

KELLY MAYRINK BALMANT

**IDENTIFICAÇÃO DE UM FATOR DO HOSPEDEIRO, RPS5A,
ENVOLVIDO NA INTERAÇÃO COM A PROTEÍNA DE
MOVIMENTO (MP) DE GEMINIVÍRUS.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

KELLY MAYRINK BALMANT

**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DO HOSPEDEIRO, RPS5A,
ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM A PROTEÍNA DE
MOVIMENTO (MP) DE GEMINIVÍRUS.**

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

APROVADA: 18 de Fevereiro de 2011.

Anésia Aparecida dos Santos

Prof. Francisco Murilo Zerbini
(Co-orientador)

Profª Claudine Márcia Carvalho
(Co-orientadora)

Profª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

Aos meus pais Aristides e Ermelinda e ao meu noivo Márcio.

DEDICO

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants “

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me abençoado me dado forças para conseguir mais essa conquista.

Aos meus pais Aristides e Ermelinda, que não pouparam esforços para que eu chegasse até aqui e que são exemplos que eu quero seguir por toda minha vida.

Ao meu irmão Aleksander, pela amizade e cumplicidade. À Ceci e Luana por estarem ao meu lado sempre.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas grandes oportunidades de estudo oferecidas durante toda minha vida acadêmica.

À genética e Melhoramento e ao CNPq pela concessão da bolsa.

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela excelente orientação, ensinamentos, oportunidade de enriquecimento profissional e confiança.

À Professora Claudine Márcia Carvalho e o professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, pela co-orientação.

À Anésia por aceitar contribuir com seus conhecimentos na banca de defesa.

À Marta pela construção da biblioteca de cDNA.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela agradável e divertida convivência e pelas ajudas durante os experimentos.

Aos amigos de Viçosa, Denise, Goiano, Lucas, Rui, às meninas da república LasBilas, pela amizade, companherismo e momentos de diversão compartilhados ao longo de todos estes anos de UFV.

E por último, mas não menos importante, agradeço ao Márcio pelo amor, companherismo, cumplicidade e que mesmo de longe me deu muita força para que conseguir mais essa conquista.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
Família Geminiviridae	4
Begomovirus.....	4
Replicação e movimento intra e intercelular do genoma viral.....	7
Relevância agrícola de begomovirus e estratégias para aquisição de resistência transgênica.	11
Interações proteína-proteína mediadas pelas proteínas de begomovirus	14
MATERIAL E MÉTODOS	20
Clonagem de MP em vetores de expressão em bactérias, leveduras e plantas	20
Extração de mRNA e síntese de biblioteca de cDNA de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Escrutínio de cDNAs pelo sistema duplo híbrido de leveduras.....	24
Clonagem de possíveis cDNAs candidatos completos em vetores de expressão em bactérias, leveduras e plantas.....	26
Confirmação da interação entre RPS5A e MP <i>in vitro</i> , através do sistema de duplo híbrido, usando o cDNA completo de RPS5A.....	27
Preparo das células competentes e transformação de <i>E. coli</i> BL21 pLys	28
Purificação de RPS5A fusionada à cauda de GST.....	29
Confirmação da interação entre RPS5A e MP <i>in vitro</i> , através de <i>pull-down</i>	30

Expressão transiente em folhas de tabaco por agroinoculação.....	31
Localização subcelular	32
Western blot.....	33
PCR em tempo real	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
Construção de uma biblioteca de cDNA a partir de folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> infectadas com CaLCuV.....	36
Identificação de proteínas que interagem com MP através do sistema de duplo-híbrido.....	39
MP interage com a Proteína Ribossomal S5A.....	40
Localização subcelular de RPS5A.....	44
MP e GST-RPS5A interagem diretamente <i>in vitro</i>	46
A expressão de AtRPS5A é regulada negativamente por infecção por CaLCuV em <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
Modelo para significância biológica da interação MP:RPS5A	50
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

BALMANT, Kelly Mayrink M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2011. **Identificação de Fatores do Hospedeiro, RPS5A, Envolvidos na Interação com a Proteína de Movimento MP de Geminivírus.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-orientadores: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Claudine Márcia Carvalho.

A proteína de movimento (MP) de geminivírus bissegmentados (begomovirus) facilita o movimento célula-célula, bem como o movimento a longas distâncias do DNA viral, além de influenciar na patogenicidade viral. Com o objetivo de identificar fatores do hospedeiro que interagem com MP, inicialmente foi construída uma biblioteca de cDNA a partir de mRNAs de folhas de *Arabidopsis* infectadas com CaLCuV (*Cabbage leaf curl virus*) no vetor pEXPAD502. Para selecionar por interações entre a proteína quimérica BD-MP e proteínas codificadas pelos cDNAs da biblioteca, transformantes duplos (BD-MP+ cDNA-AD) foram plaqueados em meio deficiente de histidina e suplementados com 3-amino triazol (3-AT). De um total de 5×10^5 transformantes escrutinados, dois clones, codificando *EXL3* (Exordium Like 3), uma proteína de parede celular, e *RPS5A*, proteína ribossomal S5A, apresentaram auxotrofia a histidina e expressão do gene repórter *LacZ*, em placas indicadoras de X-gal. Expressão do cDNA completo de *RPS5A* fusionado ao domínio de ativação de Gal-4 em leveduras, carreando BD-MP, promoveu crescimento dos transformantes na ausência de histidina e presença de 3-AT, além de ativar altos níveis de expressão de *LacZ*. Além disso, a interação entre MP e *RPS5A* foi confirmada *in vitro* por ensaios de pull down. Análises de expressão do gene *RPS5A* por meio de qRT-PCR demonstraram que o acúmulo de seus transcritos é reprimido por geminivírus. Baseado

nestes resultados e de outros, um modelo funcional para interação de MP com RPS5A é discutido.

ABSTRACT

BALMANT, Kelly Mayrink M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2011. **Identification of movement protein MP-interacting host factors.** Advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisors: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Claudine Márcia Carvalho.

The movement protein MP from bipartite geminivirus (begomovirus) facilitates the cell-to-cell and long-distance transport of viral DNA in addition to affecting viral pathogenicity. To identify host factors that interact with MP, initially a cDNA library prepared from CaLCuV (Cabbage leaf curl virus)-infected *Arabidopsis* leaf mRNA was generated in a pEXPAD502 vector. To select for interactions between the bait BD-MP and cDNA library-encoded proteins, double transformants (BD-MP+ cDNA-AD) were plated on medium lacking histidine but supplemented with 3-aminotriazole (3-AT). From 5×10^5 transformants screened, two clones, encoding *AtEXL3* (Exordium Like 3), a cell wall protein, and *AtRPS5A*, ribosomal protein S5A, displayed histidine/adenine auxotrophy and activate *LacZ* expression, on X-gal indicator plates. Expression of a full-length RPS5A cDNA fused to the Gal4 activation domain in yeast carrying BD-MP promoted growth of the double transformants in the absence of histidine and presence of 3-AT, in addition to activating high levels of *LacZ* expression. Furthermore, the interaction between MP and RPS5A was confirmed *in vitro* by pull down assays. Analysis of *RPS5A* gene expression by qRT-PCR demonstrated that the accumulation of rpS5A transcripts is suppressed by geminivirus infection. Based on these results and others, a functional model for the MP-RPS5A interaction is discussed.

INTRODUÇÃO

Durante as duas últimas décadas, os begomovírus têm causando perdas econômicas severas e ameaçando seriamente a produção de culturas agrônômicas importantes, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Morales, 2006). Os principais fatores que contribuíram para o aparecimento e propagação de begomovírus consistem na disseminação do biótipo B de *Bemisia tabaci* (inseto vetor) no início dos anos 1990 (Ribeiro *et al.*, 1998), com o subsequente aumento da população do inseto vetor (Morales, 2006), e a rápida evolução de novas variantes por mecanismos de recombinação e pseudorecombinação (Chakraborty *et al.*, 2008). Como consequência, vem sendo constatada no Brasil, inclusive em Minas Gerais, uma proliferação crescente e uma grande diversidade de begomivírus em tomateiros, provavelmente oriundos de populações nativas de vírus presentes em plantas silvestres, que se adaptaram ao tomateiro após terem sido transmitidos pelo inseto vetor (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 1998, 2003). Além disso, a possibilidade de introdução de geminivírus presentes em outros continentes, como a Europa (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV), Ásia (Tomato leaf curl virus, TLCV) e África (African cassava mosaic virus, ACMV) está sempre presente. Finalmente, o mosaico dourado do feijoeiro causado pelo BGMV (Bean golden mosaic virus) permanece como um dos fatores limitantes dessa cultura em Minas Gerais.

Uma vez que infecções por geminivírus constituem importantes restrições para a produtividade agrícola, existe um interesse crescente na

obtenção de cultivares resistentes à vírus, por meio de engenharia genética de plantas. Para begomovírus, muitas dessas estratégias têm envolvido a expressão de genes defectivos truncados (Antignus *et al.*, 2004; Brunetti *et al.*, 2001; Chellappan *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004) e RNA antisense (Asad *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). Bonfim *et al.* (2007), utilizando a estratégia de RNA de interferência para silenciar o gene viral AC1 em feijão comum, obtiveram uma linhagem transgênica com alta resistência (93% de plantas assintomáticas) a BGMV. Estratégias gerais para resistência engenheirada aplicáveis contra diversos membros e estirpes da família *Geminiviridae* devem ser consideradas. Um melhor entendimento das interações vírus-hospedeiro e seu efeito no movimento viral são cruciais para o desenvolvimento de uma metodologia efetiva que vise fatores virais ou do hospedeiro, controlando a indução de doenças causadas por geminivírus (Droga *et al.*, 2009). Uma alternativa a ser explorada consiste na identificação dos mecanismos pelos quais estes vírus interagem com o hospedeiro. Eventualmente, interações-chave serão identificadas que, quando bloqueadas, impedem o estabelecimento do vírus na planta.

A família *Geminiviridae* tem se mostrado importante não somente na agricultura mundial, mas também como um modelo no estudo de replicação do DNA, controle do ciclo celular e identificação de componentes da maquinaria nucleocitoplasmática (Hanley-Bowdoin *et al.* 2000; Gutierrez 2002; Carvalho *et al.*, 2008). Sendo assim, o interesse científico em geminivírus não está limitado a aspectos agrônômicos. Além disso, os geminivírus possuem um potencial considerável como vetores

para expressão de genes exógenos em plantas, e estes vetores serão de grande utilidade tanto para pesquisa básica quanto aplicada. Dessa forma, o significado biológico e funcional de interações vírus-hospedeiro tem sido intensamente abordado na última década. No que se diz respeito aos estudos de interação entre a proteína de movimento de geminivírus (MP) e proteínas do hospedeiro, Krenz *et al.* (2010) identificaram uma chaperone (cpHSC70-1), uma proteína de 70kDa, “heat shock” cognata, codificada no núcleo e direcionada para os plastídeos de *Arabidopsis thaliana*, capaz de interagir com MP de *Abutilon mosaic virus* (AbMV). Mais recentemente, uma sinaptotagmina (SYTA) também foi identificada pela sua capacidade de ligar-se à proteína MP de *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV; Lewis e Lazarowitz, 2010).

Embora já tenham sido identificados esses fatores do hospedeiro capazes de interagirem com MP, o mecanismo pelo qual MP promove o movimento célula-a-célula do DNA viral ainda não foi elucidado e pode-se antecipar a existência de outros fatores do hospedeiro envolvidos neste processo. A identificação de fatores do hospedeiro que interagem com MP constitui o principal objetivo desta investigação. A elucidação do significado biológico e funcional dessas possíveis interações provavelmente levará à identificação de atividades do hospedeiro que atuam no movimento intra e intercelular do genoma viral nas plantas infectadas. Assim sendo, o desenvolvimento dessa pesquisa contribuirá para aumentar nossos conhecimentos em relação aos mecanismos envolvidos na interação vírus-hospedeiro que levam ao desenvolvimento da doença.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Família Geminiviridae

Os geminivírus constituem uma grande e diversa família de vírus que infectam plantas. Representantes da família *Geminiviridae* apresentam genoma de DNA circular de fita simples, encapsidado em partículas geminadas. O DNA fita simples é convertido em fita dupla no núcleo das células hospedeiras onde se replicam por meio do mecanismo de círculo rolante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A transmissão do DNA circular fita simples do vírus se dá por insetos vetores específicos e é dependente do tipo de capa protéica que interage com os diferentes receptores de cada inseto (Höhnle *et al.*, 2001).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, a família Geminiviridae é subdividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus* (Fauquet *et al.*, 2005). Essa divisão é feita segundo a organização do genoma, tipo de inseto vetor e planta hospedeira.

Begomovirus

Dentre os gêneros de geminivírus, o *Begomovirus* possui o maior número de representantes e inclui vírus transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci* para várias espécies de dicotiledôneas (Fauquet *et al.*, 2008). Os begomovírus podem ser tanto bipartidos, que possuem dois

componentes genômicos, quanto monopartidos, com somente um componente de DNA (Rojas *et al.*, 2001). Todos os begomovírus encontrados no Brasil são bipartidos, ou seja, possuem dois componentes genômicos denominados componentes A e B (Ribeiro *et al.*, 2003).

O DNA-A da maioria dos begomovírus contém cinco genes, alguns deles sobrepostos, que codificam para as funções requeridas para a replicação do DNA, controle da expressão gênica, subversão das defesas do hospedeiro e encapsidação. Na fita de sentido viral, encontra-se o gene que codifica a proteína capsidial (CP). Na fita de sentido complementar, encontra-se os genes *Rep*, *Trap*, *Ren* e *AC4*. O gene *Rep* (*replication-associated protein*) codifica a única proteína essencial para o processo de replicação viral (Elmer *et al.*, 1998; Fontes *et al.*, 1994; 1992). Ela se liga especificamente ao intermediário dsDNA durante o reconhecimento da origem de replicação viral e cliva o motivo em grampo que se localiza na região intergênica dentro da região comum para iniciar a replicação via círculo rolante (Fontes *et al.*, 1994; Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995). *Rep* possui também a atividade de ligase, unindo as extremidades do grampo após a terminação da replicação (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995). O gene *Ren* (*replication enhancer protein*) codifica uma proteína acessória, amplificadora da replicação viral e, conseqüentemente, da severidade dos sintomas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Settlage *et al.*, 2001). Embora esta proteína não seja essencial para o processo de replicação, o acúmulo de DNA viral é intensificado na sua presença. Interação de *Ren* com a proteína de tomate SINAC1 (*Solanum lycopersicon* NAC1) promove o acúmulo de ssDNA viral e facilita a

replicação de *Tomato leaf curl virus* (TLCV; Selth *et al.*, 2005). O produto do gene *TrAP* (*trans-activating protein*) consiste em uma proteína ativadora da transcrição dos genes de sentido viral, *Cp* e *Nsp* (Rojas *et al.*, 2005). *TrAP* pode também atuar na supressão do silenciamento de RNA através da ativação de genes do hospedeiro que codificam reguladores negativos do silenciamento do RNA (Trinks *et al.*, 2005). Nos begomovírus bipartidos ACMV (*African cassava mosaic virus*) e SLCMV (*Sri Lankan cassava mosaic virus*), a proteína AC4, um homólogo de C4 de BSCTV (*Beet severe curly top virus*), um begomovírus monossegmentado, pode suprimir o silenciamento gênico pós-transcricional pela ligação a miRNAs e siRNAs (Vanitharani *et al.*, 2004; Chellappan *et al.*, 2005). O DNA-B contém os genes que codificam as proteínas de movimento NSP (*nuclear shuttle protein*) e MP (*movement protein*), na fita viral e complementar, respectivamente (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). As proteínas codificadas pelo componente B estão envolvidas com o movimento do vírus durante a infecção e afetam a patogenicidade viral (Rojas *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007).

Os begomovírus são transmitidos pelo vetor *B. tabaci* em um modo persistente e permanecem associados com o inseto durante toda sua vida adulta (Ghanim *et al.*, 2001). Estes vírus se movem dentro do corpo da mosca branca em um modo circulativo. Durante o processo de alimentação, as partículas virais são adquiridas pelo vetor e se movem do aparelho bucal para o intestino. A partir do intestino, as partículas virais alcançam a hemolinfa e posteriormente a glândula salivar, de onde são conduzidos novamente para o aparelho bucal (Sinisterra *et al.*, 2005).

Durante este processo, o DNA viral é protegido dentro do corpo da mosca branca pela proteína capsidial. Na hemolinfa, CP se liga a um análogo de GroEL (Morin *et al.*, 2000), produzida por uma bactéria endossimbionte, que protege a partícula viral de degradação (Harrison *et al.*, 2002). Desta forma, CP consiste em um determinante de especificidade do inseto vetor.

Replicação e movimento intra e intercelular do genoma viral

A replicação do DNA de geminivírus depende extensivamente de fatores do hospedeiro que atuam tanto na replicação do DNA quanto na propagação do vírus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Gutierrez, 1999). Estes vírus são capazes de replicar em células diferenciadas que encerraram o estado proliferativo e deixaram de expressar fatores do hospedeiro necessários para a replicação. Para produzir células diferenciadas permissivas à replicação do DNA, os geminivírus evoluíram a habilidade de induzir a fase S, ou pelo menos alguma função específica da fase S do ciclo celular (Gutierrez 1999, 2002). Geminivírus codificam proteínas que se ligam e modulam a função da proteína da planta relacionada à retinoblastoma (RBR), para assim produzir um ambiente para a replicação viral. A interação entre proteínas de geminivírus e RBR tem sido demonstrada para a proteína Rep e Ren de begomovírus bipartidos (Ach *et al.*, 1997; Settlage *et al.*, 2001; Arguello-Astorga *et al.*, 2004). A proteína RBR está envolvida na regulação da diferenciação, proliferação e endoreduplicação em plantas (Park *et al.*, 2005). Em células quiescentes, RBR regula negativamente a progressão do ciclo

celular, em parte, por ligar-se ao fator de transcrição E2F inativando os genes responsivos a este fator de transcrição. Os genes responsivos a E2F controlam a progressão para a fase S do ciclo celular. Assim, proteínas codificadas por geminivírus provavelmente induzem a replicação do DNA do hospedeiro por interferirem com o sistema de repressão transcricional RBR/E2F, permitindo que a célula entre na fase S (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004). Evidências sugerem que o ciclo celular em células de plantas infectadas é reprogramado diferencialmente por diferentes gêneros de geminivírus. Alguns begomovírus bipartidos modificam a expressão gênica para permitir a replicação do DNA, principalmente por endoreduplicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004).

Para o estabelecimento de uma infecção produtiva, os geminivírus devem primeiro replicar no núcleo das células, moverem-se célula a célula e finalmente mover-se ao longo de toda planta via transporte mediado pelo floema. Neste processo, os geminivírus devem sobrepor duas barreiras distintas impostas pelo envelope nuclear e pela parede celular para assim infectar a planta de forma sistêmica (Aberl *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2005). As proteínas de movimento codificadas pelo vírus estão diretamente envolvidas neste processo.. Em begomovírus bipartidos, as proteínas MP e NSP são as únicas consideradas proteínas de movimento, porque mutações que inativam os genes correspondentes resultam em perda completa de infectividade em plantas, mas não causam nenhum efeito aparente na replicação do genoma viral (Lazarowitz, 1992). Plantas transgênicas expressando MP apresentam sintomas típicos de infecção, enquanto que aquelas expressando NSP possuem aparência normal

(Ingham *et al.*, 1995; Pascal *et al.*, 1993). Além disso, NSP e MP diferem quanto à localização subcelular. Em plantas infectadas, NSP localiza-se no núcleo (Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995) e MP encontra-se associadas à membrana plasmática. (Pascal *et al.*, 1993).

Estudos bioquímicos, moleculares e celulares têm mostrado que NSP se liga ao DNA viral fita simples e o transporta do núcleo para o citoplasma, enquanto que MP facilita o movimento célula a célula (Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995, 1996; Rojas *et al.*, 1998; Noueiry *et al.*, 1994; Lazarowitz e Beachy, 1999; Hehne *et al.*, 2004). Dois mecanismos têm sido propostos para descrever o movimento de geminivírus bipartidos. O modelo “relay race” foi proposto baseado em experimentos de microinjeção e ensaios de ligação ao DNA por mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) utilizando *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) e as proteínas virais NSP e MP (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998). Estes ensaios forneceram evidências que NSP transporta DNA plasmidial entre o núcleo e o citoplasma e que MP transporta dsDNA, mas não ssDNA, para células vizinhas (Noueiry *et al.*, 1994). Além disso, foi demonstrado que NSP e MP associam-se entre si e ligam-se, de um modo dependente de forma e tamanho, a ssDNA e dsDNA (Carvalho *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 1998). De acordo com este modelo, NSP transfere o dsDNA do núcleo para o citoplasma. No citoplasma o dsDNA associa-se a MP, seguido pelo movimento célula a célula do complexo MP-DNA através dos plasmodesmas.

Um segundo modelo, “couple-skating”, tem sido proposto (Hehne *et al.*, 2004) baseado em estudos utilizando a proteína de movimento de

Squash leaf curl virus (SqLCV) e *Abutilon mosaic virus* (AbMV; Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995, 1996; Hehnle *et al.*, 2004). Nestes casos, foi observado que a associação NSP- ssDNA é mais forte do que a associação entre NSP e dsDNA e que MP associa-se fracamente com ssDNA e não interage com dsDNA. De acordo com este modelo, NSP se liga ao genoma viral ssDNA recém replicado no núcleo e este complexo é transportado para o citoplasma. MP, que está localizada na periferia celular, se liga ao complexo NSP-ssDNA e facilita seu movimento através da parede celular para uma célula adjacente não infectada (Hehnle *et al.*, 2004; Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; Zhang *et al.*, 2001).

Recentemente, foi identificada uma GTPase, NIG (NSP-Interacting GTPase) que interage *in vivo* com NSP e facilita o transporte da proteína viral do núcleo para o citoplasma (Carvalho *et al.*, 2008). A demonstração de que MP não interage com dsDNA *in vitro* (Pascal *et al.*, 1994), mas facilita o movimento de dsDNA *in vivo* (Noueiry *et al.*, 1994), fornece indícios de que, provavelmente, o mecanismo de atuação dessa proteína dependa de interações com fatores do hospedeiro. A identificação desses fatores será crucial para o entendimento do mecanismo de movimento célula-a-célula e, como consequência, para o desenvolvimento de estratégias moleculares que interfiram no ciclo de vida do vírus na planta.

Relevância agrícola de begomovirus e estratégias para aquisição de resistência transgênica.

O gênero Begomovirus tem causado grandes prejuízos em todo o mundo, principalmente em culturas como tomate (*Solanum lycopersicon*), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cucurbitáceas, pimentão (*Capsicum annuum*), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), constituindo-se em fator limitante à produção agrícola (Lima *et al.*, 2000). O mosaico dourado do feijoeiro consiste no principal impedimento para a produção de feijão na América Latina, causando perdas significativas de rendimento que variam de 40 a 100%. (Morales e Jones, 2004). Desde 1972, a produção de feijão brasileira tem sido reduzida severamente por esta doença.

A produção de tomate no Brasil é comprometida pela infecção de pelo menos oito begomovirus (Ribeiro *et al.*, 2003). Em tomateiros, perdas significativas vêm sendo registradas desde os anos 80 em países do continente americano, onde cerca de 20 diferentes geminivirus já foram relatados (Polston & Anderson, 1997).

No Brasil, seis isolados de begomovirus distintos, induzindo mosaico dourado em tomateiro foram identificados no estado de São Paulo (Costa *et al.*, 1976). Um desses vírus foi purificado e nomeado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV; Matyis *et al.*, 1975). Nessa mesma época, a incidência de TGMV foi atribuída à migração do vetor a partir da soja e do feijão para tomate (Costa, 1976). Em meados da década de 90, o biótipo B de *B. tabaci* foi introduzido no Brasil. Ao contrário do já existente biótipo A, o qual normalmente não coloniza tomate, o biótipo B

mostrou-se extremamente adaptado a esse hospedeiro (Lourenço & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996). Desde então, novos begomovírus têm emergido e severas epidemias com perdas econômicas significativas, variando de 40% a 100%, foram relatadas em tomateiro no Brasil nos últimos anos e em várias áreas de cultivo (Bezerra *et al.*, 1996; Faria *et al.*, 2000). Ainda que o conhecimento sobre a patogenicidade de geminivírus seja limitado, o manejo atual para controle de doenças causadas por geminivírus é problemático e ineficiente, uma vez que é baseado no controle da população do inseto vetor por inseticidas. Estas observações argumentam a favor da necessidade de se definirem estratégias gerais mais eficientes para resistência transgênica aplicáveis contra diversos membros e estirpes da família *Geminiviridae*. De fato, a perda econômica causada por Geminivirus tem mobilizado esforços para obtenção, por meio de engenharia genética de cultivares resistentes ao vírus.

CP é requerida para a infecção sistêmica por geminivírus monopartidos, e plantas expressando CP de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) exibiram atraso no desenvolvimento dos sintomas (Kunik *et al.*, 1994). Entretanto, CP de geminivírus bipartidos não é essencial para disseminação sistêmica do vírus, uma vez que NSP pode substituí-la na função de transporte (Pooma *et al.*, 1996). Assim, a proteção mediada por CP não é um fenômeno bem documentado entre os geminivírus. De fato, para o caso específico de geminivírus bipartidos já foi demonstrado que esta estratégia aparentemente não produz resultados satisfatórios.

Alternativamente, outras estratégias para obtenção de resistência engenheirada, baseadas na biologia molecular do vírus, tem ganhado destaque. Na primeira delas, a interferência na replicação do vírus por genomas virais defectivos de interferência do DNA B (metade do tamanho do DNA B), expressos *Nicotiana benthamiana* transgênica tem sido descrita para ACMV (*African cassava mosaic virus*; Stanley *et al.*, 1990). A multiplicação de ACMV em *N. benthamiana* foi negativamente correlacionada com a concentração dos genomas virais defectivos. Assim sendo, plantas transformadas tiveram redução dos sintomas, comparado com as plantas não transformadas infectadas com ACMV. Entretanto esse fenômeno foi vírus-específico, pois nenhum fenótipo de resistência foi observado em plantas desafiadas com outros geminivírus (*Beet curly top virus* - BCTV e *Tomato golden mosaic virus* - TGMV). Essa especificidade foi posteriormente confirmada em *N. benthamiana* transgênicas resistentes a BCTV (resistência mediada por genoma defectivo de interferência), que não se tornaram resistentes a outras estirpes (Stenger, 1994).

Uma segunda metodologia que tem sido utilizada é a expressão de genes anti-senso para a proteína de replicação do vírus em plantas transgênicas. A proliferação do TGMV foi reduzida em plantas de tabaco expressando uma construção anti-senso do gene associado à replicação do vírus (Day *et al.*, 1991). No entanto, a eficiência da proteção foi limitada, conseguindo-se no máximo retardamento e atenuação dos sintomas. Em contraste, Bonfim *et al.* (2007), utilizando a estratégia de RNA de interferência para silenciar o gene viral AC1 em feijão comum,

obtiveram uma linhagem transgênica com alta resistência (93% de plantas assintomáticas) a BGMV. Mais recentemente foi observado que pelo menos uma linhagem transgênica conferiu imunidade ao BGMV no nível de campo (Aragão & Faria, 2009). Apesar desses resultados eficientes contra infecção do BGMV em feijão, a estratégia de RNA de interferência não tem sido bem sucedida para conferir amplo espectro de proteção contra begomovírus em tomateiros (Aragão F. e Ribeiro S., comunicação pessoal).

Diante do exposto, um melhor entendimento das interações vírus-hospedeiro e seu efeito na replicação e movimento viral é crucial para o desenvolvimento de uma metodologia efetiva baseada na eliminação da função gênica de fatores do hospedeiro que controlam a indução de doenças causadas por geminivírus (Droga *et al.*, 2009).

Interações proteína-proteína mediadas pelas proteínas de begomovirus

Interações entre proteínas virais e proteínas do hospedeiro são essenciais para a maioria dos processos durante a infecção viral. Conseqüentemente, a demonstração direta de interações entre as proteínas virais e do hospedeiro tem sido um dos principais interesses na virologia de plantas. Uma metodologia rápida e econômica para esse fim é o duplo-híbrido em leveduras (Nagy, 2008).

Utilizando a metodologia de duplo híbrido, diversas interações entre proteínas de geminivírus e do hospedeiro foram identificados. Com

relação à proteína NSP, fatores de hospedeiro identificados como proteínas parceiras incluem AtNSI, uma acetilase de *Arabidopsis* localizada no núcleo (McGarry *et al.*, 2003), uma GTPase NIG (*NSP-Interacting GTPase*), localizada no citossol (Carvalho *et al.*, 2008), uma proteína receptora do tipo PERK, localizada na membrana plasmática (Florentino *et al.*, 2006), além de membros da família LRR-RLK, também localizados na membrana plasmática e designados NIK1, NIK2 e NIK3 (Mariano *et al.*, 2004, Fontes *et al.*, 2004). AtNSI é altamente conservada entre plantas divergentes. Estudos bioquímicos mostraram que NSP interage diretamente com a proteína AtNSI (*nuclear shuttle protein interactor*) de *Arabidopsis thaliana*, uma acetiltransferase nuclear, mas que ao contrário dos demais membros da família GNAT, não atua como co-ativador transcricional *in vitro* (McGarry *et al.*, 2003). AtNSI pode acetilar as histonas H2A e H3 *in vitro*, bem como a proteína capsidial viral, entretanto a proteína NSP não consiste em um substrato para esta acetiltransferase (McGarry *et al.*, 2003). Linhagens transgênicas superexpressando NSI e mutantes desta proteína mostraram que NSI aumenta a eficiência da infecção de CaLCuV (McGarry *et al.*, 2003; Carvalho e Lazarowitz, 2004). Mais recentemente, foi mostrado que NSP pode inibir a atividade de NSI, interferindo com a sua montagem em complexos ativos, sugerindo um mecanismo no qual NSP pode recrutar NSI para regular a exportação nuclear do genoma viral (Carvalho *et al.*, 2006)

A proteína NIG (*NSP-interacting GTPase*) é uma proteína citoplasmática que liga-se a GTP, acumula-se ao redor do envelope

nuclear e possui atividade GTPase intrínseca. Foi demonstrado que NIG interage *in vitro* e *in vivo* com NSP e redireciona essa proteína viral do núcleo para o citoplasma (Carvalho *et al.*, 2008). Além disso, expressão ectópica de NIG aumenta a eficiência da infecção viral. Dessa forma, foi proposto que NIG contribui positivamente para a infecção de geminivírus, modulando o movimento nucleocitoplasmático de NSP e, conseqüentemente, facilitando a interação MP-NSP no citoplasma.

A proteína NIK (*NSP-interacting kinases*), um membro da família de proteínas LRR-RLK, interage com NSP (Mariano *et al.* 2004; Fontes *et al.*, 2004). As proteínas NIKs (NIK1, NIK2, NIK3) são proteínas localizadas na membrana com propriedades bioquímicas de receptores de sinalização. Elas comportam-se como proteínas cinases autênticas que se autofosforilam e podem também fosforilar substratos exógenos. Diversas evidências na literatura indicam que NIK está envolvida na resposta de defesa antiviral. A ligação de NSP a NIK inibe sua atividade cinase *in vitro*. Assim, NSP age como um fator de virulência que suprime a resposta antiviral mediada por NIK (Fontes *et al.*, 2004). Além disso, inativação dos genes NIK em *Arabidopsis* aumenta a suscetibilidade dos nocautes à infecção por geminivírus, e superexpressão de NIK em tomateiros atenua o desenvolvimento de sintomas por geminivírus e retarda o processo de infecção viral (Fontes *et al.*, 2004, Santos *et al.*, 2009).

As proteínas AL2 e L2 (TrAP) de geminivírus aumentam a susceptibilidade, caracterizada primariamente por um aumento da infectividade viral, quando expressas em plantas transgênicas. Hao *et al.*

(2003) demonstraram genética e bioquimicamente que o aumento da susceptibilidade é atribuída à interação de AL2 e L2 com SNF1 cinase (regulador global do metabolismo). Além disso, estas proteínas interagem com adenosina cinase que também é inativada pelas proteínas virais AL2 e L2 em um processo que resulta em supressão de silenciamento por RNA de interferência (Wang *et al.*, 2003; 2005).

No caso da proteína C4 de geminivírus (proteína da patogenicidade), foi demonstrado, utilizando o sistema de duplo híbrido em leveduras, que C4 de BCTV interage com dois membros da família de proteínas cinases “shaggy”: AtSK η (um componente da via de sinalização de brassinosteróide) e AtSK ζ um receptor cinase rico em repetições de leucina (LRR-RLK). A interação de C4 com AtSK η indica que C4 pode interagir com a via de sinalização de brassinosteróide (Piroux *et al.*, 2006).

No que diz respeito à proteína de movimento MP de Geminivírus, pelo menos duas proteínas do hospedeiro foram identificadas recentemente pela suas capacidades de interagir com MP, através da técnica de duplo-híbrido (Krenz *et al.*, 2010; Lewis & Lazarowitz, 2010). A primeira refere-se a uma chaperone (cpHSC70-1), uma proteína de 70kDa, “heat shock” cognata, codificada no núcleo e direcionada para os plastídeos de *Arabidopsis thaliana*, que interage com o domínio N-terminal (posição de aminoácidos 1-116) da proteína MP de *Abutilon mosaic virus* (AbMV; Krenz *et al.*, 2010). Com o intuito de avaliar essa interação *in vivo*, foi feito um ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC), o qual confirmou a interação MP-HCS70 em células

vegetais. A inativação do gene cpHSC70-1 impacta negativamente a eficiência da infecção viral, demonstrando a dependência desse chaperone para a propagação do vírus e/ou desenvolvimento de sintomas em *Nicotiana benthamiana*.

Mais recentemente, uma sinaptotagmina (SYTA) foi identificada também através de uma triagem pelo sistema de duplo híbrido em leveduras, utilizando a proteína MP de *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) como isca (Lewis e Lazarowitz, 2010). Foi demonstrado que SYTA liga-se diretamente *in vitro* a MP de CaLCuV e a MP de vírus relacionados (SqLCV) e não relacionado (TMV), o que sugere que SYTA pode estar envolvida no movimento célula a célula em *Begomovirus* e *Tobamovirus*. No que diz respeito à função biológica dessa interação, foi demonstrado que uma linhagem “knockdown” de SYTA apresentou um atraso na infecção viral, no caso de CaLCuV, e uma inibição da propagação do vírus célula a célula, no caso de TMV. Além disso, experimentos com uma forma dominante negativa de SYTA levou estes autores a concluir que SYTA regula tanto a reciclagem de endossomos quanto a atividade de diversas MP no movimento viral célula a célula. Assim, o fato de que MP de diferentes vírus interajam com SYTA sugere que as proteínas de movimento de vírus distintos transportam seu genoma para o plasmodesma para propagação célula a célula através de uma via de reciclagem endocítica (Lewis e Lazarowitz, 2010).

Embora pelo menos dois exemplos de proteínas que interagem com MP já tenham sido identificados, por meio do sistema duplo híbrido de leveduras baseado nos domínios do transfator GAL4, este sistema não

tem se mostrado eficiente para isolamento de fatores de hospedeiro capazes de interagir com a proteína de movimento célula-célula MP (E.P.B. Fontes, comunicação pessoal). Provavelmente, isto se deve à baixa representatividade de mRNAs, que codificam proteínas que interagem com MP, em bibliotecas de cDNAs fusionados ao domínio de ativação de GAL-4 e preparadas a partir de mRNA extraído de folhas saudáveis de *Arabidopsis*. Para superar este possível problema, os objetivos primordiais da presente investigação consistem em construir uma biblioteca de cDNA fusionada ao domínio de ativação de GAL4 a partir de mRNA extraído de folhas de *Arabidopsis* infectadas com o geminivírus CaLCuV e utilizar a proteína MP fusionada ao domínio de ligação de GAL4 como isca para isolamento de proteínas que interagem com a proteína viral. Além disso, propõe-se confirmar as possíveis interações identificadas *in vitro* e *in vivo*. O isolamento de proteínas que interagem com MP permitirá o desenvolvimento de novas estratégias moleculares, fundamentadas no conhecimento básico dos mecanismos bioquímicos e moleculares que governam o ciclo de vida do vírus em células infectadas, tornando possível a produção de plantas transgênicas que eficientemente venham conferir resistência a geminivírus.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem de MP em vetores de expressão em bactérias, leveduras e plantas

A região codificadora do gene viral *MP* de CaLCuV foi amplificado com os oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) e clonado, por recombinação, no vetor de entrada pDON201 (Invitrogen), utilizando o sistema gateway, resultando no clone pUFV888. Em seguida, o inserto foi transferido de pUFV888 para os vetores pDEST17 (Invitrogen), pDEST32 (Invitrogen) e pCTAPi, utilizando *LR clonase*, para produzir os clones pUFV1607, pUFV888 e pUFV1294, respectivamente..

O clone resultante pUFV1607 promove a expressão de MP, fusionada a uma cauda de histidina na porção na porção N-terminal, em bactérias. Já o clone pUFV888 permite a expressão de MP fusionada ao domínio de ligação ao DNA de Gal4 em leveduras. O clone pUFV1294 contém o cDNA de MP fusionado a uma sequência que codifica TAP (*Tanden A Protein*) sob o controle do promotor 35S. Para clonagem de MP fusionada a YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) na porção N-terminal e sob controle do promotor 35S, a região codificadora de MP foi inicialmente clonada no vetor de entrada pDONR207 (invitrogen) por recombinação, dando origem ao clone pUFV1117. Em seguida, o inserto foi transferido por recombinação para o vetor binário de transformação de plantas N-YFP, dando origem ao clone pUFV1154. Todas as clonagens

foram confirmadas por PCR, usando oligonucleotídeos específicos para vetores e MP de CaLCuV (Tabela 1).

Extração de mRNA e síntese de biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*

Sementes de *Arabidopsis thaliana* foram esterilizadas, incubadas a 4°C por 4 dias, germinadas em placas contendo meio MS (Murashige and Skoog, 1962) a 22°C por 3 semanas e então transferidas para o solo. As plantas foram crescidas em câmara de crescimento a 22°C sob condições de luz controladas (16h luz e 8h escuro). Ao atingirem o estágio de sete folhas, as plantas foram inoculadas com plasmídeos, contendo repetições parciais em *tandem* do DNA-A e DNA-B de CaLCuV (denominados pCPCbLCVA.007 e pCPCbLCVB.002, respectivamente), por biobalística. O diagnóstico da infecção foi confirmado 10 dias após inoculação, por PCR, usando oligonucleotídeos específicos para DNA-B de CaLCuV DNA extraído de folhas sistêmicas.

As folhas das plantas positivas para infecção foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. O mRNA foi extraído utilizando-se o kit *FastTrack® 2.0 mRNA Isolation* (Invitrogen), a partir de dois gramas de material vegetal. Após a extração, o mRNA extraído foi quantificado (*Evolution 60 Thermo Scientific*) e a sua integridade foi verificada em gel de agarose desnaturante a 1,2%.

A partir do mRNA extraído de folhas de *Arabidopsis thaliana* infectadas com CaLCuV, a biblioteca de cDNA foi construída utilizando o kit *SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA*

Synthesis and Cloning (Invitrogen), porém com algumas modificações descritas a seguir. A ligação do mRNA aos adaptadores de *primers* contendo sítios para a enzima de restrição *Not I* foi realizada incubando 5 µg de mRNA, juntamente com os adaptadores, a 70°C por 15 minutos. A primeira fita foi sintetizada, adicionando-se 0,1 M de DTT, 5X *first strand buffer*, 10 mM de dNTPs e 1000 unidades de *SuperScript™ II RT*, seguindo à incubação a 37°C por 90 minutos. Já a síntese da segunda fita foi realizada conforme determinado pelo fabricante. Em seguida, adaptadores contendo os sítios para a enzima *Sal I* foram ligados ao cDNA dupla fita, utilizando 5 unidades da enzima T4 DNA ligase a 16°C por 16 horas. Após a ligação, o cDNA dupla fita foi digerido com *Not I* por 2 horas a 37°C seguido de fracionamento por cromatografia, utilizando a coluna cromatográfica proveniente do Kit (*cDNA Size Fractionation Column*). Para isto, a coluna foi previamente lavada quatro vezes com 800 µL de tampão TEN (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 25 mM NaCl) autoclavado e procedeu-se ao fracionamento de 100 µL do cDNA, pela adição de 100 µL de tampão após cada eluição. Após o fracionamento, 20 frações, de aproximadamente 35µL (volume de uma gota proveniente da coluna), foram coletadas. A integridade do cDNA nas frações coletadas foi avaliada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos (Tabela 1) da porção C-terminal de NIG (*NSP-interacting GTPase*) e 1 µL de cada fração como molde. Aquelas frações que apresentaram um padrão de banda mais intenso foram agrupadas e o cDNA foi precipitado, conforme recomendações do fabricante.

O cDNA precipitado foi ligado a 500 ng do vetor pEXAD 502, previamente digerido com *Not I* e *Sal I*, na presença de 1 unidade de *T4 DNA ligase* a 25°C por 4 horas. Após esse período, a incubação procedeu a 4°C *overnight*. O produto da reação de ligação foi precipitado, e ressuspenso em 12 µL de água estéril. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* DH5α, por eletroporação, a 25 µF de capacitância, 100 ohms e 2,50 KV. As células competentes transformadas foram recuperadas em 800 µL de LB sem antibióticos a 37°C por aproximadamente 1 hora. Após esse período, cerca de 200 µL da transformação foram plaqueados em meio seletivo contendo 100 mg/L de ampicilina e incubados a 37°C *overnight*.

Os transformantes foram recuperados em 5 mL de meio LB para a extração de DNA plasmidial, com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). O DNA plasmidial extraído foi quantificado (*Evolution 60 Thermo Scientific*). Para verificar a qualidade da biblioteca, o DNA plasmidial extraído a partir da cultura celular dos transformantes foi usado como molde em reação de PCR, utilizando os *primers*: SERK1 (*Somatic Embryogenesis receptor kinase* – domínio cinase); BIN2 (*Brassinosteroid-insensitive 2*); BES1 (*BRI1-SEM-supressor 1*); RAN (*RAS-related nuclear protein*); NIG (*NSP-interacting GTPase* – porção C-terminal); KDNIK (*NSP-Interacting kinase* – domínio cinase); AtBiP2 (*Binding proteing 2*); AtBiP3 (*Binding proteing 3*); NSP (*Nuclear Shuttle Protein*) de CaLCuV (Tabela 1).

Tabela 1- Oligonucleotídeos usados em reação de PCR.

Nome	Oligonucleotídeos	Sequência (5'→3')
KDSERK1	KDSERK1 FWD KDSERK1 RVS ST	AAAAAGCAGGCATGGGACAGCTCAAGAGGT AGAAAGCTGGGTCTTACCTTGGACCAGATAACTC
BIN2	BIN2 FWD BIN2 RVS NS	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCTGATGATAAGGA AGAAAGCTGCTTAAGTTCCAGATTGATTCAAGAA
BES1	BES1 FWD BES1 RVS NS	AAAAAGCAGGCTTCACAATGACGTCTGACGGAGC AGAAAGCTGGGTCACTATGAGCTTTACCATTTC
L10A	L10A FWD L10 RVS NS	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGAAGAAGACCTGT AGAAAGCTGGGTCTAGTGGGCTGGCAAAAAGGC
NSP-CL	NSP-CL FWD NSP-CL RVS ST	AAAAAGCAGGCTTCACAATGTATCCTACAAAAGTTT AGAAAGCTGGGTCTTAACCTAAATAATCAAGATC
RAN1	RAN1 FWD RAN1 RVS NS	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCTCTACCTAACCA AGAAAGCTGGGTCTCAAAGATATCATCATCGTC
L10B	L10B FWD L10C L10B RVS ST	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGACCAAGACCTGC AGAAAGCTGGGTCTCACTGTGCACCAGCTGACAA
NIG	301NIG FWD NIG BRVS ST	AAAAAGCAGGCTTCATCACAATGCAAGCACCCTATCGACC AGAAAGCTGGGTCTTACCCAAATGGGTTTCCTCC
AtBiP2	AtBiP2 FWD AtBiP2Bi RVS NS	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCTCGCTCGTTTGG AGAAAGCTGGGTCTGAGCTCATCGTGAGACTCATC
AtBiP3	AtBiP2 FWD AtBiP2Bi RVS NS	AAAAAGCAGGCTTCACAATGATTTTTATCAAGGA AGAAAGCTGGGTCTACGATTCTATAACTCTACGT
KDNIK	KDNIK FWD KDNIK RVS ST	AGAAAGCTGGGTCTCATCTAGGACGACCAGAGAGCT
pEXAD502	pEXAD502 FWD pEXAD502 RVS	CGGTCCGAACCTCATAACAAC GTAAATTTCTGGCAAGGTAGAC
CaLCuV-B	PCR c1 PBL1V2040	CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA GCCTCTGCAGCARTGRTGKATCTTCATACA
attb1	<i>Primer Gateway</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT
attb2	<i>Primer Gateway</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
pDON201	pDON201 FWD pDON201 RVS	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
pDEST15	4798 - GST FWD	CCAATGTGCCTGGATGCGTTCC
pK7Fw-G2	4799 – GFP RVS	CGCCCTCGCCCTCGCCGCACAC
pDEST22	pDEST 22 RVS	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
35S	MC36 FWD	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
MP CLCV	MPCLCV FWD MPCLCV RVS	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAATTCTCAGTTAGC AGAAAGCTGGGTCTTATTGCAATGACTTTGTTGTGG
AtRPS5A	AtRPS5A FWD AtRPS5A RVS ST AtRPS5A RVS NS	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCCACC GCCG CAGA AGAAAGCTGGGTCTTAACGATTAGCCTTGGCAAC AGAAAGCTGGGTACGATTAGCCTTGGCAAC

Escrutínio de cDNAs pelo sistema duplo híbrido de leveduras

A levedura da linhagem AH109 foi transformada com 5 µg de pUFV888 (pBD-MP), e 2,5 µg de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA), pelo método de acetato de lítio e polietilenoglicol (PEG). Os

transformantes foram selecionados a 28°C em meio com deficiência em *leucina*.

Após a transformação, quatro colônias dos transformantes de AH109 selecionados foram estriadas (estrias simples) em placas contendo meio seletivo com deficiência em *leucina* e *histidina*, além de placas contendo meio seletivo com deficiência em *leucina*, *histidina* e suplementado com 10; 25; 50; 75 e 100 mM de 3-aminotriazol.

Após trinta e seis horas a 28°C, uma das colônias transformantes (denominada pUFV1282) foi utilizada para a co-transformação com 12,5 µg de biblioteca de cDNA em pEXPAD502 e 400 µg de DNA carreador, seguindo as instruções do protocolo *Matchmaker Yeast Two-Hybrid System* (Clontech). Os duplo transformantes foram selecionados em meio seletivo com deficiência em *leucina*, *triptofano* e *histidina*, mas suplementado com 10 mM de 3-aminotriazol a 28°C. Os duplo transformantes selecionados foram repicados em placas contendo meio com deficiência em *leucina*, *triptofano*, *histidina* e suplementados com 10mM de 3-aminotriazol e, em seguida, transferidos para uma membrana de nylon que foi incubada sobre meio seletivo com deficiência em leucina e triptofano, por dois dias a 28°C para ensaio de β-galactosidase. As células de leveduras foram lisadas em nitrogênio líquido por 12 segundos. Após o descongelamento, a membrana foi colocada em contacto com papel de filtro embebido em tampão Z (Na₂HPO₄. 7 H₂O 16,1g/L; NaH₂PO₄. H₂O 5,5 g/L; KCl 0,75 g/L; MgSO₄ 7 H₂O 0,246 g/L), β-mercaptoetanol e X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) e incubada, na ausência de luz, a 28°C por 6 horas.

Colônias positivas para a atividade da β -galactosidase foram crescidas em meio líquido com deficiência em *leucina* e *triptofano*. O DNA plasmidial das colônias selecionadas foi extraído pelo *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), utilizando pérolas de vidro para o rompimento das células de levedura. O DNA plasmidial foi utilizado para retransformar *E. coli* DH5 α , por eletroporação. Os transformantes foram selecionados em meio contendo ampicilina e confirmados por PCR, usando os oligonucleotídeos do vetor pEXPAD 502 (Tabela 1). Além da reação de PCR, o DNA plasmidial foi quantificado por espectrofotometria (*Evolution 60 Thermo Scientific*) para sequenciamento.

Clonagem de possíveis cDNAs candidatos completos em vetores de expressão em bactérias, leveduras e plantas

Após o sequenciamento, as sequências dos cDNAs clonados no vetor pEXPAD 502, foram analisadas com o auxílio do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana* o gene *RPS5A* foi isolado, usando os oligonucleotídeos específicos que contêm uma sequência *attB* na extremidade 5' (Tabela 1). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e purificados com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Após a purificação, o fragmento purificado foi inserido no vetor de entrada pDONR201, por recombinação, usando *BP clonase* (Invitrogen), gerando os clones pDON-RPS5AST (pUFV1511.1), com códon de terminação, e pDON-RPS5ANS

(pUFV1512.1), sem códon de terminação. O inserto de pDON-RPS5AST foi transferido, por recombinação através de *LR clonase* (Invitrogen), para os vetores de expressão em levedura e bactéria, pDEST22 (Invitrogen) e pDEST15 (Invitrogen), respectivamente, resultando nas construções de DNA pDEST22-RPS5A (pUFV1517) e pDEST15-RPS5A (pUFV1518). A expressão de pDEST22-RPS5A em leveduras produz a proteína RPS5A (*Ribosomal Protein S5A*) fusionada ao domínio de ativação do Gal4. Já o clone pDEST15-RPS5A permite a expressão em bactérias da proteína RPS5A fusionada a cauda de GST (Gluthationa-S-transferase) na porção N-terminal. O inserto de pDON-RPS5ANS também foi transferido para o vetor binário de transformação em planta pK7FWG2. O clone resultante pUFV1560, contém o cDNA de RPS5A fusionado à GFP (*Green Fluorescent Protein*), sob o controle do promotor 35S.

Todas as clonagens foram confirmadas por PCR, usando oligonucleotídeos específicos para vetores e RPS5A (Tabela 1).

Confirmação da interação entre *RPS5A* e *MP in vitro*, através do sistema de duplo híbrido, usando o cDNA completo de *RPS5A*

Levedura estirpe AH109 foi co-transformada sequencialmente com pDEST32-MP (pUFV1282) e pDEST22-RPS5A (pUFV1517) pelo método de acetato de lítio e polietilenoglicol (PEG), com 2,5 µg de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA). Os duplo transformantes foram selecionados a 28°C em meio com deficiência em *leucina* e *triptofano*. Dentre os transformates uma colônia foi selecionada e crescida em meio

com deficiência em *leucina*, *triptofano* e *hisitina* e suplementado com 5mM e 10mM de 3-aminotriazol. Em seguida, a atividade de β -galactosidase foi determinada quantitativamente, segundo protocolo descrito por Amberg et al (2005).

Preparo das células competentes e transformação de *E. coli* BL21 pLys

As construções pDEST15-RPS5A e pDEST17-MP foram usadas para transformar células competentes de *E. coli* BL21 pLys pelo método do choque térmico (Sambrook et al., 1989).

A transformação foi realizada adicionando 3 μ L (50 ng / μ L) de pDEST15-RPS5A e PDEST17-MP a alíquotas separadas de células competentes. A suspensão foi mantida em gelo por 30 minutos. Após esse tempo, procedeu-se um choque térmico de um minuto a 42°C e adicionou-se 1 mL de meio LB, seguido de incubação a 37°C, por uma hora. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 μ L de meio LB e plaqueadas em meio LB contendo ampicilina e clorafenicol, para seleção dos transformantes. Os transformantes resultantes foram denominados pUFV1564 e pUFV1616, respectivamente. A transformação foi confirmada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o vetor pDEST15 e RPS5A, bem como pDEST17 e MP.

Purificação de MP fusionada à cauda de histidina

A purificação da proteína recombinante MP fusionada a cauda de histidina foi realizada por cromatografia de afinidade com resina de Ni²⁺. Com esse objetivo, a síntese dessa proteína recombinante foi induzida pela adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), na concentração de 0,4mM à 500 mL de cultura, após essa cultura atingir A₆₀₀ = 0,8. A indução ocorreu por um período de 14 horas a 20°C. Após esse tempo de indução, as células induzidas foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos e ressuspensas em tampão de ligação (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM e Imidazol 10 mM, pH 8,0), contendo lisozima (100 mg/mL) e PMSF (0,8mM). As células foram mantidas no gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram lisadas por ultrassonicação, utilizando o *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (Cole Parmer), com os padrões de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos e centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C, com o intuito de remover os restos celulares. Ao sobrenadante foi adicionada a resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) ativada com Ni²⁺, previamente equilibrada com o tampão de ligação. A purificação foi realizada por batelada em condições nativas.

Purificação de RPS5A fusionada à cauda de GST

A purificação da proteína recombinante RPS5A fusionada a cauda de GST foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando a resina Glutathiona Sepharose 4B. Para a purificação, 250 mL de cultura foram induzidos pela adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), na

concentração de 0,4mM, após a cultura atingir $A_{600} = 0,6$ por 14 horas a 20°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos e ressuspensas em PBS 1X (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 10mM e KH_2PO_4 1,8mM, pH 7,3), acrescido de lisozima (1mg/mL), PMSF (0,8mM) e TitonX-100 (concentração final 1%). A suspensão celular foi mantida no gelo por 30 minutos. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. As células foram rompidas mecanicamente por ultrassonicação, utilizando o *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (Cole Parmer), com os padrões de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos. O sobrenadante foi ligado à resina Glutathione Sepharose *High Performance* (GE Healthcare), previamente equilibrada com PBS 1X. A purificação foi realizada pelo método Batch.

Confirmação da interação entre *RPS5A* e MP *in vitro*, através de *pull-down*

Para confirmar a interação de MP e RPS5A *in vitro*, os clones pUFV pUFV1616.1 (His-MP em BL21), pUFV1564 (GST-RPS5A em BL21) e pDEST15 (pGST) foram induzidos por 14 horas a 20°C pela adição de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), na concentração de 0,4mM, em 250mL de meio LB, contendo clorafenicol 35mg/mL e ampicilina 100mg/mL a 20°C, após as culturas atingirem uma $A_{600} = 0,6$. Após centrifugação a 5000 x g por 10 minutos a 4°C, as células foram ressuspensas em PBS 1X (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 10mM e KH_2PO_4 1,8mM, pH 7,3), contendo lisozima (1mg/mL); PMSF (0,8mM) e

TitonX-100 (concentração final 1%), mantidas no gelo por 30 minutos e clareadas por centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. Em seguida as células foram rompidas mecanicamente por ultrassonicação, utilizando o *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (Cole Parmer), com os padrões de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos. O sobrenadante foi coletado e incubado com a resina Glutathione Sepharose *High Performance* (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão de ligação (Tris-HCl 50mM, pH7,5; NaCl 120mM e Nonidet P-40 0,1% (v,v)) a 4°C por 2 horas sob agitação constante. O sobrenadante foi descartado, e a resina lavada dez vezes com o tampão de ligação. Após as dez lavagens, a resina foi ressuspensa em 120µL de tampão de ligação. Em seguida, 60µL da proteína HIS-MP purificada foi incubada com 70µL de suspensão GST-RPS5A:Glutathione Sepharose, bem como com 70µL de suspensão GST-Glutathione Sepharose em 500µL de tampão de ligação. As misturas foram mantidas por 2 horas a 4°C sob agitação constante e centrifugadas a 500 x g por 2 minutos a 4°C. Após lavagens com tampão de ligação por três vezes, a resina foi ressuspensa em 60µL de tampão de amostra SDS-1X. As proteínas ligadas foram resolvidas por SDS-PAGE 12%.

Expressão transiente em folhas de tabaco por agroinoculação

Clones de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contendo as construções de DNA de interesse foram crescidos em meio Rhizo a 28°C por 12 horas. Após esse período, procedeu-se à centrifugação a 8000

rpm por 5 min, seguindo-se à ressuspensão das células com 1 mL de tampão de infiltração ($MgCl_2$ 10 mM, MES 10 mM , pH 5,6, e 100 μ M de acetoseringona), para lavagem das células. Foi realizada mais uma centrifugação nas mesmas condições e as células foram mais novamente ressuspensas em 1mL de tampão de infiltração. Em seguida, as células foram diluídas no mesmo tampão para o valor de OD de 0,2. Com auxílio de seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de tabaco foram infiltradas, por meio de uma gentil pressão através dos estômatos da face abaxial.

Localização subcelular

Com o objetivo de observar a localização subcelular de RPS5A bem como sua localização quando co-expressa com a proteína MP de CaLCuV, foi realizada a expressão transiente de RPS5A fusionada a GFP (pUFV1578) na porção C-terminal bem como a expressão de MP fusionada a YFP (pUFV1572) na porção N-terminal em folhas jovens de tabaco. Três dias após a inoculação, as folhas transformadas foram observadas no microscópio LSM 510 META invertido (ZEISS), utilizando a objetiva de imersão de óleo de 40x1,4 e o laser de argônio. A análise foi realizada nas folhas, com explantes montados em água utilizando-se lâminas e lamínulas de vidro. Para a obtenção de imagens de expressão, YFP foi excitada a 514 nm, e sua emissão coletada a 535-590 nm. Já GFP foi excitada a 488 nm, e sua emissão foi coletada a 500-530 nm. O *pinhole* foi usualmente fixado, fornecendo uma faixa óptica de 1 a 1,5 μ m.

As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser” (ZEISS) e do programa Adobe Photoshop.

Isolamento da Fração Microsomal

Plantas jovens de tabaco foram agroinoculadas com GV3101, contendo a construção 35S::RPS5A-GFP (pUFV1578) e, após três dias, o material foliar foi coletado e congelado em nitrogênio líquido. Para a extração da fração microsomal, aproximadamente 2 g de tecido foliar foi triturado com nitrogênio líquido em almofariz e solubilizado em tampão de extração (Hepes pH 7,5 100 mM, sacarose 0,4 M, KCl 10 mM, EDTA 1mM, DTT 2 mM). O extrato resultante foi passado em peneira de 0,64 µm e centrifugado a 6.000 x g por 2 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi centrifugado a 13.000 x g por 20 minutos a 4°C. Uma fração do sobrenadante foi reservada como fração total e o restante foi centrifugado a 125.000 x g por 60 minutos. O sobrenadante foi coletado (fração solúvel) e o *pellet* foi ressuspensão em Tris 50 mM, pH7,5 e CaCl₂ 10 mM (fração microsomal). As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford., 1976) (BioRad), conforme recomendações do fabricante.

Western blot

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE com concentração de acrilamida + bis-acrilamida 12% (p/v; LAEMMLI, 1970), no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, EDTA 1 mM e SDS 3,5 mM) e

voltagem constante de 100V. Após a eletroforese, as proteínas corridas em gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento *Transblot* da BIORAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada com o reagente de bloqueio *Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk* (BIORAD) por 1 hora sob agitação constante à temperatura ambiente e lavada com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; NaCl 140 mM; Tween-20 0,1% (v/v)). Para imunodeteccção da proteína GFP-RPS5A foi utilizado o anticorpo anti-GFP (Invitrogen), na diluição de 1:10.000. Como segundo anticorpo, foi utilizado o anticorpo comercial de coelho IgG anti-coelho (SIGMA), conjugado à enzima fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:15.000. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se os substratos BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e NBT (azul-nitro tetrazólio; GIBCO BRL) em tampão (Tris-HCl 0,1 M pH 9,8; NaCl 0,1M; MgCl₂ 50mM).

PCR em tempo real

Todos os procedimentos de PCR em tempo real, incluindo testes, validações e experimentos, foram conduzidos seguindo informações contidas nos manuais fornecidos pela *Applied Biosystems*. As reações foram conduzidas no equipamento *ABI7500 Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems), usando *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos específicos para o cDNA de AtRPS5A (Tabela 2).

As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. A expressão gênica foi quantificada utilizando o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O oligonucleotídeo para o cDNA do gene da Actina foi usado como controle endógeno, para normalização dos dados.

Tabela 2 – Listagem dos oligonucleotídeos para qRT-PCR em *Arabidopsis thaliana*

Nome	Oligonucleotídeos	Sequências (5' → 3')
RPS5A	RPS5A FWD	AGGCTCAGTGCCCCATTG
	RPS5A RVS	CCTCCCGTGCATCATGAGA
Actina	Actina FWD	ATGTCGTGAGCCATCCTGTC
	Actina RVS	ACACCGGATTCGTGCGGCAT

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Construção de uma biblioteca de cDNA a partir de folhas de *Arabidopsis thaliana* infectadas com CaLCuV

Com a finalidade de identificar possíveis fatores de *Arabidopsis thaliana* capazes de interagir com MP de CaLCuV, ensaios típicos de duplo híbrido têm sido utilizados com frequência (Fontes and Lazarowitz, comunicação pessoal), embora relativamente pouco sucesso tenha sido relatado na literatura. Por exemplo, utilizando uma biblioteca de cDNA de folhas de *Arabidopsis thaliana* na fase de florescência clonada no vetor pEXAD 502 e MP como isca, foram feitas três triagens independentes com a cobertura de pelo menos 5X do genoma de *Arabidopsis* e, no entanto, não se conseguiu isolar qualquer interação positiva. Duas explicações principais apontam para o fracasso desses experimentos. Primeiro, sob expressão em leveduras, MP é direcionada à membrana plasmática (Frischmuth *et al.*, 2004) uma circunstância que dificulta a identificação, pelo sistema de duplo híbrido, de fatores do hospedeiro que interajam com a proteína viral. Entretanto, uma vez que, nestes ensaios de duplo híbrido, MP é fusionada ao domínio de ligação da proteína nuclear GAL4 que contem um sinal de localização nuclear, é possível que BD-MP seja redirecionada para o núcleo de células de leveduras, com alta frequência. Por outro lado, é possível que os mRNAs que codificam proteínas que interagem com MP estejam subrepresentados nas bibliotecas de cDNA, dificultando a detecção de interações com MP em ensaios de duplo

híbrido. Assim sendo, na tentativa de contornar esse problema, uma biblioteca duplo híbrido de cDNAs de folhas de *Arabidopsis thaliana* infectadas com CaLCuV foi construída como estratégia de identificação de fatores do hospedeiro capazes de interagir com MP. A hipótese central seria que a infecção por geminivírus induziria a expressão de fatores de hospedeiro que interagem com proteínas virais e, como consequência, uma biblioteca preparada a partir de folhas infectadas estaria enriquecida de cDNAs que codificam proteínas que interagem com MP.

A biblioteca de cDNA foi preparada a partir de mRNA de folhas sistêmicas infectadas com DNA-A e DNA-B de CaLCuV. O cDNA sintetizado foi fracionado por tamanho, sendo que as frações selecionadas (Figura 1, canaletas 6 a 14) para construção da biblioteca, foram de acordo com o resultado do PCR utilizando oligonucleotídeos (301NIG) que amplificam a porção C-Terminal de NIG (*NSP-Interacting GTPase*; Carvalho *et al.*, 2008) como molde (Figura 1).

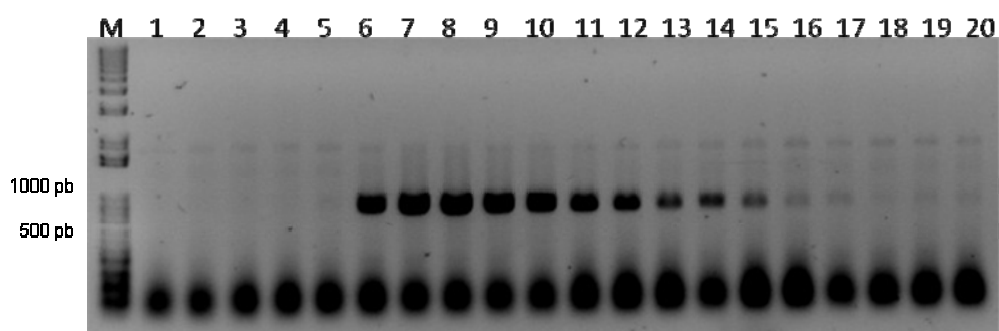


Figura 1- Fracionamento de cDNA sintetizado para construção da biblioteca duplo- híbrido. PCR utilizando como molde as frações de cDNA que foram eluídas da coluna cromatográfica de filtração gélida. Os *primers* de 301NIG foram utilizados na amplificação, gerando um fragmento de aproximadamente 900 pb. As alíquotas 6-14 foram agrupadas para dar prosseguimento à construção da biblioteca. M corresponde ao marcador de tamanho de fragmentos de DNA em pb.

A qualidade da biblioteca construída, foi avaliada por PCR, utilizando diversos oligonucleotídeos de *Arabidopsis thaliana*, além do oligonucleotídeo de NSP de CaLCuV (Figura 2).

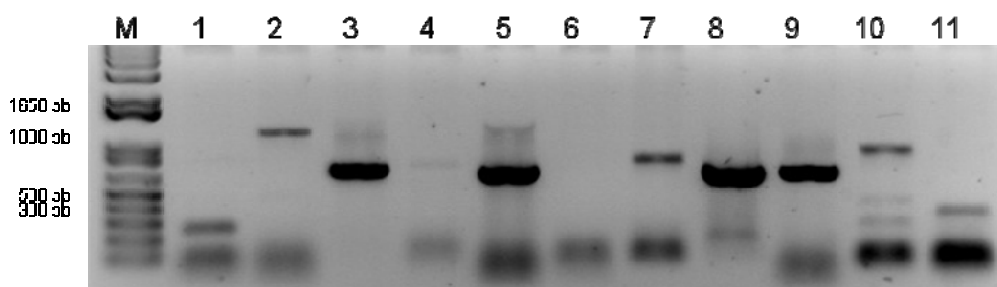


Figura 2- Amplificação de genes específicos a partir da biblioteca de cDNA. Alíquotas da biblioteca de cDNA foram utilizadas como molde em reações de PCR utilizando *primers* específicos de genes definidos. As canaletas representam: 1-KDSERK1; 2-BIN2; 3-KDNIK1; 4-BES1; 5-L10A; 6-BIP3; 7-NSP; 8-RAN1; 9-L10B; 10-301NIG; 11-BIP2. M corresponde ao marcador de tamanho de fragmentos de DNA em pb.

A amplificação eficiente dos genes BIN2, domínio *cinase* de NIK1, BES1, L10A, RAN1, L10B, porção C-Terminal de NIG, confirmaram a integridade do mRNA utilizado e validaram a representatividade da biblioteca de cDNA construída. Além disso, a amplificação do gene de NSP de CaLCuV confirmou se tratar de uma biblioteca de cDNA, preparada a partir de folhas de *Arabidopsis thaliana* infectadas com CaLCuV. A qualidade desta biblioteca e a abrangência dos genes encontrados permitiram que ela fosse utilizada em ensaios de duplo-híbrido.

Identificação de proteínas que interagem com MP através do sistema de duplo-híbrido.

Com o objetivo de identificar possíveis fatores do hospedeiro que fossem capazes de interagir com MP, foram utilizadas a biblioteca de cDNA de folhas de *Arabidopsis thaliana* infectadas com CaLCuV e MP como isca. Os duplo transformantes independentes (5×10^5) foram plaqueados em meio na ausência *leucina* e *triptofano*, com o intuito de selecionar os clones que continham ambos os plasmídeos de isca e da biblioteca de cDNA e determinar o título da biblioteca sendo escrutinada. Para varredura da biblioteca, os transformantes duplos foram plaqueados em meio na ausência de *leucina*, *triptofano* e *histidina* e suplementado com 10mM de 3-aminotriazol. Para selecionar interações entre MP e proteínas codificadas pelo cDNA da biblioteca, a suplementação do meio seletivo com 3-AT foi necessária, uma vez que o clone contendo a construção BD-MP foi capaz de crescer na ausência de histidina.

Tabela 3- Possíveis candidatos a interagir com a proteína de movimento de CaLCuV

Locus tag	E value	Identidade	Sequência Correspondente - BLASTN
At5g51550	4e-102	206/206 (100%)	EXL3 (Exordium Like 3)
At3g11940	9e-114	227/227 (100%)	RPS5A (Ribosomal Protein S5A)

Após a triagem, foram identificadas duas possíveis proteínas capazes de interagir com MP (Tabela 3). Após essa primeira identificação, objetivou-se determinar se as proteínas codificadas pelos cDNAs

candidatos interagiam especificamente com MP. Para isso, os plasmídeos da biblioteca foram recuperados desses dois clones e usados para retransformar a estirpe de seleção original. Os dois candidatos apresentados na Tabela 3, foram capazes de crescer em meio na ausência de *histidina* e presença de 10mM de 3-aminotriazol (Figura 3A), além de ativar a expressão gene repórter *LacZ*, evidenciado pela cor azul no teste da atividade da β -galactosidase (Figura 3B). Embora o controle negativo BD-MP + pEXPAD502 tenha sido capaz de crescer na ausência de *histidina*, ele não foi capaz de crescer no meio suplementado com 10mM de 3AT (Figura 3A).

MP interage com a Proteína Ribossomal S5A

Após a triagem pelo sistema do duplo-híbrido, foram identificados duas possíveis proteínas capazes de interagirem com a proteína de movimento MP de CaLCuV. Porém, a análise do resultado do sequenciamento evidenciou que o fragmento de cDNA correspondente a proteína Exordium Like 3 (EXL3), que foi clonado no vetor pEXPAD502, continha apenas 18 aminoácidos. O segundo cDNA isolado continha um fragmento de 102 bp (posições 522 a 624) do gene AT3G11940 que codifica a proteína 5A da subunidade menor do ribossomo (*ribosomal protein S5A*; RPS5A). Dessa forma, foi dado prosseguimento aos experimentos somente com o candidato com o cDNA correspondente à Proteína Ribossomal S5A (RPS5A).

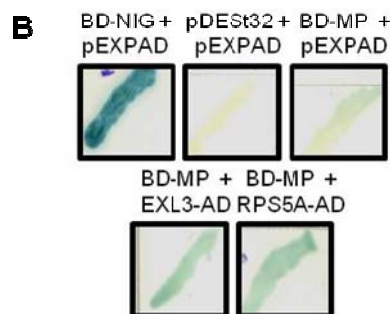
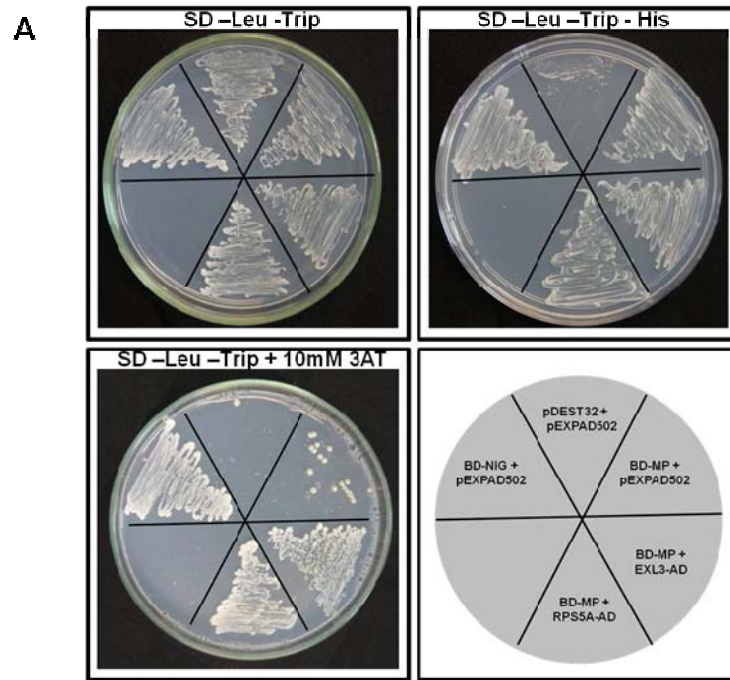


Figura 3- Possíveis proteínas de *Arabidopsis thaliana* capazes de interagirem com MP de CaLCuV. (A) As leveduras previamente transformadas com BD-MP e contendo o fragmento do cDNA de EXL3, bem como o fragmento do cDNA de RPS5A no vetor pEXPAD502 foram crescidas em meio seletivo deficiente em *leucina*, *histidina* e *triptofano* e suplementado com 10mM de 3-aminotriazol. O duplo transformante BD-MP + pEXPAD502, além do pDEST32 + pEXPAD502 foram utilizados como controle negativo. O controle positivo utilizado foi a proteína NIG clonada em pDEST-32 (Carvalho et al., 2008), que apresenta prototrofia à histidina. (B) Ensaio de β -galactosidase em leveduras. Duplos transformantes de levedura, contendo as construções BD-MP + EXL3-AD, bem como BD-MP + RPS5A-AD foram usados no ensaio de β -galactosidase. Como controle positivo foi usado o clone contendo as construções BD-NIG + pEXPAD502. Já como controle negativo, foram utilizadas as leveduras com as construções pDEST32 + pEXPAD502, além de BD-MP + pEXPAD502.

Para a confirmação da interação MP:RPS5A, o cDNA inteiro que codifica RPS5A foi fusionado ao domínio de ativação ao DNA, e essa construção foi utilizada para retransformar a levedura que continha BD-MP. A expressão da proteína quimérica AD-RPS5A em leveduras co-transformadas com BD-MP promoveu crescimento em meio na ausência de *histidina* e presença de 10mM de 3-aminotriazol (Figura 4A), bem como ativou a expressão gene repórter *LacZ* (Figura 4B). A ativação de *LacZ* foi verificada através de uma análise quantitativa da atividade de β -galactosidase. Em leveduras co-transformadas com as construções BD-MP + RPS5A-AD, a atividade de β -galactosidase ($0,0527 \pm 0,0056$) foi significativamente superior (ao nível de 5% pelo teste t) do que aquelas determinadas para os controles negativos pDEST32 + pDEST22 ($0,0208 \pm 0,0009$) e BD-MP + pDEST22 ($0,0249 \pm 0,0035$; Figura 4B).

O gene *RPS5A* pertence a uma pequena família de genes, designada RPS5 (*ribossomal protein S5*), que diferentemente de outras proteínas ribossomais (RPs) descritas em plantas, apresenta apenas dois membros, *RPS5A* e *RPS5B* (Weijers *et al.*, 2001). O gene *RPS5A* é altamente expresso em células em divisão, ao passo que o segundo membro da família, *RPS5B*, tem uma expressão menor quando comparado ao *RPS5A*, e está mais relacionado com diferenciação do que divisão celular (Weijers *et al.*, 2001).

A proteína codificada por *RPS5A*, é uma proteína pequena, de apenas 22,9 kDa, e faz parte da subunidade menor do ribossomo 40S.

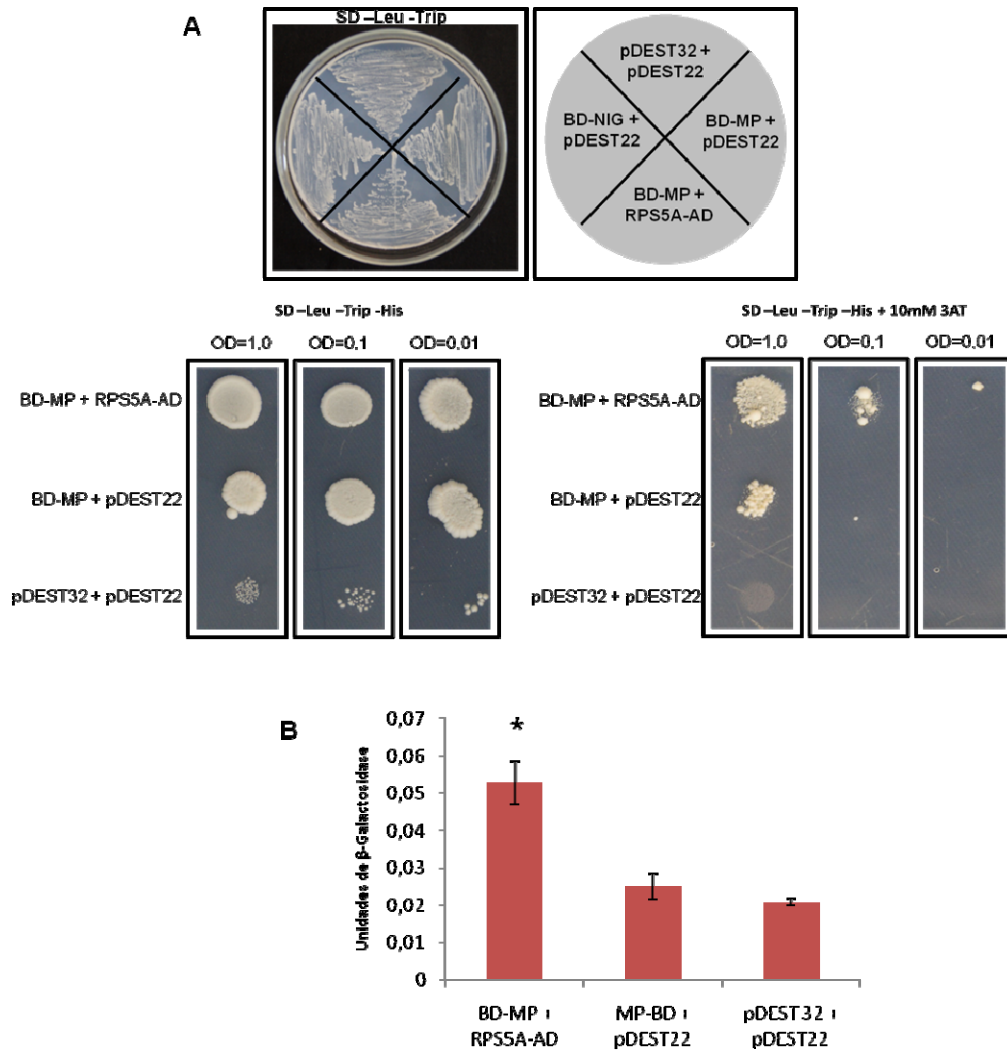


Figura 4- A proteína RPS5A completa fusionada a AD-Gal4 causa prototrofia à histidina em leveduras co-transformadas com BD-MP e ativa a expressão de *LacZ*. (A) Colônias de levedura co-transformadas com BD-MP + RPS5A-AD foram crescidas em meios seletivos na ausência de *leucina*, *triptofano* e *histidina*. O meio seletivo deficiente dos aminoácidos *leucina*, *triptofano*, *histidina* e suplementado de 10 mM de 3AT foi utilizado para a interação, uma vez que a levedura que contém BD-MP é capaz de crescer na ausência de *histidina*, mas não na presença de 3AT. pDEST32 + pDEST22, bem como BD-MP + pDEST22 foram utilizados como controle negativos. (B) Ensaio de ativação da expressão do gene *LacZ* por medida da atividade da enzima β -galactosidase. A atividade da enzima β -galactosidase foi expressa em unidades de β -galactosidase, em $\text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Asteriscos indicam que as médias são estatisticamente diferentes ao nível de 5% de significância pelo teste t.

Localização subcelular de RPS5A

A localização subcelular de RPS5A já está definida, uma vez que essa proteína é um dos componentes da subunidade menor do ribossomo. Entretanto, não existe qualquer evidência na literatura de que sua localização subcelular tenha sido confirmada pelo uso do confocal ou por métodos bioquímicos de fracionamento. Dessa forma, com a finalidade de confirmar a localização subcelular de RPS5A, foi realizado um ensaio de expressão transiente mediado por *Agrobacterium* em células da epiderme de folhas de tabaco e a localização de RPS5A-GFP foi observada por microscopia confocal. Diferentemente do que era esperado, a proteína RPS5A foi localizada no núcleo, conforme julgado pela intensa fluorescência concentrada nos núcleos das células (Figura 5A). Sendo uma proteína ribossomal, era esperado que a localização de RPS5A estivesse concentrada mais especificamente no nucléolo, onde os ribossomos são montados, e na porção citoplasmática, particularmente nas membranas dos retículos endoplasmáticos rugosos, o que não foi observado. No caso da proteína ribossomal rpL10A (*ribosomal protein L10A*), a idade da planta influencia na localização dessa proteína, alterando a proporção de células expressando-a no núcleo e citoplasma. Plantas mais jovens tem uma maior proporção de células expressando rpL10A no núcleo (Kênia Lopes Viçoso, comunicação pessoal). A localização exclusiva da proteína RPS5A no núcleo nos experimentos de confocal também pode ser devido ao estágio de desenvolvimento precoce das folhas de tobacco usadas para expressão da proteína quimérica.

Para confirmar a localização da proteína RPS5A, foi realizado um fracionamento microssomal de extratos foliares de tabaco, expressando transientemente a proteína quimérica RPS5A-GFP por agroinoculação. Neste experimento, as frações microssomais foram preparadas a partir de seções de folhas não muito jovens de tabaco infiltradas com *Agrobacterium* carreando a construção RPS5A-GFP e sondadas com o anticorpo anti-GFP. O experimento de fracionamento celular evidenciou a localização da proteína RPS5A na fração microssomal (Figura 5C), sugerindo a localização dessa proteína em ribossomos associados ao retículo endoplasmático.

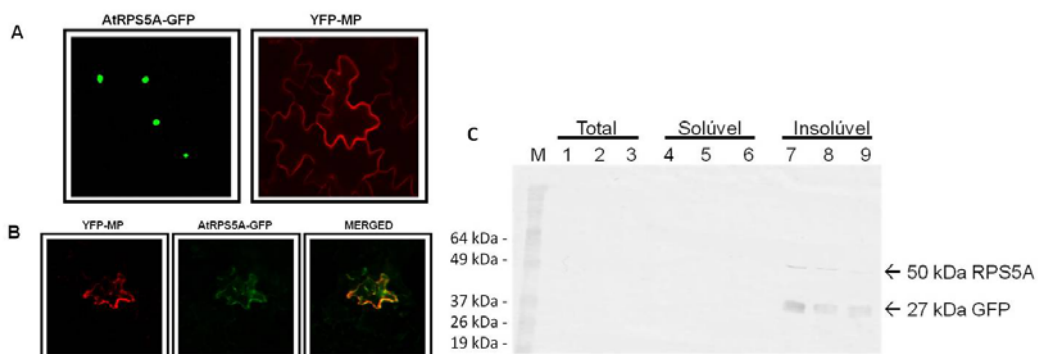


Figura 5- Localização subcelular da proteína RPS5A e MP. (A) (B) Folhas de tabaco foram infiltradas com GV3101 contendo as construções RPS5A-GFP, bem como YFP-MP e após 3 dias as imagens foram obtidas por confocal. (A) Determinação da localização subcelular de RPS5A e MP, fusionadas a GFP e YFP, respectivamente. (B) Colocalização de RPS5A e MP quando co-expressas em células da epiderme de folhas de tabaco. (C) Folhas de tabaco, expressando transientemente a proteína RPS5A, foi submetida a um fracionamento celular, por centrifugação diferencial. Canaletas 1 a 3 representam a fração total de três repetições biológicas; 4 a 6 representam a fração solúvel de três repetições biológicas e 7 a 9 representam a fração insolúvel de três repetições biológicas.

Experimentos de expressão transiente da proteína de movimento de CaLCuV fusionada a uma cauda de GFP por agroinoculação em folhas de tabaco demonstraram que MP de CaLCuV localiza-se no citoplasma

das células (Carvalho *et al.*, 2008). Esses resultados foram confirmados por meio de microscopia confocal de folhas de tabaco expressando MP fusionada a uma cauda de YFP (Figura 5A). Diferentemente do que foi observado para RPS5A-GFP (Figura 5A), em que o sinal de fluorescência foi concentrado exclusivamente no núcleo das células transfectadas, a proteína RPS5A-GFP também se localiza no citoplasma quando co-transfectada por agroinoculação com YFP-MP (Figura 5B). Estes resultados sugerem que a concentração de RPS5A-GFP no citoplasma em níveis de fluorescência detectáveis possa ser devido a interações com a proteína MP *in vivo*. Experimentos de fluorescência bimolecular (BiFC) são necessários para confirmar esta possibilidade.

MP e GST-RPS5A interagem diretamente *in vitro*

Com a finalidade de confirmar a interação específica entre MP e RPS5A *in vitro*, foi realizado um ensaio de *pull-down* e foi testada a capacidade da proteína MP de ligar-se a GST-RPS5A *in vitro*. Para isso, a proteína de movimento de CaLCuV fusionada a histidina e a proteína ribossomal S5A fusionada a GST foram produzidas em *E. coli* e purificadas (Figura 6). Embora a eficiência de expressão de GST-RPS5A tenha sido baixa, uma vez que não foi detectada claramente uma banda induzida de peso molecular de 49 kDa no extrato induzido de bactérias (dado não mostrado), a proteína quimérica GST-RPS5A ($M_r = 49.0000$) foi purificada a partir de extratos bacterianos induzidos por IPTG, em níveis baixo de homogeneidade (Figura 6C). Por outro lado, a expressão da

proteína recombinante HIS-MP foi eficientemente induzida com IPTG com acúmulo predominante na fração total, embora um pequeno acúmulo na fração solúvel e insolúvel tenha sido observado (Figura 6A). Pelo processo de purificação, a partir da fração solúvel de extratos bacterianos induzidos, obteve-se uma proteína recombinante, de aproximadamente 34 kDa correspondente ao peso molecular estimado para His-MP, bem como um contaminante de aproximadamente 90 kDa que pode representar proteína da bactéria associada à HIS-MP (Figura 6B). A proteína His-MP purificada foi utilizada, na sua forma nativa, no ensaio de *pull-down*.

Utilizando a proteína GST-RPS5A ligada a GST para direcionar o ensaio de *pull-down*, foi possível detectar uma banda de aproximadamente 34 kDa, similar ao peso molecular da proteína His-MP (Figura 6D, canaleta 1). Essa mesma banda não foi observada na canaleta referente à interação de pGST com HIS-MP. Entretanto, um contaminante de aproximadamente 30 kDa, persistiu na eluição de RPS5A. Assim, embora a intensidade da banda na canaleta de interação de GST-RPS5A com HIS-MP esteja mais forte, evidenciando presença de HIS-MP e conseqüentemente interação entre essas duas proteínas, é necessário que a identidade da proteína precipitada seja confirmada por *immunoblotting*.

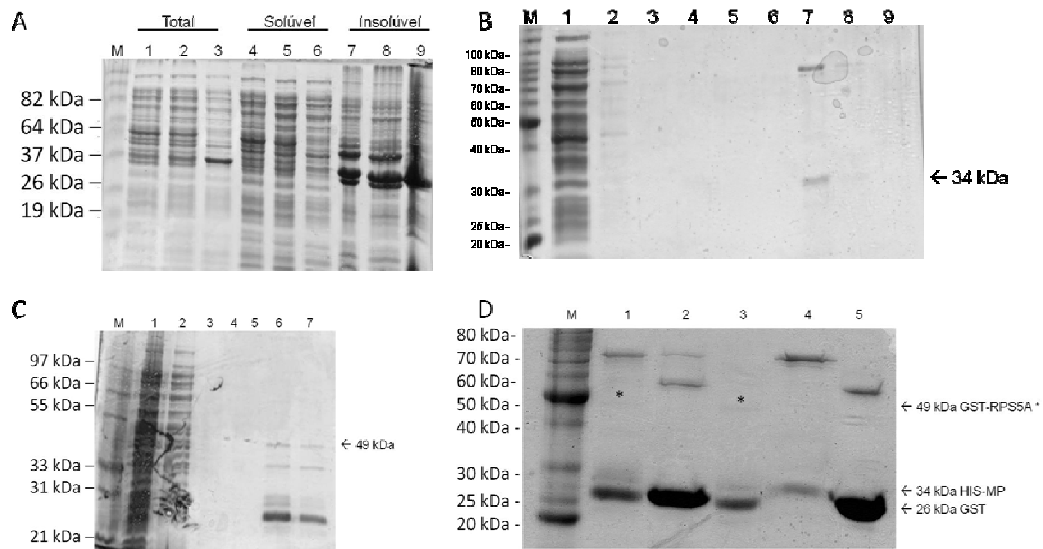


Figura 6- Confirmação da interação de MP e RPS5A *in vitro*, pelo método do pull-down. (A) Indução da proteína HIS-MP. Extratos de proteína total obtidas de células não transformadas (canaletas 1, 4 e 7) e de células transformadas, não induzidas (canaletas 2,5 e 8) e induzidas com IPTG (canaletas 3, 6, e 9) foram separados por SDS-PAGE. (B) Purificação de HIS-MP. O número 1 refere-se à fração não ligante, 2 a 6 são as lavagens feitas na resina, e 7 a 9 correspondem a primeira, segunda e terceira eluições, respectivamente. (C) Purificação de GST-RPS5A. O número 1 refere-se à fração não ligante, 2 a 5 são as lavagens feitas na resina, e 6 e 7 correspondem a primeira e segunda eluições, respectivamente. (D) Interação *in vitro* de MP e RPS5A. A proteína recombinante HIS-MP purificada (canaleta 4) foi incubada com GST-RPS5A (canaleta 3) ou pGST (canaleta 5) e adsorvidas em Glutathiona Sepharose. A canaleta 1 corresponde a mistura de HIS-MP com GST-RPS5A e a canaleta 2 a mistura de HIS-MP com pGST. M- Marcador de massa molecular em kDa. Asteriscos indicam a banda de 49.000 correspondente a GST-PRS5A.

A expressão de *AtRPS5A* é regulada negativamente por infecção por CaLCuV em *Arabidopsis thaliana*

Uma vez que *RPS5A*, foi isolado pelo sistema de duplo híbrido, usando uma biblioteca de cDNA de folhas de *Arabidopsis thaliana* infectada com CaLCuV, objetivou-se examinar se a infecção causava alguma alteração na expressão do gene *RPS5A*. A hipótese original era que a infecção viral fosse capaz de regular positivamente a expressão de

RPS5A, uma vez que esta foi identificada em uma biblioteca de cDNA de plantas infectadas. Entretanto, a análise de expressão do gene *RPS5A* conduzida por RT-PCR quantitativo, revelou que a expressão desse gene era regulada negativamente por infecção por CaLCuV (Figura 7).

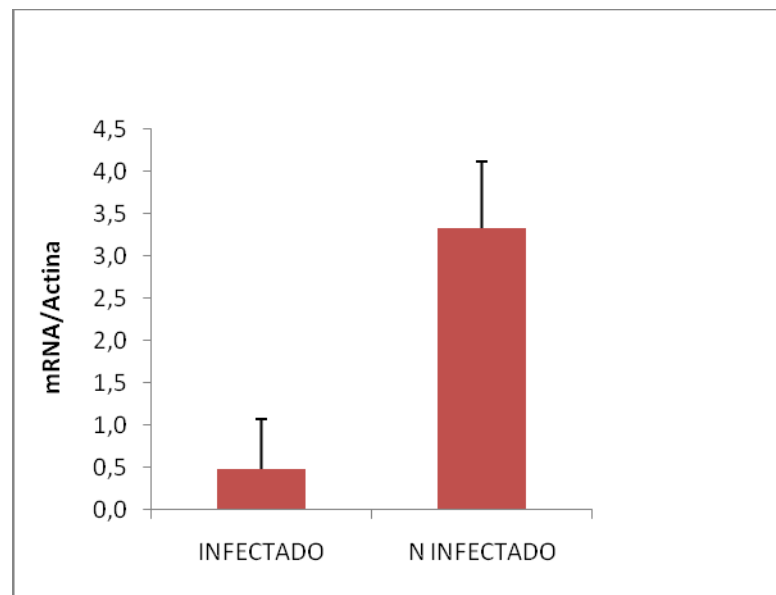


Figura 7- Regulação do gene *ATRPS5A* por infecção viral. *Arabidopsis thaliana* foram bombardeadas com com plasmídeos, contendo repetições parciais em *tandem* do DNA-A e DNA-B de CaLCuV e com tungstênio. Após confirmação da infecção por PCR, o RNA foi extraído das plantas positivas para infecção bem como daquelas bombardeadas apenas com tungstênio (não infectadas). A avaliação da regulação do gene *RPS5A* foi calculada usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Actina. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de pools de três réplicas biológicas validadas individualmente.

Recentemente, o laboratório de biologia molecular de plantas/Bioagro conduziu experimentos de sequenciamento de RNA para identificar a variação global na expressão gênica promovida pela infecção de geminivírus em tomateiros (dados não publicados). Foi verificado que a infecção por geminivírus suprime a expressão de genes ribossomais predominantemente. Entre eles, destaca-se o gene que codifica a

proteína RPS5A de tomateiros, o que está consistente com os resultados dessa investigação. Provavelmente, o sucesso no isolamento de RPS5A pela capacidade de interagir com MP tenha ocorrido devido a qualidade da biblioteca de cDNA utilizada nesta investigação e não a maior representatividade de seu mRNA em bibliotecas preparadas de folhas infectadas.

Modelo para significância biológica da interação MP:RPS5A

Evidências acumulam-se na literatura indicando que proteínas ribossomais exercem funções adicionais à montagem dos ribossomos. Um exemplo típico seria a proteína rpL10A que possui funções extraribossomais, participando de uma via de defesa da planta contra infecção por geminivírus (Fontes *et al.*, 2004; Carvalho *et al.* 2008; Santos *et al.* 2009). O processo de infecção por geminivírus ativa uma via de sinalização mediada pelo receptor transmembrana NIK (*NSP-Interacting Kinase*). Ativação de NIK, por sua vez, promove a fosforilação de rpL10A e seu redirecionamento para o núcleo, impactando negativamente a proliferação ou o movimento do vírus na planta (Santos *et al.*, 2010). Como resultado, os genes ribossomais são reprimidos o que deve levar a uma diminuição geral na síntese de proteínas, como mecanismo de defesa da planta. Entre os genes ribossomais reprimidos por infecção viral, destaca-se o gene *RPS5A* que pode exercer alguma atividade extraribossomal, contribuindo para o sucesso da infecção viral. Esta hipótese tem sido levantada devido à elevada expressão do gene *RPS5A* em células com alta taxa de divisão celular, como folhas jovens e

meristema apical da raiz (Weijers, 2001). Uma vez que a replicação do genoma viral depende extensivamente da maquinaria de replicação do hospedeiro, é razoável supor que proteínas do hospedeiro que participam em algum evento no processo de replicação possam também ser recrutadas pelo vírus e direcionadas para atuação na proliferação viral.

Essas proteínas do hospedeiro, necessárias para a replicação do genoma viral não são funcionais ou estão ausentes em células já diferenciadas. Vale ressaltar também que a replicação de geminivírus não ocorre em tecidos meristemáticos, que contêm alta taxa de divisão celular, e sim em células diferenciadas e, dessa forma, os fatores necessários para replicação do DNA não estão disponíveis. Assim, para replicarem seu genoma, os geminivírus induzem as células a um estado permissivo para a replicação do DNA, da mesma forma que os oncovírus o fazem (Ludlow, 1993; Moran, 1993; Vousden, 1993). Sendo assim, o DNA viral fita dupla (intermediários de replicação) são significativamente mais abundantes em núcleos isolados de células na fase S do que de núcleos de células em outras fases do ciclo celular (Accotto *et al.*, 1993).

Exemplos de proteínas da maquinaria de replicação do hospedeiro que são ativadas ou induzidas por geminivírus incluem a proteína RB (Aronson *et al.*, 2001; Settlage *et al.*, 2001) e PCNA (Egelkrout *et al.*, 2001; Nagar *et al.*, 1995). Em células animais, a passagem pela fase G1 do ciclo celular e a transição dessa fase para a fase S é regulada pela proteína RB que modula a atividade do fator de transcrição E2F, necessário para a regulação de uma série de genes requeridos para a transição da fase G1 para a fase S (Brhem & Kouzarides, 2000;

Weinberg, 1995). Tem sido demonstrado que a proteína RepA de *wheat dwarf virus* interage com RB de humanos e de plantas (Xie *et al.*, 2000). Similarmente, tem sido demonstrado que a proteína de replicação de CaLCuV também se liga às proteínas RBR de plantas. (Arguello-Astorga *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem um mecanismo pelo qual os geminivírus bloqueiam a atividade de RB e induzem as células do hospedeiro à fase S, favorecendo a replicação do DNA viral.

Levando-se em consideração que o vírus manipula a maquinaria celular de replicação a seu favor, que a expressão do gene *RPS5A* é mais elevada em células com alta taxa de divisão celular, que a proteína MP interage com *RPS5A* e que a expressão desse gene é regulada negativamente sob a condição de infecção, pode-se especular que essa proteína de alguma forma, pode favorecer a infecção viral. Como mecanismo de defesa do hospedeiro, a expressão do gene *RPS5A* é reprimida em resposta à infecção viral. Consistente com este argumento, a ativação da via de defesa do hospedeiro mediada pelo receptor NIK impacta negativamente a expressão do gene *RPS5A*, além de outros genes ribossomais (Elizabeth P B Fontes, comunicação pessoal).

CONCLUSÃO

A proteína de movimento (MP) de geminivírus bipartidos promove o movimento célula-a-célula, bem como o transporte a longas distâncias em plantas infectadas, além de influenciar a patogenicidade viral. Contudo, os detalhes funcionais desse processo ainda precisam ser determinados. A identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com MP corresponde à primeira etapa para o entendimento do mecanismo de transporte intercelular do DNA viral mediado pela proteína MP. Nessa investigação, é relatada a identificação da proteína RPS5A (*Ribosomal Protein S5A*) que associa com MP, por meio de varredura de uma biblioteca de cDNA, feita a partir de mRNA de folhas de *Arabidopsis thaliana* infectadas com CaLCuV, usando MP como isca.

Os resultados apresentados aqui forneceram evidências conclusivas de que MP e RPS5A formam um complexo estável. Inicialmente foi demonstrado, através do sistema de duplo híbrido, que tanto um fragmento de *RPS5A* quanto a proteína completa, quando fusionadas ao domínio de ativação de Gal4, foram capazes de ativar independentemente dois genes repórteres em leveduras contendo a construção BD-MP. Além disso, a proteína RPS5A associa-se com MP *in vitro*, conforme julgado por ensaios de *pull-down*. Finalmente, expressão transiente de MP em folhas de tabaco retém a proteína RPS5A no citoplasma em maior proporção, evidência de uma possível interação *in vivo*.

Embora uma possível função extraribossomal para RPS5A não tenha sido demonstrado, algumas evidências sugerem que a interação MP-RPS5A possa ser biologicamente relevante. Foi demonstrado por meio de qRT-PCR que a expressão do gene RPS5A é reprimida durante a infecção por geminivírus. Evidências recentes por meio de análises de variação global de expressão gênica indicam que a regulação negativa de um conjunto de genes ribossomais é parte de um mecanismo de defesa da planta contra geminivírus. Dentro desse contexto, é razoável supor que a interação MP-RPS5A contribua positivamente para o ciclo de infecção viral. A confirmação de que MP interage com RPS5A in vivo poderá fornecer subsídios adicionais em suporte a esta interpretação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCOTTO, G.P., MULLINEAUX, P.M., BROWN, S.C., MARIE, D. (1993) Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. *Virology* 195, p. 257-259.
- ACH, R.A., DURFEE, T., MILLER, A.B., TARANTO, P., HANLEY-BOWDOIN, L., ZAMBRYSKI, P.C., GRUISSEM, W. (1997) RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol.* 17, 5077–5086
- AMBERG, D. C. BURKE, D. J. STRATHERN, J. N. (2005). Assay of β -Galactosidase in Yeast: Assay of Crude Extracts. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- ANTIGNUS, Y., VUNSH, R., LACHMAN, O., PEARLSMAN, M., MASLENIN, L., HANANYA, U., ROSNER, A. (2004) Truncated Rep gene originated from *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (Mild) confers strain-specific resistance in transgenic tomato. *Ann. Appl. Biol.* 144, 39-44.
- ARAGÃO, F.J.L. & FARIA, J.C. (2009) First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nature Biotechnology* 27, 1086 – 1088.
- ARGUELLO-ASTORGA, G., LOPEZ-OCHOA, L., KONG, L.J., OROZCO, B.M., SETTLAGE, S.B., HANLEY-BOWDOIN, L. (2004) A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *J Virol.* 78, 4817–4826
- ARONSON, M., MEYER, A.D., GYÖRGYÉY, J., KATUL, L., VETTEN, H.J., GRONENBORN B., TIMCHENKO T. (2001) Clink, a Nano-virus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *Journal of Virology* 74, p. 2967-2972,
- ASAD, S., HARIS, W. A., BASHIR, A., ZAFAR, Y., MALIK, K.A., MALIK, N.N., LICHTENSTEIN, C.P. (2003) Transgenic tobacco expressing geminiviral RNAs are resistant to the serious viral pathogen causing cotton leaf curl disease. *Arch. Virol.* 148, 2341-2352.
- BEACHY, R.N. (1999) Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 354, p. 659–664.

- BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S.G., ÁVILA, A.C., GIORDANO, L.B. (1996) Survey of geminivirus in tomato producing áreas in Federal District. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 8., 1996. São Lourença: Sociedade Brasileira de Virologia, p.289, 1996.
- BONFIM, K., FARIA, J.C., NOGUEIRA, E.O.P.L., MENDES, E.A., ARAGÃO, F.J.L. (2007) RNAi-Mediated Resistance to *Bean golden mosaic virus* in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 717-726.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 171, p. 248-254.
- BREHM, A., KOUZARIDES, T. (1999) Retinoblastoma protein meets chromatin. *Trends Biochemical Sciences* 24, p. 142-145.
- BROUGH, C.L., HAYES, R.J., MORGAN, A.J., COUTTS, R.H.A., BUCK, K.W. (1988) Effects of mutagenesis in vitro on the ability of cloned tomato golden mosaic virus DNA to infect *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of General Virology*. 69, 503-514.
- BRUNETTI, A., TAVAZZA, R., NORIS, E., LUCIOLI, A., ACCOTTO, G.P., TAVAZZA, M. (2001) Transgenically expressed T-Rep of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* acts as a *trans*-dominant-negative mutant, inhibiting viral transcription and replication. *J. Virol.* 75, 10573-10581.
- CARVALHO, C.M., FONTENELLE, M.R., FLORENTINO, L.H., SANTOS, A.A., ZERBINI, F.M., FONTES, E.P.B. (2008). A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant J.* 5, 869-80.
- CARVALHO, M.F., LAZAROWITZ, S.G. (2004) Interaction of the movement protein NSP and the *Arabidopsis* acetyltransferase AtNSI is necessary for cabbage leaf curl geminivirus infection and pathogenicity. *J Virol.* 78, 11161–11171.
- CARVALHO, M.F., TURGEON, R., LAZAROWITZ, S.G. (2006) The Geminivirus Nuclear Shuttle Protein NSP Inhibits the Activity of AtNSI, a Vascular-Expressed *Arabidopsis* Acetyltransferase Regulated with the Sink-to-Source Transition. *Plant Physiology*. 140, 1317-1330.
- CHAKRABORTY, S., VANITHARANI, R., CHATTOPADHYAY, B., FAUQUET, C.M. (2008) Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India. *J Gen Virol.* 89, 818–828.

- CHELLAPPAN, P., MASONA, M.V., VANITHARANI, R., TAYLOR, N.J., FAUQUET, C.M. (2004) Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in cassava. *Plant Mol. Biol.* 56, 601-611.
- CHELLAPPAN, P., VANITHARANI, R., FAUQUET, C.M. (2005) MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 10381–10386.
- COSTA, A.S. (1976) Whitefly-transmitted plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 16, p. 429-447.
- DAY A. G., BEJANARO, E. R., BUCK, K. W., BURRELL, M., LICHTENSTEIN, C. P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, p. 6721-6725.
- DOGRA, S.C., EINI, O., REZAIAN, M.A., RANGLES, J.W. (2009) A novel shaggy-like kinase interacts with the *Tomato leaf curl virus* pathogenicity determinant C4 protein. *Plant Mol Biol.* 71, 25–38.
- EGELKROUT, E.M., OROZCO, B.M., HANLEY-BOWDOIN, L. (2001) A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional activation. *Plant Cell* 6, p. 1157-1170.
- ELMER, J.S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W., BISARO, D.M., ROGERS, S.G. (1998) Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Resort.* 16, 7043–7060.
- ETESSAMI, P., CALLIS, R., ELLWOOD, S., STANLEY, J. (1988) Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. *Nucleic Acids Research.* 16, 4811-4829.
- FARIA, J.C., BEZERRA, I.C., ZERBINI, F.M., RIBEIRO, S.G. & LIMA, M.F. (2000) Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 3, p. 125-137.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, V.; BALL, L. A. (2005) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses; eighth report of the International Commiottee on the Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, p. 1259.
- FAUQUET, C.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, M., ZHOU, X. (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.* 153, 783–821.
- FLORENTINO, L.H., SANTOS, A.A., FONTENELLE, M.R., PINHEIRO, G.L., ZERBINI, F.M., BARACAT-PEREIRA, M.C., FONTES, E.P.B. (2006) A PERK-Like receptor kinase interacts with the geminivirus

nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *Journal of Virology*. 80, 6648-6656.

FONTES, E.P.B., EAGLE, P.A., SIPE, P.S., LUCKOW, V.A., HANLEY-BOWDOIN, L. (1994) Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J Biol Chem*. 269, 8459-8465.

FONTES, E.P.B., LUCKOW, V.A., HANLEY-BOWDOIN, L. (1992) A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*. 4, 597-608.

FONTES, E.P.B., SANTOS, A.A., LUZ, D.F., WACLAWOVSKY, A.J., CHORY, J. (2004) The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & Development*. 18, 2545-2556.

FRANÇA, F. H., VILLAS-BOAS, G. L. & BRANCO, M. C. (1996) Ocorrência de *Bemisia argentifolii* (Homóptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Annual of the Society of Entomology of Brasil*. 25, p. 369-372.

FREISCHMUTH, S., KLEINOW, T., ABERLE, H.J., WEGE, C., HÜLSER, D., JESKE, H. (2004) Yeast two-hybrid systems confirm the membrane association and oligomerization of BC1 but do not detect an interaction of the movement proteins BC1 and BV1 of *Abutilon* mosaic geminivirus. *Arch Virology* 149, p. 2349-2364

GHANIM, M., MORIN, S., CZOSNEK, H. (2001) Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology*. 91, 188–196.

GUTIERREZ, C. (1999) Geminivirus DNA replication. *Cell Mol Life Sci*. 56, 313–329.

GUTIERREZ, C. (2002) Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiol Mol Plant Pathol*. 60, 219–230.

HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S., ROBERTSON, D. (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Plant Sci*. 35(2), 105–140.

HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., ROBERTSON, D. (2004) Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol Plant Pathol*. 5, 149–156.

HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S., ROBERTSON, D. (2000) Geminiviruses: models for plant DNA

- replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Plant Sci.* 35(2), 105–140.
- HAO, L., WANG, H., SUNTER, G., BISARO, D.M. (2003) Geminivirus AL2 and L2 Proteins Interact with and Inactivate SNF1 Kinase. *The Plant Cell*, 15, p. 1034-1048.
- HARRISON, B.D., SWANSON, M.M., FARGETTE, D. (2002) Begomovirus coat protein: serology, variation and functions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60, 257–271.
- HEHNLE, S., WEGE, C., JESKE, H. (2004) Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *J. Virol.* 78, 7698–7706.
- HEYRAUD-NITSCHKE, F., SCHUMACHER, S., LAUFS, J., SCHAEFER, S., SCHELL, J., GRONENBORN, B. (1995) Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Res.* 23, 910–916.
- HÖHNLE, M., HÖFER, P., BEDFORD, I.D., BBRIDDON, R.W., MARKHAM, P.G., FRISCHMUTH, T. (2001) Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible *Abutilon* mosaic virus isolate. *Virology.* 290, 164-171.
- INGHAM, D.J., PASCAL, E., LAZAROWITZ, S.G. (1995) Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology.* 207, 191-204.
- KRENZ, B., WINDEISEN, V., WEGE, C., JESKE, H., KLEINOW, T. (2010) A plastid-targeted heat shock cognate 70 kDa protein interacts with the *Abutilon* mosaic virus movement protein. *Virology.* 401, 6-17.
- KUNIK, T., SALOMON, R., ZAMIR, D., NAVOT, N., ZEIDAN, M., MICHELSON, I., GAFNI, Y., CZOSNEK, H. (1994) Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Biotechnology*, 12, p. 500–504.
- LAZAROWITZ, S.G. (1992) Geminiviruses: genomes structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Science.* 11, 327-349.
- LAZAROWITZ, S.G., BEACHY, R.N. (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell.* 11, 535–548.
- LEWIS, J.D., LAZAROWITZ, S.G. (2010) *Arabidopsis* synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *PNAS.* 107(6), 2491-2496.

- LIMA, M.F., BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S. G. & de ÁVILA, A.C. (2000) Detection of sweet pepper whitefly-transmitted geminivirus in the "Submédio" of San Francisco Valley. Programa e Resumos, 22º Congresso Paulista de Fitopatologia, Jaboticabal, SP. p.106.
- LOURENÇO, A. L. & NAGAI, H. (1994) Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia*. 53, p. 53-59.
- LUDLOW, J.W. (1993) Interactions between SV40 large-tumorantigen and the growth suppressor proteins pRB and p53. *FASEB Journal* 7, p. 866-871.
- MARIANO, A.C., ANDRADE, M.O., SANTOS, A.A., CAROLINO, S.M.B., OLIVEIRA, M.L., BARACAT-PEREIRA, M.C., BROMMONSHENKEL, S.H., FONTES, E.P.B. (2004) Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*. 318, 24-31.
- MATYIS, J. C., SILVA, D. M., OLIVEIRA, A. R. & COSTA, A. S. (1975) Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*. 1, p. 267-275.
- MCGARRY, R.C., BARRON, Y.D., CARVALHO, M.F., HILL, J.E., GLOD, D., CHEUNG, E., KRAUS, W.L., LAZAROWITZ, S.G. (2003) A novel *Arabidopsis* Acetyltransferase Interacts with the Geminivirus Movement Protein NSP. *The Plant Cell*, 15, p. 1605-1618.
- MORALES, F.J. (2006) History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Adv Virus Res*. 67, 127–162.
- MORALES, F.J., JONES, P.G. (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Res*. 100, 57–65.
- MORIN, S., GHANIM, M., SOBOL, I., CZOSNEK, H. (2000) The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two hybrid system. *Virology*. 276, 404–416.
- MOURAN E. (1993). Interactions of adenoviral proteins with pRB and p53. *FASEB Journal* 7, p. 880-885.
- NAGAR, S., PDERSEN, T.J., CARRICK, K.M., HANLEY-BOWDOIN, L. (1995) A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7, p. 705-719
- NAGY, P.D. (2008), Yeast as a model Host to Explore Plant Virus-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 46, p. 217-242.

- NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. (1994) Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. *Cell*. 76, 925–932.
- PARK, J.A., AHN, J.W., KIM, Y.K., KIM, S.J., KIM, J.K., KIM, W.T., PAI, H.S. (2005) Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants. *Plant J.* 42, 153–163.
- PASCAL, E., GOODLOVE, P.E., WU, L.C., LAZAROWITZ, S.G. (1993) Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *The Plant Cell*. 5, 795-807.
- PASCAL, E., SANDERFOOT, A.A., WARD, B.M., MEDVILLE, R., TURGEON, R., LAZAROWITZ, S.G. (1994) The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *The Plant Cell*. 6, 995-1006.
- PIROUX, N., SAUNDERS, K., PAGE, A., STANLEY, J. (2006) Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with *Arabidopsis thaliana* shaggy-related protein kinase AtSK η , a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology* 362, p. 428–440.
- POLSTON, J.E. & ANDERSON, P.K. (1997) The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease*, 12, p. 1358-1369.
- POOMA, W., GILLETTE, W.K., JEFFREY, J.L., PETTY, I.T. (1996) Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology*, 218, p. 264–268.
- RIBEIRO, S.G., AMBROZEVICIUS, L.P., AVILA, A.C., BEZERRA, I.C., CALEGARIO, R.F., FERNANDES, J.J., LIMA, M.F., DE MELLO, R.N., ROCHA, H., ZERBINI, F.M. (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch. Virol.* 148, 281–295.
- RIBEIRO, S.G., ÁVILA, A.C., BEZERRA, I.C., FERNANDES, J.J., FARIA, J.C., LIMA, M.F., GILBERTSON, R.L., ZAMBOLIM, E.M., ZERBINI, F.M. (1998) Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Dis.* 82, 830.
- ROJAS, M.R., JIANG, H., SALATI, R., XOCONOSTLE-CAZARES, B., SUDARSHANA, M.R., LUCAS, W.J. AND GILBERTSON, R.L. (2001) Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*. 291, 110–125.

- ROJAS, M.R., HAGEN, C., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 361–394.
- ROJAS, M.R., NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. (1998). Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size specific manner. *Cell.* 95, 105–113.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATS, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- SANDERFOOT, A.A., LAZAROWITZ, S.G. (1995) Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *The Plant Cell.* 7, 1185-1194.
- SANDERFOOT, A.A., LAZAROWITZ, S.G. (1996) Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol.* 6, 353-358.
- SANTOS, A.A., CARVALHO, C.M., FLORENTINO, L.H., RAMOS, H.J.O., FONTES, E.P.B. (2009) Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. *PLoS ONE.* 4(6), e5781.
- SANTOS, A.A., LOPES, K.V.G., APFATA, J.A.C., FONTES, E.P.B. (2010) NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signaling. *Journal of Experimental Botany* 61, p. 3839-3845.
- SELTH, L.A., DOGRA, S.C., RASHEED, M.S., HEALY, H., RANGLES, J.W., REZAIAN, M.A. (2005) A NAC domain protein interacts with tomato virus replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell.* 17, 311– 325.
- SETTLAGE, S.B., MILLER, A.B., GRUISSEM, W., HANLEY-BOWDOIN, L. (2001) Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology.* 279, 570–576
- SINISTERRA, X.H., MCKENZIE, C.L., HUNTER, W.B., POWELL, C.A., SHATTERS, R.G. (2005) Differential transcriptional activity of plantpathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae). *J. Gen. Virol.* 86, 1525–1532.
- STANLEY, J. (1991) The molecular determinants of geminiviruses pathogenesis. *Seminars Virology*, 2, p. 139-149.

- STENGER, D.C. (1994) Strain-specific mobilization and amplification of a transgenic defective-interfering DNA of the geminivirus beet curly top virus. *Virology*, 203, p. 397–402.
- TRINKS, D., RAJESWARAN, R., SHIVAPRASAD, P.V., AKBERGENOV, R., OAKELEY, E.J., VELUTHAMBI, K., HOHN, T., POOGGIN, M.M. (2005) Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* 79, 2517–2527.
- VANITHARANI, R., CHELLAPPAN, P., PITA, J.S., FAUQUET, C.M. (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol.* 78, 9487–9498.
- VOUSDEN K. (1993) Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB Journal* 7, p. 872-879.
- WEIJERS, D., DIJK, M.F., VENCKEN, R., QUINT, A., HOOYKAAS, P., OFFRINGA, R. (2001) An *Arabidopsis* Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a *RIBOSOMAL PROTEIN S5* gene. *Development* 128, p. 4289-4299.
- WEINBERG, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and the cell cycle control. *Cell* 81, p. 323-330.
- XIE, Q., SANZ-BURGOS, A.P., GUO, H., GARCÍA, J.A., GUTIERREZ, C. (1999) GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology* 39, p. 647-656.
- YANG, Y., SHERWOOD, T.A., HIEBERT, C.P., POLSTON, J.E. (2004) Use of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) Rep gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology.* 94, 490-496.
- ZHANG, P., VANDERSCHUREN, H., FUTTERER, J., GRUISSEM, W. (2005) Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes. *Plant Biotechnol. J.* 3, 385-397.
- ZHANG, S.C., WEGE, C., JESKE, H. (2001) Movement proteins (BC1 and BV1) of *Abutilon* mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. *Virology.* 290, 249–260.
- ZHOU, Y.C., GARRIDO-RAMIREZ, E.R., SUDARSHANA, M.R., YENDLURI, S., GILBERTSON, R.L. (2007) The N-terminus of the begomovirus nuclear shuttle protein (BV1) determines virulence or

avirulence in *Phaseolus vulgaris*. Mol. Plant Microbe Interact. 20, 1523–1534.