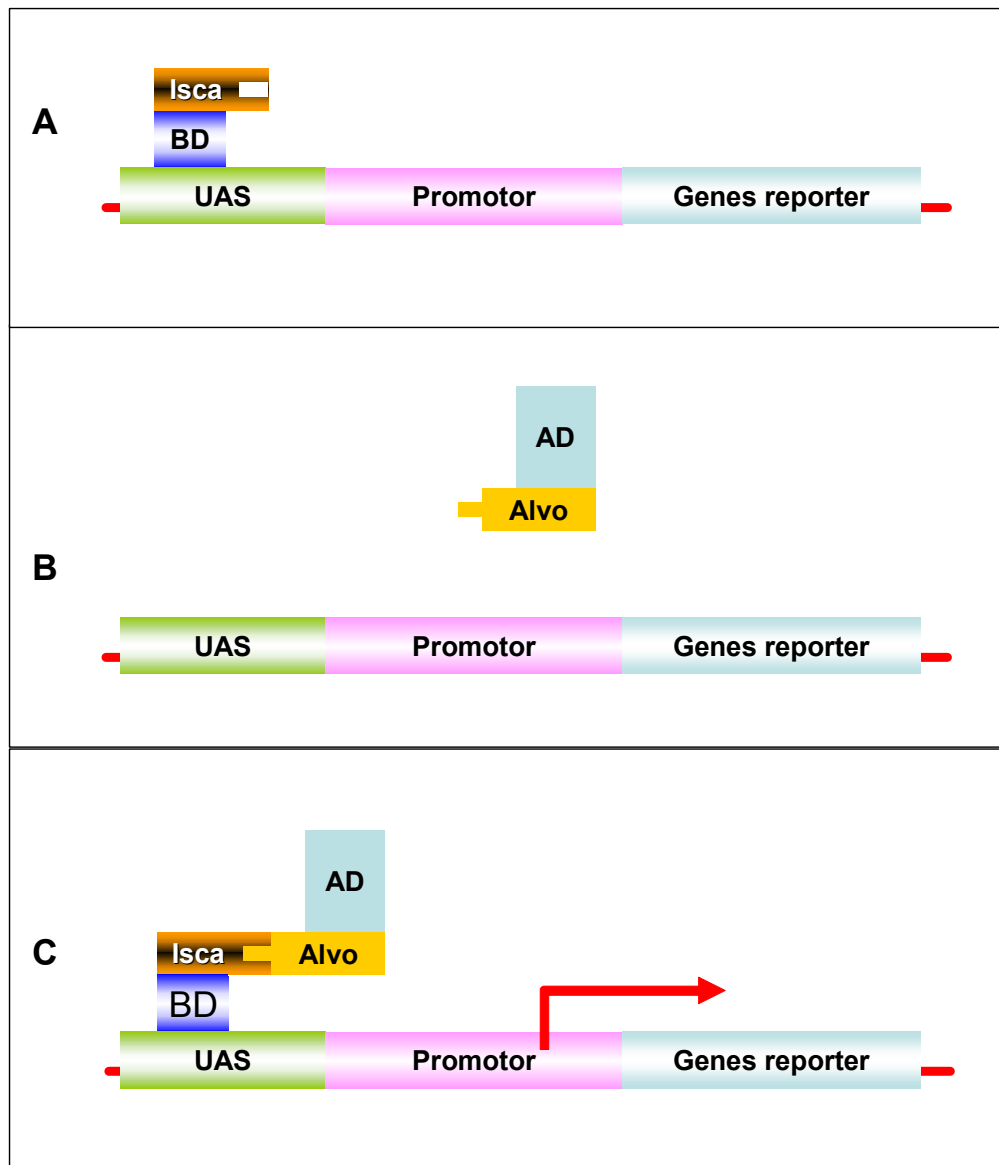


Figura 3. Representação esquemática do funcionamento do sistema duplo-híbrido. **A.** A proteína “isca” fusionada ao domínio de ligação ao DNA (BD) se liga a seqüência UAS mas não capaz de ativar a transcrição dos genes repórteres. **B.** As proteínas “alvo”, codificadas pela biblioteca de cDNA, fusionadas ao domínio de ativação de Gal4 (AD) não conseguem se ligar ao DNA consequentemente ativar a transcrição dos genes repórteres. **C.** Interação entre as proteínas “isca” e “alvo”, resultando na restauração de Gal4 consequentemente na expressão dos genes repórteres.

proteína retinoblastoma, e que o domínio de interação está localizado entre os aminoácidos 134 a 180 (SETTLAGE *et al.*, 2001). Este domínio se sobrepõe ao domínio de interação à proteína viral REn. Experimentos realizados com proteínas recombinantes mostram que a proteína REn de TGMV também é capaz de interagir com a proteína retinoblastoma de milho. Essa interação sugere que o complexo REn/Rep e não Rep/Rb seja funcional para o início da replicação de geminivírus.

O escrutínio de uma biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana* utilizando o sistema duplo-híbrido e usando como isca a proteína Rep de *Cabasse leaf curly virus* (CbLCV), foi realizado com a finalidade de identificar fatores do hospedeiro que estão envolvidos no processo de infecção (KONG & HANLEY-BOWDOIN, 2002). Foram identificados três cDNAs cujas proteínas codificadas interagem com a proteína Rep de TGMV. A proteína Rep foi capaz de interagir com a histona H3, o que é consistente com a função da proteína Rep durante o processo de replicação do DNA viral. A ligação da proteína Rep à histona H3 pode alterar ou desfazer os nucleossomos, facilitando assim a replicação e transcrição do genoma viral. O segundo cDNA identificado foi o que codifica para proteína denominada GRIMP. Essa proteína, além de um domínio de cinase, contém em sua região central um domínio de ligação à ciclina (cdc2), o que sugere sua participação no processo de divisão celular. A região central também é responsável pela interação com a proteína viral Rep. Experimentos de imunolocalização mostraram que a proteína GRIMP foi localizada no fuso e em cromossomos condensados durante a mitose. A interação GRIMP/Rep pode estar relacionada com a condensação da cromatina observada em células infectadas por meio de hibridização *in situ* (BASS *et al.*, 2000). Nestes experimentos foi demonstrado que células de *N. benthamiana* infectadas por TGMV apresentavam a cromatina condensada em estágio semelhante àquele observado em células em prófase.

O domínio de Rep que interage com GRIMP também interage com a proteína GRIK, cujo cDNA foi identificado pela capacidade interagir com a proteína Rep (KONG & HANLEY-BOWDOIN, 2002). A GRIK é uma proteína

cinase citoplasmática, não relacionada a receptores de cinase e tem sua expressão regulada durante o desenvolvimento da planta, possuindo altos níveis em folhas jovens. Experimentos mostraram que a proteína GRIK não fosforila Rep, o que sugere que Rep pode recrutar o substrato para proteína GRIK, em células infectadas.

Estudos relacionados aos processos pelos quais ocorre a transmissão do vírus pelo inseto vetor ainda são pouco difundidos. Experimentos *in vitro* demonstraram a afinidade entre uma proteína homóloga a GroEL, encontrada em mosca branca e partículas do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (MORIN *et al.*, 1999). A utilização do sistema duplo-híbrido permitiu verificar a interação entre a proteína GroEL e a proteína CP de dois geminivírus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) e *Tomato yellow leaf curl virus* – Israel (TYLCV-Is), uma vez que experimentos anteriores demonstraram o envolvimento da proteína CP na transmissão pelo inseto vetor (MORIN *et al.*, 2000). A interação entre a proteína CP e a proteína GroEL pode estar envolvida na especificidade do vírus pelo vetor na família *Geminiviridae*.

Embora evidências sugere que o movimento célula à célula e sistêmico de geminivírus na planta infectada seja absolutamente dependente de interações com fatores do hospedeiro, as bases moleculares dessas interações ainda não foram elucidadas. Entretanto, caracterizações moleculares de interações entre proteínas virais de movimento e fatores do hospedeiro têm sido conduzidas para outras famílias de vírus de planta.

Os Tospovirus são vírus de RNA fita simples que infectam plantas. O RNA S de *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) codifica as proteínas do nucleocápsido (N) e de movimento (NSm), que parecem estar envolvidas com o movimento do vírus na planta (UHRIG *et al.*, 1999). A avaliação da capacidade de multimerização da proteína N por meio do sistema duplo híbrido mostra que essa proteína é capaz de formar homomultímeros *in vivo*, sugerindo que essa proteína possa estar relacionada ao reconhecimento específico e ligação correta ao RNA viral. KORMELINK *et al.* (1994) sugeriram que as proteínas N e NSm de TSWV interagem formando estruturas tubulares que facilitam o movimento

do vírus célula-célula. A interação entre essas proteínas foi confirmada por meio de experimentos, utilizando também o sistema duplo-híbrido de leveduras. Uma vez que a proteína N de TSWV tem sido relacionada à formação do nucleocapsídeo, esta interação pode sugerir o reconhecimento específico de estruturas presentes no nucleocapsídeo (SOELLICK *et al.*, 2000). Utilizando o sistema duplo híbrido, foi demonstrado que a proteína NSm de TSWV interage com proteínas homólogas à família DnaJ de *Nicotiana tabacum* e *A. thaliana*. As proteínas da subclasse da família que contêm o domínio DnaJ podem se ligar às chaperoninas Hsp70, regulando sua atividade através de modificações conformacionais e estimulação da hidrólise de ATP (KELLEY, 1998). A interação entre a proteína NSm/DNAJ sugere o recrutamento de Hsp70 durante o processo de translocação do genoma viral (SOELLICK *et al.*, 2000).

O TMV é um vírus de RNA que codifica uma proteína relacionada ao movimento do genoma viral muito bem caracterizada. Essa proteína de 30kDA é capaz de interagir com o plasmodesma aumentando o limite de exclusão e facilitando a translocação do genoma viral célula-célula (WAIGMANN *et al.*, 1994; WOLF *et al.*, 1989). Experimentos para a detecção de fatores do hospedeiro que interagem com a MP de TMV, mostraram que a MP se liga a uma pectina metiltransferase (PME), uma proteína ligada à parede celular (CHEN *et al.*, 2000). Esta proteína é também capaz de interagir com a MP de *Turnip vein clearing virus* (TVCV) e de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). A PME modula o pH e o transporte de íons, o que afeta a porosidade da parede celular (PRESSEY *et al.*, 1984; NAIRN *et al.*, 1998). Deleções no domínio de interação entre a MP e PME levam à perda da capacidade de infecção do vírus na planta hospedeira, sugerindo uma função biológica para esta interação durante o movimento célula a célula do vírus (WAIGMANN *et al.*, 1994). A interação MP-PME pode estar relacionada a induções de mudanças da permeabilidade do plasmodesma (CHEN *et al.*, 2000). Interações entre proteínas cinase e a MP de TMV também foram detectadas (CITOVSKY *et al.*, 1993). Estes estudos sugerem que a fosforilação de proteínas seja um mecanismo pelo qual a planta regula o transporte de macromoléculas na célula. A fosforilação da proteína MP

de TMV parece atuar como um regulador negativo no transporte através do plasmodesma, dificultando o tráfego do genoma viral (WAIGMANN *et al.*, 2000). O efeito regulatório sobre a permeabilidade do plasmodesma pode ser variável de acordo com hospedeiro, o que poderia contribuir para a susceptibilidade diferencial das diferentes plantas hospedeiras.

O *Turnip crinkle virus* (TCV) é um vírus de RNA que codifica duas proteínas envolvidas no movimento do genoma viral (HACKER *et al.*, 1992). Experimentos realizados com a proteína viral p8 mostraram que esta interage com a proteína Atp8 de *A. thaliana* (HEATON & LIN, 2001). Atp8 possui dois domínios transmembrana e duas seqüências RDG. A seqüência de aminoácidos RDG está relacionada à interação com integrinas (ROIVAINEN *et al.*, 1994; WICKHAM *et al.*, 1993), o que sugere que esta proteína pode estar envolvida no movimento célula-célula do vírus na planta (HEATON & LIN, 2001). TCV, similarmente ao que acontece em vírus animais, pode utilizar interações tipo RDG-integrinas-citoesqueleto para facilitar o seu movimento na planta hospedeira.

Em resumo, o sistema duplo híbrido em leveduras tem sido amplamente utilizado para detectar interações vírus-hospedeiro. Particularmente no caso de geminivírus, as interações identificadas se concentram no processo de replicação do genoma viral, especialmente no que se refere ao isolamento de cDNAs de proteínas que interagem com a proteína Rep. Assim também, evidências indicam que ocorre uma interação produtiva entre a proteína CP de geminivírus e a proteína GroEL do inseto vetor, durante o processo de transmissão. Quanto ao mecanismo de movimento do genoma viral na planta hospedeira, enquanto que as evidências demonstram uma dependência absoluta de fatores do hospedeiro, conforme demonstrado pelas interações identificadas entre proteínas de movimento de vírus de RNA e proteínas do hospedeiro, nenhuma interação específica vírus-hospedeiro possivelmente envolvida no movimento de geminivírus tem sido identificada, o que constitui objetivo primordial dessa investigação.

3. OBJETIVOS

No Brasil tem sido recentemente identificado um grande aumento populacional de geminivírus em tomateiros. Contudo o conhecimento sobre as interações patógeno:hospedeiro e movimento do vírus célula:célula ainda é restrito. Pouco se sabe sobre fatores do hospedeiro que são induzidos ou inibidos durante a infecção viral. Esses fatos argumentam a favor do desenvolvimento de pesquisas que definam estratégias gerais eficientes para resistência engenheirada aplicáveis contra diversos membros da família Geminiviridae. Sendo assim o objetivo geral desse trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos na interação patógeno:hospedeiro na infecção de tomateiros pelo vírus TGMV envolvidos no processo de movimento do genoma viral no hospedeiro. Especificamente a verificação da ocorrência de interações entre as proteínas de movimento viral NSP e MP de TGMV e o isolamento de fatores do hospedeiro que interagem com a proteína de NSP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Clonagem dos genes virais nos vetores pADGAL4 e pBDGAL4 Cam

4.1.1. Clonagem do gene *REn* em pBDGAL4 Cam

O gene que codifica a proteína viral REn foi amplificado por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) a partir do clone pTG 1.3A, que contém 1,3 cópias do componente A de TGMV (*Tomato golden mosaic virus*), utilizando os oligonucleotídeos específicos AL3FECO1453 e AL3RSM1003 (Tabela 1). As sequências dos oligonucleotídeos introduzem os sítios para enzimas de restrição *Eco* RI e *Pst* I nas extremidades 5’ e 3’ do gene *Ren*, respectivamente. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador MJ RESEARCH Peltier Thermal Cyclor 200 com incubação inicial de 1 min a 94°C, seguido por 30 ciclos consecutivos de 94°C por 45 seg para desnaturação, 50°C por 1 min para anelamento e extensão por 1’30 min a 72°C. Após os ciclos, a reação foi submetida a um período adicional de polimerização de 10 min a 72°C. Cada reação continha além do DNA molde, 1 unidade de Pfu polimerase (Pharmacia Biotech) e 20 pmoles dos oligonucleotídeos em um volume final de 100 µL. Os produtos das amplificações foram dessalinizados, utilizando-se o “Kit Prep-A-Gene”(BIORAD) e, em seguida, digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Pst* I.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *MP*, *NSP*, *REn* e para amplificação de fragmentos inseridos nos vetores pAD-GAL4 2.1 e pBD-GAL4 Cam

	Oligonucleotídeos	Seqüência
5' gene <i>MP</i>	BL1FECO2185	GGGAGGTCTTCAGAATTCATGGATTC
3' gene <i>MP</i>	BL1RPS1612	CCTGTTAGATCTGCAGGGGGATCTG
5' gene <i>MP</i>	FCBL1PST1620	GGGCCTGTTAGATCTGCAGGCGGATC
3' gene <i>MP</i>	RBNBL1ECO2020	GTGTGATTGAATTCAGGCAACAGG
5' gene <i>NSP</i>	BR1F443 e	GGATATTATAAGTTAACATGTACTC
3' gene <i>NSP</i>	BR1RPS1250	AGTTGGCTGCAGTATGACATTATTG
5' gene <i>REn</i>	AL3FECO1453	CGACTGCAGAATTCATGGATTCACGC
3' gene <i>REn</i>	AL3RSM1003	TGCCTCTAACCCGGGGTATGCGACG
Vetor pADGAL4 2.1	AD745F	AGGGATGTTTAATACCACTAC
	AD929R	GCACAGTTGAAGTGAAGTTGC
Vetor pBDGAL4 Cam	GAL4BDF	GATTGGCTTCAGTGGAGACT
	PBDR	GAAATTCGCCCAGGAATTAGC

A região sublinhada representa o sítio da enzima de restrição introduzido por mutações induzidas por PCR.

A reação de ligação do fragmento ao vetor foi conduzida de acordo com técnicas padrões de clonagem molecular em plasmídeos (SAMBROOK *et al.*, 1989). Foi utilizada a proporção de 3:1 do DNA a ser clonado e do vetor pBDGAL4 Cam (Tabela 2), previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição e desfosforilado. A reação de ligação foi feita em um volume de 15 µL, na presença de 0,5 U da enzima T4 DNA ligase (GIBCO/BRL), Tris HCl 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 10mM, ATP 1mM, DTT 1mM, polietilenoglicol 8000 5% (p/v), seguida de incubação a mistura incubada a 14°C por 24 horas.

Após a reação de ligação, 200µL da suspensão de células competentes de *E. coli*, estirpe JM109, preparadas como descrito por SAMBROOK *et al.* (1989), foram transformadas com 7,5 µL do DNA recombinante. Para transformar as

Tabela 2. Estirpes de leveduras e plasmídeos usados na presente investigação

Levedura	Estirpe	Características relevantes	Referência
S. cerevisiae	YRG-2	Mato α ura3 his3-200 ade-1-1 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 gal4-542 gal80-553 LYS::UAS _{GAL1} -TATA _{GAL1} -HIS3 URA3:: UAS _{GAL4} -TATA _{GCYC} : - lacZz	Stratagene
Plasmídeos	Características relevantes		Referência
pADGAI4 2.1	<i>leu2</i> Amp ^R Gal4AD		Stratagene
pBDGAL4 Cam	<i>trp1</i> Cam ^R GAL4BD		Stratagene
pSV40	pADGAL4 Cam contendo t-antisense de SV40		Stratagene
pGAL4	<i>leu2</i> Amp ^R Gal4		Stratagene
pBD-NSP	pBDGAL4 Cam contendo ORF (807 pb) de NSP		Este trabalho
pBD-MP	pBDGAL4 Cam contendo ORF (573pb) de MP		Este trabalho
pBD-REn	pBDGAL4 Cam contendo ORF (450 pb) de REn		Este trabalho
pBD-Rep	pBDGAL4 Cam contendo ORF (1470 pb) de Rep		Este trabalho
pBD-AC4	pBDGAL4 Cam contendo ORF (261 pb) de AC4		Este trabalho
pAD-MP	pADGAL4 Cam contendo ORF (573pb) de MP		Este trabalho
pAD-tMP	pBDGAL4 Cam contendo ORF (400 pb)MP truncada		Este trabalho
pAD-NIK	pADGAL4 Cam contendo cDNA parcial (1000 pb) de NIK		Este trabalho
pAD-GmNIK	pADGAL4 Cam contendo ORF (2200pb) GmNIK		Este trabalho

células competentes, a mistura contendo a suspensão de células e o DNA recombinante foi mantida a 0°C por 30 minutos. Após um choque térmico de 1 minuto a 42°C, foi adicionado 1mL de meio LB e incubado a 37°C por 1 hora. Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 μ L de meio LB e distribuídas em placa de Petri contendo meio LB contendo cloranfenicol (SIGMA) 50 μ g/mL, para seleção das colônias transformantes. O clone resultante pUFV285 contém a sequência codificadora de REn fusionada ao domínio de ligação de Gal4.

4.1.2. Clonagem dos genes MP e NSP

Os genes *MP* e *NSP* foram amplificados por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) a partir do clone pTG 1.4B que contém 1,4 cópias do componente B de TGMV. Nessa reação, foram utilizados oligonucleotídeos específicos que introduziram sítios para enzimas de restrição apropriadas para clonagem nos vetores pAD-GAL4 2.1 (Tabela 2) e pBD-GAL4 Cam (Stratagene) (Tabela 1). As reações de amplificação foram conduzidas, conforme descrito no item 3.1.1.

O gene que codifica a proteína de movimento viral MP foi clonado no vetor pAD GAL4 2.1 em duas versões, uma que codifica a proteína integral obtida com a amplificação do gene utilizando os oligonucleotídeos BL1FECO2185 e BL1RPS1612 e, em uma versão truncada obtida com os oligonucleotídeos FCBL1PST1620 e RBNBL1ECO2020. Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas *Eco* RI (GIBCO) e *Pst* I (GIBCO) e clonados em pADGAL4 Cam, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição, resultando nos clones pUFV208 e pUFV237. O clone pUFV208 contém uma versão truncada da proteína MP que codifica os aminoácidos da posição 1 a 127, fusionado ao domínio de ativação de GAL4. No clone pUFV237, a sequência completa da proteína MP foi fusionada ao domínio de ativação de GAL4. O gene que codifica a proteína MP também foi clonado nos sítios *Eco* RI e *Pst* I do vetor pBDGAL4, dando origem ao clone pUFV 239.

O gene que codifica a proteína NSP foi amplificado a partir do DNA do clone pTG 1.4B, utilizando-se os oligonucleotídeos BR1F443 e BR1RPS1250. Após amplificação, o fragmento de DNA foi digerido com a enzima de restrição *Pst* I e inserido nos sítios das enzimas de restrição *Sma* I e *Pst* I do vetor pBD Gal4. O clone obtido foi denominado pUFV264.

4.2. Propagação dos clones em *S. cerevisiae* estirpe YRG-2

Os clones obtidos no item anterior foram utilizados para transformação da levedura *S. cerevisiae* estirpe YRG-2 (Tabela 2). Aproximadamente 25 µl de

uma suspensão de células competentes foram transformadas com 100 ng do plasmídeo em 240 µL de polietilenoglicol 50% (v/v), 36 µL acetato de lítio 1 M e 50 µL de ssDNA (DNA de espermatozoides de salmão) na concentração 20 mg/mL. A mistura foi incubada a 30 °C por 30 minutos e, posteriormente, a 20 min por 4°C. A suspensão celular foi concentrada por centrifugação, ressuspensa em 200 µL de meio SD (6,7 % de meio para leveduras sem dextrose e sem aminoácido – YNB, BIO) e plaqueada em meio seletivo SD sem o aminoácido triptofano para o clone pUFV264 ou em meio SD sem o aminoácido leucina para os clones pUFV208 e 237. O diagnóstico dos transformantes foi realizado por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos que flanqueiam o sítio de clonagem nos vetores pBDGAL4 Cam ou pAD-GAL4 2.1 (Tabela 1) e os clones obtidos propagados em *S. cerevisiae* estirpe YRG-2 encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Clones obtidos em *S. cerevisiae* estirpe YRG-2

Clone	Descrição
pUFV 343 (pBD-NSP)	Levedura YRG-2 transformada com a construção proveniente de pUFV264 (BD-NSP)
pUFV 344 (pAD-MP)	Levedura YRG-2 transformada com a construção proveniente de pUFV237 (AD-MP)
pUFV 346 (pGAL4)	Levedura YRG-2 transformada com DNA de pGAL4
pUFV 349 (pAD-MP+ pBD-NSP)	Levedura YRG-2 transformada com a construção proveniente de pUFV237 (AD-MP) e pUFV 264 (BD-NSP)
pUFV 360 (pBD-REn)	Levedura YRG-2 transformada com a construção proveniente de pUFV285 (BD-REn)
pUFV 361 (pAD-tMP+ pBD-NSP)	Levedura YRG-2 transformada com a construção proveniente de pUFV208 (AD-tMP) e pUFV 264(BD-NSP)
pUFV 370 (pAD-MP+ pBD-MP)	Levedura YRG-2 transformada com a construção proveniente de pUFV237 (AD-MP) e pUFV 239(BD-MP)

4.3. Determinação da atividade de ativação transcricional e/ou atividade de ligação ao DNA de proteínas virais

A atividade de ativação transcricional ou de ligação ao DNA foi avaliada segundo a metodologia descrita por SONG *et al.* (1994), utilizando o *o*-nitrofenol β -D-galactopiranosídeo (ONPG). Neste ensaio, células transformadas com a construção apropriada foram crescidas em meio seletivo durante 24 horas e as absorvâncias (OD_{600}) foram ajustadas para 1,0 em 100 μ L do tampão Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$ 60 mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 40 mM, pH 7,0, KCl 10 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM). Em seguida, as células foram rompidas em nitrogênio líquido. Foram adicionados às amostras 700 μ L de tampão Z com β -mercaptoetanol e 160 μ L de uma solução de *o*-nitrofenol β -D-galactopiranosídeo 14,6 mM diluído em tampão Z. Às amostras foram incubadas a 30°C até que houvesse o desenvolvimento de uma cor amarela, resultado da atividade da enzima β -galactosidase e, em seguida, a reação foi bloqueada usando 400 μ L de uma solução de Na_2CO_3 1M. A atividade foi determinada de acordo com a equação sugerida por SONG *et al.* (1994).

4.4. Identificação da interação entre a proteína nsp e proteínas do hospedeiro

4.4.1. Construção da biblioteca de cDNA de tomate (*Lycopersicum esculentum*)

Plantas de tomateiros Santa Clara cultivados em casa de vegetação foram utilizados para a obtenção do mRNA. Folhas jovens foram coletadas, trituradas em nitrogênio líquido na presença de tampão de extração (Tris 0,18 M, pH 8,5, LiCl 0,09 M, EDTA 4,5 M, SDS 1% (p/v), β -mercaptoetanol) e fenol tamponado pH 7,0 para a extração da fração protéica. O RNA total foi então precipitado em cloreto de lítio 8 M e, finalmente, ressuspensionado em água. O mRNA foi isolado utilizando o RNasy maxy kit (Quiagen), de acordo com as instruções do fabricante e utilizado para a síntese do cDNA, segundo o protocolo descrito no

manual do kit “two hybrid” cDNA (Stratagene). O cDNA obtido foi clonado no vetor HibriZap (Stratagene), contendo as seguintes características: domínio de ativação de *gal4*, *leu*⁺ e *amp*^r. A biblioteca obtida foi posteriormente amplificada ($6,0 \times 10^{13}$) e excisada de acordo com o protocolo descrito no manual do kit “two hybrid” cDNA (Stratagene).

4.4.2. Interação entre a proteína viral NSP e proteínas do tomateiro

A interação das proteínas virais com proteínas do tomateiro foi avaliada utilizando o “Two Hybrid System” (Stratagene) (Figura 4). O clone pUFV 264, contendo a proteína viral NSP, clonada em pBD-GAL4 Cam foi utilizada como “isca” em ensaios de interação específica pelo sistema duplo-híbrido, tendo como alvo a biblioteca de cDNA de tomate.

A levedura *S. cerevisiae* estirpe YRG-2 foi inicialmente transformada com o clone pUFV264 e, subsequente, co-transformada com a biblioteca de cDNA de tomate, que encontra-se clonada no vetor pAD-GAL4, fundida ao domínio de ativação de GAL4, conforme descrito no item 3.4.1. Os clones de interação vírus-hospedeiro foram selecionados em meio seletivo SD na ausência dos aminoácidos histidina, leucina e triptofano. Após a seleção em meio SD, os clones foram crescidos em meio líquido e submetidos a ensaios de avaliação quantitativa da atividade da enzima β -galactosidase, conforme descrito anteriormente.

O DNA plasmidial dos clones de interação positiva foi extraído da levedura com tampão de extração [(Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; Triton X 2% (v/v); SDS 1% (p/v)], seguido de adição de fenol: clorofórmio na proporção 1:1, precipitado com etanol 70 % v/v e acetato de sódio 0,3 M pH 7,5. O DNA plasmidial extraído foi utilizado para diagnóstico por PCR com oligonucleotídeos específicos, AD745F e AD929R (Tabela 1) e para transformação de *E. coli* estirpe XL1-Blue, por meio de eletroporação, a 2500 V, 2,5 μ F e 250 Ω .

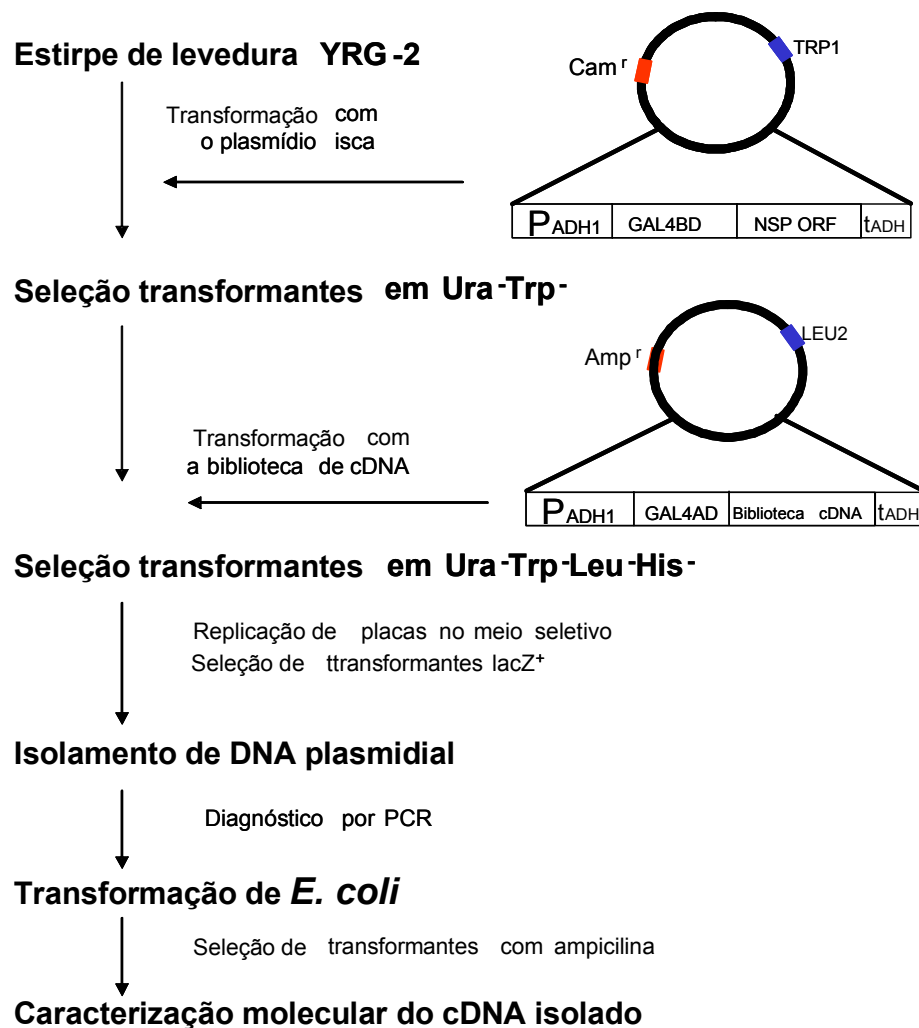


Figura 4. Estratégia experimental para identificação de proteínas de tomateiros que interagem com NSP. A levedura estirpe YRG-2 foi sequencialmente transformada com pBD-NSP e a biblioteca de cDNA de tomateiros. Os transformantes foram selecionados em meios apropriados, conforme descrito em material e métodos. Candidatos His⁺ e lacZ⁺ foram selecionados para caracterizações adicionais.

4.4.3. Caracterização molecular do clone pUFV371, identificado no ensaio de interação com NSP

O cDNA obtido no ensaio de interação foi eletroporado em suspensão de células de *E coli* estirpe XL1-Blue, dando origem ao clone pUFV 371. Após a obtenção do mapa de restrição do clone pUFV371, foram gerados dois subclones, com a finalidade de facilitar o sequenciamento. O clone pUFV371 foi digerido com a enzima de restrição *Hind III* e o fragmento liberado foi inserido no mesmo sítio do vetor pUC118 originando o clone pUFV431. O subclone pUFV432 foi obtido por meio da transferência do fragmento *Bam* HI e *Pst* I de pUFV371 para o vetor pUC118, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição.

As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático Pelkin Elmer, modelo 377, utilizando o “Pelkin Elmer ABI-Prism Thermo cycle Sequencing Dye Terminator Kit”, segundo recomendações do fabricante.

4.4.4. Análise das seqüências

As análises de comparação de seqüências do DNA foram realizadas com o auxílio dos programas computacionais encontradas no endereço eletrônico <http://www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html> (“Sequence Interpretation Tools”), onde estão disponíveis os endereços dos seguintes programas: <http://blast.genome.ad.jp/> (“Blast”), <http://clustalw.genome.ad.jp/> (“Clustalw”) e a análise dos domínios nos programas <http://psort.nibb.ac.jp> (PSORT- Prediction of protein sorting signals and localization sites in amino acids sequences). A tradução de seqüências de DNA foi feita utilizando o programa <http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html> (“DNA to protein translation”). As sobreposições das seqüências dos sub-clones foram feitas utilizando o programa http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/cap_in.pl (CAP). A árvore de homologia foi feita no programa DNAMAN versão 4.0. As seqüências utilizadas na construção do cladograma de homologia encontram-se relacionadas na Tabela 4.

Tabela 4. Proteínas utilizadas na análise de homologia

NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK	PROTEÍNA
AY088040	Receptor protein kinase-like (<i>Arabidopsis thaliana</i>) - AtRPK
NM_127957	Putative LRR receptor protein kinase (<i>Arabidopsis thaliana</i>) - AtPLRRPK
AC002292	Putative Serine/Threonine protein kinase (<i>Arabidopsis thaliana</i>) - AtPSTK
AJ277703	Somatic embryogenesis receptor kinase (<i>Zea mays</i>) - ZmSERK2
NM_123946	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, (<i>Arabidopsis thaliana</i>) - AtPLRRTPK
AP003044	Putative receptor like kinase (<i>Oryza sativa</i>) - OsPRLK
Y14600	Putative protein serine/threonine kinase (<i>Sorghum bicolor</i>).- SbSTK
BAB78668	Putative receptor protein kinase PERK1 (<i>Oryza sativa</i>) - OsPERK1
AAK21965	Receptor protein kinase PERK1 (<i>Brassica napus</i>) - BnPERK1
NP_173940	Pto kinase interactor, putative; (<i>Arabidopsis thaliana</i>) - AtPtoP
T50851	Receptor protein kinase homolog - soybean - GmRPKH
AAF91322	Receptor-like protein kinase1(<i>Glycine max</i>) - GmRLPK
AAK58568	Receptor-like protein kinase (<i>Lycopersicon peruvianum</i>) - LpRLPK
AAK28346	Receptor-like protein kinase 1 (<i>Zea mays</i>) - ZmRLP
AAB47421	Serine/threonine protein kinase Pto (<i>Lycopersicon esculentum</i>) - LeSTPKPto
T07589	Disease resistance protein Prf - tomato. -LeDRPPrf
AAK28345	Receptor-like protein kinase 3 (<i>Lycopersicon esculentum</i>) - LeRLK3
CAC83607	Putative receptor-like serine-threonine protein kinase (<i>Solanum tuberosum</i>).- StRLKST
S42867	Protein kinase (EC 2.7.1.-) – spinach - SpoPK
gi:18405693	Wall-associated kinase 2, putative; protein id: Atlg56120.1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) - AtWKP
AF197946	Receptor protein kinase-like protein (CLV1A) (<i>Glycine max</i>) - GmCLV1A
AY007367	<i>Lycopersicon esculentum</i> tospovirus resistance protein C (Sw5-c) - LeSW5C

A análise do potencial de fosforilação da proteína NSP foi feita utilizando o programa <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos> (NetPhos 2 Prediction Server).

4.5. Expressão da proteína cinase de tomate

4.5.1. Clonagem da sequência parcial da proteína cinase de tomate no vetor de expressão pET16B (Novagen)

O inserto do clone pUFV 371 que corresponde a sequência parcial de uma cinase de tomateiro foi liberado com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Pst* I. O fragmento liberado foi tratado com a enzima Klenow (Pharmacia Biotech) para a obtenção de extremidades abruptas e clonado no vetor pET16B (Novagen), que foi previamente digerido com a enzima de restrição *Bam* HI (GIBCO) e reparado com a enzima Klenow. O diagnóstico da orientação senso foi feito por meio de digestão com a enzima de restrição *Bgl* II (GIBCO) e o clone resultante na orientação senso foi denominado pUFV423. O DNA plasmidial do clone pUFV423 foi extraído e utilizado para transformação de suspensão de células competentes de *E. coli* estirpe BL21(DE3), originando o transformante pUFV466.

4.5.2. Indução da versão truncada da proteína cinase de tomateiro

Células de *E. coli* transformadas com o clone pUFV466 foram crescidas em 2 mL de meio LB com ampicilina (50 µg/mL) a 37°C, por 16 horas e usadas como inóculo para expressão da proteína em 50 mL de meio. A suspensão de células de *E. coli* foi crescida a 37°C em meio seletivo até atingir a absorvância (OD₆₀₀) de 0,6, quando foi submetida à indução com IPTG 2mM, por 10 horas. Após o período de indução, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 5000 g a 4°C e, em seguida, ressuspensas em tampão de ligação (Imidazol 5,0 mM, NaCl 0,5 mM, Tris HCl pH7,9 120 mM), sonicada para o rompimento celular e centrifugada durante 15 minutos, 20.000 g a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi coletado. O “pellet” foi ressuspendido em tampão de ligação, contendo uréia 9 M e incubado no gelo durante 1 hora. Após este período, a suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições

anteriores e a fase aquosa contendo as proteínas insolúveis coletada foi filtrada em membrana de 22 µm (Millipore), para posterior utilização. As frações solúvel e insolúvel foram analisadas em gel de poliacrilamida contendo SDS, segundo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970).

4.5.3. Purificação da versão truncada da proteína cinase de tomateiros

A purificação da versão truncada da proteína cinase de tomateiro foi feita por cromatografia de afinidade, uma vez que esta se encontrava fundida a uma cauda de histidina. A indução da expressão da proteína cinase de tomate foi feita em 500 mL de meio LB, contendo ampicilina (50 µL/mL), seguindo os mesmos passos descritos anteriormente. A fração insolúvel ressuspensa em tampão de ligação contendo uréia 9 M foi aplicada em coluna de cromatografia, contendo a resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia Biotech), ativada com Ni^{++} .

A coluna cromatográfica contendo 2 mL da resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia Biotech) foi inicialmente lavada com 10 mL de água, seguida de 15 mL de tampão de troca (NiSO_4 50 mM) e finalmente equilibrada com 10 mL de tampão de ligação contendo uréia 9 M. O extrato bruto de proteínas insolúveis foi aplicado à coluna, sendo a coluna inicialmente lavada com 18 mL de imidazol 60 mM, NaCl 0,5 M, tris-HCl 20 mM pH 7,9 e, posteriormente, a proteína recombinante foi eluída em 15 mL de tampão de eluição (Imidazol 1 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM pH 7,9, Ureia 6 M). Foram coletadas frações de 1mL e a purificação da proteína cinase de tomate foi analisada em gel de poliacrilamida contendo SDS, corado com “coomassie brilliant blue”.

4.6. Obtenção do anticorpo contra a proteína cinase de tomate

4.6.1. Imunização de coelhos

O anticorpo contra a proteína cinase de tomate foi obtido pela imunização de coelhos. Foram realizadas quatro imunizações em intervalos de sete dias utilizando como imunógeno a proteína recombinante. A primeira aplicação continha 500 µg da proteína truncada purificada e 250 µl de Adjuvante de Freud's completo. As demais imunizações continham o Adjuvante de Freud's incompleto e a mesma quantidade de proteína. As coletas de sangue para a obtenção do anticorpo, em um total de quatro, foram realizadas após o término das imunizações em intervalos de sete dias. Após a coleta, o sangue foi incubado a 37°C por uma hora, incubado a 4°C durante a noite e, em seguida, centrifugado a 3000 g por 15 minutos a 4°C. O soro foi coletado e estocado a -20°C. O anticorpo proveniente das quatro diferentes imunizações foi testado nas diluições 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000 em "imunoblotting".

4.6.2. Verificação da especificidade do anticorpo

Extratos protéicos de suspensão de células de *E. coli* transformadas com a construção proveniente de pUFV 466 e com a suspensão de células de *E. coli* não transformadas, foram obtidos de acordo com o protocolo descrito no item 3.5.2. Os extratos protéicos fracionados por eletroforese em gel de acrilamida contendo SDS (LAEMMLI, 1970). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em cuba de transferência (Biorad) durante uma hora a 60 V. As membranas foram bloqueadas com o "Blocker" (Biorad). Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com TBS (Tris-HCl 10 mM/L, pH 7,6 e NaCl 140 mM) adicionado de Tween 0,1% (v/v) (TBS-T) e, em seguida, incubadas durante 2 horas com anticorpo contra a proteína cinase truncada na diluição 1:500. Após as membranas serem novamente lavadas com TBS-T e incubadas durante 2 horas com um anticorpo

contra IgG conjugada à fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5000. A membrana foi lavada extensivamente com TBS-T e, subseqüentemente, incubada com tampão da enzima (Tris-HCl 0,1 M, pH 9,8, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,5 M) por cinco minutos. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se os substratos NBT (azul-nitro-tetrazolium, GIBCO/BRL) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, GIBCO/BRL).

4.6.3. Extração de proteínas e “immunoblotting”

Extratos protéicos provenientes de diversos órgãos da planta foram extraídos de acordo com a metodologia descrita por GÖRG *et al.* (1988). Aproximadamente 2 g de tecido de folha foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados com ácido tricloroacético 10% (v/v), em acetona contendo 2-mercaptoetanol 0,07% (v/v). A fração de proteína total foi precipitada a -20°C durante 40 minutos, centrifugada a 16.000 g a 4°C, por 15 minutos e lavada 2-3 vezes com acetona contendo 0,07% (v/v) de 2-mercaptoetanol. O precipitado foi secado à vácuo, ressuspendido em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, SDS 1% (p/v) e EDTA 25 mM, na proporção de 100 mg/pmol. Após nova centrifugação a 25.000 g por 20 minutos, a concentração de proteína no sobrenadante foi determinada como descrito por BRADFORD (1976). Os extratos protéicos foram analisados em gel de acrilamida (LAEMMLI, 1970) e por “imunoblotting”, conforme descritos no item 4.6.2.

5. RESULTADOS

Os genes que codificam para as proteínas virais NSP, MP e REn de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Figura 1) foram clonados em vetores apropriados e utilizados na triagem da biblioteca de cDNA por meio do sistema duplo híbrido. As construções obtidas são apresentadas na Tabela 4.

5.1. A proteína REn complementa o domínio de ativação transcricional de GAL4

Os plasmídeos recombinantes pBD-NSP e pBD-Ren foram mantidos em leveduras, praqueadas em o meio seletivo sem o aminoácido triptofano, enquanto que os plasmídeos pAD-MP e pAD-tMP foram propagados em leveduras multiplicadas em meio seletivo sem leucina. As leveduras transformadas com pBD-NSP, pAD-MP e pAD-tMp não cresceram na ausência de histidina, confirmando que as referidas proteínas virais não substituem o domínio ativação ou de ligação de GAL4 ausente nos respectivos plasmídeos e não induzem o promotor *HIS3* (Figura 5A) e o promotor *lacZ* (Figura 5B), ambos sob o controle de GAL4. Em contraste, transformação de *S. cerevisiae*, estirpe YRG-2 com o

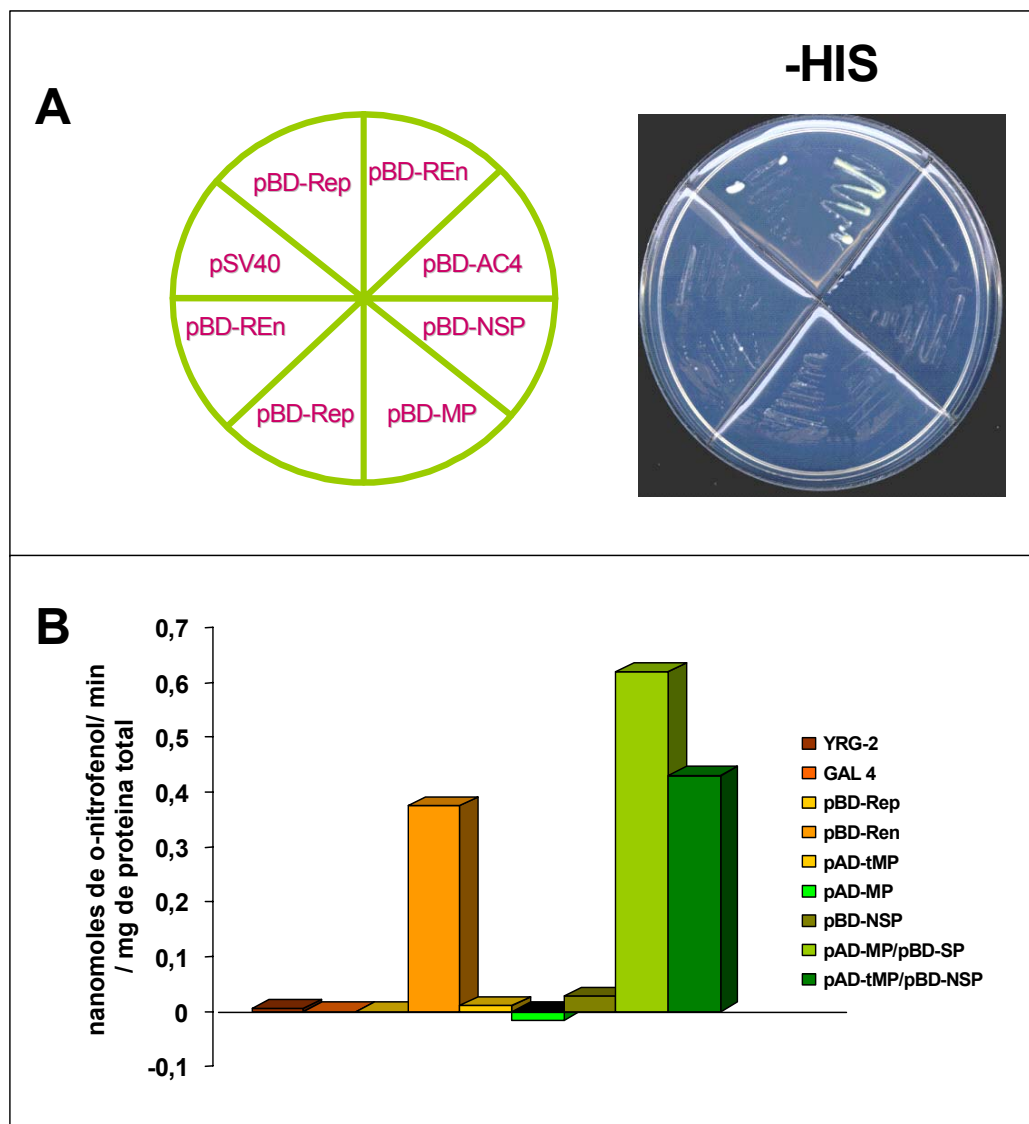


Figura 5. Fenótipo dos transformantes obtidos em *S. cerevisiae* estirpe YRG-2. **A.** Crescimento dos transformantes de *S. cerevisiae*, estirpe YRG-2 em meios seletivos. Os transformantes foram plaqueados no meio seletivo, –His, e crescidos a 30°C durante três dias. As construções de DNA usadas para transformar levedura são indicadas na Figura e descritas na Tabela 4. **B.** Avaliação da atividade da enzima β-galactosidase. As leveduras *S. cerevisiae*, estirpe YRG-2, transformadas com os plasmídeos indicados, foram crescidas em meio seletivo e a atividade da enzima β-galactosidase foi avaliada.

plasmídeo pBD-REn capacitou seu crescimento na ausência do aminoácido histidina (Figura 5A)

O crescimento da levedura transformada com o clone pBD-Ren, na ausência de histidina, sugere que a proteína REN de TGMV é capaz de complementar o domínio de ativação transcricional do gene *GAL4* na indução do promotor *HIS3*. A propriedade de ativador transcricional da proteína REN foi confirmada por meio de ensaio de ativação transcricional do gene *lacZ*, também sob o controle do gene *GAL4*. A atividade da enzima β -galactosidase das leveduras transformadas com pBD-REn foi similar àquela extraída das leveduras transformadas com a construção que contém o gene *GAL4* intacto (Figura 4B, pGAL4 e pBDREn).

As proteínas REN e TrAP são codificadas por seqüências que se sobrepõem no genoma de TGMV (Figura 1). O fragmento de TGMV clonado em pBD-REn contém a ORF completa de REN e a seqüência que codifica o carboxi-terminal de TrAP em diferente fase de leitura. Com a finalidade de confirmar a identidade da proteína recombinante, a junção das seqüências BDGAL4-REn foi seqüenciada (dado não mostrado). O sequenciamento de pBD-Ren confirmou a fusão traducional de REN com o domínio de ligação ao DNA de GAL4 e eliminou a possibilidade de que a atividade de ativação da transcrição exibida pela proteína recombinante fosse uma contribuição do domínio carboxi-terminal de TrAp. Assim sendo, a ativação transcricional exercida pela proteína REN impossibilitou o seu uso como “isca” em ensaios de interação proteína:proteína por meio do sistema duplo-híbrido, que tem por finalidade detectar fatores do hospedeiro capazes de interagir com esta proteína viral.

5.2. Oligomerização da proteína viral MP detectada pelo sistema duplo-híbrido

Uma vez que a proteína MP foi clonada nos vetores pADGAL4 2.1 e pBDGAL4 Cam, foi possível avaliar a formação de homo-oligômeros da proteína por meio do sistema duplo-híbrido de leveduras. Ambos os plasmídeos

recombinantes, pAD-MP e pBD-MP foram mantidos em leveduras, usando meio seletivo sem leucina e sem triptofano, respectivamente. A levedura transformada com a construção pAD-MP foi co-transformada com a construção pBD-MP e os transformantes plaqueados em meio seletivo na ausência dos aminoácidos leucina, histidina e triptofano (dados não mostrados). A capacidade da levedura co-transformada com pAD-MP e pBD-MP de crescer na ausência de histidina demonstrou que a proteína de movimento MP de geminivírus forma homooligômeros. A eficiência da interação MP-MP foi avaliada por meio de ensaio de atividade da enzima β -galactosidase (Figura 6). A atividade de β -galactosidase em extratos de leveduras co-transformadas com pAD-MP e pBD-MP foi superior àquela de extratos de leveduras transformadas com pGAL4. Estes resultados indicam que MP oligomeriza com alta eficiência e confirmam a expressão correta da proteína em ambos os vetores.

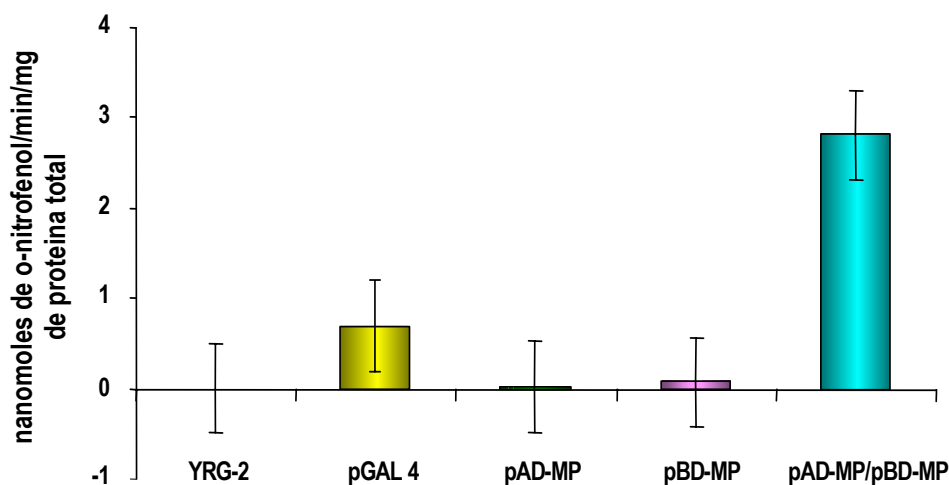


Figura 6. Oligomerização da proteína MP de TGMV. A atividade de β -galactosidase foi determinada em extratos protéicos de leveduras co-transformadas com os plasmídeos pAD-MP e pDB-MP (pAD-MP/pBD-MP). A levedura transformada com a construção pGAL4 representa o controle positivo, enquanto que a levedura não transformada (YRG-2), o controle negativo.

5.3. Interação entre as proteínas de movimento NS e MP

O plasmídeo recombinante pBD-NSP foi mantido em leveduras seletivamente na ausência de triptofano (Figura 7, -TRP; Figura 8B, linha pBD-NSP) enquanto que pAD-MP, em meio sem leucina (Figura 7, -LEU; Figura 8A, pAD-MP). A levedura, estirpe YRG-2, foi co-transformado com pBD-NSP e pAD-MP ou pAD-tMP e os transformantes foram crescidos em meio na ausência dos aminoácidos leucina, histidina e triptofano, demonstrando a interação entre as proteínas virais (Figura 6). O clone positivo His⁺ (Figura 7, -HIS, -LEU, -TRP) teve a sua identidade confirmada por meio de PCR (Figura 8, pBD-NSP/pAD-MP), sendo que os fragmentos amplificados apresentaram tamanhos similares ao dos genes virais clonados. A confirmação da interação entre as proteínas de movimento NSP e MP, foi realizada por meio de avaliação quantitativa da enzima β -galactosidase, sendo que o transformante pAD-MP/pBD-NSP apresentou atividade enzimática similar àquela de leveduras expressando a proteína GAL4 intacta (Figura 5). A forma truncada da proteína MP, que apresenta uma deleção de 57 aminoácidos na região carboxi-terminal, reteve a capacidade de interagir com NSP, embora a atividade de β -galactosidase foi menor para a combinação pAD-tMP/pBD-NSP (Figura 5). Tentativas de avaliar a quantidade produzida de proteínas recombinantes, utilizando anticorpos contra GAL4, não foram bem sucedidas e, como consequência, os valores relativos da atividade da enzima não puderam ser correlacionados com a eficiência da interação entre as proteínas parceiras.

Coletivamente, estes resultados demonstraram que a proteína NSP de TGMV é capaz de interagir com MP. Além disso, eles confirmaram a expressão correta de NSP na construção pBD-NSP, possibilitando o uso dessa construção para identificação de fatores do hospedeiro que interagem com a respectiva proteína viral, por meio do sistema duplo-híbrido.

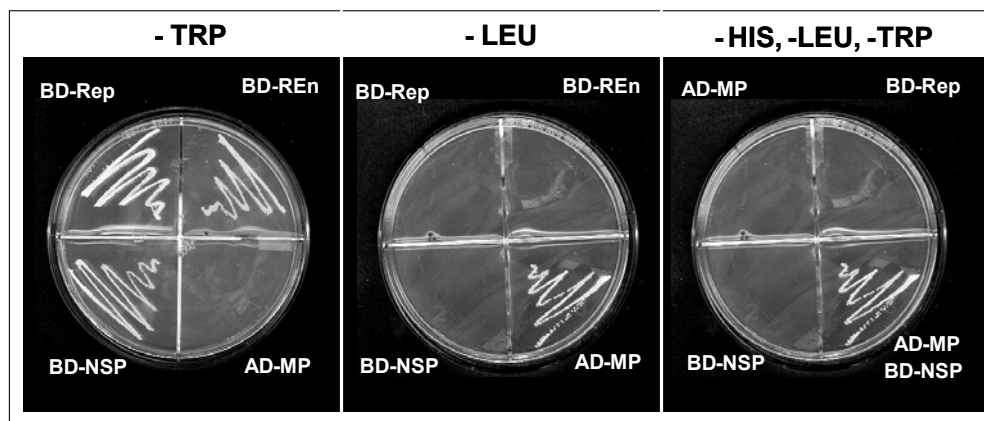


Figura 7. Interação entre as proteínas virais MP e NSP. Células de *S. cerevisiae*, estirpe YRG-2, transformadas com os plasmídeos indicados e descritos na tabela 4, foram crescidas em meio seletivo desprovido dos aminoácidos triptofano, leucina ou leucina/ histidina/ triptofano durante três dias a 30°C. A interação entre as proteínas MP e NSP foi verificada pela capacidade de crescimento em meio desprovido dos aminoácidos leucina, histidina e triptofano.

5.4. Identificação de fatores do hospedeiro que interagem com a proteína NSP de TGMV

A interação patógeno:hospedeiro tem sido recentemente alvo de inúmeros estudos na literatura. A interação mais bem caracterizada entre proteínas de geminivírus e seu hospedeiro é a interação entre as proteínas da família retinoblastoma e a proteína viral Rep (ACH *et al.*, 1997; HORVÁTH *et al.*, 1998; SETTLAGE *et al.*, 2001). Até então, não foram identificadas interações entre proteínas virais de movimento e fatores do hospedeiro de espécies da família *Geminiviridae*.

De um total de $4,7 \times 10^6$ fagos, foram isolados cinco clones denominados pUFV364, pUFV365, pUFV380, pUFV381 e pUFV382, que cresceram na ausência de histidina e mostraram expressão de LacZ em membranas indicadoras de X-Gal (dado não mostrado). Os tamanhos dos insertos dos clones isolados

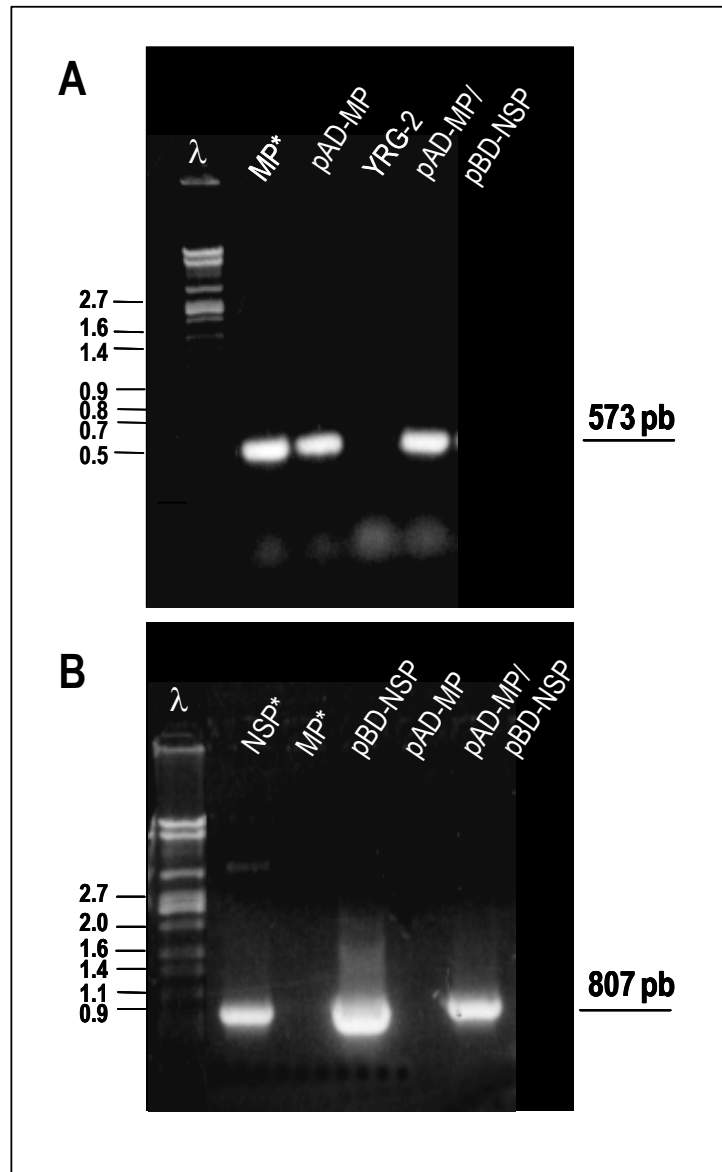


Figura 8. Diagnóstico dos clones em *S. cerevisiae* estirpe YRG-2, por meio de PCR. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados para a amplificação de insertos no vetor pADGAL4 2.1 (**A**) e pBDGAL4 Cam (**B**) usando como molde DNA plasmidial extraído de leveduras transformadas com pBD-MP, pBD-NSP, pBD-MP/pBD-NSP. O asterisco indica a amplificação a partir de DNA plasmidial de clones em *E. coli*, utilizados como controle da reação. λ corresponde a marcadores de DNA de tamanhos conhecidos.

foram determinados por PCR (Figura 9). Exceto a construção pUFV380 cujo inserto possui tamanho de 2000 pb, os demais clones, pUFV364, pUFV365, pUFV381 e pUFV382 possuem insertos similares (1000 pb). Baseado no padrão de restrição e sequenciamento do inserto, verificou-se que os clones pUFV364 e pUFV381 eram idênticos.

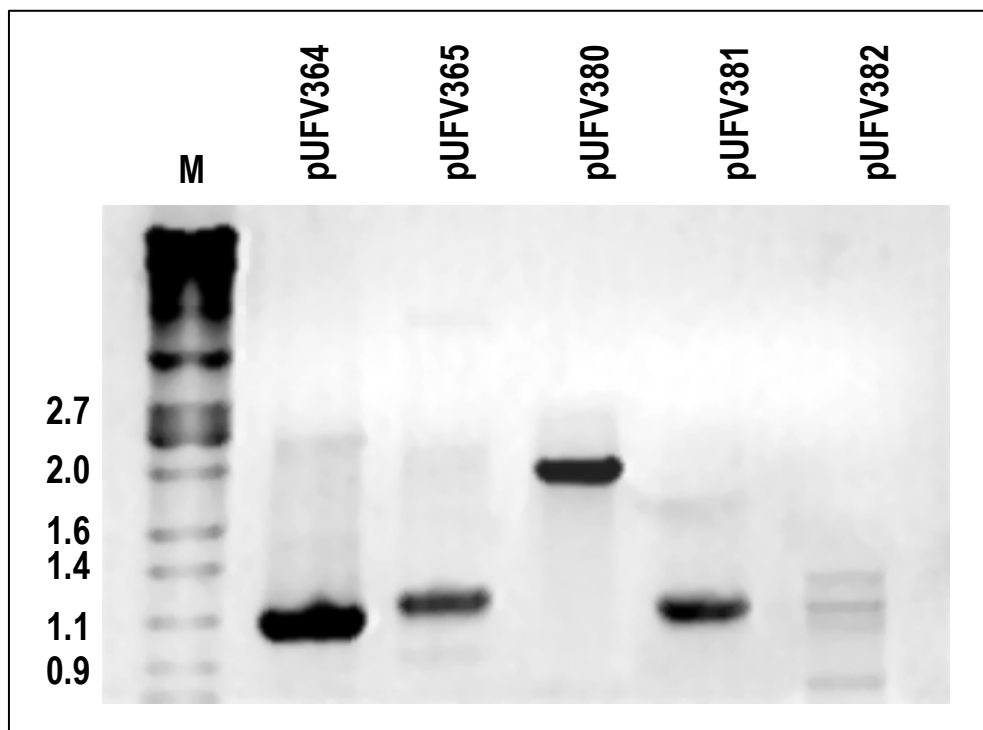


Figura 9. Diagnóstico por PCR dos clones isolados da biblioteca de cDNA. DNA isolado de leveduras His⁺, conforme indicado na figura, foi amplificado por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para amplificação de insertos no vetor pADGAL4 2.1. M indica marcadores de DNA, cujos tamanhos são indicados em pb.

As interações identificadas no escrutínio da biblioteca de cDNA de tomateiro, pBD-NSP/pAD-cDNA foram confirmadas por meio de ensaio da atividade de β -galactosidase (Figura 10B), assim como pelo fenótipo observado

em placas de meio seletivo desprovido dos aminoácidos leucina, histidina, triptofano (Figura 10A, -HIS, -LEU, -TRP). O crescimento da levedura na ausência de histidina foi dependente da presença da proteína isca NSP e da construção quimérica contendo o domínio de ativação de GAL4 fusionadas ao cDNA de tomateiro (Figuras 10A e 10B).

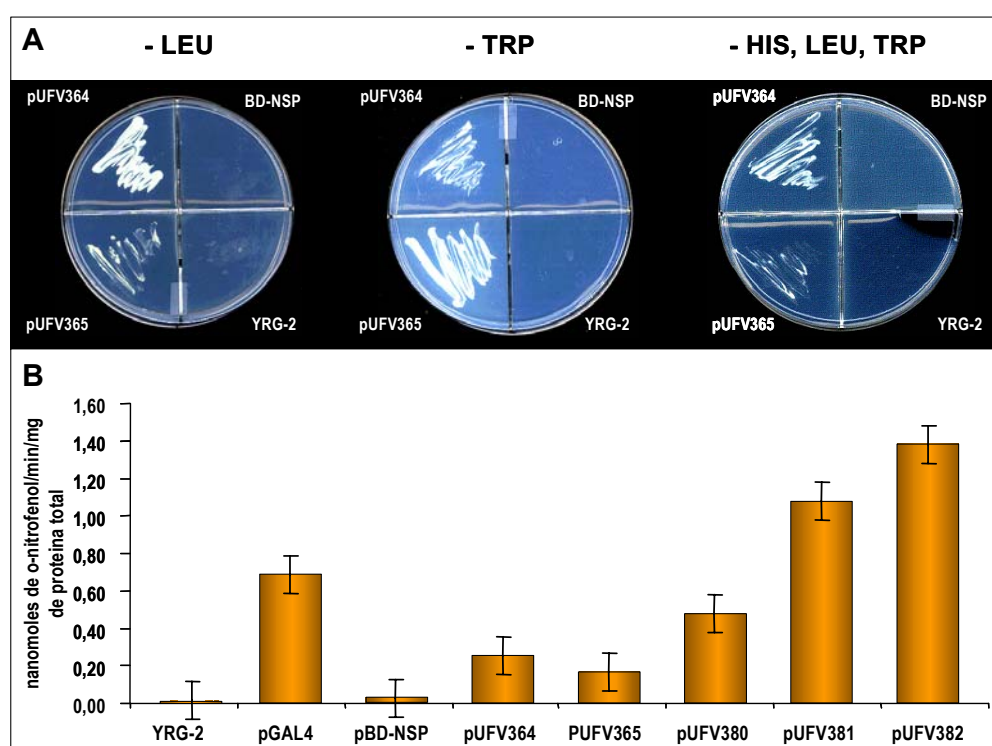


Figura 10. Interação entre a proteína NSP e proteínas de tomateiro. **A.** Fenótipo dos clones de interação obtidos em *S. cerevisiae* estirpe YRG-2. Células de *S. cerevisiae*, estirpe YRG-2, transformadas com os plasmídeos indicados foram crescidas em placas de meio seletivo desprovido dos aminoácidos leucina, histidina e triptofano a 30°C durante três dias. **B.** Avaliação quantitativa da atividade da enzima β -galactosidase. Os clones foram crescidos em meio seletivo a 30°C e a atividade enzimática foi quantificada, utilizando o *o*-orto-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo como substrato para a enzima β -galactosidase.

A fim de determinar se a proteína codificada pelo cDNA pUFV364 interage especificamente com NSP, o plasmídeo pUFV364 foi utilizado para transformar diversas leveduras utilizando BiP e Rep fusionadas ao domínio GAL4 como isca (dados não mostrados). A co-transformação das referidas leveduras com pUFV364 não restaurou prototrofia de histidina. Estes resultados confirmam que a interação entre NSP e a proteína expressa por pUFV364 é específica, o que sugere que possivelmente o complexo é formado durante o processo de infecção viral. Assim sendo, o clone pUFV364 foi selecionado para as avaliações adicionais.

5.5. Caracterização molecular do clone pUFV364.

O sequenciamento de pUFV 364 revelou a presença de uma ORF parcial de 211 resíduos de aminoácidos, com homologia com proteínas tipo serina/treonina cinase (Figura 11). As maiores identidades de sequência encontradas para a sequência pUFV364 foi com o gene ZmSERK2 (*Zea mays* Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 2) de milho (61%) e com os cDNAs que codificam proteínas serina/treonina cinases de *A. thaliana* [número de acesso AY088040 (79%) e AY075617 (79%)]. Com base na homologia de sequência, a proteína codificada por pUFV364 foi denominada NIK (NSP - Interacting Kinase). A ausência do códon iniciador de tradução AUG na sequência do cDNA *NIK* indicou que este cDNA obtido era truncado. Com a finalidade de se obter a sequência completa do cDNA de NIK, cDNAs preparados de mRNA de folhas de tomateiro foram amplificados, utilizando oligonucleotídeos baseados na sequência amino-terminal de homólogos de NIK e na sequência 5' do clone pUFV364, em ensaios de RT-PCR (Figura 12). Estes oligonucleotídeos estenderam a extremidade 5' do cDNA de NIK, resultando na amplificação de um fragmento de aproximadamente 1100 pb (Figura 11, linhas 1, 2, 3). O mesmo conjunto de oligonucleotídeos amplificou um fragmento de tamanho similar a

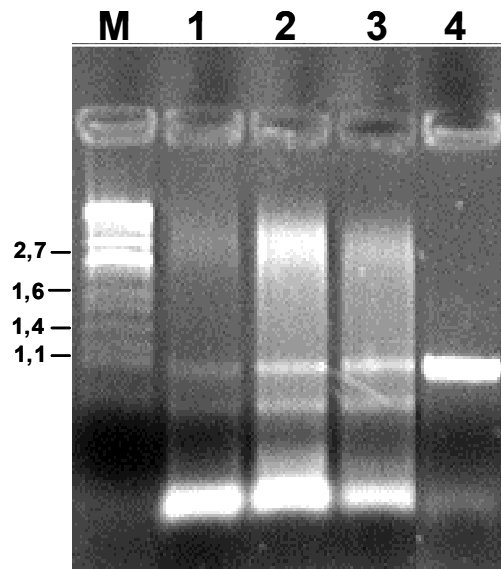


Figura 11. Amplificação da extremidade 5' do cDNA *NIK*. O mRNA de folhas de tomateiro foi extraído e utilizado como molde em reação de RT-PCR usando oligonucleotídeos específicos para a amplificação da extremidade 5' do cDNA que codifica a proteína NIK. **1, 2 e 3** são amplificações feitas a partir de cDNA de tomateiros. **4.** é um controle positivo, usando como DNA molde o clone pUVF444 que contém o cDNA de um homólogo de soja. M corresponde a marcadores de DNA, expressos em pb.

partir do cDNA de uma proteína cinase homóloga de soja (Figura 11, linha 4). O tamanho do fragmento amplificado indica que a proteína NIK completa deve possuir aproximadamente 610-620 resíduos de aminoácidos, tamanho similar aos seus homólogos em milho e *Arabidopsis* (Figura 12). Uma vez que a interação entre NSP e NIK envolveu a região carboxi-terminal de NIK, onde se encontra o domínio de cinase, o potencial de fosforilação da proteína NSP foi avaliado. A análise da seqüência de aminoácidos de NSP apresentou resíduos de serina e treonina, em um contexto favorável para fosforilação por cinase do tipo serina treonina (Figura 13). Contudo, a hipótese de que NSP constitui substrato para NIK não foi avaliada bioquimicamente.

```

AY088040      -AKPVLDSIRKRIAIGAARGLVYLHEQCDDPKIIHRDVKAANILLDDYCEAVVGDFGLAK 449
NIK           -----FHEQCDDPKIIHRDVKAANILLDDYCEAVVGDFGLAK 36
AY075617      TAKPVLWDGTRKRIALGAGRGLLYLHEQCDDPKIIHRDVKAANILLDDYFEAVVGDFGLAK 472
ZmSERK2       PSEPPLSWEPRRRIALGSARGLSYLHDHCDPKIIHRDVKAANILLDEDFEAVVGDFGLAK 454
               *:.*      *:.*:*****:*****

AY088040      --LLDHQDSHVTTAVRGTVGHIAPYELSTGQSSEKTDVFGFILLLELVTGQRAFEFGKA 507
NIK           --LLDHQDSHVTTAVRGTVGHIAPYELSTGQSSEKTDVFGFILLLELITGMRAIEFGKA 94
AY075617      FTLLDHEESHVTTAVRGTVGHIAPYELSTGQSSEKTDVFGFILLLELITGLRAIEFGKA 532
ZmSERK2       --LMDYKDTHTVTTAVRGTIGHIAPYELSTGKSSEKTDVFGYIGIMLELITGQRAFDLRL 512
               *:.*:.*:*****:*****:*****:*.***:* **:*:.*

AY088040      A--NQKGVMLDWVKKIHQEKKLELLVDKELLKKKSYDEIELDEMVRVALLCTQYLPGHRP 565
NIK           A--NQKGVMLDWVRKIHQEKKLDVLVDKDLRIN--YDRIELEEMVQVALLCTQYLPGHRP 151
AY075617      AFTNQRGAILDWVKKLQEKKLEQIVDKDLKSN--YDRIEVEEMVQVALLCTQYLPPIHRP 590
ZmSERK2       AN-DDDVMLLDWVKGLLKEKKVEMLVDPDLQKA--YEEVEVESLIQVALLCTQGSPLDRP 569
               *  :.  :****:  :****:.*  :*  *:.*:.*:.*:*****  *  .**

AY088040      KMSE--VVRMLEGDGLAEKWEAS-QRSDSVSKCSNRINELMSSSDRYSDLTDDSSLLVQA 622
NIK           KMSE--IVRMLEGDGLAERWEAS-QKFDGSNKYK---TKELSSSERFSDLTDDSSLLVQA 204
AY075617      KMSEFTVVRMLEGDGLVEKWEASSQRAETNRSYSK--PNEFSSSERYSDLTDDSSVLVQA 648
ZmSERK2       KMSE--VVRMLEGDGLAERWDEW-QKVEVVR-----QEAESAPLRNDWIVDSTYNLRA 619
               ****  :*****.*:*  *:  :  :  :.*  .*  **  :.*

AY088040      MELSGPR 629
NIK           MELSGPR 211
AY075617      MELSGPR 655
ZmSERK2       VELSGPR 626
               :*****

```

Figura 12. Comparação de seqüências de NIK com cinases de outros organismos. O alinhamento múltiplo de seqüência da estrutura primária deduzida de NIK, de ZmSERK2 (Zein Max Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 2, número de acesso AJ277703) e de proteínas cinases do tipo serina/treonina de *Arabidopsis thaliana* (número de acesso AY088040 E AY075617) foi obtido com o programa “Clustal-W”. A seqüência conservada em cinases do tipo serina/treonina está destacada em vermelho.

MDSQLACPPNAFNIESNRDEYQLSHDLTEIILQFPSTASQLSARLSRSCMKIDHCVIEF	60
RQQVPINATGSGVVVEIHDKRMTDNESLQASWTFPVRNIDLHYFSSSFFSLKDPIPWKLY	120
YKVCDSNVHQRTTHFAKFKGKLLSTAKHSVDIPFRAPT VKILSKQFTDKD VDSATWDMGN	180
GIEK	240
.....S.....S...S.....	60
.....T.....S.....S.....	120
.....S...S.....T...S...T...S.....	180
....	240

Figura 13. Análise do potencial de fosforilação da proteína viral NSP. A sequência de aminoácidos da proteína NSP (preto) foi analisada no programa NetPhos para determinação dos possíveis resíduos de serina e treonina que possuem potencial para serem fosforilados. Em vermelho, encontram-se os resíduos de serina e, em azul, os resíduos de treonina com potencial para fosforilação.

5.6. O homólogo de soja da proteína NIK possui domínios característicos de receptores de membrana e genes de resistência

A sequência completa do cDNA *NIK* de tomateiro, designado *LeNIK* (*Lycopersicum esculentum* NIK), não foi obtida devido a dificuldade encontrada em clonar a extremidade 5' do gene amplificado em ensaios de RT-PCR (Figura 12). No entanto, foi possível comparar o domínio carboxi-terminal de NIK com sequências completas de cDNAs de soja, isolados no laboratório de Biologia Molecular de Plantas no BIOAGRO e ainda não disponibilizados para domínio público. Esta análise permitiu a identificação de um cDNA homólogo de soja que possui 98% de similaridade e 87% de identidade de sequência com a região correspondente de *LeNIK* (Figura 14). Este cDNA foi designado *GmNIK* (*Glicine max* NIK), tem 2200 pb e codifica uma proteína de 620 resíduos de aminoácidos com massa molecular estimada de 68,6 KDa e pI 6,97. A estrutura primária deduzida para *GmNIK* apresenta diversos domínios conservados e

biologicamente relevantes. Estes incluem o domínio conservado de cinases do tipo serina/treonina (em vermelho posições 419-431), um sítio de ligação a nucleotídeos (em amarelo, posições 309-322), que contem uma sequência conservada tipo “walker” para a alça P {ALGX(4)G-L-(S/T)}, repetições ricas em leucina (em violeta, 96-144 e 167-192), além de um peptídeo sinal (verde) no terminal amino da proteína de endereçamento para o aparelho secretor e um domínio transmembrana (em rosa, 238-259.)

A presença de um segmento transmembrana, repetições ricas em leucina, domínio de cinase e sítios de ligação a nucleotídeos conservados indica que a proteína GmNIK compartilha domínios característicos de receptores de membrana envolvidos em transdução de sinais. Análise de homologia de sequências com proteínas cinases de plantas selecionadas no banco de dados revela que GmNIK é mais relacionada com um putativo receptor de cinase de *Arabidopsis*, RPKAt (Figura 15). GmNIK também apresenta homologia com proteínas cinases que apresentam regiões ricas em leucina como um possível receptor de cinase identificado em *A thaliana*, e denominado LRRAt (Figura 15). Genes de resistência, como gene *PTO*, identificado em tomate, apresentaram baixa homologia com GmNIK; contudo, os domínios encontrados em GmNIK também estão presentes na proteína codificada pelo gene de resistência *Xa21*, caracterizado em arroz e que confere resistência a *Xanthomonas campestris*.

5.7. GmNIK interage com a proteína NSP de geminivírus

Com a finalidade de verificar a interação entre as proteína NSP e GmNIK por meio do sistema duplo-híbrido, a sequência do cDNA de GmNIK foi clonada no vetor pADGA14 2.1. Leveduras transformadas com pAD-GmNIK cresceram na ausência de leucina (Figura 16A, -LEU), mas não na ausência de histidina (Figura 16A, -HIS). A co-transformação da levedura com pBD-NSP e pAD-GmNIK promoveu crescimento em meio seletivo desprovido de histidina,

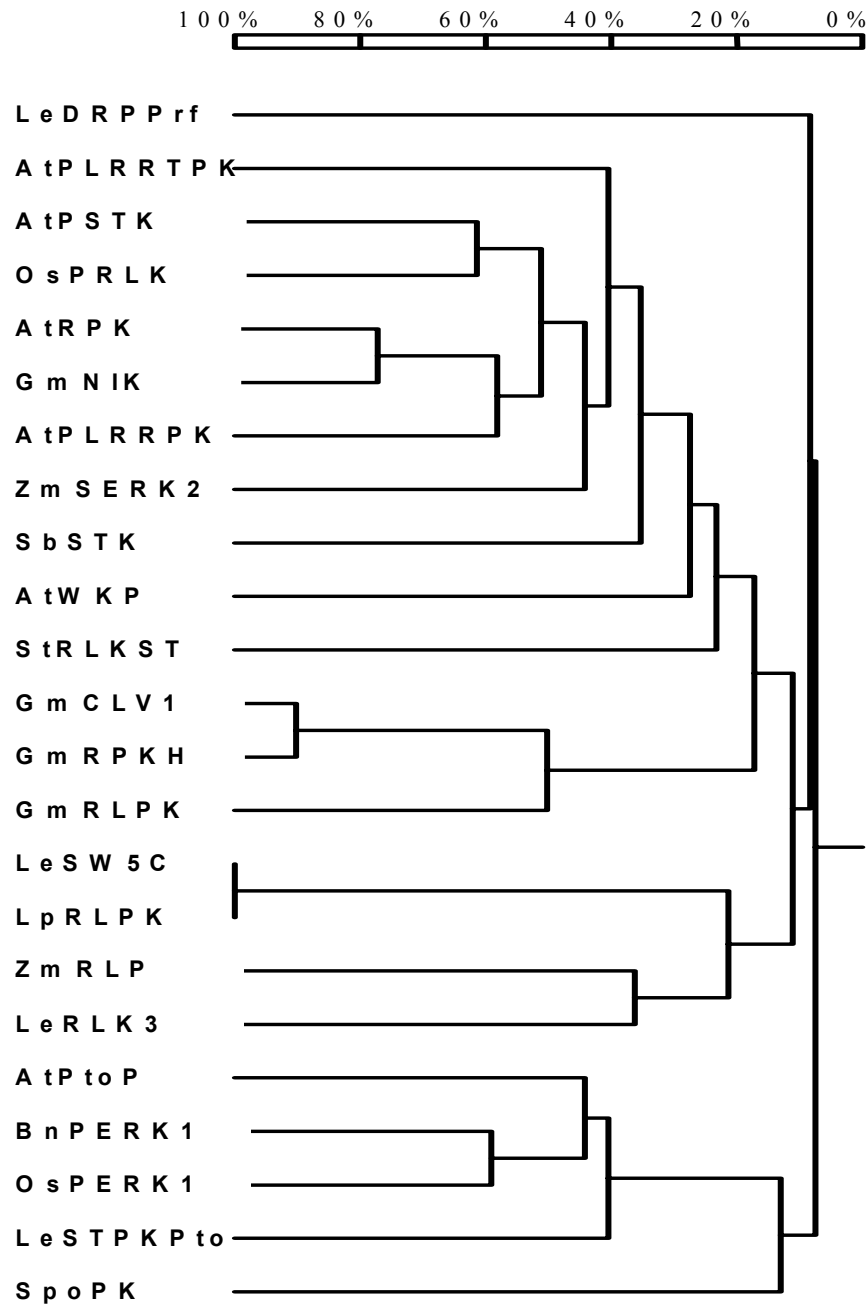


Figura 15. Árvore de homologia da proteína cinase de soja. A sequência de aminoácidos de GmNIK foi comparada com sequências de aminoácido de proteínas cinase de outras plantas pelo programa DNAMAN versão 4.0

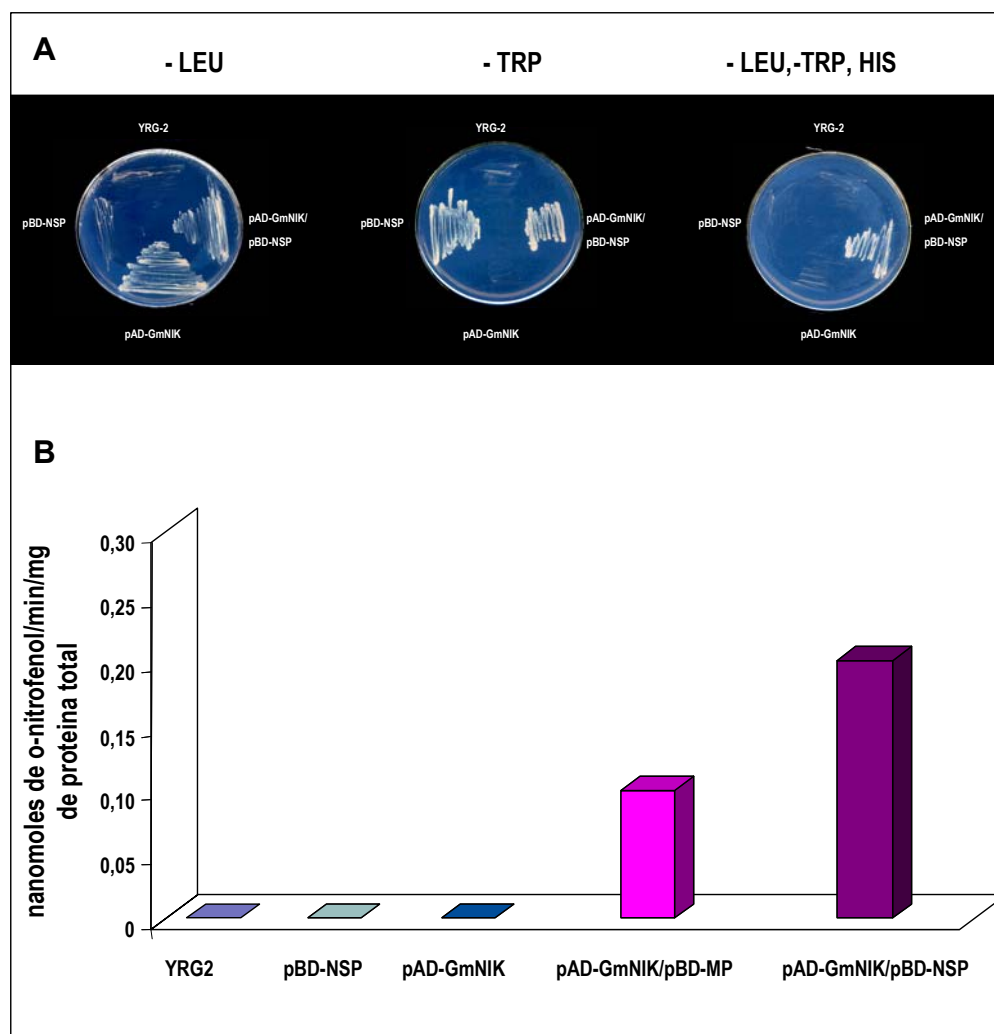


Figura 16. Interação entre a proteína NSP e a proteína GmNIK. **A.** Fenótipo dos clones de interação obtidos em *S. cerevisiae* estirpe YRG-2. Células de *S. cerevisiae*, estirpe YRG-2, transformadas com os plasmídios indicados, foram crescidas em placas de meio seletivo desprovido dos aminoácidos leucina, histidina e triptofano a 30°C durante três dias, conforme indicado na figura. **B.** Avaliação quantitativa da atividade da enzima β -galactosidase. Os clones foram crescidos em meio seletivo a 30°C e a atividade enzimática foi quantificada, utilizando o *o*-orto-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo como substrato para a enzima β -galactosidase.

indicando interação produtiva entre as duas proteínas recombinantes e, conseqüentemente, indução do promotor *HIS3*. A especificidade da interação foi avaliada em leveduras transformadas com os genes *MP*, *BiP* e *Rep* fusionadas ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 como isca. A co-transformação desses transformantes com pAD-GmNIK não restaurou o fenótipo His⁺, não observando crescimento no meio seletivo His⁻ (dados não mostrados).

A interação entre GmNIK e NSP foi confirmada pela indução do promotor lacZ, na presença de pAD-GmNIK e pBD-NSP (Figura 16B). Embora a combinação pAD-GmNIK e pBD-MP não tenha promovido crescimento de transformantes na ausência de histidina, extratos protéicos desses transformantes, crescidos em meio normal exibiram atividade de β -galactosidase em níveis inferiores. Estes resultados sugerem que GmNIK interage fracamente com MP e, provavelmente, de uma maneira não específica.

6. APÊNDICE

6.1. Obtenção de anticorpos contra o carboxi-terminal de LeNIK

A região carboxi-terminal da LeNIK foi expressa em bactérias como uma proteína recombinante fusionada a uma cauda de histidinas no amino-terminal, derivada do vetor de expressão pET16B (Figura 17A).

A adição de IPTG induziu a síntese de um polipeptídeo de massa molecular em torno de 21,5 KDa, similar àquela deduzida do cDNA *LeNIK* (linhas 6 e 9). A proteína recombinante foi expressa em grandes quantidades em células induzidas de *E. coli*, sendo observada tanto em frações insolúveis como em extratos totais (linhas 6 e 9). A síntese da proteína recombinante foi, inicialmente, avaliada com base na sua mobilidade eletroforética e na indução por IPTG (linhas 6 e 9) em comparação com o extrato protéico de bactérias não induzidas (linhas 5 e 8) e não transformadas (linhas 4 e 7). Além disso, a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade a partir de frações insolúveis induzidas, sendo eficientemente retida em resinas de Ni^{++} , devido a presença da sequência de histidinas no terminal amino (Figura 17B). A proteína purificada foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais contra a proteína LeNIK, denominada anti-NIK.

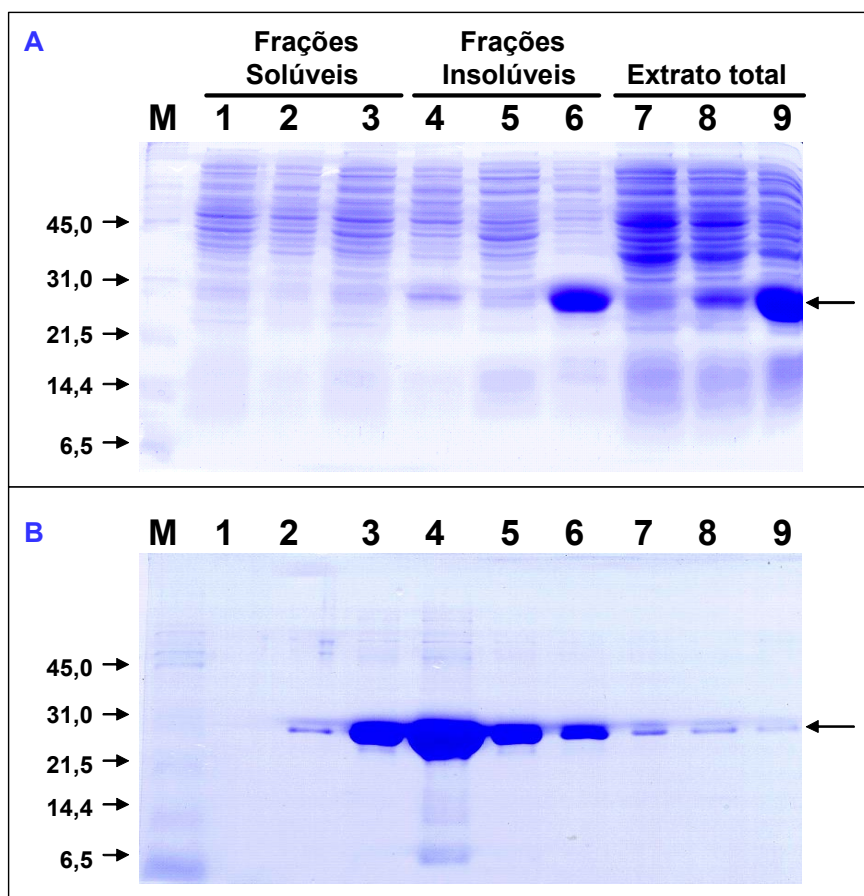


Figura 17. Indução da síntese da proteína NIK em *E. coli*. e purificação da proteína recombinante. **A.** Indução da proteína NIK. A síntese do terminal carboxi de LeNIK foi induzida pela adição de IPTG em *E.coli* estirpe BL21(DE3) transformada com a construção pET16B–NIK (colunas 3, 6 e 9). As frações protéicas totais, insolúveis e solúveis provenientes do clone pUFV466 induzido (colunas 3, 6 e 9) e não induzido (colunas 2, 5 e 8) e da bactéria não transformada (colunas 1, 4 e 9) foram separadas em géis de poliacrilamida, contendo SDS e coradas com “coomassie brilliant blue R-250”. A seta indica a posição da proteína induzida. **M** mostra a migração eletroforética de padrões de proteínas de massa molecular conhecidas, em KDa. **B.** Purificação da proteína NIK. O clone pUFV466 que contém a sequência parcial do gene *NIK* foi induzido com IPTG para a produção da proteína recombinante. A fração protéica insolúvel foi coletada e aplicada em coluna de afinidade. As frações eluídas foram analisadas em géis de poliacrilamida, contendo SDS e coradas com “coomassie brilliant blue R-250”. **M** mostra a migração eletroforética de padrões de proteínas de massa molecular conhecidas, em KDa.

O anti-soro NIK foi eficiente em detectar uma proteína em extratos protéicos extraídos de *E. coli* transformada e induzida (Figura 18, linha 4) com massa molecular relativa idêntica a da proteína recombinante, além da proteína recombinante purificada (linha 5). O anti-soro não apresentou reações cruzadas com proteínas bacterianas (linhas 1 a 4)

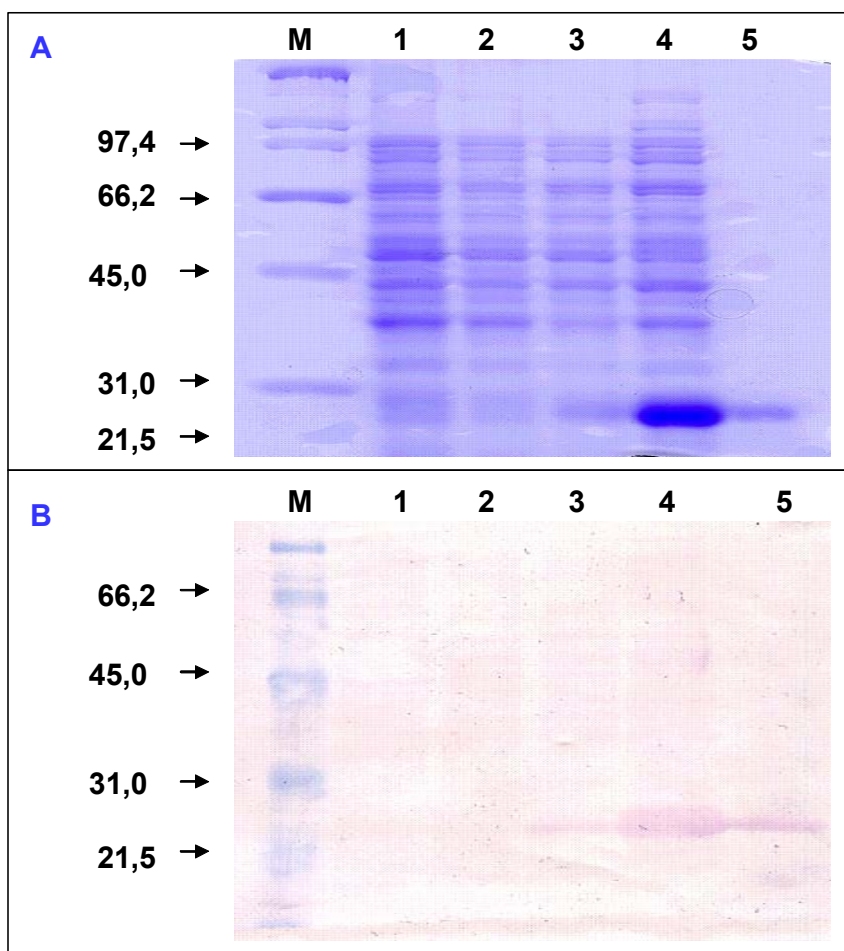


Figura 18. Especificidade do anticorpo anti-NIK. **A.** SDS-PAGE de proteínas totais de bactéria. Proteínas extraídas de suspensão de células de *E.coli* estirpe BL21(DE3) não transformada e não induzida (1), não transformada e induzida (2), suspensão de células de pUFV 466 não induzidas (3) e induzidas(4) e proteína cinase purificada (5), foram separadas em SDS-PAGE e coradas com “coomassie brilliant blue R-250”. **B.** “Western blotting” de extratos bacterianos. A especificidade do anticorpo contra a proteína cinase de tomateiro foi monitorada em “imunoblotting” obtidos a partir do gel de acrilamida contendo as mesmas amostras visualizadas em **A.**

7. DISCUSSÃO

A família *Geminiviridae* é uma extensa família de vírus de plantas, cuja eficiência de propagação na planta hospedeira depende de interações entre proteínas virais e com fatores do hospedeiro, tanto para replicação quanto translocação do genoma viral. TGMV possui dois componentes genômicos, denominados A e B que possuem seis ORFs envolvidas na replicação, encapsidação e movimento do genoma viral no hospedeiro.

O componente A de TGMV codifica a proteína REn, cuja ORF sobrepõe a região 3'da ORF da proteína TrAP. A proteína REn não é essencial para a replicação do genoma viral, mas atua como “enhancer”, aumentando o acúmulo do DNA viral durante a infecção. Embora o mecanismo de atuação da proteína REn não tenha sido elucidado, sabe-se que REn é capaz de interagir com a proteína de replicação Rep do vírus e com a proteína retinoblastoma, envolvida com a progressão do ciclo celular (SETTLAGE *et al.*, 2001). Os resultados dessa investigação forneceram evidências que REn também atua como ativador transcricional, uma vez que esta proteína foi capaz de restaurar a atividade transcricional do domínio de ligação ao DNA de GAL4, em ensaios de indução de promotores repórteres sob o controle de GAL4, realizados em leveduras (Figura 5). Consistente com esta observação, REn localiza-se no núcleo de células infectadas (SUNTER *et al.*, 1990) e apresenta na região terminal amino

uma sequência conservada, característica de ativadores transcricionais (CRESS *et al.*, 1991). Em contraste, a proteína Rep, essencial para a replicação do genoma viral, exibe atividade de repressão de transcrição, envolvida na auto-regulação negativa de seu promotor (EAGLE *et al.*, 1994). Aparentemente, a atividade de transativação de REn pode contrapor a atividade auto-repressora de Rep, promovendo um maior acúmulo da proteína Rep e, como consequência, maior eficiência da replicação do genoma viral. Experimentos transientes de ativação do promotor do gene Rep, na presença de Rep e REn em protoplastos poderão explorar esta possibilidade.

Dois modelos para o movimento do genoma viral têm sido discutidos, baseados nas atividades bioquímicas associadas às proteínas de movimento MP e NSP. No primeiro modelo, a proteína NSP facilita o movimento do genoma viral do núcleo para o citoplasma onde é substituída por MP, que então transporta o DNA viral para as células adjacentes através do plasmodesma (NOUEIRY *et al.*, 1994). Consistente com este modelo, MP de BDMV aumenta o limite de exclusão do plasmodesma, MP e NSP exibem atividade de ligação ao DNA (ROJAS *et al.*, 1998). Além disso, MP de BDMV foi capaz de mediar o movimento célula-célula de DNA fita simples e fita dupla em estudos de microinjeção, enquanto que NSP foi capaz de exportar DNA injetado do núcleo (NOUEIRY *et al.*, 1994, ROJAS *et al.*, 1998). Os resultados da presente investigação demonstraram que a proteína MP de TGMV é capaz de formar homo-oligômeros (Figura 6), fornecendo novos discernimentos para o mecanismo de atuação da proteína MP de begomovírus. De uma maneira geral, acredita-se que a multimerização de proteínas virais de movimento seja um pré-requisito para transporte de genomas virais através do plasmodesma.

O segundo modelo para translocação do genoma viral tem sido proposto baseado nas propriedades bioquímicas das proteínas de movimento MP e NSP de SqLCV (PASCAL *et al.*, 1994; WARD *et al.*, 1997). Neste modelo, MP direciona a translocação do genoma viral, facilitando inicialmente o transporte intracelular de DNA fita simples mediado por NSP do núcleo para o citoplasma. Em seguida, MP intermédia o transporte do complexo NSP-ssDNA para as

células adjacentes via túbulos, temporariamente induzidos no floema em desenvolvimento durante o processo de infecção viral. A aparente discrepância entre os dois modelos têm sido explicada pela limitação ao floema de SqLCV, enquanto que BDMV pode também infectar tecidos não vasculares (LAZOROWITZ & BEACHY, 1999). Independente de qual modelo se ajusta melhor para o movimento célula-célula de TGMV, ambos o modelo prevêem uma associação entre as duas proteínas de movimento NSP e MP. Os resultados dos ensaios de interação entre proteínas virais pelo sistema duplo-híbrido (Figuras 5 e 7) confirmam, pela primeira vez, que, de fato, NSP e MP interagem fisicamente. NSP foi capaz de interagir tanto com a proteína MP intacta quanto com uma versão truncada da proteína, deletada de 55 resíduos de aminoácidos na região terminal carboxi. Estes resultados estão coerentes com os resultados de análises genéticas que mapearam o domínio putativo de interação com NSP na região central da proteína MP de SqLCV (SANDERFOOT *et al.*, 1996).

Além de avaliar diretamente as interações entre proteínas virais, o sistema duplo híbrido foi utilizado para identificar fatores do hospedeiro que interagem com a proteína viral NSP. De cinco clones isolados pelo escrutínio de uma biblioteca de cDNA de tomateiro usando NSP como isca, quatro foram idênticos e codificam um domínio conservado de cinases do tipo serina/treonina, cuja proteína codificada foi designada LeNIK (*L. esculentum* NSP-Interacting Kinase). Evidências indicam que a interação NSP-NIK pode ser biologicamente relevante. A interação detectada é altamente específica, conforme julgada pela falha do domínio cinase da proteína NIK em interagir com outras proteínas virais e controles, pelo sistema duplo híbrido. Além disso, a associação entre NSP e uma atividade de cinase é esperada, uma vez que experimentos *in vitro* demonstraram que a proteína NSP de SqLCV sofre modificações por fosforilação (PASCAL *et al.*, 1994). Análise da estrutura primária de NSP de TGMV permitiu identificar resíduos de serina e treonina em contexto favorável para fosforilação por cinases do tipo serina/treonina. Entretanto, a capacidade da proteína NIK em utilizar a proteína NSP como substrato não foi avaliada por dois motivos básicos. Primeiro, a proteína truncada, produzido em bactéria, fracionou como proteína

insolúvel nos extratos bacterianos, sendo recuperada como proteína desnaturada. Segundo a proteína truncada, produzida a partir do cDNA isolado, não contém o sítio de ligação a nucleotídeos, não sendo provavelmente funcional.

Extensão da extremidade 5' do cDNA NIK de tomateiros por RT-PCR revelou que o cDNA completo tem a capacidade para codificar uma proteína de aproximadamente 610-620 resíduos de aminoácidos, tamanho similar aos homólogos da proteína de outros organismos que possuem de 610 a 650 resíduos de aminoácidos. Entretanto, a sequência completa de LeNIK não foi obtida, uma vez que a extremidade 5' do cDNA correspondente não foi clonada. Por outro lado, a análise comparativa de sequências com cDNAs de soja, isolados no laboratório e ainda não disponíveis para domínio público, identificou um cDNA completo de soja homólogo de *LeNIK*, designado *GmNIK* (*Glycine max*). Evidências indicam que *LeNIK* e *GmNIK* são genes ortólogos. A proteína deduzida a partir da sequência do cDNA de *GmNIK* possui 92% de similaridade e 87% de identidade de sequência com a região correspondente de LeNIK. Além disso, as duas proteínas possuem tamanhos similares e os domínios de cinase conservados estão localizados na mesma região carboxi terminal. Finalmente, foi demonstrado, por meio do sistema duplo híbrido, que a proteína GmNIK intacta é capaz de interagir com NSP.

A análise filogenética baseada em homologia de sequência indicou que a proteína GmNIK é mais relacionada com receptores cinases serina/treonina típicos, cuja estrutura modular permite comunicação entre estímulos extracelulares e vias de sinalização intracelulares. De fato, a proteína GmNIK possui domínios conservados que são bioquimicamente relevantes em algumas classes de genes de resistência de plantas e de genes envolvidos em processos de desenvolvimento em organismos multicelulares (BONAS & LAHAYE, 2002). Estes incluem um domínio conservado de cinases do tipo serina/treonina, um sítio de ligação a nucleotídeos (NBS), repetições ricas em leucinas (LRR), um domínio transmembrana e o peptídeo sinal de endereçamento para o aparelho secretor. A presença desse conjunto de sequências conservadas é característica de genes de resistência da classe extracelular LRR (JONES & JONES, 1997). Esta

classe inclui o gene *Xa21* de arroz para resistência contra a bactéria *Xantomonas* (HE *et al.*, 2000) e o gene *Cf* de tomate que confere resistência ao fungo *Cladosporium fulvum* (JOOSTEN & De WIT, 1999). A proteína codificada pelo gene *Cf* possui um domínio LRR extracelular, um segmento transmembrana, mas não apresenta uma região intracelular que poderia constituir um componente de sinalização, tal como um domínio cinase e, portanto, não pode constituir um homólogo funcional de NIK. Por outro lado, a proteína codificada pelo gene de resistência *Xa21* apresenta a estrutura de receptores cinase típicos, ou seja, um domínio LRR extracelular, um segmento transmembrana e um domínio de proteínas cinases intracelular, compartilhando com GmNIK os mesmos domínios estruturais. Baseado na homologia estrutural com *Xa21* e na região de interação com NSP mapeado na região carboxi terminal que contem o domínio de cinase, uma provável topologia estrutural para a proteína GmNIK é apresentada na Figura 19.

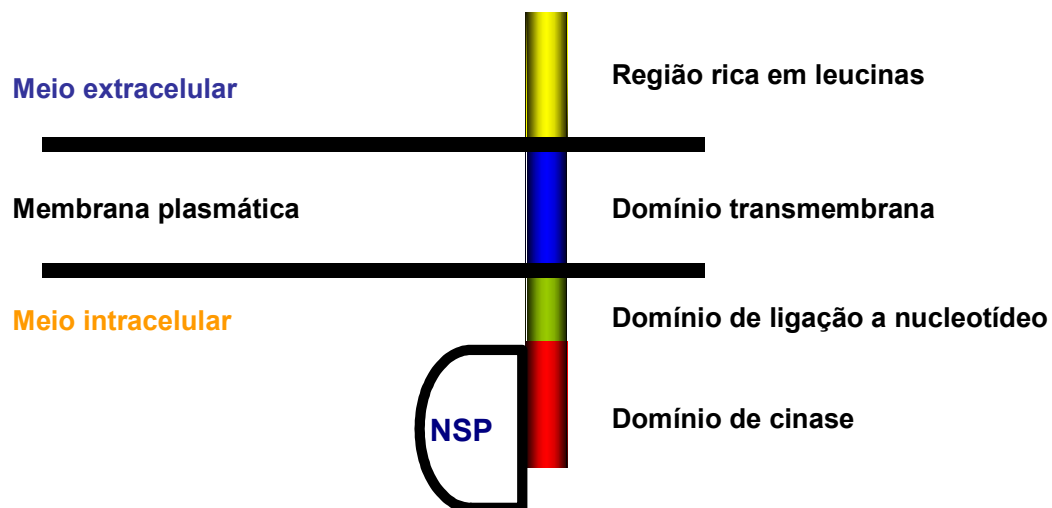


Figura 19. Modelo topológico proposto para a proteína GmNIK. O segmento transmembrana presente em GmNIK sugere se tratar de uma proteína integral de membrana. A orientação da proteína é proposta baseado na homologia modular com *Xa21* e na localização intracelular do domínio de interação com NSP.

Embora estudos funcionais que atribuísem funções específicas para a proteína GmNIK não tenham ainda sido conduzidos, a estrutura modular e a topologia proposta para a proteína na membrana sugere que a interação NIK-NSP seja biologicamente relevante durante o processo de infecção viral. Duas possibilidades, mutuamente exclusivas e consistentes com a atuação de *GmNIK* como gene de resistência, podem atribuir relevância funcional para a interação NSP-NIK. A primeira refere-se à ativação de um mecanismo típico de resistência gene-a-gene. Neste caso, o gene *NSP* estaria atuando como gene de avirulência (gene *avr*) na indução de resistência a geminivirose. Consistente com esta hipótese, os determinantes de avirulência (*avr*) em cultivares de feijão resistentes a BDMV foram mapeados na ORF *NSP*, sendo provavelmente dependentes da expressão da proteína NSP (GARRIDO-RAMIREZ *et al.*, 2000). A segunda possibilidade refere-se a uma possível atuação da proteína NSP como determinante de virulência. Neste caso, a interação de NSP com NIK causaria inibição da atividade de cinase do receptor e, como consequência, supressão da resposta de defesa do hospedeiro. Experimentos de determinação da atividade de cinase de GmNIK na presença de NSP fornecerão subsídios para avaliar bioquimicamente esta possibilidade.

Uma explicação alternativa para interação funcional entre NSP e GmNIK pode estar relacionada com um mecanismo de modulação das atividades bioquímicas de NSP por fosforilação. Neste caso, a proteína NSP estaria recrutando de uma maneira específica atividades de receptores de cinase para regulação do movimento do genoma viral. A interação de proteínas de movimento com proteínas cinases do hospedeiro tem sido documentado para o caso de MP de *Tabacco mosaic virus* (TMV) (WAIGMANN *et al.*, 2000). Neste caso, a fosforilação de MP de TMV parece ter efeito inibitório na atividade da proteína, bloqueando a interação dessa proteína com o plasmodesma e dificultando assim o transporte do genoma viral. O efeito regulatório da fosforilação de MP sobre a permeabilidade do plasmodesma é dependente de hospedeiro, ocorrendo em tabaco, mas não em *N. benthamiana*. A fosforilação de

proteínas de movimento pode representar um mecanismo geral de controle de interações de proteínas de movimento de vírus com o plasmodesma.

A determinação da localização subcelular das proteínas LeNIK e GmNIK importante para a determinação de sua atuação durante o movimento do vírus na planta, uma vez que a fosforilação pode exercer um efeito regulatório sob o processo de translocação via plasmodesma. A proteína MP pode encontrar-se localizada na membrana plasmática, membrana do RE ou ainda pode estar localizada dentro associada a membrana mas na parte interna do plasmodesma (Figura 20), interagindo com a proteína NSP e influenciando no processo de translocação do genoma. A localização celular de NSP e sua função proposta no movimento célula-célula do genoma viral prevê que interações com fatores do hospedeiro possam ocorrer tanto no citoplasma quanto no núcleo. Assim, o mecanismo de atuação de NSP como uma determinante avr ou vr pode envolver tanto um reconhecimento ativo no poro nuclear por um receptor endógeno quanto por um receptor da membrana plasmática. Assim, a determinação da localização celular da proteína GmNIK fornecerá subsídios para o entendimento da significância biológica de sua interação com NSP durante o processo de infecção viral.

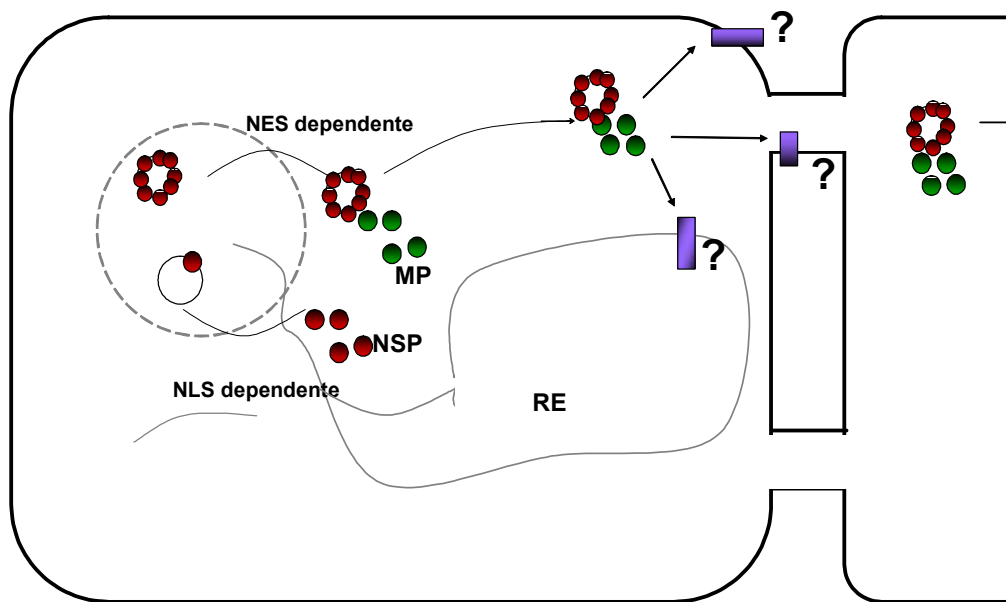


Figura 20. Localização da proteína LeNIK/GmNIK em células de tomateiro. A proteína NSP forma, inicialmente, um complexo com o DNA viral, este complexo sai do núcleo em direção ao citoplasma, onde, na presença da proteína de movimento MP é translocado para periferia celular. A NSP interage então com a proteína LeNIK/GmNIK sendo possivelmente fosforilada e o complexo é translocado através do plasmodesma para a célula adjacente. Os pontos de interrogação indicam os possíveis locais onde a proteína LeNIK /GmNIK pode estar localizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASS, H.W., NAGAR, S., HANLEY-BOWDOIN, L. & ROBERTSON, D. Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature cells. **Journal of Cell Science**, v.113, p.1149- 1160, 2000.
- BONAS, U. & LAHAYE, T. Plant disease resistance triggered by pathogen derived molecules: refined models of specify recognition. **Current Opinions Microbiology**, v.5, p.44-50, 2002.
- BOULTON, M.I., PALLGHY, C.K., CHANTANI, M., MACFARLANE, S. & DAVIES, J.W. Replication of maize streak virus mutants in maize protoplasts-evidence for a movement protein. **Virology**, v.192, p.85-93. 1993.
- BRIDDON, R.W., WATTS, J., MARKHAM, P.G. & STANLEY, J. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. **Virology**, v.172, p.628-633, 1989.
- CHEN, M.H., SHENG, J., HIND, G. HANDA, A.K. & CITOVSKY, C. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement **EMBO Journal**, v.19, p.913-920, 2000.
- CITOVSKY, V, MCLEAN, B.G., ZUPAN, J.R., ZAMBRYSKI, P. Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. **Genes Developmental**, v.7, n.5, p.904-910, 1993.
- CRESS, W.D. & TRIEZENBERG, S.J. Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. **Science**, v.251, p.87-90, 1993.

- EAGLE, P.A., OROZCO, B.M., HANLEY-BOWDOIN, L.A. DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation **The Plant Cell**, v.6, p.1157-1170, 1994.
- ELMER, J.S. , BRAND, L., SUNTER, G., GERDINER, W.E., BISARO, D.M. & ROGERS, S.G. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus II. The product of the A11 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.7043-7060, 1988.
- ETESSANI, P., CALLIS, R., ELLWOOD, S. & STANLEY, J. Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.4811- 4829, 1988.
- FEILOTTER, H.E., HANNON, G.J., RUDDALL, C.J. & BEACH, D. Construction of an improved host strain for two hybrid screening. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.8, p.1502-1503, 1994.
- FONTES, E.P.B., EAGLE, P.A., SIPE, P.S., LUCKOW, V.A., & HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.8459-8465, 1994a.
- FONTES, E.P.B., GLADFELTER, H.J., SCHAFFER, R.L., PETTY, I.T.D., & HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **The Plant Cell**, v.6, p.405-416. 1994b.
- FONTES, E.P.B., LUCKOW, V.A., HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication is a sequence –specific DNA binding protein. **The Plant Cell**, v.4, p.597-608, 1992.
- GARRIDO-RAMIREZ, R., SUDARSHANA, M.R., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. *Bean dwarf mosaic virus* BV1 protein is a determinant of the hypersensitive response and avirulence in *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.13, n.11, p.1184-1194, 2000.
- GILLETTE, W.K., MEADE, T.J., JEFFREY, J.L. & PETTY, T.D. Genetics determinants of host-specificity in bipartite geminivirus DNA A components **Virology**, v.251, p.361-369, 1998.
- GRONING, B.R., HAYES, R.J. & BUCK, K.W. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and A11 gene expression: expression of the A14 gene may contribute to suppression of the A11 gene. **Journal of General Virology**, v.75, n.4, p.721-726, 1994.

- HACHER, D.L., PETTY, I.T.D. WEI, N. & MORRIS, T.J. Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. **Virology**, v.189, p.1-8, 1992.
- HAMILTON, W.D.O., STEIN, V.E., COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. Complet nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: Potential coding regions and regulatory sequences. **The EMBO Journal**, v.3, p.2197-2205, 1984.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZOCO, B.M., NAGAR, S. & ROBERTSON, D. Geminivirus: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.18, n.1, p.71 -106, 1999.
- 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**, v.263, p.1-14, 1999.
- HAYES, R.J. & BUCK, K.W. Replication of tomato golden mosaic virus DNA B in transgenic plants expressing open reading frames (ORFs) of DNA A: requirement of ORF AL2 for production of single-stranded DNA. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.10213-10222, 1989.
- HE, Z., WANG, Z.Y., LI, J., ZHU, Q., LAMB, C., RONALD, P. & CHORY, J. Perception of brassinostroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. **Science**, v.288, p.2360-2363, 2000.
- HEATON, A. & LIN, H. An *Arabidopsis thaliana* protein interacts with a movement protein of *Turnip crinkle virus* in yeast cells and in vitro. **Journal of General Virology**, v.2, p.1245-1251, 2001.
- HEYDRAUD-NITSCHKE, F., SCHUMACHER, S. LAUFS, S., SCHAEFER, S. & GRONENBORN, B. Determination of origin cleavage and joining domain of geminivirus rep protein. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.910-916, 1995.
- HONG, Y.G., SAUDERS, K., HARTLEY, M.R. & STANLEY, J. Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of dianthin in transgenic plants. **Virology**, v.220, p.119-127, 1996.
- HORVÁTH, G.V., PETTKÓ-SZANDTNER, A., NIKOVIES, K., BILGIN, M., BOULTON, M., DAVIES, J.W., GUTIÉRREZ, C. & DUDITS, D. Prediction of funcional regions of the maize streak virus replication-association protein by protein-protein interaction analysis. **Plant Molecular Biology**, v.38, p.699-712, 1998.

- INGHAM, D.J., PASCAL, E. & LAZAROWITZ, S.G. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. **Virology**, v.207, p.191-204, 1995.
- JONES, D.A. & JONES, J.D.G. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. **Advanced Botany Research**, v.24, p.89-167, 1997.
- JOOSTEN, M.H.A.J. & De WIT, P.J.G.M. The tomato –Cladosporium fulvum interaction A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. **Annual Review Phytopathology**, v.37, p.335-367, 1999.
- KELLEY, W.L. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. **Trends in Biochemistry Sciences**, v.23, n.6, p.222-227, 1998.
- KONG, L. J. & HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. **The Plant Cell**, v.14, p.1817- 1832, 2002.
- KORMELINK, R., STORMS, M., VAN LENT, J., PETERS, D. & GOLDBACH, R. Expression and subcellular location of the Nsm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. **Virology**, v.200, p.56-65, 1994.
- LAUFS, J., TRAUT, W., HEYRAUD, F., MATZEIT, V., ROGERS, S.G., SCHELL & GRONENBORN, B. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow mosaic curl virus. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.92, p.3879-3883, 1995.
- LAZAROWITZ, S.G & BEACHY, R.N. Viral movement proteins as probes of intracellular and intercellular trafficking in plants. **The Plant Cell**, v.11, p.535-548, 1999.
- LAZAROWITZ, S.G. Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. **Current Opinion Plant Biology**, v.2, n.4, p.332-381, 1999.
- LAZAROWITZ, S.G., WU, L.C., ROGERS, S.G. & ELMER, J.S. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **The Plant Cell**, v.4, p.799-809, 1992.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminivirus: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.11, n.4, p.327-349, 1992.

- LIU, L. SAUDERS, K., THOMAS, C.L., DAVIES, J.W. & STANLEY, J. Bean Yellow Dwarf Virus Rep A but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. **Virology**, v.256, p.270-279, 1999.
- MORIN, S., GHANIM, M., SOBOT, I. & CZOSNEK, H. The GroEL protein of whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomovirus in the yeast two-hybrid system. **Virology**, v.276, p.404-416, 2000.
- MORIN, S., GHANIM, M., ZEIDAN, M., CZOSNEK, H., VERBEEK, M & HEUVELT, J.F.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**, v.256, p.75-84, 1999.
- NAGAR, S., PEDERSEN, T.J., CARRICK, K., HANLEY-BOWDOIN, L. & ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA replication protein in terminally differentiated plant cells. **The Plant Cell**, v.7, p.705-719, 1995.
- NAIRN, C.J., LEWANDOWSKI, D.J. & BURNS, J.K. Genetics and expression of two pectinesterase genes in *Valencia orange*. **Plant Physiology**, v.102, p.226-235, 1998.
- NOUEIRY, A.D., LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v.76, p.25-32, 1994.
- OROZCO, B.M, MILLER, A.B, SETTLAGE, S.B, HANLEY-BOWDOIN, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal Biology Chemistry**, v.272, n.15, p.9840-9846, 1997.
- 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**, v.242, p.346-356, 1998.
- OROZCO, B.M., KONG, L.J., BATTS, L.A. ELLEDGE, S. & HANLEY-BOWDOIN, L.A. The multifunctional character of a geminivirus replication protein is reflect by its complex oligomerization propriets. **Journal Biological Chemistry**, v.272, p.9840-9846, 2000.
- OROZCO, B.M. & HANLEY-BOWDOIN, L.A. DNA structure is required for geminivirus originated function. **Journal of Virology**, v.270, p.148-158, 1996.

- OROZCO, B.M. & HANLEY-BOWDOIN, L.A. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.24448-24456, 1998.
- 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**, v.6, p.995-1006, 1994.
- POLSTON, J.E., ANDERSON, P. The emergence of whitefly-transmitted geminivirus in tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease**, v.1028, n.1, p.1358-1369, 1997.
- PRESSEY, R. Role of pectinesterase in pH-dependent interactions between pea cell wall polymers. **Plant Physiology**, v.76, p.547-549, 1984.
- ROIVAINEN, M., PIIRAINEN, L., VIRTANEN, I., RIIKONEN, T., HEINO, J. & HYYPIÄ, T. Entry of coxsackievirus A9 into host cells: specific interactions with α v β 3 integrin, the vitronectin receptor. **Virology**, v.203, p.357- 365, 1994.
- ROJAS, M.R., NOUERY, A.O., LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in form- and size-specific manner. **Cell**, v.95, p.105-113, 1998.
- RUIZ-MEDRANO, R., GUEVARA-GONZÁLES, R.G., ARGÜLLO-ASTORGA, G.R., MONSALVE-FONNEGRA, Z., HERRERA-ESTRELLA, L.R. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Identification of a sequence involved in AC2-mediated transactivation of pepper huasteco virus coat protein gene. **Virology**, v.253, p.162-169, 1999.
- RYBICKY, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. **Archives of Virology**, v.139, p.105-113, 1994.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 1998.
- SANDERFOOT, A.A. & LAZAROWITZ, S. 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**, v.7, p.1185-1194, 1995.

- SANDERFOOT, A.A. & LAZAROWITZ, S.G. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement protein. **Trends in Cell Biology**, v.6, p.353-358, 1996.
- 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**, v.7, p.1185-1194, 1995.
- SETTLAGE, S.B., MILLER, A.B., GRUSSEM, W. HANLEY-BOWDOIN, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and plant cell cycle regulator. **Virology**, v.279, p.570-576, 2001.
- SETTLAGE, S.B., MILLER, B. & HANLEY-BODOWIN, L. Interaction between geminiviruses replication proteins. **Journal of Virology**, v.70, p.6790-6795, 1996.
- SOELICK, T.R., UHRIG, J.F., KELLMANN, J.W. KELLMANN, J.W. & SCHREIER, P.H. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identifications of interacting plant protein. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.97, n.5, p.2373-2368, 2000.
- STANLEY, J. & GAY, M.R. The nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. **Nature**, v.301, p.260, 1993.
- STANLEY, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**, v.206, p.707-712, 1995.
- STANLEY, J. Infectivity of cloned geminivirus genome requires sequence from both DNAs. **Nature**, v.305, p.643-645, 1983.
- SUNTER, G. & BISARO, M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **The Plant Cell**, v.4, p.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**, v.179, p.69-77, 1990.
- SUNTER, G., STENGER, D.C. & BISARO, D.M. Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. **Virology**, v.203, p.203-210, 1994.

- UHRIG, J.F., SOELLICK, T.R., MINKE, C.J., PHILIPP, C., KELLMANN, J.W. & SCHREIER, P.H.. Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: Identifications and characterization of two interacting domains. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.96, p.55-60, 1999.
- WAIGMANN, E., LUCAS, W., CITOVSKY, V. & ZAMBRRYSKI, P. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.91, p.1433-1437, 1994.
- WANG, H.L., GILBERTSON, R.L. & LUCAS, W.J. Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. **Phytopathology**, v.86, p.1204-1214, 1996.
- WANITCHAKORN, R., HAFNER, G.J., HARDING, R.M. & DALE, J.L. Functional analyses of protein encoded by banana bunchy top virus DNA -4 to -6. **Journal of General Virology**, v.81, p.299-306, 2000.
- WARD, B.M., MEDVILLE, R., LAZAROWITZ, S.G. & TURGEON, R. the geminivirus b11 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-derived tubules in developing phloem cells. **Virology**, v.71, p.3726-3733, 1997.
- WICKHAM, T.T., MATHIAS, P., CHERESH, D.A. & NEMEROW, G.R. Integrin $\alpha v \beta 3$ promotes adenovirus internalization but not virus attachment. **Cell**, v.73, p.309-319.
- ZHANG, S.C., WEGE, C. JESKE, H. Movement proteins (BC1 and BV1) of Abutilon mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink and not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. **Virology**, v.290, p.249-260, 2001.