

SÂMERA DE SOUZA BREVES

**DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ANTIVIRAL WWP1: FORMAÇÃO DE CORPOS
NUCLEARES E INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS PRO-VIRAIS**

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

Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Coorientador: Pedro Augusto Braga dos Reis

**VIÇOSA-MINAS GERAIS
2022**

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

T

B846d Breves, Sâmera de Souza, 1991-
2022 Domínios da proteína antiviral WWP1: formação de corpos nucleares e interação com proteínas pro-virais / Sâmera de Souza Breves. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (58 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

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

Referências bibliográficas: f. 50-58.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.078>

Modo de acesso: Word Wide Web.

1. Proteínas virais. 2. Corpos nucleares. 3. Ativação viral.
I. Fontes, Elizabeth Pacheco Batista, 1957-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 572.69

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

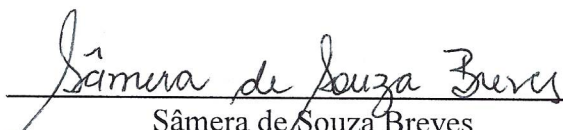
SÂMERA DE SOUZA BREVES

**DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ANTIVIRAL WWP1: FORMAÇÃO DE CORPOS
NUCLEARES E INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS PRO-VIRAIS**

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

APROVADA: 29 de agosto de 2022

Assentimento:


Sâmera de Souza Breves
Autora

Documento assinado digitalmente

gov.br

ELIZABETH PACHECO BATISTA FONTES

Data: 24/04/2023 14:27:59-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
Orientadora

Aos meus pais Mara (*in memorian*)
e Benedito (*in memorian*), DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Mara e Benedito que sempre incentivaram suas filhas a estudar e se orgulhavam de todas as nossas conquistas.

Agradeço minha irmã Samantha que foi meu apoio, minha amiga, me aconselhou e me ouviu muito!

Agradeço minhas irmãs Patrícia e Tereza Cristina que sempre me apoiaram quando precisei, me ajudando nesse período de mudanças na minha vida e me incentivando mesmo que à distância.

Agradeço meus sobrinhos Matheus, Vivian e João, meu cunhado Amilton e Augusto por sempre estarem comigo em todas as minhas conquistas.

Agradeço ao Eduardo, Acássia, Regina e Rafael que por anos me ajudaram e fizeram parte dessa minha conquista.

Agradeço aos meus queridos amigos Bia e Pedro que não mediram esforços para me ajudar, principalmente nessa etapa final! Sempre me aconselhando, me ouvindo e arrancando sorrisos diários.

Agradeço ao Henrique que na época, foi muito parceiro e meu amigo nesse período de bastante dedicação e resiliência.

Agradeço a minha amiga Manu por toda a parceria me fazendo rir e não medindo esforços para me ajudar.

Agradeço ao Dr. Marco Aurélio, que foi meu mentor no laboratório, sempre disponível a me ajudar, ensinar, a ouvir e contribuiu muito para o meu trabalho de mestrado. Serei sempre grata!

Agradeço a Thainá, Leo e Ruan que foram meus parceiros de laboratórios, fazendo que a convivência nos tornássemos amigos e sempre um ajudando ao outro.

Agradeço a Dra. Christiane, que contribuiu muito para me direcionar nesses experimentos finais, sempre me respondendo as mensagens e disposta a ajudar.

Agradeço a galera do Lab, Márcia, Nívea, Raquel, Fellipe, Bassi, Eugênio, Otto, Iana, Célio, Fredy, Gabriel, Beatriz, Rafael, Nathália, Igor, Henrique, Luiza, Vitória e João que não mediram esforços para me ajudar nessa etapa final.

Agradeço a Gláucia e a Nathalie que todos os dias fazem com que nosso trabalho se encaminhe.

Agradeço aos meus amigos de longa data Alisson, Daniela e Daniel que apesar da distância, sempre estiveram comigo!

Agradeço aos meus dogs Bud e Dimmu que me acompanharam nas madrugadas de escrita.

Agradeço aos meus antigos amigos da DuPont, Aline, Francieli, Daniel, Daniella, Rosane, Vanessa e Fernando que me incentivaram a iniciar uma etapa nova da minha vida, apoiando a minha decisão.

Agradeço aos meus amigos da EPAMIG, Juliano, Ana Paula, Aurinete, Néia, Bárbara e Geraldo que foram os primeiros a me ensinar as técnicas de laboratório e sempre me apoiaram.

Agradeço à minha professora Jane que me fez querer ser cientista desde muito nova.

Agradeço aos amigos Beth, Pedro, Bianca Voss, Naty, Gi, Day, Martha, Yago, Raíssa, Iara, Karol e Roberth do grupo Epica Brazil que diariamente estão comigo me incentivando!

Ao meu amigo Rangel que ajudou nas edições dos vídeos durante as disciplinas.

Agradeço ao Professor Dr. Pedro pela co-orientação e pela preocupação diária de como os experimentos estavam encaminhando.

Agradeço a Professora Dra. Elizabeth que mesmo sem me conhecer, deu oportunidade de poder fazer parte da sua equipe de laboratório e me ensinou muito nesse período.

Agradeço ao Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da UFV pela oportunidade de estudo.

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

*“Being conscious is a torment
The more we learn is the less we get
Every answer contains a new quest
A quest to non-existence, a journey with no end...”*

EPICA- Sensorium

RESUMO

BREVES, Sâmera de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Domínios da proteína antiviral WWP1: formação de corpos nucleares e interação com proteínas pro-virais.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientador: Pedro Augusto Braga dos Reis.

A proteína *WW domain-containing protein* (AtWWP1) possui 463 aminoácidos e contém dois domínios de triptofano conservados que reconhecem motivos ricos em prolina (PRM) e sítios de serina/treonina-prolina fosforilados. AtWWP1 atua como proteína antiviral promovendo a translocação da proteína pro-viral citoplasmática *NSP-interacting GTPase* (NIG) para corpos nucleares, diminuindo o processo infeccioso contra begomovirus. A rede de interações proteína-proteína de *Arabidopsis thaliana* ligada ao *hub* imune da proteína *COP9 signalosome complex subunit 5* (CSN5A) revelou que, além de NIG, AtWWP1 também se conecta com *Methyl CpG binding domain 2 protein* (AtMBD2), uma proteína capaz de reconhecer regiões metiladas das ilhas CpG. A proteína formadora de corpos nucleares, designada *ciclina dependente de quinase 2* (CDKC2), também foi co-localizada com AtWWP1 nos corpos nucleares. Sabendo que CDKC2 fosforila a porção C-terminal (CTD) da RNA polimerase II e AtMBD2 está associado a fatores de repressão transcricional e desmetilação do DNA, levantou-se a hipótese de que os corpos nucleares formadores de AtWWP1 são transcricionalmente ativos. Para identificar como a proteína AtWWP1 interage com as proteínas CDKC2 e AtMBD2, ensaios *in vitro* e *in planta* de proteínas mutantes e truncadas de AtWWP1 foram realizados, concluindo que AtWWP1 interage com CDKC2, em leveduras, via seus domínios de triptofano conservados e com AtMBD2 via porção C-terminal *in vitro* e *in vivo*. Estudos funcionais da proteína AtMBD2 sugerem seu envolvimento no processo de infecção contra begomovirus. Inicialmente foi demonstrado que, além de participar do *hub* imune de CSN5A, AtMBD2 é induzida por infecção com *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) similarmente a AtWWP1 e NIG. Além disso, foi demonstrado que a superexpressão de AtMBD2 aumentou a suscetibilidade ao vírus, enquanto inativação de AtMBD2 no nocaute *mbd2* – Salk 069448 diminuiu significativamente o acúmulo do DNA viral comparado com as linhagens controle, Col-0. Estes resultados indicam que AtMBD2 participa do processo de infecção viral e exibe atividade pró-viral. Como NIG, AtMBD2 não forma corpos nucleares mas é redirecionada para corpos nucleares quando expressa com AtWWP1, confirmando a atividade imune intrínseca dos corpos nucleares derivados de AtWWP1.

Palavras-Chave: Domínio WW. AtWWP1. AtMBD2. Corpos nucleares. Atividade pro-viral

ABSTRACT

BREVES, Sâmera de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Antiviral domains of the AtWWP1 protein: nuclear bodies formation and pro-viral protein interaction.** Advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisor: Pedro Augusto Braga dos Reis.

WW domain-containing protein 1 (AtWWP1) is a well-known 463 amino acid protein formed by two conserved tryptophan domains that recognize proline-rich motifs (PRM) and phosphorylated serine/threonine-proline sites. AtWWP1 plays an antiviral role, which promotes the relocation of pro-viral cytoplasmatic protein *Nuclear shuttle protein (NSP)-interacting GTPase* (NIG) to nuclear bodies, decreasing the begomovirus infection process. The *Arabidopsis thaliana* protein-protein interactions network connected to the *COP9 signalosome complex subunit 5* (CSN5A) immune hub revealed that, in addition to NIG, AtWWP1 is also connected to *Methyl CpG binding domain 2 protein* (AtMBD2), a protein that recognizes CpG methylated island. The nuclear body-forming *cyclin-dependent kinase 2* (CDKC2) co-localizes with AtWWP1-derived nuclear bodies. CDKC2 phosphorylates the RNA polymerase II C-terminus (CTD) and AtMBD2 is associated with repressor transcription factors and DNA demethylases, raising the hypothesis that AtWWP1-derived nuclear bodies are transcriptionally active. To delimit the domains on AtWWP1 that interact with CDKC2 and AtMBD2, we performed *in vitro* and *in planta* experiments using AtWWP1 mutants and truncated AtWWP1. These results indicate that AtWWP1 interacts with CDKC2, in yeast, via the conserved tryptophan domain and AtMBD2 via the C-terminal domain of AtWWP1 *in vitro* and *in vivo*. Functional studies of AtMBD2 implicate AtWWP1 in infection by begomovirus. Firstly, AtMBD2 participates in the CSN5A-derived immune hub and is induced by Cabbage leaf curl virus (CabLCV) infection. Additionally, AtMBD2 overexpression enhanced susceptibility to the virus, whereas AtMBD2 inactivation in the *mbd2* – Salk 069448 knockout line decreased significantly the viral DNA accumulation compared to the control line, Col-0. These results indicate that AtMBD2 participates in the virus infection process and displays a proviral activity. Like NIG, AtMBD2 cannot form nuclear bodies but is redirected to nuclear bodies when expressed with AtWWP1, confirming the immune intrinsic activity of the AtWWP1-derived nuclear bodies.

Keywords: WW domain. AtWWP1. AtMBD2. Nuclear bodies. Pro-viral activity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Geminivírus e movimento intracelular de begomovirus.....	14
2.2 AtWWP1, uma proteína com atividade imune e formadora de corpos nucleares.....	15
2.3 MBD2, uma proteína contendo o domínio conservado de ligação ao DNA metilado..	17
2.4 CDKC2.....	18
3. METODOLOGIA.....	20
3.1 Clonagem de mutantes de AtWWP1, MBD2 e CDKC2 em vetores de expressão em levedura.....	20
3.1.1 Ensaio de Interação dos mutantes e proteínas truncadas de AtWWP1 com proteínas MBD2 e CDKC2 (Duplo Híbrido).....	21
3.1.2 Confirmação da interação entre os mutantes de AtWWP1 com MBD2 e CDKC2; interação entre as proteínas truncadas de AtWWP1 e MBD2.....	22
3.1.3 Western blot de proteínas recombinantes expressas pelo sistema duplo híbrido de leveduras.....	22
3.2 Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC).....	23
3.2.1 Obtenção e confirmação dos clones.....	23
3.2.2 Transformação em <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e BiFC.....	24
3.3 Avaliação do papel da proteína MBD2 no processo de Infecção Viral em <i>Arabidopsis</i> com CabLCV.....	24
3.3.1 Linhagens transgênicas.....	24
3.3.2 Análise de expressão das linhagens nocautes.....	25
3.3.3 Ensaio de Infecção Viral.....	25
3.3.4 Extração de DNA e PCR de confirmação da infecção viral.....	26
3.3.5 RT-qPCR para quantificação dos números de cópias virais.....	26
3.4 Técnicas de Biologia Molecular.....	26
3.5 Método estatístico.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Seleção in silico de proteínas que possivelmente interagem com AtWWP1.....	27
4.2 AtWWP1 interage com CDKC2 via o domínio WW formador de corpo nuclear.....	28
4.3 AtWWP1 interage com MBD2 in vitro e in planta via carboxi- terminal.....	31
4.4 AtMBD2 provavelmente exerce uma atividade pro-viral.....	39
5. DISCUSSÃO.....	46
5.1 O domínio WW formador de corpo nuclear de WWP1 interage com CDKC2, cujos corpos nucleares são transcricionalmente ativos.....	46
5.2 A interação de AtWWP1 com MBD2 pode estar relacionada a sua atividade antiviral... 47	
6 REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

A proteína *WW domain-containing protein 1* (AtWWP1) é uma proteína de 463 aminoácidos e contém dois domínios de triptofano conservados e reconhece motivos ricos em prolina (PRM) (MACIAS *et al.*, 1996) e sítios de serina/treonina-prolina fosforilados (SALAH *et al.*, 2012). A rede de interações proteína-proteína de *Arabidopsis thaliana* ligada ao *hub* imune da proteína *COP9 signalosome complex subunit 5* (CSN5A) revelou que, além da proteína *NSP-Interacting GTPase* (NIG- AT4G13350) facilitadora do tráfego do DNA de begomovírus para o citoplasma, AtWWP1 também se conecta com *Methyl CpG binding* (AT55G35330 - AtMBD2) uma proteína capaz de reconhecer regiões metiladas das ilhas CpG (CALIL, 2013).

Ensaio de co-localização mostraram a sobreposição dos corpos nucleares derivados de AtWWP1 com aqueles derivados de *Cyclin-dependent kinase 2* (AT5G64960- CDKC2) (KITSIOS *et al.*, 2008; CALIL, 2013; 2017). Corpos nucleares são localizados em domínios de cromatina que contém partículas de ribonucleoproteínas (RNPs), formando cadeias lineares que atuam na poliadenilação do RNA, fatores de *splicing* e snRNAs (BELMONT, 2022). Estas informações sugerem que os corpos nucleares derivados de AtWWP1 podem ser transcricionalmente ativos, já que as cinases dependente de ciclina, estão envolvidas na modulação de fosforilação da porção maior do carboxi-terminal (CTD) da RNA polimerase II (ZHENG, 2022).

Para entender a dinâmica da formação de corpos nucleares, domínios de WW da proteína AtWWP1 foram mutados por mutagênese, substituindo o aminoácido triptofano por alanina em diferentes posições nos dois domínios conservados dessa proteína (Figura 1). E essas substituições gradativas dos triptofanos conservados por alanina afetam o número de corpos nucleares derivados de AtWWP1 (CALIL *et al.*, 2018).

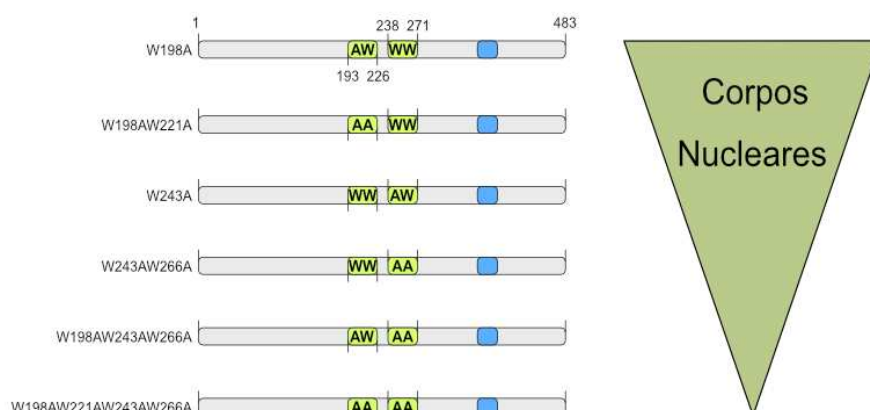


Figura 1: Mutantes de AtWWP1 perdem a capacidade de formar corpos nucleares. Representação esquemática dos mutantes de AtWWP1 que perdem sua capacidade de formar corpos nucleares, ao substituir o resíduo de triptofano por alanina.

Foi demonstrado recentemente que os corpos nucleares de AtWWP1 possuem uma atividade imune intrínseca e protegem plantas contra begomovírus. O mecanismo de defesa mediado por AtWWP1 está relacionado com a capacidade de WWP1 de se ligar a proteína pro-viral NIG e sequestrá-la para os corpos nucleares. NIG está localizado no citoplasma, concentra-se ao redor do envelope nuclear, interage com a proteína de begomovírus, NSP, e facilita o transporte do complexo vDNA-NSP dos poros nucleares para o citoplasma (CARVALHO *et al.*, 2008). Por meio de interação direta, AtWWP1 redireciona NIG para os corpos nucleares, impedindo assim a atividade pro-viral de NIG que está associada com sua localização citoplasmática.

Além da atividade imune, é razoável supor que os corpos nucleares derivados de AtWWP1 participem de processos celulares básicos como moduladores de transcrição. Esta hipótese foi levantada devido à co-localização de AtWWP1 com corpos nucleares derivados de CDKC2, envolvida na fosforilação do domínio do carboxi-terminal (CTD) da RNA polimerase II, que controla a transição de iniciação para alongação de transcrição, bem como o recrutamento de fatores de *splicing* (ZHENG, 2022).

Além das proteínas CDKC2 e NIG, AtWWP1 também interage com AtMBD2, cuja função ainda é desconhecida em plantas. Seu domínio MBD confere a capacidade de se interagir com regiões ricas em CpG e que sua interação com outras proteínas, não é dependente desse domínio (COELHO *et al.*, 2022), podendo exercer uma função de demetilase do DNA (WANG *et al.*, 2013) e repressão transcricional (BECKER *et al.*, 2013).

Entender o papel biológico e bioquímico das proteínas que participam da rede interações entre proteínas de geminivírus e proteínas do hospedeiro, pode levar à

identificando proteínas de defesa e fatores virais como pré-requisito para definição de estratégias para combater o vírus. O presente estudo visa caracterizar as interações da proteína AtWWP1, com a proteína CDKC2, formadora de corpos nucleares, e proteína AtMBD2, dispersa no nucleoplasma, mas que pode ser concentrada em corpos nucleares quando co-expressa com AtWWP1.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Geminivírus e movimento intracelular de *begomovirus*

Geminivírus pertence a uma grande família de vírus de plantas que causam danos em diversas culturas agrônomicas, sendo designada família *Geminiviridae* (GUTIERREZ, 1999). Seu genoma é composto por uma fita simples de DNA em partículas geminadas icosaédricas, sendo que a família *Geminiviridae* engloba nove gêneros (*Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*), classificados de acordo com organização do genoma, gama de hospedeiros, inseto vetor e filogenia (ZERBINI *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2021).

Espécies do gênero *Begomovirus* que predominam no Brasil, são transmitidas pela mosca branca do gênero *Bemisia tabaci* (FAUQUET *et al.*, 2008) e possuem o genoma monossegmentado ou bissegmentado, designado de DNA-A e DNA-B com tamanho de 2,5-2,6 kb respectivamente (FANDONG, 2013). O componente A contém 2 *Open Reading Frame* (ORFS) no sentido viral (AV1/V1; AV2/V2) que codificam a proteína da capa (CP; AV1/V1), responsável pela encapsidação do DNA viral de fita simples (*single-stranded DNA*- ssDNA), e proteína de movimento (MP; AV2/V2) que facilita o transporte intercelular do DNA viral (vDNA) na célula hospedeira. As ORFS no sentido complementar (AC1, AC2, AC3 e AC4), codificam as proteínas responsáveis pela replicação (AC1/Rep- *replication initiator protein*), *replication enhancer protein* (AC3/Ren), fator transcricional para ativação do gene (*transcriptional activator protein* - AC2/TrAP) e supressor de silenciamento para defesa do hospedeiro (AC4) (FANDONG, 2013).

O componente B possui duas ORFs, uma no sentido viral (BV1) que codifica a proteína *Nuclear Shuttle Protein* (NSP) e outra no sentido complementar (BC1) que codifica *Movement Protein* (MP) e estão relacionadas ao tráfego intra e intercelular do vDNA. Para o sucesso da infecção no hospedeiro causado por begomovírus, após a sua introdução pelo inseto vetor, ocorre um processo de desencapsulamento, movimento do ssDNA viral para o núcleo da célula hospedeira e início do processo de replicação totalmente dependente da maquinaria de replicação do hospedeiro (NOUEIRY *et al.*, 1994).

Sendo assim, após o vírus adentrar na célula, o ssDNA viral liberado é direcionado para o núcleo, onde o DNA fita simples é inicialmente convertido para um intermediário de DNA fita dupla, denominado forma replicativa (RF), iniciando então o processo de replicação pelo método círculo rolante. O DNA fita dupla também serve como molde para a transcrição do genoma viral (FAUQUET, *et al.*, 2005). O vDNA (viral DNA) recém sintetizado interage

com a proteína do capsídeo (CP) para empacotamento ou com a proteína NSP, para movimento nucleocitoplasmático (SILVA *et al.*, 2022). Consequentemente, CP e NSP competem pela interação com vDNA. NSP recruta uma acetiltransferase que acetila CP diminuindo sua afinidade pelo vDNA, o que favorece a interação NSP-vDNA. NSP facilita a saída do vDNA do núcleo para o citoplasma, sendo auxiliada por uma outra proteína citoplasmática que se concentra em volta do poro nuclear, designada *NSP-Interacting GTPase* (NIG) (CARVALHO *et al.* 2008).

No citoplasma, o complexo NIG-NSP-vDNA interage com uma proteína endossomal *NSP-interacting syntaxin domain-containing protein* (NISIP) que fornece uma rota para o movimento intracelular do complexo NSP-vDNA-NIG-NISIP até os endossomos. Neste modelo de transporte citoplasmático do vDNA, NISIP exerce uma função pro-viral e via ancoragem de proteínas cargo por meio de interações do domínio sintaxina-6 (GOUVEIA-MAGESTE *et al.*, 2021). O regulador de endocitose *Synaptotagmin A* (SYTA), promove a translocação de MP da superfície celular para os endossomos, onde interage com NSP-vDNA, e o complexo MP-NSP-vDNA é redirecionado para o plasmodesmata via a rota de reciclagem endocítica regulada por SYTA (GOUVEIA-MAGESTE *et al.*, 2021). MP aumenta o limite de exclusão do plasmodesmata e transporta o complexo vDNA-NSP para as células adjacentes (SHESHUKOVA *et al.*, 2020).

2.2 AtWWP1, uma proteína com atividade imune e formadora de corpos nucleares.

A família de proteínas que contém o domínio WW são amplamente distribuídas em eucariotos (INGHAM *et al.*, 2005). Os domínios WW, responsáveis por interações proteína-proteína, contém dois resíduos de triptofano conservados e 40 aminoácidos que formam três folhas β pregueadas antiparalelas (SUDOL & HUNTER, 2000; SUDOL *et al.*, 2005), sendo que dois resíduos de prolina em volta do primeiro domínio de triptofano forma uma cavidade hidrofóbica do lado convexo da folha (MACIAS *et al.*, 1996). Entre os resíduos de triptofano há um espaço de 20-22 aminoácidos conservados que fazem um papel importante em nível estrutural e funcional da proteína (SUDOL & HUNTER, 2000).

Proteínas que contém os domínios WW são classificados em cinco grupos que variam em relação aos sítios de reconhecimento do ligante. O grupo I se liga em regiões consenso de aminoácido Pro-pro- X-Tyr (CHEN & SUDOL, 1995; INGHAM *et al.*, 2005), grupo II se liga aos motivos de aminoácidos Pro-Pro-Leu-Pro (BEDFORD *et al.*, 1997), no grupo III os domínios de WW selecionam motivos de poliprolina que forma regiões truncadas por arginina e lisina (BEDFORD *et al.*, 2000), o grupo IV é representado pelos domínios

cujos ligantes tem padrão de reconhecimento de motivo de Prolina (PRM) e sítios de fosforilação nos aminoácidos fosfo-serina-prolina ou fosfo-treonina-prolina (LU *et al.*, 1999; SUDOL & HUNTER, 2000; MACIAS *et al.*, 2002). O grupo V inclui dois conjuntos repetidos de domínios WW na porção N-terminal que se liga de forma ininterrupta em sequências de prolina e seu primeiro resíduo possui uma sequência hidrofóbica (OTTE *et al.*, 2002).

Proteínas que contêm os domínios WW exercem funções celulares básicas como transcrição, processamento do RNA, tráfego de proteínas, receptor de sinalização e controle do citoesqueleto (IGHAM *et al.*, 2005). Em humanos, essas proteínas podem estar envolvidas direta ou indiretamente em complexos de sinalização que causam doenças graves como câncer, Síndrome de Liddle, Rett, Alzheimer e Huntington (SALAH *et al.*, 2012).

Em plantas da espécie *Arabidopsis thaliana*, a proteína AtWWP1 foi identificada pela sua capacidade de interagir com o domínio prolina de NIG (NSP-interacting GTPase), um facilitador do transporte do DNA de begomovirus do núcleo para o citoplasma (CALIL *et al.*, 2018). AtWWP1 forma corpos nucleares via seu domínio WW e redireciona NIG do citoplasma para os corpos nucleares, prevenindo assim a função pró-viral de NIG que está associada com sua localização citoplasmática. Este modelo funcional preconiza que AtWWP1 confere uma atividade antiviral contra begomovirus por sequestrar NIG em corpos nucleares (CALIL *et al.*, 2018; MARTINS, *et al.*, 2020). Consistente com imunidade intrínseca dos corpos nucleares de AtWWP1, superexpressão de AtWWP1 confere tolerância a begomovirus e sua inativação aumenta suscetibilidade ao begomovirus que rompe os corpos nucleares derivados de AtWWP1 (CALIL *et al.*, 2018). Codificada pelo gene AT2G41020, AtWWP1 possui 463 aminoácidos e seu primeiro domínio de triptofano posicionado no aminoácido 193-226 e segundo domínio de triptofano no aminoácido 238-271 (INTERPRO- IPR001202). Ambos os domínios WW são necessários para a atividade total de formação de corpos nucleares de AtWWP1 (CALIL *et al.*, 2018). A substituição gradual dos triptofanos conservados por alanina, de 1 a 4 substituições, em AtWWP1 diminui gradativamente o número de corpos nucleares formados com completa abolição pela mutação total dos 4 triptofanos conservados.

Estudos de análises filogenéticas, mostraram que AtWWP1 compartilha os domínios WW assim como a região C-terminal conservada com proteínas não conhecidas de grandes culturas. Como *Glycine max* (Glyma 02G162000), *Oriza sativa* (LOC-Os01G68760) e *Solanum lycopersicum* (Solyc11G005110) (CALIL *et al.*, 2018). Em *Arabidopsis*, 13 proteínas que contêm os domínios WW foram identificadas, sendo que a maioria dela ainda

não foram caracterizadas funcionalmente. Análise filogenética agrupou AtWWP1 com AT3G19840, AT1G44910 e AT3G19670, proteínas AtPrp40 (A-C) (*pre-mRNA processing protein 40*), consideradas fatores de splicing, em leveduras que se associam com U1 do snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*). Prp40 também se liga a ao domínio fosforilado do carboxi-terminal (CTD) da RNA polimerase II via os domínios de triptofano (WW) e fenilalanina (FF) (KAO & SICILIANO, 1996; KANG, *et al.*, 2009; ALLEN, *et al.*, 2022; STEPIEN *et al.*, 2022).

Consistente com sua atividade de formação de inclusões nucleares, ensaios de duplo híbrido e complementação de fluorescência bimolecular (BiFC - *Bimolecular fluorescence complementation*) demonstraram a interação de AtWWP1 com proteínas de formação de corpos nucleares como a CDKC2 (codificada pelo gene AT5G64960) (CALIL, 2013, 2017). Além disso foi demonstrado que AtWWP1 interage com o domínio C-terminal da RNA polimerase II (CTD) e se liga ao DNA de fita simples (ssDNA) e ao DNA de fita dupla (dsDNA). Através de experimentos com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol), um marcador fluorescente em regiões ricas em adenina-timina, foi demonstrado que os corpos nucleares derivados da proteína AtWWP1 localizam-se em regiões de eucromatina, sugerindo que AtWWP1 pode desempenhar um papel de regulação transcricional e na atividade imune contra begomovirus. No entanto, a caracterização funcional dos corpos nucleares derivados de AtWWP1 é ainda muito limitada, necessitando de abordagens bioquímicas e genéticas mais direcionadas para a caracterização da imunidade intrínseca e função celular dessas inclusões nucleares.

2.3 MBD2, uma proteína contendo o domínio conservado de ligação ao DNA metilado

A metilação do DNA é uma modificação epigenética importante no desenvolvimento de plantas e animais desempenhando um papel na estabilidade do genoma, imprinting genômico, paramutação e inativação do cromossomo X (HE *et al.*, 2011; LAW & JACOBSEN, 2010, WOOD & ZHOU, 2016). As proteínas contendo o domínio de ligação ao DNA CpG metilado (*methyl-CpG-binding domain*, MBD) estão envolvidas no reconhecimento de metil citosinas e afetam a expressão gênica por meio de recrutamento de remodeladores da cromatina relacionados à modificação de histonas, formação de heterocromatina e eucromatina (COELHO *et al.*, 2022). A família MBD possui motivos definidos por MeCP2 que consistem em 70 aminoácidos, que exibem interação específica com ilhas CpG, que são regiões ricas em GC do DNA (HENDRICH; BIRD, 1998).

Proteínas MBD podem ser classificadas em 6 tipos de proteínas (MBD1-6) que compartilham a capacidade de se ligar em regiões mGC, não sendo, entretanto, propriedade de todos os membros do grupo MBD (WOOD & ZHOU, 2016). MBD1 e MBD2 ligam ao DNA com alta densidade de CpG e se associam com outras proteínas co-repressoras via domínios de repressão transcricional (TRD) (NAN *et al.*, 1998; BECKER *et al.*, 2013). MBD3 possui uma mutação pontual que permite a interação com regiões com baixa densidade em citosina, metilado (mGC) e hemimetilado (hmC) (GÜNTHER *et al.*, 2013). MBD4 se liga ao DNA metilado e tem a atividade de glicosilase (TDG), exibida pelo domínio C-terminal, sendo o domínio N-terminal de ligação ao metil (ISHIBASHI *et al.*, 2008). MBD5 e MBD6 se localizam em regiões de heterocromatina e não se ligam especificamente em DNA metilado (LAGET *et al.*, 2010).

Em *Arabidopsis*, 13 proteínas da família MBD foram caracterizadas com motivos conservados em sua estrutura. AtMBD5, AtMBD6 e AtMBD7 se ligam especificamente em sítios CpG (ZEMACH & GRAFI, 2007), enquanto AtMBD4 possui um domínio conservado de DNA glicosilase, contendo resíduos conservados e essenciais para se ligar ao substrato e iniciar a catálise, excisando timinas e uracilas complementando guanina (RAMIRO-MERINA *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2022). AtMBD9 possui vários domínios que estão associados à regulação da cromatina via MBD e controle do tempo de floração, ramificação axilar através de metilação e acetilação das histonas (PENG *et al.*, 2006; LIANG *et al.*, 2022).

Para entender como as proteínas de domínio MBD interagem em ilhas CpG e CpNpG, Zemach e Graffi (2003) mostraram que a proteína AtMBD2 não possui a capacidade de se ligar nessas ilhas CG metiladas, quando há interferência inibitória no seu domínio MBD, concluindo que a capacidade dessa proteína interagir ou não aos componentes metilados é totalmente dependente desse domínio.

A função de AtMBD2 codificada pelo gene AT5G35330, ainda é desconhecida; porém sua interação com a AtWWP1 foi identificada em uma rede de transfatores de resposta a auxina (CALIL, 2013). Este *hub* de interação proteína-proteína converge para a proteína CSN5A (*hub* imune já caracterizado) e acomoda diversas proteínas com atividades antiviral e pro-viral durante a infecção por begomovirus. Entretanto, não se sabe se a proteína AtMBD2 participa do ciclo de infecção por begomovírus.

2.4 CDKC2

Proteínas CDKs fazem parte de uma família de proteínas que possuem domínios catalíticos e fosforilam resíduos de serina, treonina ou tirosina (STONE & WALKER, 1995).

Desenvolvem um papel do controle e progressão do ciclo celular em diferentes fases da divisão celular através da sua subunidade reguladora de ciclina e uma unidade catalítica CDK (STONER & WALKER, 1995; KITSIOS; DOONAN, 2011).

A subfamília CDK da classe C é composta pelas proteínas CDKC1 e CDKC2, que também estão envolvidos na modulação e fosforilação da porção maior da subunidade carboxi-terminal (CTD) da RNA polimerase II, exercendo um papel cooperativo na maquinaria transcricional (ZHENG, 2022) e na regulação do processamento do RNA mensageiro (mRNA) (KITSIOS *et al.*, 2008). Em *Arabidopsis thaliana*, a proteína CDKC2 é codificada pelo gene AT5G64960 e colocaliza-se com os componentes do spliceossomo. A atividade da kinase de CDKC2 é importante para a formação de *speckles* (KITSIOS *et al.*, 2008) e pela sua co-localização com a proteína *Serine/Arginine-rich protein splicing factors – SR proteins* (AtSR34), codificada pelo gene AT1G02840, desempenha função de *splicing* do RNA, *splicing* alternativo e processamento do metabolismo do RNA (REDDY *et al.*, 2011).

A proteína CDKC2 também exerce uma importante função no processo de infecção viral de *cauliflower mosaic virus* (CaMV). A CDKC2 associado a cinco proteínas ciclinas do tipo T em plantas de *Arabidopsis*. As linhagens nocautes *cdkc2* e *cyct1* mostraram ser resistente ao CaMV, sendo o duplo mutante *cdkc/cyct1* ainda mais resistente. Estes resultados indicam que CaMV utiliza CDKC2 para ativação da transcrição e a ativação inicia pela fosforilação da CTD da RNAP II interagindo com a subunidade da ciclina T (CUI *et al.*, 2007).

Por meios de ensaios de co-expressão da proteína AtWWP1 fusionada a tag *Green fluorescent protein* (GFP) com CDKC2 fusionada a tag de *mcherry*, foi possível observar uma sobreposição dos corpos nucleares derivados da AtWWP1 com aqueles derivados de CDKC2. Essa co-localização de AtWWP1 com CDKC2 sugere que os corpos nucleares derivados de AtWWP1 podem ser transcionalmente ativa como as cinases dependente de ciclina 2, que modulam a porção C-terminal (CTD) da RNA polimerase II via fosforilação (CALIL, 2013). Seria interessante determinar se AtWWP1 interage com CTD fosforilado da RNA polimerase II.

3. METODOLOGIA

3.1 Clonagem de mutantes de AtWWP1, MBD2 e CDKC2 em vetores de expressão em levedura

Para o ensaio do duplo híbrido, os clones em *Escherichia coli* da estirpe DH5 α , pAD-AtWWP1 (pUFV 1483), pAD- AtWWP1^{W198A} (pUFV 2772), pAD- AtWWP1^{W243A} (pUFV 2771), pAD- AtWWP1^{W198AW243AW266A} (pUFV 2774), pAD- AtWWP1^{W243AW266A} (pUFV 2773), pAD- AtWWP1^{W198AW221AW243AW266A} (pUFV 3098; CALIL *et al.*, 2018), pBD-PRNIG (pUFV 1098), pBD-MBD2 (pUFV 2172), pAD-Vazio (pUFV 1783; pDEST22), pBD-Vazio (pUFV 1784, pDEST32), foram plaqueados em LB (Luria Bertani) sólido contendo os antibióticos de seleção Ampicilina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para os clones em pDEST22 (*Activation Domain*) e Gentamicina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para os clone no BD (*Binding domain*). As colônias coletadas foram adicionadas em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos de seleção e posteriormente foi feito a extração de DNA plasmidial via Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen). Os DNAs foram quantificados e a integridade examinada via eletroforese com gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Os clones pAD-AtWWP1¹⁻¹⁹³ pUFV (3447), pAD- AtWWP1¹⁻²⁷² (pUFV 3448) e pAD-AtWWP1²⁷²⁻⁴⁶³ (pUFV 3449), contendo as respectivas versões truncadas de AtWWP1 em pDEST22, foram previamente descritos (CALIL *et al.*, 2018). O DNA plasmidial (50 ng) dos referidos clones, disponibilizado no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, foi utilizado para transformar *Escherichia coli* da estirpe DH5 α por eletroporação. Os respectivos clones foram selecionados no meio LB sólido contendo antibiótico Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e posteriormente confirmado por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos e reconfirmados por sequenciamento.

O DNA recombinante contendo o cDNA de CDKC2 (pUFV 2273) clonado no vetor de entrada pDONR 201 foi previamente descrito (CALIL, 2013). O inserto de pUFV2273 foi então transferido para pDEST32 por recombinação utilizando a enzima Gateway LR clonase® da Invitrogen a 25° C *overnight*. A reação foi utilizada para a transformação de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α , pelo método de eletroporação. O transformante positivo foi selecionado pelo uso do antibiótico gentamicina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e confirmado via PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1), originando o clone pBD- CDKC2 (pUFV 3432).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados em reação de PCR e RT-qPCR.

Sequência alvo	Nome	Sequência 5' -> 3'
AtWWP1	At2G41020_Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGAGAAGAGCTGCA
AtWWP1 (mutantes)		
AtWWP1 ¹⁻¹⁹³		
AtWWP1 ¹⁻²⁷²		
AtWWP1 ²⁷²⁻⁴⁶³	WWP1_272_Fwd	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATG TTACAGAAGCCCGCTGC
AtMBD2	MBD2_Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAGTATGTGCGCAGTC
	qRT_MBD2_Fwd	GGAGACTCATGCCTTCAATGC
	qRT_MBD2_Rvs	CGTTTTTCTGCGATACAGCG
CDKC2	CDKC2_Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCGGCTGCGGCTTTTGGG
NIG	NIG391600_Fwd	CACAATGTCTCCAAGTGAGAC
Actina	qRT- Actin Fwd	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
	qRT-Actin Rvs	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
rRNA 18S	qRTAt18sRNA_Fwd	TGTGCTGGCGACGCATCATT
	qRTAt18sRNA_Rvs	TAATTTGCGCGCCTGCTGCC
pDEST32 e 22	DEST22-Rvs	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
Spyne	Spyne	GGCCATGATATAGACGT
Spyce	Spyce	TTACTTGTACAGCTCGTCCA
CaLCuV-B	PCRC1	CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA
CaLCuV-B	PBL1v2040	GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA
	qRTCaLCuVB_Fwd	GGGCCTGGGCCTGTTAGT
	qRTCaLCuVB_Rvs	ACGGAAGATGGGAGAGGAAGA
Nocaute <i>mbd2</i>	LBB1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
	<i>mbd2</i> – LP	GGCTTCATCAAAGCTTGACAG
	<i>mbd2</i> - RP	GTCCGAGTAGTTTCGTCCTCC

3.1.1 Ensaio de Interação dos mutantes e proteínas truncadas de AtWWP1 com proteínas MBD2 e CDKC2 (Duplo Híbrido).

Para os ensaios de interação proteína-proteína, células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem AH109 (MATa, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1UAS-GAL1TATAHIS3*, *GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*, *URA3::MEL1 UASMEL1TATA-lacZ*, *MEL1*) descrito por Mariano, et al (2004), que é deficiente na produção de triptofano, leucina e uracila e contém os genes repórteres *LacZ* e *HIS3*, foram inicialmente crescidas em meio YPDA por 16 horas, sendo então centrifugadas a 13000 g por 30 segundos e re-suspensas com 1 mL de água deionizada. Após re-centrifugação a 13000 g por 30 segundos, foram obtidas as células pré-lavadas utilizadas para transformação com DNA plasmidial, pelo método de transformação com acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG).

Para cada transformação, foram adicionados 240 µl de PEG (PEG MW 3350), 36 µl de Acetato de Lítio 1 M, 25 µl de ssDNA (2 µg/ µl) e 1000 ng de DNA plasmidial. As células foram homogeneizadas e incubadas a 30 °C por 30 minutos e 42° C por 25 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 13 000 rpm por 1 minuto, lavadas com água deionizada e plaqueadas em meio seletivo com deficiência de triptofano - *Synthetic Dropout* (SD)-trp para as amostras transformadas com os clones derivados de pDEST 22 e meio com deficiência de triptofano e leucina (SD-leu-trp) para amostras co-transformadas com os clones derivados de pDEST 22 (domínio de ativação) e pDEST 32 (domínio de ligação) e mantidos em B.O.D. a 30° C por três a quatro dias.

3.1.2 Confirmação da interação entre os mutantes de AtWWP1 com MBD2 e CDKC2; interação entre as proteínas truncadas de AtWWP1 e MBD2

Os duplos transformados com as combinações entre clones expressando as versões de AtWWP1 fusionadas a AD e clones expressando as proteínas MBD2 ou CDKC2 fusionadas a BD foram confirmados em meios seletivos com deficiência de leucina e triptofano (SD-leu-trp) e expostos ao meio com ausência de leucina, triptofano e histidina (SD-leu-trp-his), suplementado com um competidor de histidina 3 AT (3-amino-1, 2, 4-triazole) a 2, 5 mM e 5, 0 mM. Para os duplos transformantes com resultado negativo para interação, proteína total foi extraída e a expressão das proteínas recombinantes confirmadas por Western blot utilizando anticorpos contra os domínios de ativação (AD) e ligação (BD) de Gal-4.

3.1.3 Western blot de proteínas recombinantes expressas pelo sistema duplo híbrido de leveduras

A extração de proteína de leveduras foi realizada pelo método descrito por Baerend *et al.* (2000) adaptado.

As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 10% (m/v) de poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose. A membrana foi sondada incubada com anticorpo Anti-Galactose 4 DNA *activation domain* (AD) conjugado a HRP (Anticorpo monoclonal anti-GAL4 domínio TA conjugado a HRP GAL4-TA Anticorpo (A-2): sc-46680 – Marca Santa Cruz) por 16 horas e revelada pelo fotodocumentador ChemiDoc® (Bio-Rad™) através de reação quimioluminescente com o kit Super Signal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate- Thermo Fisher. Após a revelação das proteínas com domínio AD de Gal4, os anticorpos anti-AD foram dissociados com Tris-glicina, e a

membrana re-incubada com o anticorpo Anti-Galactose 4 DNA *binding domain* (BD) conjugado a HRP (Anticorpo monoclonal anti-GAL4 domínio DBD conjugado a HRP GAL4 *Antibody* (RK5C1): sc-510 HRP- Marca Santa Cruz).

3.2 Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC)

3.2.1 Obtenção e confirmação dos clones

Os clones AtWWP1¹⁻¹⁹³-nYFP (pUFV 3086), AtWWP1¹⁻²⁷¹-nYFP (pUFV 3087) e AtWWP1²⁷²⁻⁴⁶³-nYFP (pUFV 3450), contendo as versões truncadas de AtWWP1, nas posições 1-193, 1-271 e 272-463, fusionadas a nYFP, foi previamente obtido (CALIL *et al.*, 2018). DNA plasmidial (50 ng), disponibilizado no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, foi utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α por eletroporação. O clone foi selecionado no meio LB sólido contendo antibiótico Canamicina (50 μ g/mL) e posteriormente confirmado por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1).

Para obter os clones dos mutantes de AtWWP1, a clonagem foi feita pelo DNA plasmidial a partir dos clones AtWWP1^{W198A}-NS-pDONR207 (pUFV 2997), AtWWP1^{W243A}-NS-pDONR207 (pUFV 2998), AtWWP1^{W198AW221A}-NS-pDONR207 (pUFV 2795), AtWWP1^{W243AW266A}-NS-pDONR207 (pUFV 2999), AtWWP1^{W198AW243AW266A}-NS-pDONR207 (pUFV 3000), AtWWP1^{W198AW221AW243AW266A}-NS-pDONR207 (pUFV 3037) que foram recombinados com a enzima Gateway LR clonase[®] da Invitrogen nos vetores SPY-NE GW e SPY-CE GW a 25° C *overnight*. As reações foram utilizadas para transformação de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α , pelo método de eletroporação. Os transformantes positivos foram selecionados pelo uso do antibiótico Canamicina (50 μ g/mL) e foram confirmados via PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1), originando os clones AtWWP1^{W198A}-nYFP (pUFV 3436), AtWWP1^{W198A}-cYFP (pUFV 3437), AtWWP1^{W243A}-nYFP (pUFV 3438), AtWWP1^{W198AW243AW266A}-nYFP (pUFV 3439), AtWWP1^{W198AW243AW266A}-cYFP (pUFV 3440), AtWWP1^{W198AW221AW243AW266A}-nYFP (pUFV 3441), AtWWP1^{W198AW221AW243AW266A}-cYFP (pUFV 3442), AtWWP1^{W198AW221A}-nYFP (pUFV 3443), AtWWP1^{W198AW221A}-cYFP (pUFV 3444), AtWWP1^{W243AW266A}-nYFP (pUFV 3445) e AtWWP1^{W243AW266A}-cYFP (pUFV 3446), sendo posteriormente armazenados em glicerol 50%. Para o experimento de BiFC, não foram utilizados todos os mutantes de AtWWP1.

3.2.2 Transformação em *Agrobacterium tumefaciens* e BiFC

Para verificar a interação *in vivo* do mutante e proteínas truncadas de AtWWP1 com a proteína MBD2 e identificar região dessa interação, DNAs dos clones AtWWP1-nYFP (pUFV 1650), AtWWP1-cYFP (pUFV 1651), NIG-cYFP (pUFV 1647), AtWWP1^{W198AW221AW243AW266A}-nYFP (pUFV 3441), AtWWP1^{W198AW221AW243AW266A}-cYFP (pUFV 3442), AtMBD2-nYFP (pUFV 2055), AtMBD-cYFP (pUFV 2056), as proteínas truncadas de AtWWP1¹⁻¹⁹³-nYFP (pUFV 3086), AtWWP1¹⁻²⁷² (pUFV 3087), AtWWP1²⁷²⁻⁴⁶³ (pUFV 3450), vetor SPY-NE GW vazio (pUFV 1641) e vetor SPY-CE GW vazio (pUFV 1642) foram extraídos de *E. coli* e utilizados para transformar *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV3101, pelo método de eletroporação. Os transformantes positivos foram confirmados via PCR convencional e utilizados no ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) em diversas combinações (SHÜTZE *et al.*, 2009).

Após a confirmação via PCR, culturas de *Agrobacterium tumefaciens*, carreando as construções de interesse foram crescidas em meio LB, contendo os antibióticos Canamicina, Estreptomicina e Gentamicina, a 28 °C por 16 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2500 x g por 5 minutos e lavadas três vezes com tampão de agroinfiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10mM pH 5,6 e acetoseringona 100 µM). Em seguida, as células foram diluídas em tampão de agroinfiltração para O.D600 = 1 e infiltradas em folhas jovens de *N. benthamiana*, utilizando-se seringas estéreis, gentilmente pressionadas sobre a face abaxial da epiderme foliar.

Após 72 horas, fragmentos das folhas foram analisados no microscópio confocal Zeiss LSM510 META, sendo a fluorescência do YFP avaliada com excitação a 514nm. As imagens foram processadas com auxílio do *software* LSM Image Browser.

3.3 Avaliação do papel da proteína MBD2 no processo de Infecção Viral em *Arabidopsis* com CabLCV

3.3.1 Linhagens transgênicas

As quatro linhagens 35S::MBD2-6HA foram previamente obtidas, nocaute Salk 069448, CS 900672 e Columbia-0 (*Wild type*-WT) foram obtidos do Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University. As referidas linhagens foram crescidas em meio Murashige e Skoog (MS-1962) ½ força, contendo antibiótico de seleção higromicina (20 mg/mL) para linhagens super expressando MBD2. As plântulas foram cultivadas a 21° C por duas semanas e, em seguida, transferidas para o solo sob regime de luminosidade 8h luz/ 14h escuro.

3.3.2 Análise de expressão das linhagens nocautes

Foi coletado aproximadamente 100 mg de tecido de planta para extração de RNA total. O RNA total foi obtido pelo protocolo de CTAB e 3 µg da amostra foi tratado com DNase I (ThermoFisher) a 36°C por 30 minutos e inativada com EDTA a 65°C por 15 minutos.

Para a síntese de cDNA, foram utilizados 8 µl RNA total (1275 ng) tratados com DNase I, 1 µl (500 µg/mL) do oligonucleotídeos oligo dT, 1 µl de dNTPs 10 mM, 4 µl do tampão da enzima transcriptase reversa 5X concentrado, 2 µl de 0,1M de DTT e 1 µl de M-MLV RT Transcriptase Reversa (200 U/µl) em um volume final de 20 µl, de acordo com as recomendações do protocolo M-MLV *Reverse Transcriptase* da Invitrogen.

Para análise de expressão gênica via RT-qPCR, foram utilizados oligonucleotídeos para AtMBD2 e Actina, como gene endógeno para normalização (Tabela 1). A reação foi realizada no equipamento ABI7500 (*Applied Biosystems*) e utilizando SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) nas condições de amplificação 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O método $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizado para a quantificação da expressão gênica relativa (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

3.3.3 Ensaio de Infecção Viral

O ensaio de infecção foi realizado utilizando *cabbage leaf curl virus* (CabCLV). Plantas de *Arabidopsis* em estágio de seis folhas foram inoculadas com 2 µg de DNA plasmidial dos clones CaLCuVA (pUFV 3367) e CaLCuVB (pUFV 3368), precipitados em micropartículas de tungstênio na presença de espermidina 15 mM, e de CaCl₂ 1M, e lavados com etanol absoluto. As membranas foram colocadas no acelerador de partículas, sendo lançadas contra o meristema foliar por meio de biobalística usando um bombardeador modelo PDS-1000/He com acelerador a 900 psi. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento, a 22 °C onde realizou-se a análise visual de sintomas, assim como extração de DNA total das plantas, a cada 7 dias, durante 35 dias após o bombardeamento, com objetivo de monitorar o progresso da infecção (FLORENTINO *et al.*, 2006). Para o bombardeamento, foram usadas 15 plantas de cada linhagem, sendo elas: plantas Col-0, 4 linhagens super expressando AtMBD2-6HA, 2 linhagens nocautes Salk 069448 e CS 900672.

3.3.4 Extração de DNA e PCR de confirmação da infecção viral

Para confirmar a infecção viral de CabLCV, foram coletadas amostras foliares a cada 7 dias, durante 35 dias após a inoculação. O DNA foi extraído pelo método CTAB e a PCR foi realizada com oligonucleotídeos degenerados específicos para o componente B de begomovirus PBL1v2040 e PCRC1 (ROJAS *et al.*, 1993). O produto de amplificação foi analisado por gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µL/mL.

3.3.5 RT-qPCR para quantificação dos números de cópias virais

O acúmulo do DNA viral em plantas infectadas foi quantificado por qPCR utilizando 100 ng do DNA total de plantas sistemicamente infectadas e adicionado à 10 µL de reação contendo Fast *SYBER* GreenMasterMix (Life Technologies), oligonucleotídeo específico de CabCLV-B (Tabela 1) e as amostras foram amplificadas em um sistema de PCR em tempo real 7500 (Applied Biosystems). As cópias genômicas de CabCLV foram normalizadas contra o gene de referência rRNA18S. As curvas padrão de DNA viral e hospedeiro, foram calculadas com base na análise de regressão dos respectivos valores de Ct e do controle de referência (ZORZATTO *et al.*, 2015)

3.4 Técnicas de Biologia Molecular

As técnicas de biologia molecular como, extração de DNA genômico, DNA plasmidial, extração de RNA, síntese de cDNA e transformação genética, foram realizados de acordo com os protocolos dos fabricantes e do livro de Sambrook (1989).

3.5 Método estatístico

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa R (R Development Core Team 2015), no pacote ExpDes (FERREIRA *et al.*, 2014).

4. RESULTADOS

4.1 Seleção *in silico* de proteínas que possivelmente interagem com AtWWP1.

Uma primeira etapa para avaliar a natureza bioquímica dos corpos nucleares derivados de AtWWP1 seria identificar parceiros que interagem com a proteína. A natureza biológica dos corpos nucleares de AtWWP1 foi previamente investigada por meio de ensaios de colocalização com marcadores de corpos nucleares cuja função biológica tenha sido definida (CALIL, 2013). Nestes experimentos prévios, foi demonstrado que AtWWP1 colocaliza com a proteína CDKC2 (At5G64960), capaz de formar corpos nucleares designados *Speckles* e envolvida no processamento do pré-mRNA e *splicing*, atuando no controle de transcrição e tradução. Sendo assim, a proteína CDKC2 foi selecionada para confirmar a interação *in vivo* e analisar o domínio de AtWWP1 que interage com CDKC2.

Uma segunda propriedade de AtWWP1, previamente caracterizada, é sua atividade antiviral por sequestrar componentes da maquinaria de transporte citoplasmático do DNA de begomovírus em corpos nucleares (CALIL *et al.*, 2018). De fato, AtWWP1 foi integrada em um *hub* imune de interações proteína-proteína derivado de CSN5A para o qual convergem proteínas de defesa e de suscetibilidade a vários patógenos, incluindo begomovírus (Figura 2). Neste interactoma imune, AtWWP1 interage diretamente com NIG, como previamente demonstrado e caracterizado (CALIL *et al.*, 2018), e com AtMBD2. A proteína AtMBD2 é dispersa no nucleoplasma, mas é redirecionada para corpos nucleares quando co-expressa com AtWWP1 em ensaios de expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* (CALIL *et al.*, 2013). Baseado nestas propriedades, a proteína AtMBD2 foi também selecionada para avaliar domínios funcionais de interação proteína-proteína de AtWWP1 e possível participação em infecção por begomovirus.

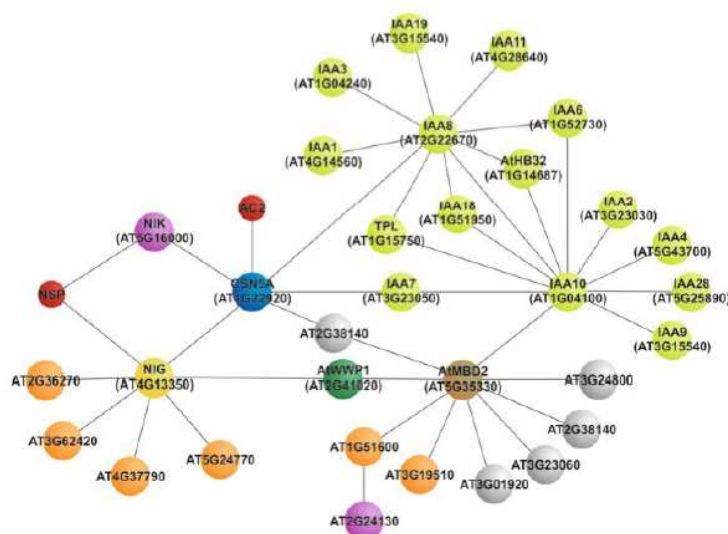


Figura 2: Rede de interações derivadas do Interactoma de *Arabidopsis* envolvendo o interactoma do sistema imune e de transfadores. Em verde escuro AtWWP1; em vermelho, proteínas virais; em marrom e amarelo, alvos diretos de AtWWP1; em azul, hub do sistema imune de plantas; em verde claro, repressores de transcrição da via de auxina; em laranja, fatores de transcrição; em roxo, receptores de quinase (CALIL, I., 2013).

4.2 AtWWP1 interage com CDKC2 via o domínio WW formador de corpo nuclear

Nesta investigação foi inicialmente examinado se AtWWP1 interage com a proteína CDKC2 pelo sistema duplo híbrido em leveduras. Nestes ensaios, a sequência codificadora completa de AtWWP1 fusionada ao domínio de ativação (AD), quando co-expressa com a construção de DNA, contendo a sequência codificadora de CDKC2 fusionada ao domínio de ligação (BD), foi capaz de promover a expressão do gene repórter *HIS3* restaurando prototrofia à histidina em leveduras crescidas nos meios com deficiência de leucina, triptofano e 5 mM 3AT (Figura 3). Estes resultados indicam que CDKC2 interage especificamente com AtWWP1 em leveduras.

Em seguida, foi utilizado uma série de mutantes de AtWWP1, especificamente nos domínios WW, a fim de verificar se a interação CDKC2 e WWP1 era dependente dos dois domínios WW formadores de corpos nucleares. As proteínas mutantes continham substituições gradativas de um a quatro resíduos de triptofano (W) por alanina (A), sendo designados pelas respectivas posições das mutações na sequência de aminoácidos da proteína (Figura 3, Tabela 2, CALIL *et al.*, 2018). As proteínas mutantes não interagiram com CDKC2, pois as co-transformações de leveduras com as proteínas recombinantes AD-WWP1

mutantes e BD-CDKC2 não apresentaram prototrofia à histidina em meio ausente de leucina, triptofano e histidina e suplementado com 3AT (Figura 3).

Embora a interação positiva entre BD-CDKC2 e mutante AA/WW possa indicar que o segundo domínio WW tem um função importante na interação entre AtWWP1 e CDKC2, o resultado do mutante AW/WW contradiz esta interpretação, uma vez que, apesar de conter o segundo domínio WW intacto, não foi capaz de interagir com CDKC2 em leveduras. Estes resultados também podem ser confrontados porque não se certificou a expressão do mutante AW/WW em leveduras, por western blot. Além disso, é possível que o resultado de interação do mutante AA/WW com CDKC2 seja resultado de contaminação no experimento, já que o mutante AA/WW fusionado a AD foi capaz de promover prototrofia à histidina quando co-expresso com o vetor vazio BD.

Coletivamente, os resultados do duplo híbrido indicam que os domínios WW de AtWWP1 que são formadores de corpos nucleares também são essenciais para interação com CDKC2. Sendo CDKC2 também uma proteína formadora de corpos nucleares, estando dispersa no nucleoplasma, seria interessante avaliar se CDKC2 requer AtWWP1 para formar os corpos nucleares ou vice-versa.

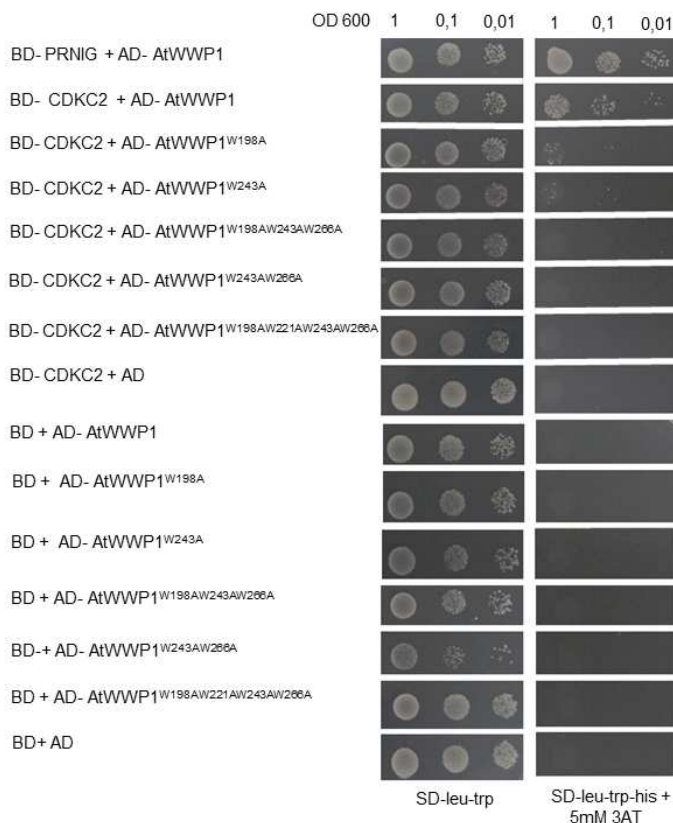


Figura 3: A proteína AtWWP1 interage com CDKC2 via domínio formadora de corpos nucleares. Leveduras co-transformadas com interações indicadas na legenda, foram avaliadas quanto a prototrofia a histidina em meios de cultura com deficiência de leucina, triptofano e histidina, suplementado com 3 AT a 5mM. O controle positivo AD-AtWWP1+ BD-PRNIG e AD-AtWWP1+ BD-CDKC2 apresentou crescimento.

Tabela 2: Domínios de AtWWP1 e interações positivas e negativas com a proteína CDKC2 em leveduras. Mutantes da proteína AtWWP1 e representação esquemática da substituição dos resíduos de triptofano (W) por resíduos de alanina (A) e suas interações com a proteína CDKC2.

Proteína	Mutação	CDKC2
AtWWP1	n/a	+
AtWWP1 ^{W198A}	AW + WW	-
AtWWP1 ^{W243A}	WW + AW	-
AtWWP1 ^{W198AW243AW266A}	AW + AA	-
AtWWP1 ^{W243AW266A}	WW + AA	-
AtWWP1 ^{W198AW221AW243AW266A}	AA + AA	-

4.3 AtWWP1 interage com MBD2 *in vitro* e *in planta* via carboxi- terminal

Também foi avaliado nesta investigação a interação de AtWWP1, *in vitro* e *in vivo*, com AtMBD2, uma proteína que não forma corpos nucleares, mas ao invés é recrutada por AtWWP1 em corpos nucleares (CALIL, 2013). Foi confirmado a interação entre AtWWP1 e AtMBD2 *in vitro* pelo ensaio de duplo híbrido, utilizando as construções de DNA contendo AtWWP1 e AtMBD2 fusionadas aos domínios AD e BD, respectivamente (Figura 4, Tabela 3).

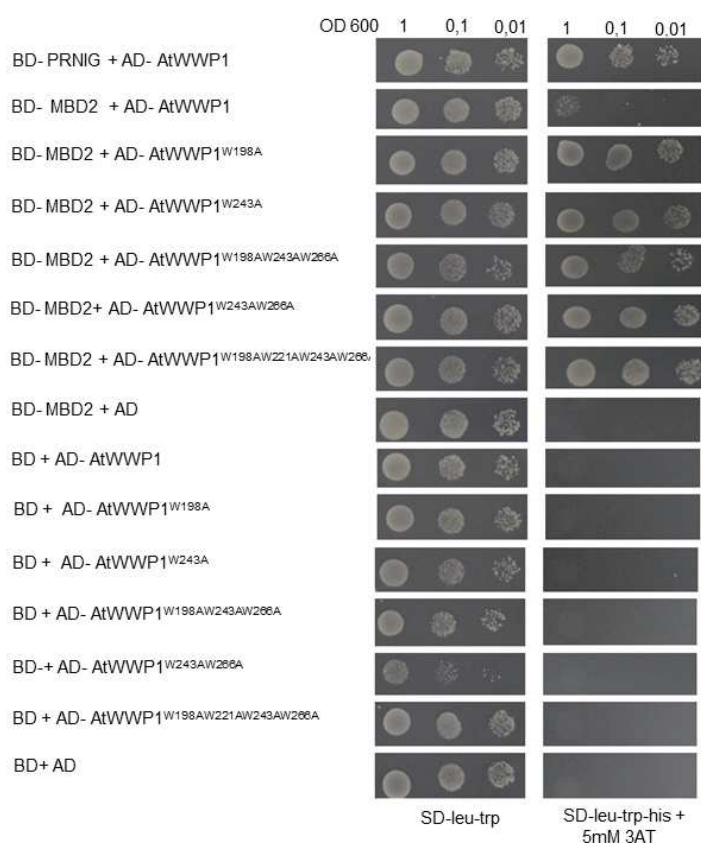


Figura 4: A proteína AtWWP1 interage com MBD2 independente domínio formadora de corpos nucleares. Leveduras co-transformadas com interações indicadas na legenda, foram avaliadas quanto a prototrofia a histidina em meios de cultura com deficiência de leucina, triptofano e histidina, suplementado com 3 AT a 5mM. O controle positivo AD-AtWWP1+ BD-PRNIG e todas as construções citados na legenda apresentaram crescimento.

Tabela 3: Domínios de AtWWP1 e interações positivas e negativas com a proteína AtMBD2 em leveduras. Mutantes da proteína AtWWP1 e representação esquemática da substituição dos resíduos de triptofano (W) por resíduos de alanina (A) e suas interações com a proteína MBD2.

Proteína	Mutação	AtMBD2
AtWWP1	n/a	+
AtWWP1 ^{W198A}	AW + WW	+
AtWWP1 ^{W243A}	WW + AW	+
AtWWP1 ^{W198AW243AW266A}	AW + AA	+
AtWWP1 ^{W243AW266A}	WW + AA	+
AtWWP1 ^{W198AW221AW243AW266A}	AA + AA	+

A interação entre AtWWP1 e AtMBD2 foi examinada *in planta* por meio de ensaios de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC). Folhas de *N. benthamiana* foram co-infiltradas com agrobactéria transformadas com construções de DNA contendo AtWWP1 e AtMBD2 fusionada na porção N-terminal e C-terminal da proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) e analisadas por microscopia confocal (Figura 5). A fluorescência foi reconstituída no núcleo de células co-expressando AtWWP1-nYFP e AtMBD2-cYFP (Figura 5B) e em folhas co-expressando AtWWP1-cYFP e AtMBD2-nYFP (Figura 5C), não importando, portanto, a orientação da etiqueta. Não foi detectado sinal de fluorescência reconstituída nos controles, ou seja, nas combinações das proteínas AtWWP1 e AtMBD2 fusionadas aos vetores vazios SPYNE e SPYCE (Figura 5D, 5E, 5F e 5G). Estes resultados indicam que AtWWP1 e AtMBD2 interagem especificamente no núcleo de células transfetadas.

Interessantemente, em leveduras, as interações entre AtMBD2 e as versões mutadas de AtWWP1 nos domínios WW foram aparentemente mais fortes do que com a proteína AtWWP1 intacta. De fato, a substituição dos quatro resíduos conservados de triptofano por alaninas não aboliu a interação com AtMBD2, uma vez que as leveduras co-transformadas, mesmo na diluição 0,01, apresentaram prototrofia à histidina em meios com deficiência de leucina, triptofano e histidina e suplementados com 5mM 3AT (Figura 4).

Para verificar se a proteína AtMBD2 depende dos domínios WW para interagir com AtWWP1 *in vivo*, as combinações dos mutantes AtWWP1^{AA/AA}- nYFP e AtWWP1^{AA/AA}- cYFP com AtMBD2-cYFP e AtMBD2-nYFP foram co-infiltradas em folhas de *N. benthamiana* e examinadas por microscopia confocal (Figura 6A, 6B). A fluorescência foi reconstituída no núcleo de células transfetadas independentemente da orientação das fusões

de proteínas (N-terminal ou C-terminal de YFP). Não foi detectado fluorescência dos mutantes de AtWWP1 ou AtMBD2 com vetores vazios (Figura 6C, 6D, 6E e 6F). Esse ensaio complementa o resultado da interação *in vitro* entre AtWWP1 e AtMBD2, indicando que a interação ocorre no núcleo, sem, contudo, depender dos dois domínios conservados de triptofano da proteína AtWWP1.

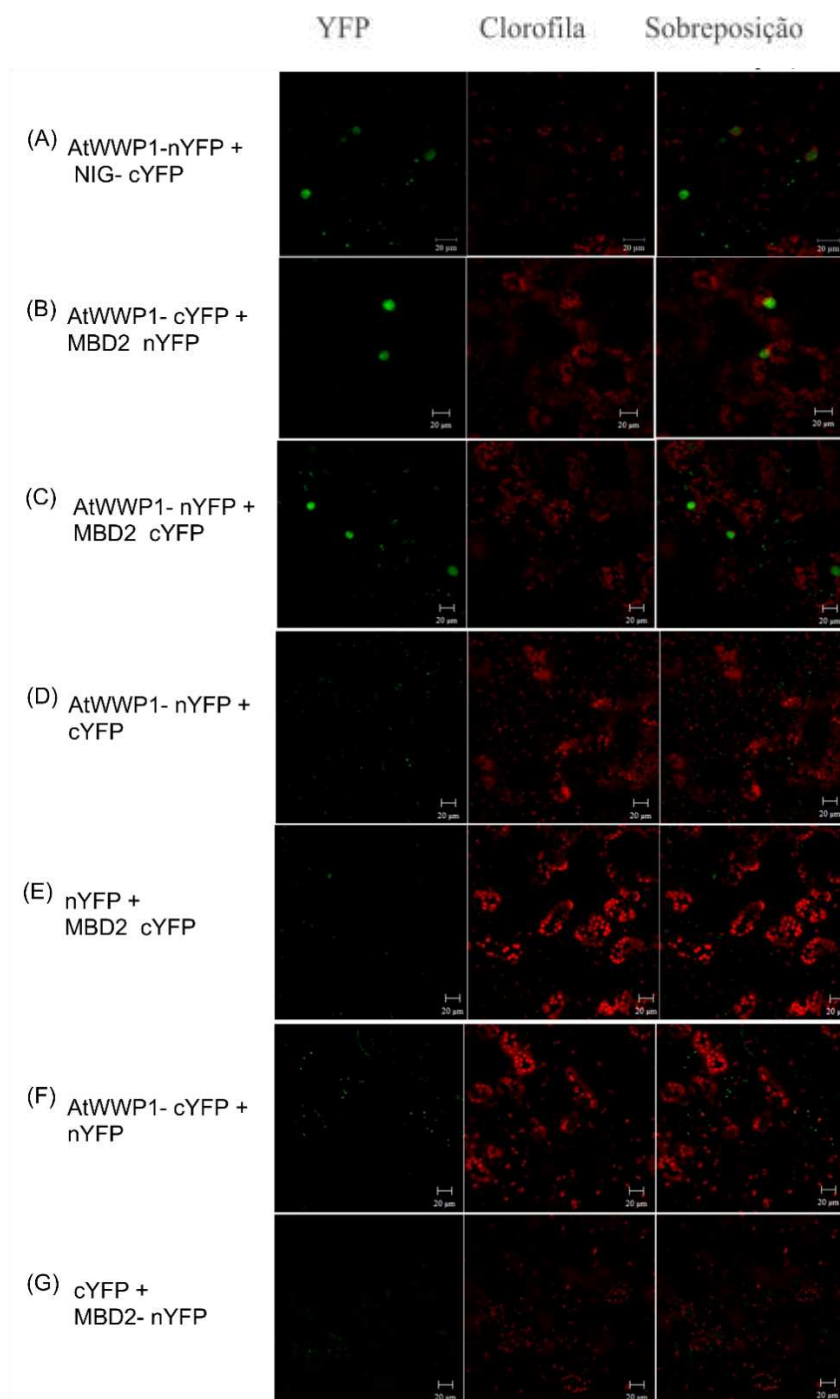


Figura 5: A proteína AtWWP1 interage *in planta* com MBD2. Ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC). A) Controle positivo: AtWWP1-nYFP + NIG-cYFP. B, C) Ensaio de BiFC da proteína inteira de AtWWP1 e MBD2 fusionadas na porção N e C- terminal da proteína amarela fluorescente (YFP). D, E) Proteína AtWWP1 fusionada na porção N e C terminal de YFP com vetor vazio. F, G) Proteína MBD2 fusionada na porção N e C- terminal de YFP com vetor vazio. As construções foram agroinfiltradas em *Nicotiana benthamiana* e imagens obtidas em confocal 72 h após inoculação. Barras = 20µm.

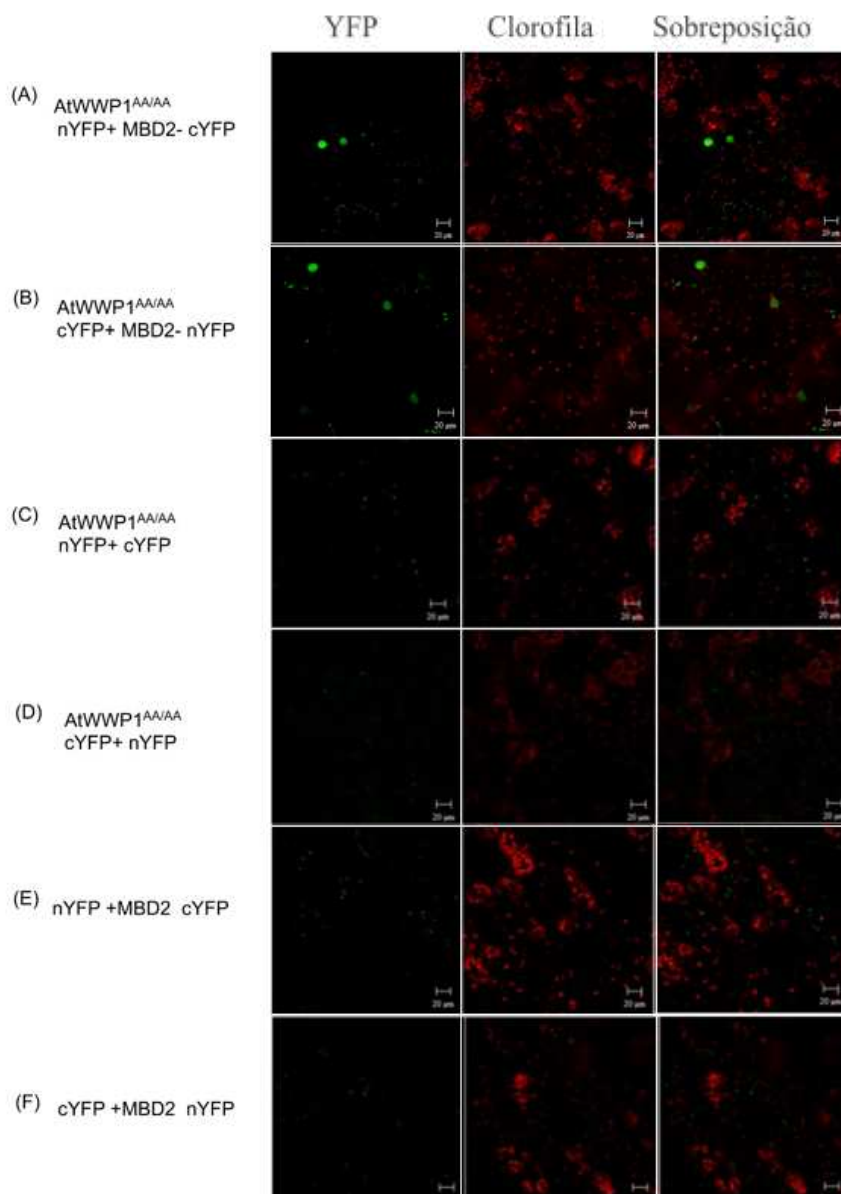


Figura 6: Proteína AtWWP1^{AA/AA} interage com MBD2 *in planta*. A, B) Ensaio de BiFC da proteína AtWWP1^{AA/AA} -nYFP e cYFP com fusionadas na porção N e C- terminal da proteína amarela fluorescente (YFP). C, D) Proteína AtWWP1^{AA/AA} fusionada a porção N e C - terminal de YFP com vetor vazio. E, F) Proteína MBD2 na porção N e C -terminal de YFP com vetor vazio. As construções foram agroinfiltradas em *Nicotiana benthamiana* e imagens obtidas em confocal 72 h após inoculação. Barras = 20µm.

Para delimitar o domínio de interação de AtWWP1 com AtMBD2, três versões truncadas de AtWWP1 foram avaliadas *in vitro* pelo sistema de duplo híbrido (Figura 7). Leveduras co-transformadas com as construções de DNA pAD-AtWWP1¹⁻¹⁹³, pAD-AtWWP1¹⁻²⁷² combinadas com pBD-AtMBD2 não cresceram em meios com ausência de leucina, triptofano, histidina e contendo 3 AT (Figura 7). Já as leveduras co-transformadas com a versão truncada pAD-AtWWP1²⁷²⁻⁴⁶³ e AtMBD2 apresentaram prototrofia à histidina, crescendo no meio de cultura com ausência de leucina, triptofano e histidina e suplementado

com 5mM de 3AT (Figura 7B). O acúmulo das versões truncadas de AtWWP1 fusionadas a AD e de BD-AtMBD2 em leveduras foi confirmado por western blot utilizando anticorpos específicos contra os domínios AD e BD de Gal 4 (Figura 8). Estes controles confirmaram que AtMBD2 interagiu especificamente com o C-terminal de AtWWP1 enquanto as deleções N-terminal acumularam estavelmente em leveduras, mas não interagiram com AtMBD2 que também acumulou estavelmente em leveduras (Figura 8).

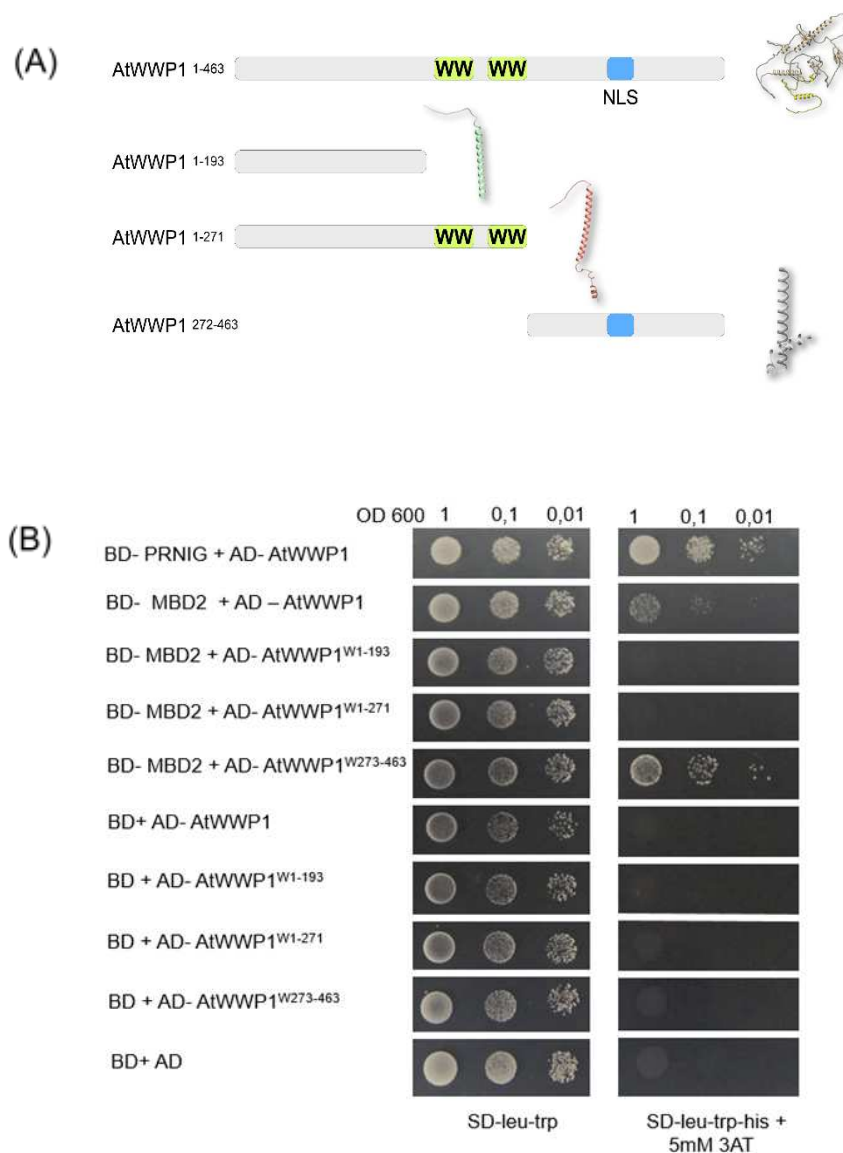


Figura 7: A) Representação das proteínas truncadas. Representação esquemática e predição estrutural tridimensional das proteínas truncadas de AtWWP1. **B) A proteína AtWWP1 interage com MBD2 via carboxi-terminal *in vitro*.** Leveduras co-transformadas com interações da proteína truncada de AtWWP1 como indicadas na legenda, foram avaliadas quanto a prototrofia a histidina em meios de cultura com deficiência de leucina, triptofano e histidina, suplementado com 3 AT a 5mM. O controle positivo AD-AtWWP1+ BD-PRNIG e a AD- AtWWP1^{W273-463} + BD-MBD2 apresentaram crescimento.

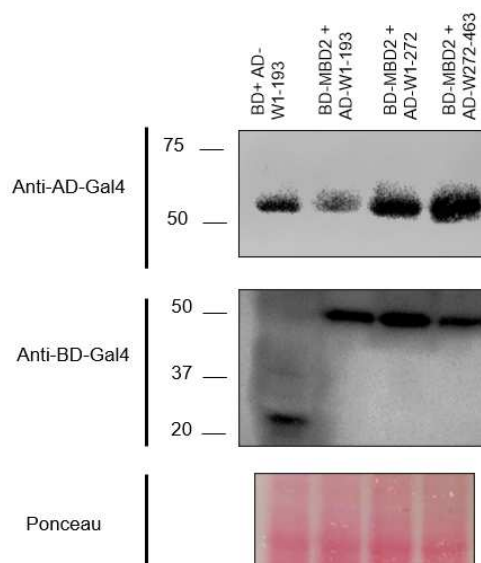


Figura 8: Proteínas truncadas de AtWWP1 e AtMBD2 são expressas estavelmente em levedura. Os extratos proteicos foram obtidos a partir de leveduras co-transformadas com as construções indicadas, as quais foram utilizadas no ensaio de duplo híbrido. As membranas foram sondadas com anticorpos anti-BD GAL4 e anti-AD GAL4, conforme indicado na figura.

A interação entre AtMBD2 e C-terminal de AtWWP1 também foi confirmado *in planta* por BiFC. As versões truncadas da proteína AtWWP1 contendo duas extensões do N-terminal fusionado a nYFP (AtWWP1¹⁻¹⁹³-nYFP e AtWWP1¹⁻²⁷²-nYFP) não foram capazes de reconstituir a fluorescência com AtMBD2-cYFP (Figura 9B, 9D) e com os vetores vazios (Figura 9C, 9E) em células transfetadas, confirmando o resultado do duplo híbrido. Em contraste, a co-expressão da versão truncada AtWWP1²⁷²⁻⁴⁶³-nYFP, que abrange a região de carboxi-terminal da proteína AtWWP1 sem os domínios conservados WW, e AtMBD2- cYFP reconstituiu a fluorescência no núcleo de células de *N. benthamiana* co-transfectadas com as duas construções (Figura 9F), o que não foi visível em células transfetadas com AtWWP1²⁷²⁻⁴⁶³-nYFP e os vetores vazios SPYNE e SPYCE (Figura 9G, 9H). Coletivamente, estes resultados *in vitro* e *in planta* indicam que a proteína AtWWP1 interage com AtMBD2 via porção carboxi-terminal, não sendo dependente dos domínios conservados de triptofano da proteína AtWWP1. Estes resultados estão consistentes com resultados prévios que demonstram que AtMBD2 é dispersa no nucleoplasma (ITO *et al.*, 2003) mas é redirecionada para corpos nucleares quando co-expressa com AtWWP1 (CALIL *et al.*, 2018).

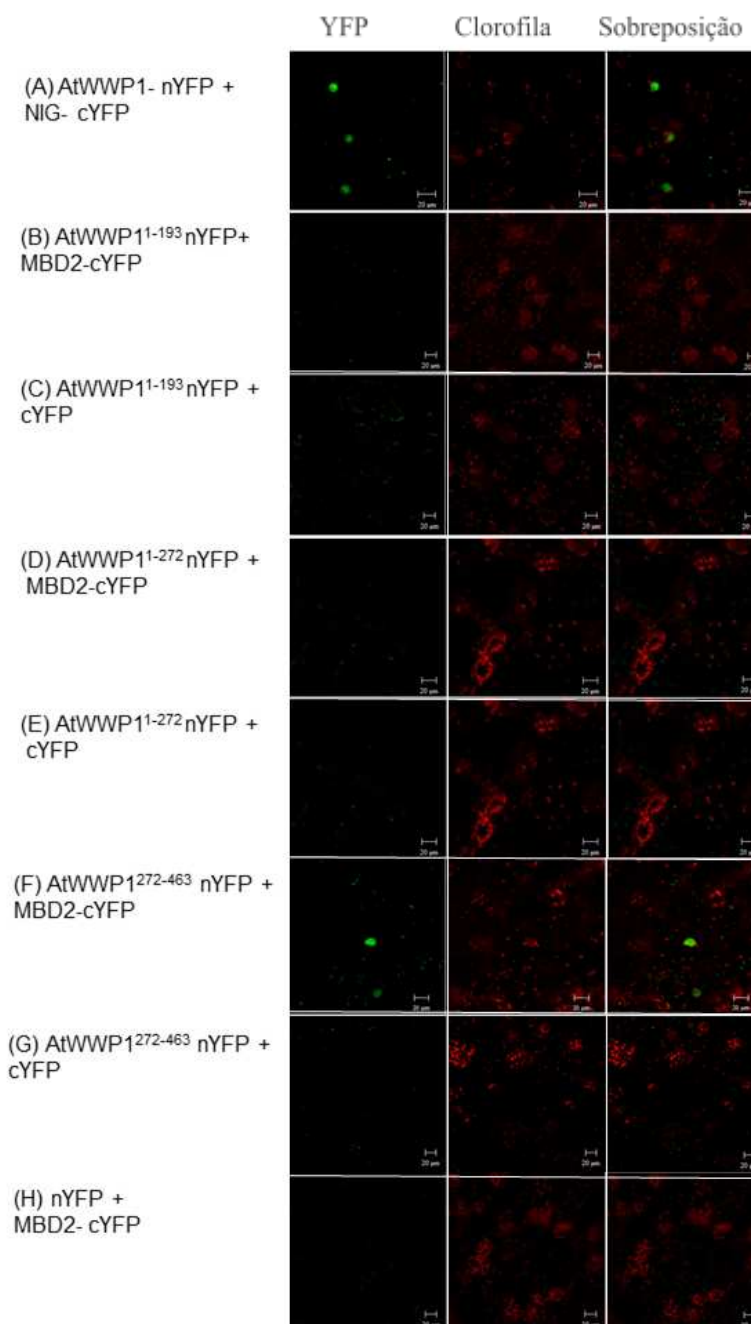


Figura 9: A proteína AtWWP1 interage com MBD2 via carboxi-terminal *in planta*. Ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC). A) Controle positivo: AtWWP1-nYFP + NIG-cYFP. B) Proteína AtWWP1^{W 1-193} fusionada na porção N- terminal da proteína YFP e proteína MBD2 fusionada na porção C-terminal. C) Proteína AtWWP1^{W 1-193} fusionada na porção N- terminal da proteína YFP e proteína MBD2 fusionada com vetor vazio. D) Proteína AtWWP1^{W 1-272} fusionada na porção N- terminal da proteína YFP e proteína MBD2 fusionada na porção C-terminal. E) Proteína AtWWP1^{W 1-272} fusionada na porção N- terminal da proteína YFP e proteína MBD2 fusionada com o vetor vazio. F) Proteína AtWWP1^{W 272-463} fusionada na porção N- terminal da proteína YFP e proteína MBD2 fusionada na porção C-terminal. G) Proteína AtWWP1^{W 272-463} fusionada na porção N- terminal da proteína YFP e proteína MBD2 fusionada com o vetor vazio. H) Vetor vazio e proteína MBD2 fusionada na porção C terminal de YFP. As construções foram agroinfiltradas em *Nicotiana benthamiana* e imagens obtidas em confocal 72 h após inoculação. Barras = 20µm.

4.4 AtMBD2 provavelmente exerce uma atividade pro-viral

AtMBD2 foi inicialmente detectada em um interactoma imune, interagindo diretamente com AtWWP1, uma propriedade também demonstrada para a proteína de suscetibilidade a begomovirus, NIG (Figura 1). Além disso, foi demonstrado que, assim como AtMBD2, NIG é recrutada nos corpos nucleares derivados de AtWWP1, como um mecanismo proposto de defesa da planta contra o vírus (CALIL *et al.*, 2018). Sabe-se ainda que AtWWP1 é induzida em resposta a infecção por begomovirus (CALIL *et al.*, 2018). Estes resultados prévios, analisados conjuntamente, levantaram a hipótese de que AtMBD2 pudesse estar envolvida no ciclo de infecção viral. Para testar esta hipótese foi usada diferentes abordagens.

Inicialmente, foi analisada a expressão de AtMBD2 em resposta a infecção viral (Figura 10). RNA total preparado de plantas infectadas com *cabbage leaf curl virus* (CabLCV) e plantas não infectadas foi utilizado para quantificação da expressão gênica. Assim como AtWWP1 e NIG, a expressão de AtMBD2 foi induzida pela infecção viral (Figura 10). Em seguida, foram preparadas linhagens transgênicas independentes acumulando níveis superiores de mRNA de AtMBD2 comparado com Col-0 (Figura 11C). A qualidade do RNA total utilizado na síntese do cDNA foi avaliada por eletroforese (Figura 11A) e a integridade do cDNA por meio de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para MBD2 e actina (Figura 11 B). Finalmente, foram obtidas do *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) linhagens mutagenizadas (Salk 069448 e CS900672) por inserção de TDNA no *locus* AtMBD2 (Figura 12A) que foram caracterizadas quanto à expressão do AtMBD2 (Figura 12C) para acessar diretamente uma possível função de AtMBD2 no processo de infecção viral.

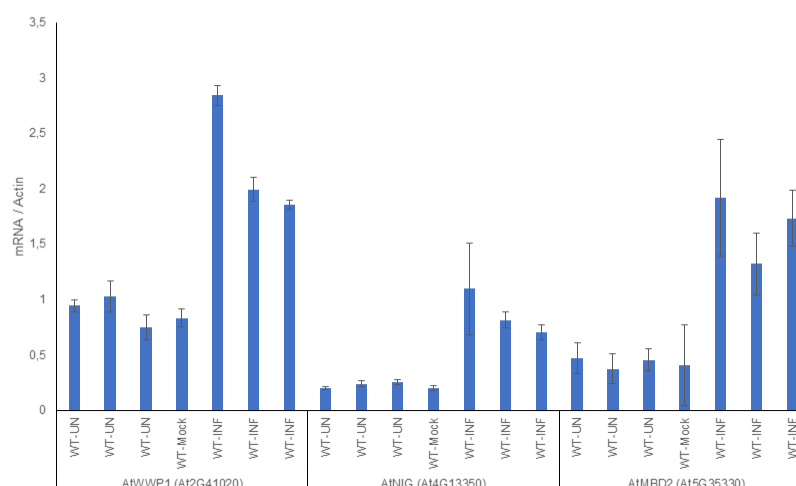


Figura 10: Acúmulo de AtWWP1, AtNIG e AtMBD2 em linhagem selvagem Col-0 pós infecção. Linhagens selvagens de *Arabidopsis thaliana* Col-0, foram expostas com RNA total de plantas infectadas com CabCLV. O nível de expressão dos genes AtWWP1, AtNIG e AtMBD2 foram induzidos após infecção. O gene actina foi utilizado como controle endógeno e os níveis do transcrito foram determinados pelo método de $2^{-\Delta Ct}$. As barras representam desvio padrão da média com base em 3 replicatas distintas para cada tratamento.

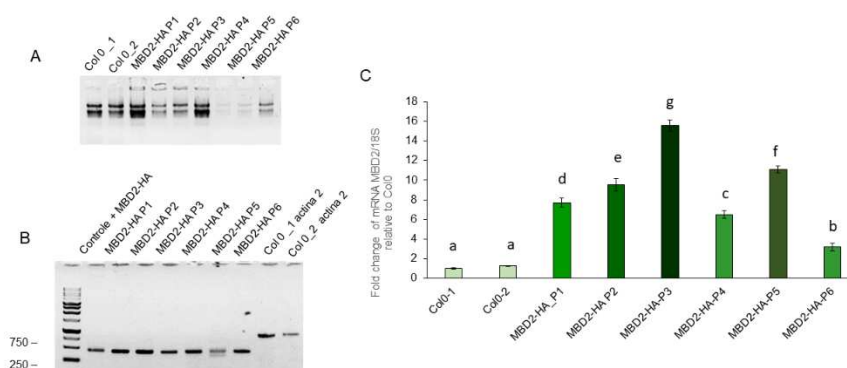


Figura 11: Acúmulo de AtMBD2 nas novas linhagens transgênicas superexpressando MBD2 (A) RNA total extraído de plantas transformadas com o transgene MBD2-HA (B) PCR para verificação da qualidade do cDNA (C) RT-qPCR para análise da expressão gênica a partir do cDNA mostrado em (B). O gene 18SrRNA foi utilizado como controle endógeno e os níveis do transcrito foram determinados pelo método de $2^{-\Delta Ct}$. As barras representam desvio padrão da média com base em 3 replicatas distintas para cada linhagem transgênica. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0.05$).

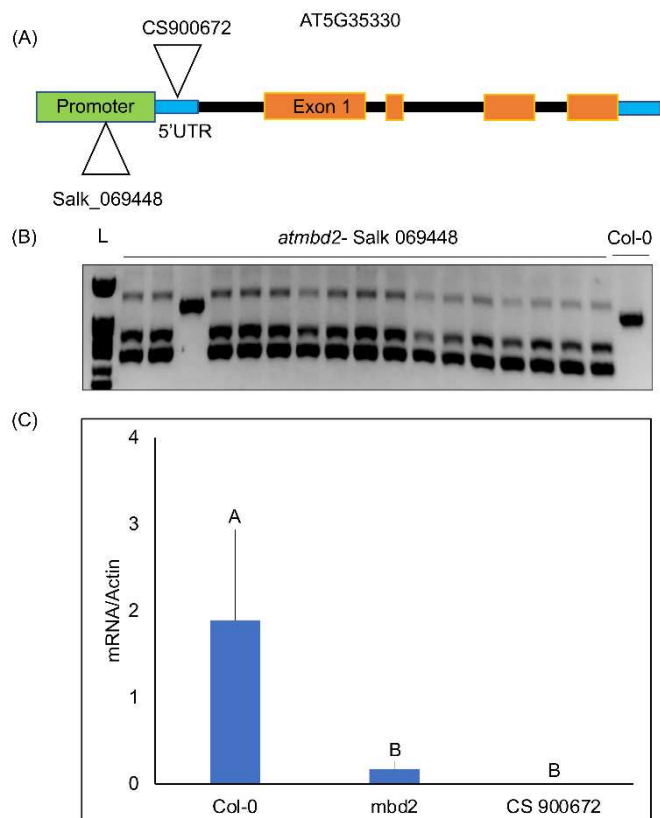


Figura 12: Acúmulo de AtMBD2 nas linhagens nocautes. (A) ABRC linhagens mutagenizadas (Salk 069448 e CS900672) por inserção de TDNA no locus AtMBD2. B) PCR convencional das plantas nocautes de *atmbd2* Salk 069448 para confirmar homozigose. (C) Expressão do gene AtMBD2 em Col-0, Salk 069448 e CS900672. O gene actina foi utilizado como controle endógeno e os níveis do transcrito foram determinados pelo método de $2^{-\Delta Ct}$. As barras representam desvio padrão da média com base em 3 replicatas distintas para cada linhagem nocaute. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Para investigar se AtMBD2 está envolvida no processo de infecção viral, plantas de *Arabidopsis* expressando diferentes níveis de mRNA de AtMBD2 (L2, L3 e L4), linhagens nocautes (*atmbd2* e CS900672) e planta selvagem (Col-0) foram inoculadas com clones infecciosos de CabLCV DNA-A e DNA-B (Figura 13). O processo de infecção foi acompanhado por PCR do DNA viral em diferentes dias após a inoculação e aparecimento dos sintomas causados por begomovirus, como encarquilhamento das folhas, clorose e atrofia, sendo que o processo de monitoramento foi feito por 35 dias. Amostragens representativas dos sintomas estão mostrados na Figura 13 aos 14 dias após inoculação (DPI). A Figura 14 mostra o resultado de sintomas aos 28 dpi. Aos 14 dpi, sintomas atenuados foram observados nas linhagens superexpressando AtMBD2. Aos 28 dpi os sintomas observados foram intensificados em todas as linhagens analisadas, não sendo observado uma maior suscetibilidade entre linhagens superexpressando, nocautes e selvagem.

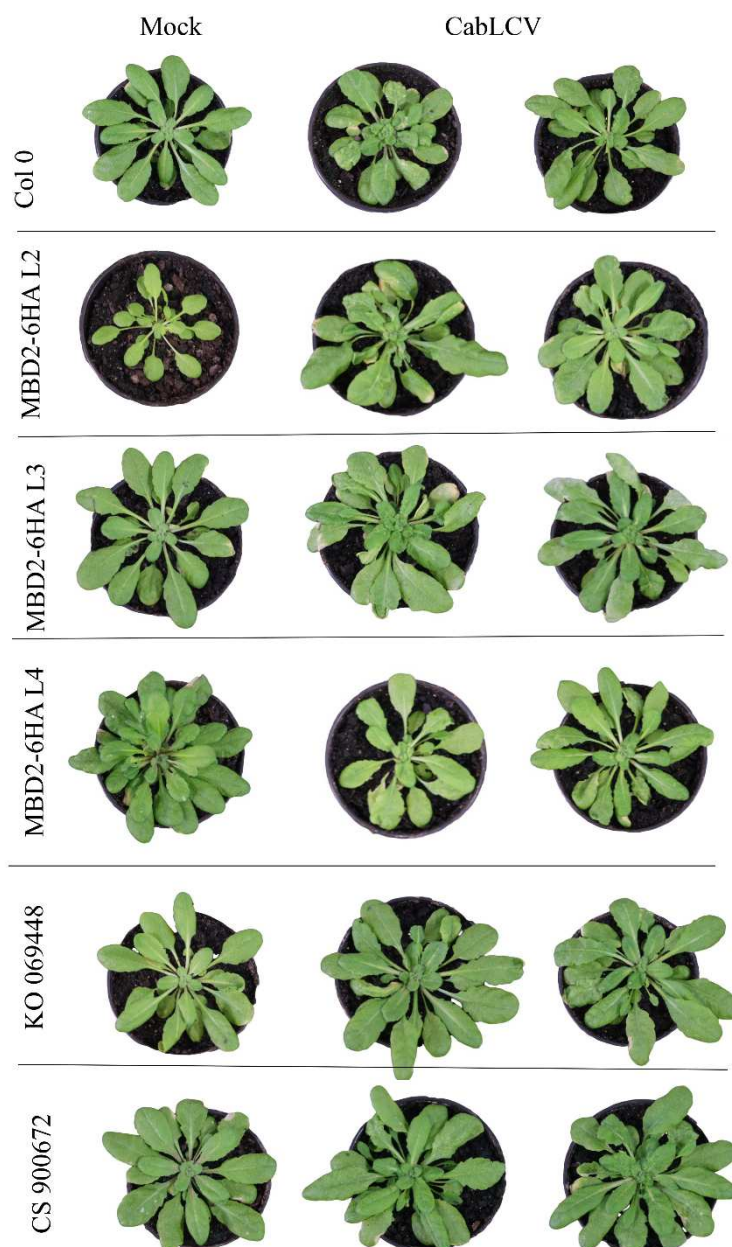


Figura 13: Sintomas associados à infecção por CabCLV nas linhagens WT, nocautes e AtMBD2 superexpressando com 14 dpi. As plantas foram infectadas com CabCLV por biobalística, e o curso da infecção foi monitorado por amplificação do DNA viral por PCR. São mostradas imagens representativas de cada linhagem.

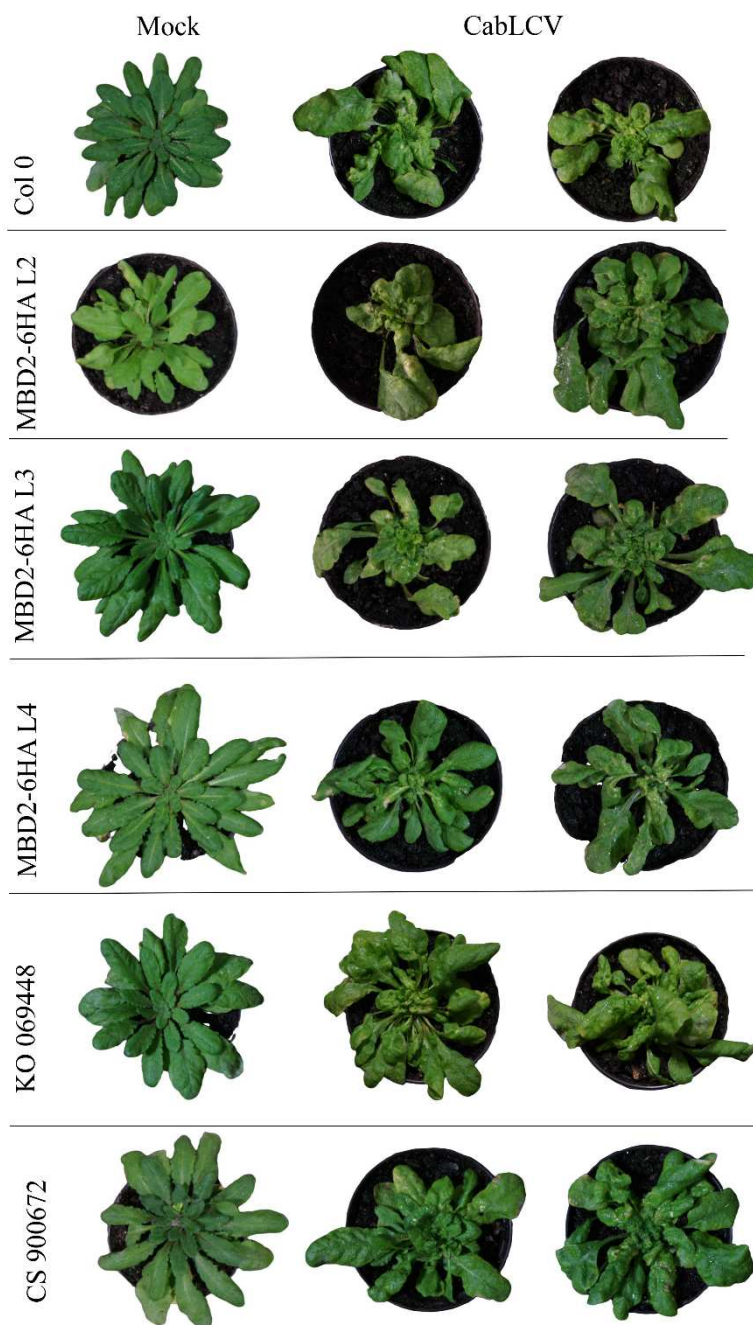


Figura 14: Sintomas associados à infecção por CabCLV nas linhagens WT, nocautes e AtMBD2 superexpressando com 28 dpi. As plantas foram infectadas com CabCLV por biobalística, e o curso da infecção foi monitorado por amplificação do DNA viral por PCR. São mostradas imagens representativas de cada linhagem.

Entretanto o número de cópias do DNA viral via RT-qPCR em linhagens superexpressando AtMBD2 foi significativamente superior do que a linhagem controle, Col-0, observando uma correlação direta entre acúmulo de DNA viral e expressão do transgene, sugerindo que AtMBD2 exibe uma função pro-viral (Figura 15). Em contraste, na linhagem nocaute *mbd2*, o DNA viral acumulou em níveis significativamente inferiores do que em Col-0. Porém, esta tendência não foi mantida para a linhagem nocaute CS900672, cujo teor de DNA viral foi similar a Col-0. Estes resultados sugerem que o fenótipo de tolerância aumentada de *mbd2* pode ser resultado de inserção do T-DNA em outros loci e não da inativação do gene AtMBD2. Estudos de complementação de função das linhagens nocaute *mbd2* poderão certificar se AtMBD2 exerce atividade pro-viral.

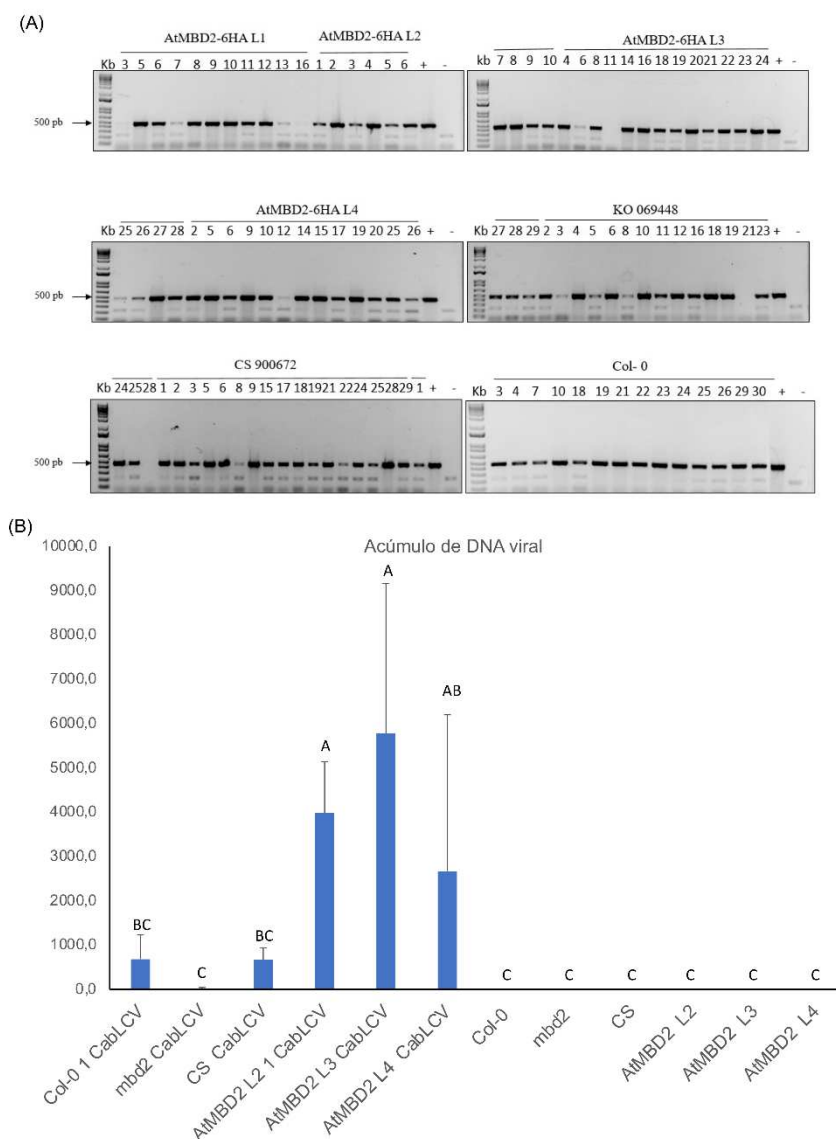


Figura 15: Diagnóstico da infecção viral e acúmulo de DNA viral em plantas infectadas com CabCLV. A) Linhagens transgênicas, nocautes e WT tiveram seus DNA extraídos e a confirmação de infecção foi feita utilizando-se oligonucleotídeos degenerados. + Controle positivo; - Controle negativo. (B) Número de cópias virais de linhagens de *Arabidopsis thaliana* selvagem Col-0, nocaute Salk 069448, CS900672 e superexpressando AtMBD2 infectadas com o begomovírus *Cabbage leaf curl virus* (CabCLV). A quantificação absoluta de unidades genômicas de CabCLV foi estimada em plantas infectadas aos 14 dias pós-inoculação (dpi). As barras representam desvio padrão da média com base em 2 pools para cada linhagem. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0.05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 O domínio WW formador de corpo nuclear de WWP1 interage com CDKC2, cujos corpos nucleares são transcricionalmente ativos

Proteínas com domínio WW são mais bem caracterizadas em mamíferos, estando envolvidas em uma série de processos celulares incluindo transcrição e processamento do RNA, transporte e estabilidade de proteínas, controle de apoptose, ubiquitinação e em redes de sinalização celular (SALAH *et al.*, 2012). De uma maneira geral, as funções destas proteínas estão associadas ao domínio WW que são módulos que intermedeiam a associação entre proteínas por meio de motivos ricos em prolina (PRM) e sítios fosforilados de serina/treonina-prolinas. Em plantas, foi demonstrado que a proteína AtWWP1 forma corpos nucleares e exibe atividade antiviral contra begomovirus; linhagens superexpressando AtWWP1 são mais resistentes e linhagens nocautes mais suscetíveis ao vírus. Acredita-se que o mecanismo de defesa da planta baseado em AtWWP1 esteja relacionado a sua atividade formadora de corpos nucleares, uma vez que AtWWP1 sequestra NIG, uma proteína facilitadora da infecção viral, nos corpos nucleares prevenindo a função proviral de NIG que está associada à localização no citoplasma (CALIL *et al.*, 2018). Entretanto, a função celular dos corpos nucleares derivados de WWP1 não é conhecida.

Para entender a dinâmica da formação dos corpos nucleares, proteínas formadoras de *speckles* e que estão relacionados a *splicing* e formação de corpos de cajal, foram previamente utilizada como marcadores de corpos nucleares tendo sido observado a co-localização dos corpos nucleares derivados de AtWWP1 com aqueles derivados da a proteína CDKC2 (CALIL, 2013), que no processo transcricional, regula a fosforilação e desfosforilação da porção maior da região carboxi-terminal (CTD) da RNA polimerase II por meio de interação com uma ciclinaT (CUI *et al.*, 2007; ZHENG, 2022). Nesta investigação, foi inicialmente delimitado em AtWWP1 o domínio de interação com CDKC2. Foi demonstrado que CDKC2 interage com AtWWP1 em leveduras via o domínio WW. Considerando que o domínio WW é responsável pela montagem de redes de multiproteínas envolvidas em processos celulares básicos, a interação AtWWP1-CDKC2 em corpos nucleares compartilhados deve indicar que as duas proteínas estão envolvidas em funções comuns. CDKC2 é uma proteína importante da família das quinases, formadora de corpos nucleares que exerce uma função de organizar a maquinaria de transcrição como fatores de *splicing* (REDDY *et al.*, 2012), regulação da via de fosforilação dos componentes do spliceossomo e proteínas com componentes SR (serina e arginina) (CORKERY *et al.*, 2015). Seria interessante examinar se os corpos nucleares de AtWWP1 são dependentes da formação dos corpos nucleares derivados de CDKC2 e

vice-versa. A existências de linhagens nocautes de AtWWP1 e o silenciamento de CDKC2 podem resolver esta questão.

5.2 A interação de AtWWP1 com MBD2 pode estar relacionada a sua atividade antiviral

A proteína AtMBD2 foi identificada numa rede de interactoma de *Arabidopsis thaliana* junto a proteína NIG, como possível parceira da proteína AtWWP1 (<http://signal.salk.edu/interactome/AI1.html>). MBD2 é uma proteína de nucleoplasma, não formadora de corpos nucleares e possui o domínio MBD capaz de interagir em ilhas CpG metiladas (ZEMACH & GRAFI, 2007).

Calil (2013; 2017) confirmou a interação da proteína inteira e versões truncadas de AtWWP1 com MBD2 *in vitro* pelo método de duplo híbrido. Essa interação também foi confirmada *in vivo* por co-imunoprecipitação. Perda de função na formação de corpos nucleares pelo mutante AA/AA de AtWWP1 (CALIL *et al.*, 2018), foi demonstrado nesta investigação que a interação *in vitro*, por duplo híbrido em leveduras, e *in vivo*, por BiFC de AtWWP1 com a proteína AtMBD2 não depende dos domínios conservados de triptofano, mas sim da porção conservada da região C-terminal da proteína AtWWP1. Esta interpretação foi derivada de ensaios com mutantes no domínio WW e versões truncadas de AtWWP1. Deleção da região C-terminal de WWP1, mas não mutações no domínio WW, preveniram a interação de AtWWP1 com AtMBD2. Precedentes na literatura indicam preferência de ligação de proteínas MBD2 com C-terminal de proteínas parceiras. Por exemplo, Zemach *et al.* (2005), mostraram que a interação de proteínas AtMBDs de *Arabidopsis* com a *Deficient in DNA methylation 1* (DDM1), uma proteína de DNA helicase dependente de ATP, ocorre via C-terminal da proteína DDM1, não indicando sua interação com a porção N-terminal por ensaio suspenso de GST. Assim também, a proteína a proteína FBP11, um fator de *splicing* em mamíferos, pertencente ao grupo II de domínios WW, interage com o C-terminal, rico em prolinas, de *methyl-CpG-binding protein 2* (MeCP2) de humanos, que também se associa a regiões de cromatina pelo N-terminal que reconhece as regiões CpGs (BUSHDORF & STRÄTLING, 2004). Versões truncadas na região C-terminal de MeCP2 que não são capazes de interagir com FBP11 contendo WW, prevalecem em doenças neurais como síndrome de Rett, demonstrando a relevância de interações com MBD2 pelo domínio C-terminal de MeCP2.

A família MBD é uma importante classe de proteína cromossômica que associa a proteínas que desempenham um papel de repressão transcricional e formação de heterocromatina (FATEMI & WADE, 2006). Tanto em plantas e em animais, proteínas com

domínio MBD são capazes de reconhecer sítios metilados em regiões CpG do DNA, mas essa interação não é sítio específica, podendo exercer outras funções (CLOUAIRE & STANCHEVA, 2008; COELHO *et al.*, 2022). A função dessa proteína ainda é desconhecida, mas estudos em mamífero, reportaram que MBD2 é uma enzima demetilase (dMTase) capaz de desmetilar o DNA *in vitro* em experimento utilizando cDNAs expressos em célula humanas embrionárias de rins (HEK-293) (BHATTACHARYA *et al.*, 1999). Essas proteínas formam complexos com regiões de heterocromatina como a enzima desacetilase HDAC agindo como uma função de DNA demetilase removendo resíduos de metil e ativando a transcrição gênica (WANG *et al.*, 2013).

Nesta investigação, foram fornecidas linhas de evidência que indicam que a proteína AtMBD2 exibe uma função proviral em infecções de begomovírus. De fato, a proteína AtMBD2 está integrada em um *hub* imune já caracterizado no qual interações entre proteínas virais, como NSP e TrAP, proteínas antivirais, como NIK1 e AtWWP1, e proteínas pro-virais como NIG convergem para a proteína CSN5A, funcionalmente ativa contra patógenos divergentes (LOZANO-DURAN *et al.*, 2011, MUKHTAR *et al.*, 2011, CALIL, 2017). Consistente com esta observação, foi demonstrado nesta investigação que AtMBD2 é induzida por begomovírus, similarmente à AtWWP1 e NIG. Além disso, como NIG, AtMBD2 interage com AtWWP1 *in vivo* e *in vitro*. Finalmente, foi demonstrado que as linhagens superexpressando MBD2 apresentaram um maior acúmulo de carga viral comparado às linhagens nocautes e WT, indicando que AtMBD2 contribui positivamente para a infecção por begomovírus. Consistente com esta interpretação, inativação de MBD2 no nocaute *atmbd2* aumentou a resistência a begomovírus. Entretanto, estes resultados foram confrontados uma vez que um segundo alelo nulo de *atmbd2* (CS) não interferiu com a infecção viral, já que acumulou teor de DNA viral similar à linhagem Col-0 (controle). Estudos prévios demonstraram que mutantes diferentes por inserção de T-DNA em diferentes posições no mesmo locus podem apresentar variações fenotípicas relacionadas a vários caracteres (VALENTINE *et al.*, 2012). Estes resultados conflitantes entre *atmbd2-1* e CS somente poderão ser reconciliados com ensaios de complementação do alelo nulo *atmbd2-1* e caracterização molecular do mutante CS.

Como mecanismo de defesa da planta após infecção por vírus de DNA, há uma produção de pequenos RNAs de interferência (siRNAs) que potencializam a metilação do DNA e silenciamento transcricional (CHELLAPPAN *et al.*, 2004). Ao infectar a planta, o vDNA acumula no núcleo formando mini cromossomos virais capazes de serem transcritos

pela RNA polimerase II do hospedeiro, gerando modificações pós transcricionais (POOGGIN, 2013).

Uma vez que AtWWP1 tem a capacidade de modificar a localização subcelular da proteína proviral NIG, tem sido proposto que o mecanismo de defesa da planta mediado por AtWWP1 esteja relacionado a sua capacidade de sequestrar NIG em corpos nucleares (CARVALHO *et al.*, 2008). De fato, NIG se localiza no citoplasma, concentrando em volta do envelope nuclear, uma localização estratégica para facilitar a liberação do complexo NSP-vDNA do núcleo para o citoplasma. O processo de infecção viral induz o acúmulo de AtWWP1 que redireciona NIG para os corpos nucleares, impedindo sua interação com NSP e com o complexo NSP-vDNA e prevenindo assim o transporte nucleocitoplasmático de vDNA (CALIL *et al.*, 2018). A capacidade de AtWWP1 de interagir com AtMBD2, redirecionar a proteína para corpos nucleares de forma semelhante a NIG e a demonstração de que AtMBD2 pode contribuir positivamente para a infecção viral invoca modelo de defesa similar, reforçando o argumento de que a formação de corpos nucleares derivados de AtWWP1 constituem um mecanismo de defesa da planta contra begomovírus. Consistente com esta observação, previamente foi demonstrado que vDNA age em contra ataques a este mecanismo de defesa, interage com AtWWP1 e rompe os corpos nucleares de defesa (CALIL *et al.*, 2018). A confirmação de que inativação do gene AtWWP1 confere resistência a begomovírus poderá substanciar este argumento.

6 REFERÊNCIAS

ALLEN, J. R., WILKINSON, E. G., STRADER, L. C. (2022). Creativity comes from interactions: modules of protein interactions in plants. *The FEBS Journal*, 289(6), 1492-1514.

BECKER, A., ALLMANN, L., HOFSTÄTTER, M., CASÀ, V., WEBER, P., LEHMKUHL, A., HERCE, D. H., CARDOSO, M. C. (2013). Direct homo-and hetero-interactions of MeCP2 and MBD2. *PLoS One*, 8(1), e53730.

BEDFORD, M. T., CHAN, D. C., LEDER, P. (1997). FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *The EMBO journal*, 16(9), 2376-2383.

BEDFORD, M. T., SARBASSOVA, D., XU, J., LEDER, P., YAFFE, M. B. (2000). A novel pro-Arg motif recognized by WW domains. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10359-10369.

BELMONT, A. S. (2022). Nuclear compartments: an incomplete primer to nuclear compartments, bodies, and genome organization relative to nuclear architecture. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(7), a041268.

BHATTACHARYA, S. K., RAMCHANDANI, S., CERVONI, N., SZYF, M. (1999). A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, 397(6720), 579-583.

BUSCHDORF, J. P., STRÄTLING, W. H. (2004). A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *Journal of molecular medicine*, 82(2), 135-143.

CALIL, I. P., QUADROS, I. P., ARAÚJO, T. C., DUARTE, C. E., GOUVEIA-MAGESTE, B. C., SILVA, J. C. F., BRUSTOLINI, O. J. B., TEIXEIRA, R. M., OLIVEIRA, C. N., MILAGRES R. W. M. M., MARTINS, G. S., CHORY, J., REIS, P. A. B., MACHADO, J. P. B., FONTES, E. P. (2018). A WW domain-containing protein forms immune nuclear bodies against begomoviruses. *Molecular plant*, 11(12), 1449-1465.

CALIL, I. P. Caracterização funcional da proteína AtWWP1, componente de uma interconexão de fatores da interação geminivirus-hospedeiro envolvido na formação de corpos subnucleares. 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Programa de Pós graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

CALIL, I. P. Characterization of transcriptionally active AtWWP1 nuclear bodies that confer partial immunity against begomoviruses. 2017. 162f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Programa de Pós graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

CARVALHO, C. M., FONTENELLE, M. R., FLORENTINO, L. H., SANTOS, A. A., ZERBINI, F. M., FONTES, E. P. (2008). A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *The Plant Journal*, 55(5), 869-880.

CARVALHO, C. M., SANTOS, A. A., PIRES, S. R., ROCHA, C. S., SARAIVA, D. I., MACHADO, J. P. B., MATOS, E. L., FIETTO, L. G., FONTES, E. B. P. (2008). Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS pathogens*, 4(12), e1000247.

CHELLAPPAN, P., VANITHARANI, R., FAUQUET, C. M. (2004). Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of virology*, 78(14), 7465-7477.

CHEN, H. I., SUDOL, M. (1995). The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7819-7823.

CLOUAIRE, T., STANCHEVA, I. (2008). Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(10), 1509-1522.

COELHO, F. S., SANGI, S., MORAES, J. L., DA SILVA SANTOS, W., GAMOSA, E. A., FERNANDES, K. V. S., GRATIVOL, C. (2022). Methyl-CpG binding proteins (MBD) family evolution and conservation in plants. *Gene*, 824, 146404.

CORKERY, D. P., HOLLY, A. C., LAHSAEE, S., DELLAIRE, G. (2015). Connecting the speckles: Splicing kinases and their role in tumorigenesis and treatment response. *Nucleus*, 6(4), 279-288.

CUI, X., FAN, B., SCHOLZ, J., CHEN, Z. (2007). Roles of Arabidopsis cyclin-dependent kinase C complexes in cauliflower mosaic virus infection, plant growth, and development. *The Plant Cell*, 19(4), 1388-1402.

FATEMI, M., WADE, P. A. (2006). MBD family proteins: reading the epigenetic code. *Journal of cell science*, 119(15), 3033-3037.

FAUQUET, C. M., BRIDDON, R. W., BROWN, J. K., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, M., ZHOU, X. (2008). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of virology*, 153(4), 783-821.

FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L. A. (2005). *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.

FERREIRA, E. B., CAVALCANTI, P. P., NOGUEIRA, D. A. (2014) ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. *Applications of Mathematics*, 5:2952–2958

FERREIRA, M. A., TEIXEIRA, R. M., FONTES, E. P. (2021). Geminivirus–Host Interactions: Action and Reaction in Receptor-Mediated Antiviral Immunity. *Viruses*, 13(5), 840.

FLORENTINO, L. H., SANTOS, A. A., FONTENELLE, M. R., PINHEIRO, G. L., ZERBINI, F. M., BARACAT-PEREIRA, M. C., FONTES, E. P. (2006). A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *Journal of virology*, 80(13), 6648-6656.

SILVA, F. D. A., RAIMUNDO, G. S., FONTES, E. P. (2022). Begomovirus–host protein-protein interactions in intracellular virus movement. In *Geminivirus: Detection, Diagnosis and Management* (pp. 347-356). Academic Press.

GOUVEIA-MAGESTE, B.C., MARTINS, L.G.C., DAL-BIANCO, M., MACHADO, J.P.B., SILVA, J.C.F., KIM, A.Y., YAZAKI, J. SANTOS, A.A., ECKER, J.R., FONTES, E.P.B. (2021) A plant-specific syntaxin-6 protein contributes to the intracytoplasmic route for the begomovirus CabLCV. *Plant Physiology*, 187(1), 158-173.

GÜNTHER, K., RUST, M., LEERS, J., BOETTGER, T., SCHARFE, M., JAREK, M., BARTKUHN, M., RENKAWITZ, R. (2013). Differential roles for MBD2 and MBD3 at methylated CpG islands, active promoters and binding to exon sequences. *Nucleic acids research*, 41(5), 3010-3021.

GUTIERREZ, C. (1999). Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 56(3), 313-329.

HE, X. J., CHEN, T., ZHU, J. K. (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research*. 21(3):442-65

HENDRICH, B., BIRD, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl CpG-binding proteins. *Genetics Research*, 72(1), 59-72.

INGHAM, R. J., COLWILL, K., HOWARD, C., DETTWILER, S., LIM, C. S., YU, J., HERSI, K., RAAIJMAKERS, J., GISH, G., MBAMALU, G., TAYLOR, L., YEUNG, B., VASSILOVSKI, G., AMIN, M., CHEN F., MATSKOVA, L., WINBERG, G., ERNBERG, I., LINDING, R., O'DONNELL, P., KELLER, W., STAROSTINE, A., METALNIKOV, P., STARK, C., PAWSON, T. (2005). WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Molecular and cellular biology*, 25 (16), 7092-7106.

ISHIBASHI, T., SO, K., CUPPLES, C. G., AUSIÓ, J. (2008). MBD4-mediated glycosylase activity on a chromatin template is enhanced by acetylation. *Molecular and cellular biology*, 28(15), 4734-4744.

ITO, M., KOIKE, A., KOIZUMI, N., SANO, H. (2003). Methylated DNA-binding proteins from Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(4), 1747-1754.

KANG, C. H., FENG, Y., VIKRAM, M., JEONG, I. S., LEE, J. R., BAHK, J. D., YUN, D. J., LEE, S. Y., KOIWA, H. (2009) *Arabidopsis thaliana* PRP40s are RNA polymerase II C-terminal domain-associating proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1;484(1):30-8.

KAO, H.Y., SILICIANO, P. G. (1996) Identification of Prp40, a novel essential yeast splicing factor associated with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Molecular and Cellular Biology*.16(3):960-7

KITSIOS, G., ALEXIOU, K. G., BUSH, M., SHAW, P. DOONAN, J. H. (2008). A cyclin-dependent protein kinase, CDKC2, colocalizes with and modulates the distribution of spliceosomal components in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 54(2), 220-235.

KITSIOS, G., DOONAN, J. H. (2011). Cyclin-dependent protein kinases and stress responses in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 204-209.

LAGET, S., JOULIE, M., LE MASSON, F., SASAI, N., CHRISTIANS, E., PRADHAN, S., ROBERTS, R. J., DEFOSSEZ, P. A. (2010). The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA. *PloS one*, 5(8), 11982.

LAW, J., JACOBSEN, S. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*. 11, 204–220 (2010).

LIANG, J., LI, X., WEN, Y., WU, X., WANG, H., LI, D., SONG, F. (2022). Genome-Wide Characterization of the Methyl CpG Binding Domain-Containing Proteins in Watermelon and Functional Analysis of Their Roles in Disease Resistance Through Ectopic Overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 13.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. (2001) "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method." *Methods* 25.4: 402-408.

LOZANO-DURAN, R., BEJARANO, E. R. (2011). Mutation in *Arabidopsis* CSN5A partially complements the lack of Beet curly top virus pathogenicity factor L2. *J. Plant Pathol. Microbiol*, 2(3).

LU, P. J., ZHOU, X. Z., SHEN, M., LU, K. P. (1999). Function of WW domains as phosphoserine-or phosphothreonine-binding modules. *Science*, 283(5406), 1325-1328.

MACIAS, M. J., HYVÖNEN, M., BARALDI, E., SCHULTZ, J., SUDOL, M., SARASTE, M., OSCHKINAT, H. (1996). Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*, 382(6592), 646-649.

MACIAS, M. J., WIESNER, S., SUDOL, M. (2002). WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Letters*. 20;513(1):30-7

MARTINS, L. G., RAIMUNDO, G. A., RIBEIRO, N. G., SILVA, J. C. F., EUCLYDES, N. C., LORIATO, V. A., DUARTE, C. E. M, FONTES, E. P. (2020). A Begomovirus nuclear shuttle protein-interacting immune hub: Hijacking host transport activities and suppressing incompatible functions. *Frontiers in plant science*, 11, 398.

MARIANO, A. C., ANDRADE, M. O., SANTOS, A. A., CAROLINO, S. M., OLIVEIRA, M. L., BARACAT-PEREIRA, M. C., BROMMONSHENKEL, S. H., FONTES, E. P. (2004). Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*, 318(1), 24-31.

MUKHTAR, M. S., CARVUNIS, A. R., DREZE, M., EPPLE, P., STEINBRENNER, J., MOORE, J., DANGL, J. L. (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *science*, 333(6042), 596-601.

NAN, X., NG, H. H., JOHNSON, C. A., LAHERTY, C. D., TURNER, B. M., EISENMAN, R. N., BIRD, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), 386-389.

NOUEIRY, A. O., LUCAS, W. J., GILBERTSON, R. L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, 76(5), 925-932.

OTTE, L., WIEDEMANN, U., SCHLEGEL, B., PIRES, J. R., BEYERMANN, M., SCHMIEDER, P., KRAUSE, G., VOLKMER-ENGERT, R., VOLKMER-ENGERT, V., OSCHKINAT, H. (2003). WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein Science*, 12(3), 491-500.

PENG, M., CUI, Y., BI, Y. M., ROTHSTEIN, S. J. (2006). AtMBD9: a protein with a methyl-CpG-binding domain regulates flowering time and shoot branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 46(2), 282-296.

POOGGIN, M. M. (2013). How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *International journal of molecular sciences*, 14(8), 15233-15259

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2015) R: a language and environment for statistical computing. R Found. *Stat. Comput.* Vienna Austria.

RAMIRO-MERINA, Á., ARIZA, R. R., ROLDÁN-ARJONA, T. (2013). Molecular characterization of a putative plant homolog of MBD4 DNA glycosylase. *DNA repair*, 12(11), 890-898.

REDDY, A. S., DAY, I. S., GÖHRING, J., BARTA, A. (2012). Localization and dynamics of nuclear speckles in plants. *Plant physiology*, 158(1), 67-77.

ROJAS, M. R., GILBERTSON, R. L., MAXWELL, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant disease*, 77(4), 340-347.

SALAH, Z., ALIAN, A., AQEILAN, R. I. (2012). WW domain-containing proteins: retrospectives and the future. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 17(1), 331-348.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

SILVA, F. D. A., RAIMUNDO, G. S., FONTES, E. P. (2022). Begomovirus–host protein-protein interactions in intracellular virus movement. In *Geminivirus: Detection, Diagnosis and Management* (pp. 347-356). Academic Press.

SHESHUKOVA, E. V., ERSHOVA, N. M., KAMAROVA, K. A., DOROKHOV, Y. L., KOMAROVA, T. V. (2020). The Tobamoviral movement protein: A “conditioner” to create a favorable environment for intercellular spread of infection. *Frontiers in Plant Science*, 11, 959.

SCHÜTZE K, HARTER K, CHABAN C. (2009). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to study protein-protein interactions in living plant cells. *Methods Molecular Biology*. 479:189-202.

STEPIEN, A., DOLATA, J., GULANICZ, T., BIELEWICZ, D., BAJCZYK, M., SMOLINSKI, D. J., SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z., JARMOŁOWSKI, A. (2022). Chromatin-associated microprocessor assembly is regulated by PRP40, the U1 snRNP auxiliary protein. *bioRxiv*.

STONE, J. M., WALKER, J. C. (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant physiology*, 108(2), 451-457.

SUDOL, M., HUNTER, T. (2000). New wrinkles for an old domain. *Cell*, 103(7), 1001-1004.

SUDOL, M., RECINOS, C. C., ABRACZINSKAS, J., HUMBERT, J., FAROOQ, A. (2005). WW or WoW: the WW domains in a union of bliss. *IUBMB life*, 57(12), 773-778.

TEIXEIRA, R. M., FERREIRA, M. A., RAIMUNDO, G. A., FONTES, E. B. P. (2021). Geminiviral triggers and suppressors of plant antiviral immunity. *Microorganisms*, 9(4), 775.

VALENTINE, M. E., WOLYNIAK, M. J., RUTTER, M. T. (2012) Extensive Phenotypic Variation among Allelic T-DNA Inserts in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7(9): e44981.

ZEMACH, A., GRAFI, G. (2003). Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. *The Plant Journal*, 34(5), 565-572.

ZEMACH, A., LI, Y., WAYBURN, B., BEN-MEIR, H., KISS, V., AVIVI, Y., KALCHENKO, V., JACOBSEN, S. E., GRAFI, G. (2005). DDM1 binds Arabidopsis methyl-CpG binding domain proteins and affects their subnuclear localization. *The Plant Cell*, 17(5), 1549-1558.

ZEMACH, A., GRAFI, G. (2007). Methyl-CpG-binding domain proteins in plants: interpreters of DNA methylation. *Trends in plant science*, 12(2), 80-85.

ZERBINI, F. M., BRIDDON, R. W., IDRIS, A., MARTIN, D. P., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, J., RIVERA-BUSTAMANTE, R., ROUMAGNAC, P., VARSANI, A., ICTV Report Consortium. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *The Journal of general virology*, 98(2), 131.

ZORZATTO, C., MACHADO, J.P.B., LOPES, K.V.G., NASCIMENTO, K.J.T., PEREIRA, W.A., BRUSTOLINI, O.J.B., REIS, P.A.B., CALIL, I.P., DEGUCHI, M., SACHETTO-MARTINS, G., GOUVEIA, B. C., LORIATO, V. A. P., SILVA, M. A. C., SILVA, F. F., SANTOS, A. A., CHORY, J., FONTES, E. P. B. (2015). NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature*, 520:679–682.

ZHENG, Z. L. (2022). Cyclin-Dependent Kinases and CTD Phosphatases in Cell Cycle Transcriptional Control: Conservation across Eukaryotic Kingdoms and Uniqueness to Plants. *Cells*, 11(2), 279.

WANG, L., LIU, Y., HAN, R., BEIER, U. H., THOMAS, R. M., WELLS, A. D., & HANCOCK, W. W. (2013). Mbd2 promotes foxp3 demethylation and T-regulatory-cell function. *Molecular and cellular biology*, 33(20), 4106-4115.

WOOD, K. H., ZHOU, Z. (2016). Emerging Molecular and Biological Functions of MBD2, a Reader of DNA Methylation. *Frontier in Genetics*. 7:93.