

CAROLINA DA SILVA ROCHA

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO
MEDIADA PELA PROTEÍNA NIK, UM RECEPTOR QUE
INTERAGE COM A PROTEÍNA NSP DE GEMINIVÍRUS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

CAROLINA DA SILVA ROCHA

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO
MEDIADA PELA PROTEÍNA NIK, UM RECEPTOR QUE
INTERAGE COM A PROTEÍNA NSP DE GEMINIVÍRUS**

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

APROVADA: 1º de agosto de 2007.

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior
(Co-orientador)

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Co-orientador)

Prof^a. Maria Cristina Baracat Pereira

Pesq. Claudine Márcia Carvalho

Prof^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

Às pessoas mais importantes e queridas da minha vida: Meu lindo filho, Felipe, meu marido, Gustavo, meus queridos pais, Alaerte e Joana e minhas irmãs, Dani e Lu.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar por perto a cada passo e a cada queda, por me dar força e perseverança nos momentos difíceis. Por fazer da ciência algo magnífico.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso. Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, ao coordenador do curso, professor José Marcelo Soriano Viana, e aos professores da pós-graduação, pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela oportunidade de crescimento profissional, por permitir que em seu laboratório eu pudesse dar os primeiros passos na pesquisa, e pela sua orientação.

Aos professores Luciano Fietto e Murilo Zerbini, pela co-orientação e pela colaboração dada ao trabalho.

Ao Luís Antônio Contim, pelos ensinamentos durante a Iniciação Científica.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Proteômica, por tornar cada dia de trabalho ainda mais agradável, pelas risadas e pela ajuda. Em especial aos amigos pelo excelente convívio Max, Pedro, Rej, João, Breno, Gui. Ao Max e ao Pedro, obrigada pela ajuda na extração de RNA. À Claudine, muito obrigada pela dedicada ajuda nos experimentos de confocal, pela amizade e agradável convívio.

Ao estudante de Iniciação Científica João Paulo, pela incansável ajuda, pelas milhões de extrações de DNA, pelos trilhões de PCRs. João, muito obrigada!!!!

À minha eterna amiga Rej, que preencheu minha vida, minha casa, a bancada, com sua presença e risada magnífica. Pelo carinho, pela ajuda, por estar sempre por perto mesmo em pontas opostas do corredor.

À Marlene, pela competência e por proporcionar um bom trabalho a todos do LBMP.

Aos meus pais, pelo carinho e por cuidarem do meu filho por inúmeras vezes, em que fiquei trabalhando quando deveria estar com ele. Por acreditarem em mim e fazerem minha vida mais fácil e mais bela. Obrigada pai, obrigada

mãe, sem vocês não teria chegado até aqui. Às minhas irmãs, pelo amor, carinho, apoio e por me ouvirem sempre que precisei de um ombro amigo.

Ao meu marido e grande amigo, Gustavo, por sempre estar presente na minha vida, mesmo à distância. Por compreender a minha ausência, mesmo estando por perto. Por ser o amor da minha vida.

Ao meu filho, por ser a pessoa mais preciosa para mim. Obrigada, Felipe, por você existir e dar sentido à minha vida. Amo muito você!!!

A todos os amigos e familiares, que de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Carolina da Silva Rocha, filha de Alaerte Adão da Rocha e Joana D'Arc da Silva Rocha, nasceu no dia oito de outubro de 1979, em Viçosa, MG.

Em março de 2000, ingressou no curso de Agronomia, na Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como Engenheira Agrônoma em Julho de 2005.

Em Agosto de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de mestrado, na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Biologia Molecular de Plantas.

Em Agosto de 2007, submeteu-se à defesa de sua dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
I- INTRODUÇÃO.....	1
II- REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1- Geminivírus.....	5
1.1- Características gerais dos geminivírus.....	5
1.2- Taxonomia.....	5
1.3- Gênero begomovirus.....	7
1.4- Modelo de movimento intra e intercelular do DNA viral....	8
1.5- Replicação de begomovírus.....	10
2- Interação da proteína NSP com proteínas do hospedeiro....	11
3- Proteínas da família LRR-RLK.....	12
4- Proteínas ribossomias L10 e L18.....	13
III- MATERIAL E MÉTODOS.....	16
1- Material vegetal.....	16
2 – Construções de DNA.....	16
3 – Expressão heteróloga em <i>E. coli</i> e purificação de proteínas recombinantes.....	18
3.1 – Preparo das células competentes e transformação de <i>E. coli</i> BL21:DE3 (pLYSs).....	18
3.2 – Indução da expressão em <i>E. coli</i>	20
3.3- Obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis.....	20
3.4- Purificação e quantificação das proteínas recombinantes.....	21
4.- Ensaio de fosforilação in vitro.....	21
5 - Análises de seqüência de possíveis sítios de fosforilação das proteínas L10 e L18.....	22
6 - Obtenção de plantas de <i>Arabidopsis</i> mutantes <i>knockout</i> para os genes <i>L10</i> e <i>L18</i>	22
6.1 - Genotipagem dos mutantes T-DNA insercionais Salk_010170 (I10) e Salk_014456 (I18).....	22

6.2 - Extração de RNA total das plantas mutantes I10 e I18...	23
6.3 - Análise da expressão de plantas mutantes I10 e I18 por RT-PCR.....	23
7 - Infecção de <i>Arabidopsis</i> com o CaLCuV e ensaios de infectividade.....	24
8 - Diagnóstico molecular da infecção viral.....	25
8.1 - Extração de DNA das plantas e confirmação por PCR.....	25
8.2 - Análises dos dados do ensaio de infecção.....	26
9 - Análise da localização subcelular das proteínas L10 e L18.....	26
9.1 - Transformação transiente de plantas de tabaco.....	26
9.2- Microscopia confocal e processamento de imagens.....	27
10- Análise de transativação em levedura.....	27
IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
1- Expressão em <i>E. coli</i> e purificação das proteínas L10, L18, KDN1K1, KDN1K2, KDN1K3, KDBR11 e KDSERK1, fusionadas a GST e a His.....	28
2- Especificidade de interação de L10 e L18 com membros da família LRR-RLK.....	33
3- As proteínas L10 e L18 foram encontradas preferencialmente no citoplasma de células epidérmicas de tabaco.....	37
4- A superexpressão de NIK redireciona a proteína L10 para o núcleo, mas L18 permanece no citoplasma.....	40
5- Análise da expressão de L10 e L18 e co-localização com NIK1 na presença de TGMV.....	43
6- Identificação de linhagens <i>knockout</i> de L10 e L18.....	46
7- Linhagens I10 e I18 exibem aumento de suscetibilidade à infecção por geminivírus.....	47
9- Modelo proposto para a via de sinalização mediada pela proteína NIK.....	50
V- CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APENDICE.....	61

RESUMO

ROCHA, Carolina da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Identificação de componentes da via de sinalização mediada pela proteína NIK, um receptor que interage com a proteína NSP de geminivírus.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-orientadores: Luciano Gomes Fietto e Francisco Murilo Zerbini Júnior.

As proteínas da família das LRR-RLKs (receptor-*like*-quinases com repetições ricas em leucina) possuem uma relevância conceitual em eventos de sinalização mas, em plantas, a informação funcional ainda é restrita a alguns membros desta família. Os receptores NIK1, NIK2 e NIK3 de *Arabidopsis thaliana* pertencem à sub-família LRR-II-RLK e foram inicialmente identificados pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP de geminivírus. Em resposta a um estímulo desconhecido, *NSP-interacting kinases* (NIKs) são ativadas após a formação de dímeros e autofosforilação intermolecular. A inibição da autofosforilação de NIK por NSP e a inativação de genes *NIKs* aumenta a suscetibilidade à infecção viral, sugerindo que esta proteína estaria envolvida em uma via de defesa contra a infecção por geminivírus. Os componentes *downstream* dessa via de sinalização, mediada pela proteína NIK, ainda não foram identificados. No presente estudo foi descrita a caracterização bioquímica e funcional de duas proteínas ribossomais, L10 e L18, as quais foram capazes de interagir com a proteína NIK através do sistema de duplo híbrido de leveduras. Estudos *in vitro* demonstraram que a proteína NIK é capaz de fosforilar a proteína L10, mas não L18. Entre os membros da família LRR-II-RLK, a proteína NIK2 fosforila L10, enquanto NIK3 apresenta uma baixa capacidade de fosforilação do substrato. No entanto, a proteína de desenvolvimento SERK1 não utiliza L10 como substrato. Ensaio de expressão transiente, em plantas de

tabaco, revelaram que a proteína L18 está localizada no citoplasma, bem como ao redor do núcleo e no nucléolo de algumas células. Por sua vez, em 97% das células, L10 foi localizada apenas no citoplasma, embora tenha sido encontrada no núcleo, em aproximadamente 3% das células observadas. A expressão transiente de NIK1 e NIK2 redireciona a proteína L10 para o núcleo em aproximadamente 30% das células. Em contraste, NIK3 não realocaliza a proteína L10 para o núcleo, e L18 não muda sua localização na presença das NIKs. Em plantas infectadas com TGMV, observou-se mudança apenas na localização citoplasmática de L10, acumulando-se em pontos do citoplasma quando não co-localizada com NIK. Para se comprovar geneticamente as interações de L10-NIK e L18-NIK, alelos nulos para os genes *L10* e *L18* de *Arabidopsis*, contendo inserção de T-DNA, foram obtidos e inoculados com o CaLCuV. A inativação dos genes *L10* e *L18* recapitulou o fenótipo de suscetibilidade aumentada de *nik1* e as plantas *knockout*, principalmente *l10*, apresentaram sintomas severos e taxa de infecção alta quanto comparados com as plantas selvagens columbia. Os resultados deste trabalho são consistentes com um modelo que posiciona as proteínas ribossomais L10 e L18 como componentes funcionais da via de sinalização de defesa mediada pela proteína NIK, sendo L10 um componente imediatamente *downstream* ao receptor transmembrana.

ABSTRACT

ROCHA, Carolina da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2007.
Identification of components of the signaling pathway mediated by NIK protein, a receptor that interages with the NSP protein of geminivirus.
Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto and Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Proteins of the family of LRR-RLKs (receptor-*like*-kinases with leucine-rich repeats) have a conceptual relevance in signaling events but in plants information regarding function is limited to a few members of this family. The receptors NIK1, NIK2 and NIK3 of *Arabidopsis thaliana* belong to the sub-family LRRII-RLK and were initially identified by their capacity to interact with the geminivirus NSP protein. In response to an unknown stimulus, *NSP-interacting kinases* (NIKs) are activated after the formation of dimers and intermolecular autophosphorylation. The inhibition of autophosphorylation of NIK by NSP and the activation of *NIK* genes increase the susceptibility to viral infection, suggesting that this protein is involved in a defense pathway against geminivirus infection. The *downstream* components of this pathway, mediated by the protein NIK, have yet to be identified. In the present study, the biochemical and functional characterization of two ribosomal proteins, L10 and L18 were described, these being capable of interacting with the protein NIK via the yeast two-hybrid system. *In vitro* studies demonstrated that the protein NIK is capable of phosphorylating the protein L10, but not L18. Of the members of the LRRII-RLK family, the protein NIK2 phosphorylates L10, while NIK3 presents a low capacity for phosphorylation of the substrate. However, the development protein SERK1 does not use L10 as a substrate. Assays of transient expression in tobacco plants, revealed that the L18 protein is located in the cytoplasm, as well as around the nucleus and the nucleoli of some cells. In turn, in 97% of the cells,

L10 was localized only in the cytoplasm, although it was also found in the nucleus, in approximately 3% of the observed cells. The transient expression of NIK1 and NIK2 redirects the L10 protein to the nucleus in approximately 30% of the cells. In contrast, NIK3 does not relocalize the L10 protein to the nucleus, and L18 does not change its localization in the presence of the NIKs. In plants infected with TGMV, a change only in the cytoplasmic localization of L10 was observed, accumulating in points of the cytoplasm when not co-localized with NIK. To prove genetically the interactions of L10-NIK and L18-NIK, null alleles for the genes L10 and L18 de *Arabidopsis*, containing T-DNA insertion, were obtained and inoculated with CaLCuV. The inactivation of the genes *L10* and *L18* restored the elevated susceptibility phenotype of *nik1* and the knockout plants, principally *l10*, presented severe symptoms and high rates of infection when compared with the wild columbia plants. The results of this work are consistent with a model that places the ribosomal proteins L10 and L18 as functional components of the defense signaling pathway mediated by the protein NIK, L10 being a component immediately downstream of the transmembrane receptor.

I – INTRODUÇÃO

Proteínas receptores quinases de plantas e animais possuem um papel crucial no mecanismo de percepção e transdução de sinais extracelulares. Estes receptores podem estar relacionados a várias funções no interior da célula, tais como divisão celular, metabolismo, resposta a hormônios e defesa da planta contra patógenos (revisado por Torii, 2004). O genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica um grande número de proteínas quinases do tipo serina/treoninas, entre as quais predomina a família das proteínas *leucine rich-repeat receptor-like kinase* (LRR-RLK) (revisado por Shiu e Bleecekr 2001). Os representantes da família das LRR-RLK possuem três domínios funcionais: um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio quinase intracelular. O domínio extracelular é capaz de perceber o estímulo e transmitir para o interior da célula através da região quinase. Essas proteínas, uma vez ativas, se autofosforilam e este fenômeno leva a uma cascata de sinalização em resposta ao estímulo. Esta autofosforilação parece ocorrer predominantemente pela fosforilação intermolecular (trans), o que tem sugerido que a oligomerização está envolvida na regulação da atividade quinase.

Várias proteínas receptoras do tipo LRR-RLK têm sido identificadas, estando relacionadas com desenvolvimento, resistência a doenças ou à interação com proteínas de patógenos. O gene *ERECTA* de *Arabidopsis thaliana* é responsável pela proliferação de células ao longo de toda a planta, além de estar relacionado com a resistência ao patógeno bacteriano *Ralstonia solanacearum* (Godiard et al., 2003). Em tomate, o gene *BRI1* está envolvido na percepção do hormônio brassinosteróide. Além disso, esta LRR-RLK é responsável pela percepção do peptídeo sistemina, levando à ativação de MAPKs, à síntese de ácido jasmônico e à expressão de genes de defesa contra insetos (Scheer e Ryan, 2002; Kandoth et al., 2007). Outra proteína envolvida na

interação planta-patógeno foi identificada em tomate, através de um ensaio de duplo híbrido, utilizando a proteína de geminivírus NSP (*Nuclear Shuttle Protein*) como isca. Tal proteína, designada LeNIK (*Lycopersicum esculentum* NSP *Interacting Kinase*), foi caracterizada como um provável receptor transmembrana serina/treonina quinase (Mariano et al., 2004), cujo domínio quinase, localizado no citosol, é capaz de interagir com a proteína viral NSP. Esta proteína facilita o transporte intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma (Lazarowitz et al., 1999) e, juntamente com a proteína MP (*Movement Protein*), está envolvida com o movimento do DNA viral de célula a célula (Noueiry et al., 1994; Ward et al., 1997).

Os geminivírus constituem os maiores e mais relevantes grupos de vírus de plantas que infectam culturas importantes, do ponto de vista agrônomico e econômico, incluindo leguminosas, fumo, tomate, trigo e milho. São representados pela família *Geminiviridae* e apresentam capsídeos icosaédricos geminados, sendo constituídos de DNA circular fita simples, com 2500 a 3000 nucleotídeos (nt), cuja replicação ocorre por círculo rolante, através de um intermediário de DNA fita dupla, no núcleo de células infectadas (Hanley-Bowdoin et al., 1999). Esta família é dividida em quatro gêneros - *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* e *Begomovirus* (Rybicki et al., 2000), de acordo com o tipo de inseto vetor, a gama de hospedeiros (monocotiledôneas ou dicotiledôneas) e o número de componentes do genoma viral. Representantes do gênero de *Begomovirus*, tal como TGMV e CaLCuV, possuem dois componentes genômico, DNA-A e DNA-B. O DNA-A possui cinco genes que codificam proteínas envolvidas na replicação, ativação transcricional de genes virais e encapsidação do genoma viral (Elmer et al. 1988; Fontes et al. 1992, 1994a). O componente DNA-B codifica duas proteínas de movimento, a NSP (*nuclear shuttle protein*) e a MP (*movement protein*), ambas requeridas para a infecção sistêmica (Lazarowitz e Beachy, 1999; Gafni e Epel, 2002). A proteína

NSP facilita o transporte intracelular de DNA viral entre o núcleo e o citoplasma, enquanto MP participa do movimento de célula a célula.

A caracterização bioquímica e funcional de proteínas da planta hospedeira que interagem com proteínas virais é de fundamental importância para a elucidação do mecanismo de infecção viral, bem como para a estruturação de um modelo de interação planta:patógeno, possibilitando o estabelecimento de estratégias de resistência, por meio da engenharia genética de plantas. Estes estudos têm sido conduzidos na identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com proteínas virais durante o processo de replicação de geminivírus (Kong et al., 2000; Settagle et al., 2001; Gutierrez, 2004; Malik, 2005; Alberter et al., 2005) e com a proteína NSP de begomovírus (Mariano et al., 2004; Fontes et al., 2004; Florentino et al., 2006). Apesar disso, a maquinaria de transporte do hospedeiro, que possibilita a movimentação do vírus e, como consequência, a instalação da infecção sistêmica, ainda não é bem conhecida (Rojas et al., 2001; Zhang et al., 2001). Dentro desse contexto, é extremamente relevante que se detectem proteínas do hospedeiro, que atuem modulando, de forma positiva ou negativa, as atividades bioquímicas codificadas pelo genoma viral, e que estão envolvidas no estabelecimento do vírus na planta.

Um homólogo de NIK de soja, designando *GmNIK* (*Gycine max* NIK), e três genes homólogos de *Arabidopsis*, designados *NIK1*, *NIK2* e *NIK3*, também foram isolados pela capacidade de interação com NSP. A proteína NIK exibe propriedades bioquímicas consistentes com receptores de membrana e com uma função de sinalização na defesa contra infecção por geminivírus (Fontes et al., 2004). Entretanto, os componentes *downstream* dessa via de sinalização ainda não foram identificados.

Um ensaio de interação gênica, através do sistema de duplo híbrido de leveduras, utilizando o domínio quinase de NIK como isca, a partir de uma biblioteca de cDNAs de *Arabidopsis*, permitiu identificar duas proteínas

ribossomais, L10 e L18, que foram capazes de interagir com NIK (Fontes E.P.B., comunicação pessoal). Os objetivos dessa dissertação foram caracterizar bioquímica e molecularmente as proteínas L10 e L18, bem como confirmar se as referidas proteínas, identificadas pela capacidade de interagir com o domínio quinase de NIK em leveduras, são integrantes da via de sinalização de resposta à infecção viral, mediada por NIK.

II - REVISÃO DE LITERATURA

1- *Geminivírus*

1.1- *Características gerais dos geminivírus*

Os geminivírus constituem um grupo de vírus de plantas de grande importância econômica por infectar diversas culturas relevantes em todos os continentes. A família *Geminiviridae* é caracterizada pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas incompletas (Rojas *et al.*, 2005), com 18x30 nm, que envolve uma molécula de DNA circular fita simples, com 2.500 a 3.000 nucleotídeos, encapsidada por uma única proteína estrutural (CP). De 110 monômeros de CP são arranjados em 22 capsômeros para gerar uma partícula geminada, conferindo-lhe a aparência de dois icosaedros incompletos (Zhang *et al.*, 2001; Lazarowitz *et al.*, 1992).

Os geminivírus se replicam no núcleo das células infectadas, utilizando maquinaria de círculo rolante, formando um intermediário de fita dupla circular, que também serve como molde para a transcrição bidirecional (Gutierrez *et al.*, 2000). A transmissão do DNA circular, fita simples do vírus se dá por insetos vetores específicos e é dependente do tipo de proteína capsidial, que interage com os diferentes receptores de cada inseto (Höhnle *et al.*, 2001).

1.2- *Taxonomia*

A família *Geminiviridae* possui quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*), diferenciados com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros que o vírus infecta (monocotiledôneas ou dicotiledôneas), na organização genômica, podendo apresentar um ou dois componentes de

DNA e no relacionamento filogenético (Fauquet e Stanley, 2003; Rybicki *et al.*, 2000; Stanley *et al.*, 2005).

O gênero *Mastrevirus*, compreende os vírus de genoma monossegmentado que infectam principalmente monocotiledôneas e possuem como inseto vetor diferentes espécies de cigarrinhas. Representantes deste gênero incluem os vírus *Chloris striate mosaic virus* (CSMV), *Maize streak virus* (MSV) e *Wheat dwarf virus* (WDV) (Rybicki *et al.*, 2000). O genoma de *Mastrevirus* codifica quatro proteínas: a proteína RepA, exclusiva do gênero e a proteína Rep, na fita complementar; a proteína de movimento (MP) e a proteína do capsídeo (CP), na fita viral.

Os vírus pertencentes ao gênero *Curtovirus*, como o *Beet curly top virus* (BCTV), possuem genoma monopartido, são transmitidos por cigarrinhas e infectam dicotiledôneas. A fita viral codifica as proteínas V2, MP e CP, e a fita complementar possui quatro ORFs (*open reading frames*) que codificam Rep, C2, Ren (*Replication enhancer*) e C4.

O gênero *Topocuvirus* possui uma única espécie representante, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um único componente genômico, sendo transmitido pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* a espécies dicotiledôneas.

Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus*, como os vírus *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *Bean golden mosaic virus* (BGMV), possuem dicotiledôneas como únicos hospedeiros e seu vetor é a mosca branca, *Bemisia tabaci*. De uma maneira geral, os begomovírus do hemisfério ocidental possuem dois componentes genômicos e os do hemisfério oriental possuem um único componente genômico.

1.3- Gênero *begomovirus*

Dentre os gêneros de geminivírus, o *Begomovirus* possui o maior número de representantes. Sua organização genômica pode ser mono ou bissegmentada, embora todos os begomovírus encontrados no Brasil sejam bissegmentados (Ribeiro *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2000). Seus componentes genômicos são o DNA-A, que é responsável pela replicação e transcrição do DNA viral e encapsidação da progênie viral, e o DNA-B, responsável pelo movimento do vírus célula-a-célula, do núcleo para o citoplasma e pelo movimento sistêmico do vírus na planta (Lazarowitz *et al.*, 1992) (Figura 1). Conseqüentemente, ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas. Exceto por uma seqüência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), os dois componentes não apresentam similaridade em suas seqüências de nucleotídeos. A RC contém a origem de replicação dos geminivírus (Fontes *et al.*, 1994a; Fontes *et al.*, 1994b), que inclui diversos elementos de seqüência altamente conservados entre as diferentes espécies do gênero. Entretanto, a RC como um todo é a região do genoma que apresenta maior variação entre diferentes espécies de begomovírus. Já entre os dois componentes genômicos de uma mesma espécie, a RC é idêntica ou muito similar (>95% de identidade de seqüência). Uma exceção é o *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), que apresenta 80% de homologia entre as seqüências das RCs do DNA-A e do DNA-B (Hill *et al.*, 1998).

O DNA-A da maioria dos begomovírus contém cinco genes. Na fita de sentido viral, encontra-se o gene que codifica a proteína capsidial (CP). Na fita de sentido complementar, encontram-se os genes *rep*, *trap* e *ren*. A função do gene *cp* é codificar a proteína do capsídeo viral. O gene *rep* (*replication-*

associated protein) codifica a única proteína essencial para o processo de replicação viral. O gene *ren* (*replication enhancer protein*) codifica uma proteína acessória, amplificadora da replicação viral. Embora esta proteína não seja essencial para o processo de replicação, o acúmulo de DNA viral é intensificado na sua presença. Ren promove o acúmulo de ssDNA viral quando interage com a proteína de tomate SINAC (*Solanum lycopersicon* NAC), que atua facilitando a replicação de *Tomato leaf curl virus* (TLCV) (Selth *et al.*, 2005). O produto do gene *trap* (*trans-activating protein*) é uma proteína ativadora da transcrição dos genes de sentido viral, *cp* e *nsp* (Rojas *et al.*, 2005).

O DNA-B contém os genes que codificam as proteínas de movimento NSP e MP, nas fitas viral e complementar, respectivamente (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Geminivírus maneja o transporte do DNA no interior das células do hospedeiro com a ajuda de três proteínas, a proteína da capa (CP), a *nuclear shuttle protein* (NSP) e a *movement protein* (MP) (Hehnl *et al.*, 2004). A proteína NSP se liga com a mesma afinidade a DNA fita simples e DNA fita dupla, de maneira seqüência independente (Lazarowitz, S. G. e R. N. Beachy, 1999).

1.4- Modelo de movimento intra e intercelular do DNA viral

As propriedades bioquímicas e a localização subcelular das proteínas de movimento de begomovirus sugerem que, enquanto NSP participa do movimento do genoma viral do núcleo para o citoplasma, MP age na membrana plasmática e parede celular como uma proteína de movimento clássica. Dentro desse contexto, tem sido proposto que MP promove a translocação do genoma viral para as células adjacentes, através dos plasmodesmas, conforme descrito para *Bean dwarf mosaic virus*, BDMV (Rojas *et al.*, 2005). No caso do vírus SqLCV,

foi proposto que o transporte intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma, que é mediado por NSP, é facilitado por MP, que promove o movimento do DNA viral, associada à NSP, para células adjacentes (Hehne *et al.*, 2004). Foi proposto também que a proteína MP funciona como uma âncora na membrana plasmática, facilitando o transporte de complexos ao longo dessa membrana (Zhang *et al.*, 2001). Mutações que inativam estes genes bloqueiam a capacidade do vírus mutante de infectar as plantas, mas não alteram a eficiência de replicação do genoma viral (Lazarowitz, 1992).

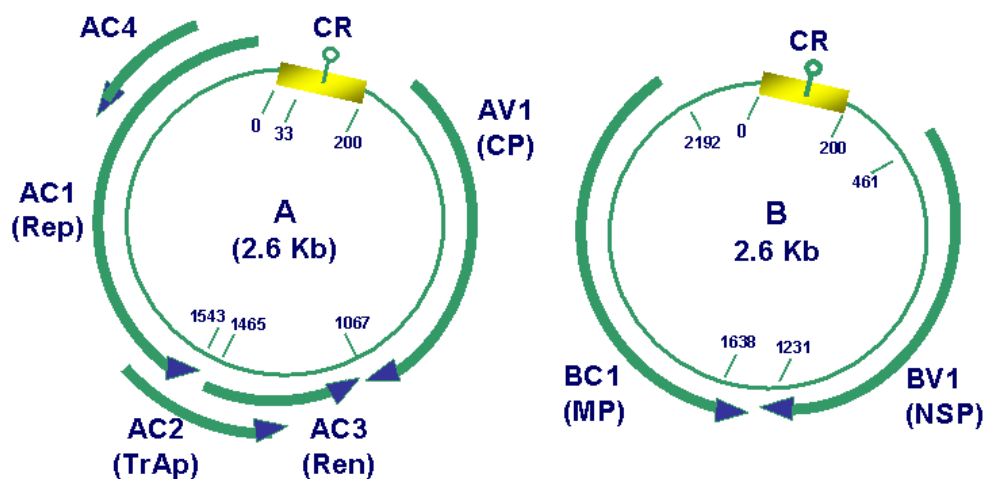


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Os círculos representam o genoma viral, dividido em dois componentes (DNA-A e DNA-B) com aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada um. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição: *rep*, replication-associated protein; *trap*, trans-activating protein; *ren*, replication-enhancer protein; *cp*, gene da proteína capsial (coat protein); *mp*, movement protein; *nsp*, nuclear shuttle protein. A região comum (CR) também está indicada.

1.5- Replicação de Begomovírus

O processo de replicação dos geminivírus, incluindo dos begomovírus, ocorre no núcleo da célula hospedeira infectada, onde o ssDNA é convertido em dsDNA (denominado forma replicativa, RF). O mecanismo que direciona esta conversão não é conhecido, mas evidências indiretas indicam que ela é realizada por fatores do hospedeiro, uma vez que o genoma viral não codifica DNA polimerase. A RF serve como molde para síntese de novos ssDNA e de RNAs mensageiros virais. A proteína Rep do vírus é a única essencial no processo de replicação. Várias atividades bioquímicas têm sido demonstradas para esta proteína, incluindo propriedades de ligação a DNA de fita simples e dupla, clivagem e ligação do DNA em seqüências específicas, hidrólise de ATP e iniciação do mecanismo de replicação por círculo rolante (Rojas *et al.*, 2005).

A replicação dos geminivírus depende em grande parte do sistema enzimático de seus hospedeiros, responsável pela síntese da forma replicativa e das novas fitas de ssDNA de sentido viral. Assim, torna-se fundamental que as células infectadas por geminivírus contenham a maquinaria enzimática responsável pela síntese de DNA, caso contrário a replicação viral será prejudicada. Uma vez que os geminivírus infectam células vegetais plenamente diferenciadas, nas quais a síntese de novos DNAs praticamente não ocorre, o vírus deve ser capaz de modificar o ciclo celular do hospedeiro de forma a reiniciar a síntese de DNA, ou pelo menos ativar a transcrição das enzimas envolvidas nesse processo. De fato, tem sido demonstrado que a expressão da proteína Rep de TGMV é suficiente para induzir a síntese de PCNA (*Proliferating Nuclear Cell Antigen*), alterando o ciclo celular das células infectadas (Nagar *et al.*, 1995).

2- Interação da proteína NSP com proteínas do hospedeiro

O transporte de partículas virais do núcleo para o citoplasma e vice-versa é fundamental para o estabelecimento e desenvolvimento do vírus em células do hospedeiro. De acordo com a função importante de NSP no transporte do vírus na planta, acredita-se que essa proteína interaja com proteínas do hospedeiro nos diversos compartimentos celulares. Foi isolado um receptor transmembrana serina/treonina quinase, designado LeNIK (*Lycopersicum esculatum* NSP-Interacting Kinase), capaz de interagir com NSP (Mariano *et al.*, 2004). Foi comprovado que um homólogo de NIK em soja (GmNIK) e três homólogos em *Arabidopsis thaliana* (AtNIK) também interagem com NSP (Fontes *et al.*, 2004). A interação de NSP com NIK1, NIK2 ou NIK3, através de seus domínios de quinase localizados no citosol, inibe a atividade dos receptores, sugerindo envolvimento na resposta de defesa antiviral (Fontes *et al.*, 2004). Consistente com esta hipótese, a inativação dos genes *NIK* em *Arabidopsis* aumenta a suscetibilidade à infecção viral.

A proteína NIK possui domínios característicos de proteínas receptoras de membranas, envolvidas no desenvolvimento da planta ou em resistência a patógenos. Além do domínio quinase conservado, os três homólogos desses receptores, em *Arabidopsis thaliana*, contêm 3-5 repetições ricas em leucina (LRR–*leucine-rich repeat*). Foi também demonstrado que a proteína NIK se autofosforila, e que esta fosforilação antecede sua oligomerização, sugerindo que NIK possui propriedades bioquímicas consistentes com uma função sinalizadora. Experimentos adicionais descartaram a proteína viral NSP como seu substrato, e, pelo contrário, demonstraram que a proteína viral inibe a autofosforilação deste receptor quinase (Fontes *et al.*, 2004).

Além de NIK, a proteína AtNSI (*Nuclear Shuttle Protein Interactor*) foi isolada pela sua capacidade de interagir com NSP de geminivírus. NSI é uma acetiltransferase nuclear pertencente a uma família de acetiltransferases de histonas nucleares, altamente conservada em plantas. Similarmente à interação NSP-NIK, NSP não é substrato para a enzima acetiltransferase, mas inibe sua atividade enzimática (McGarry *et al.*, 2003).

Outra proteína identificada pela capacidade de interagir especificamente com NSP é uma proteína *PERK-like*, designada NsAK (*NSP-Associated Kinase*). A proteína NsAK é estruturalmente organizada em um domínio N-terminal rico em prolina, seguido por um domínio transmembrana e um domínio quinase do tipo serina/treonina no carboxi-terminal. Ensaios de tradução *in vitro* de NsAK, na presença de NSP, apresentaram um aumento nos níveis de fosforilação de NSP, indicando que NSP age como substrato para NsAK (Florentino *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a perda de função de NsAK, *in vivo*, diminui a susceptibilidade à infecção por CaLCuV, indicando que esta proteína contribui positivamente para a infecção de geminivírus e sugerindo uma possível regulação da função de NSP.

3- Proteínas da família LRR-RLK

Plantas possuem uma grande família de proteínas *receptor-like-kinases* (RLKs), as quais têm sido implicadas no mecanismo de percepção e transdução de sinais extracelulares (revisado por Shiu e Bleecker, 2001). Análise filogenética das proteínas RLKs de *A. thaliana* revelou mais de 400 genes que codificam possíveis receptores quinases com uma seqüência sinal, uma região amino-terminal com domínio transmembrana e um domínio quinase citoplasmático no carboxi-terminal (Shiu e Bleecker, 2001). As RLKs de plantas, que se autofosforilam na porção carboxi-terminal, para a transdução de sinal,

utilizam os resíduos serina e/ou treonina para a transfosforilação, ao contrário das RLKs de animais, que utilizam apenas o resíduo de tirosina (Braun e Walker, 1996). Uma grande classe de proteínas de plantas pertencentes à família RLK é caracterizada pela presença de um motivo LRR (*leucine-rich repeats*), sendo os membros dessa subfamília conhecidos por participarem de importantes vias de sinalização em plantas, incluindo desenvolvimento, resposta a estresse, defesa contra patógenos e simbiose.

Extensivos estudos bioquímicos e genéticos têm sido realizados para identificar proteínas LRR-RLKs e componentes pertencentes à via de sinalização dessas proteínas. Em *Arabidopsis*, os genes *CLAVATA1 (CLV1)* e *ERECTA* foram identificados por determinarem a forma e o tamanho do órgão floral (Torii et al., 1996; Clark et al., 1997) e o gene *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 (BR1)* foi identificado por participar do desenvolvimento da planta, pela percepção do hormônio brassinosteróide (Li e Chory, 1997; Li et al., 2002; Nam e Li, 2002). A proteína SERK1 (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1*), também de *Arabidopsis*, foi identificada como uma LRR-RLK, que participa na formação de células embriogênicas e que também está presente no complexo protéico contendo BRI1, sugerindo que SERK1 também participa da via de sinalização regulada pelo hormônio brassinosteróide (Hecht et al., 2001). Desta forma, proteínas LRR-RLKs respondem a uma variedade de sinais extracelulares, transmitindo-os para o interior da célula.

4- Proteínas ribossomais L10 e L18

O gene *L10* de *Arabidopsis* codifica uma proteína ribossomal básica, L10, de 220 aminoácidos (28kDa). Um homólogo desta proteína foi primeiro identificado, em humanos, como um possível supressor de tumor de linhagens

de células de tumor Wilms' (Dowdy et al., 1991), sendo denominada QM. Esta proteína é altamente conservada em mamíferos, plantas, vermes, insetos e leveduras (Farmer et al., 1994).

Proteínas L10 estão localizadas no citoplasma, preferencialmente no retículo endoplasmático, conforme demonstrado por ensaios de fracionamento subcelular (Nguyen et al., 1998) sendo consistente com o fato de ser uma proteína ribossomal. Em contraste, foi observado que L10 associada a uma presenilina 1 (PS1) é translocada do citoplasma para o núcleo, resultando na supressão do complexo de formação de homodímeros c-Jun (Imafuku et al., 1999). Karl et al. (1999) demonstraram que, em leveduras, genes homólogos à L10, como *GRC5* e *QSR1*, participam do controle da expressão gênica. A proteína tQM (*Tomato QM-like*) está envolvida em várias vias de resposta a estresse, participando na modulação dos níveis de prolina em leveduras, através da diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células expressando tQM (Chen et al., 2006). Estes resultados sugerem que a proteína L10 pode estar envolvida com vias de sinalização celular.

O gene *L18* de *Arabidopsis* codifica uma proteína ribossomal, L18, de 178 aminoácidos (22kDa). Esta proteína interage com a proteína P6 do CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), que participa do controle da síntese das demais proteínas virais por atuar como um fator de reiniciação da tradução do RNA policistrônico. Tal interação mostrou ser restrita a uma região mínima de P6, designado de domínio mini-TAV (Leh et al., 2000). A superexpressão de L18 de mamíferos pode promover a síntese de proteínas e o crescimento celular em certas células cancerígenas. Isso ocorre em função da inibição da atividade da proteína PKS (*RNA-Activated Protein Kinase*), fundamental para o controle da iniciação da tradução, através da fosforilação da subunidade α do fator de iniciação eIF-2 α (Kumar et al., 1998).

Diversos estudos têm sido feito para identificar os componentes *downstream* ou *upstream* de vias de sinalização mediadas por receptores quinases. Desta forma o principal objetivo dessa dissertação foi caracterizar bioquímica e molecularmente se as proteínas L10 e L18 são integrantes da via de sinalização de resposta à infecção viral, mediada por NIK.

III- MATERIAL E MÉTODOS

1– Material vegetal

Plantas de *Arabidopsis thaliana* da linhagem Col-0 (Columbia) foram cultivadas em câmara de crescimento, a 22°C, com fotoperíodo de 16 horas. As sementes de *Arabidopsis* foram semeadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) ½ força e as plântulas foram transplantadas para substrato. Os mutantes *I10* e *I18* foram originados por mutagênese insercional por T-DNA e as sementes foram obtidas do ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*).

2– Construções de DNA

Os cDNAs de *L10* e *L18* foram isolados de uma biblioteca duplo híbrido de cDNA de *Arabidopsis* pela capacidade de interagirem com o domínio de quinase da proteína NIK1 (Fontes, E.P.B., comunicação pessoal). O clone BRI1-GFP, contendo o cDNA de BRI1 fusionado a GFP e sob o controle do promotor endógeno de BRI1, foi cedido pelo Salk Institute of Biological Studies e o clone U13033, contendo o cDNA de SERK1, foi obtido do ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*). Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para amplificar os genes completos *L10* e *L18* e os domínios quinases de BRI1 e SERK1, para posterior re-amplificação com extensões de recombinação para clonagem via sistema Gateway (Tabela 1). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), purificados e inseridos, por recombinação, no vetor de entrada pDONR201, utilizando a BP clonase (Invitrogen). Nos clones, pDON-L10 (pUFV608), pDON-L18 (pUFV829), pDON-KDBRI1 (pUFV769) e pDON-KDSERK (pUFV770), os cDNAs inseridos contêm códon de parada e foram usados para transferir seu respectivo fragmento para vetores de expressão em bactéria e em plantas. Os clones resultantes pDON-

NSL10 (pUFV609) e pDON-NSL18 (pUFV830), contêm os respectivos cDNAs sem o códon de parada e foram usados para transferência dos cDNAs para o vetor binário pK7FWG2. Adicionalmente, os cDNAs de L10 e L18, com códon de parada, foram clonados por recombinação no vetor de entrada alternativo pDONR207, resultando nos clones pDONR207-L10 (pUFV900) e pDONR207-L18 (pUFV898). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos respectivos cDNAs são apresentados na Tabela 1.

A transferência dos referidos genes de pDONR201 para o vetor pDEST17 e pDEST15 (Invitrogen), por meio da LR clonase (Invitrogen), deu origem aos clones pHIS-L10 (pUFV778), pHIS-L18 (pUFV836), pGST-L10 (pUFV730), pGST-L18 (pUFV835), pGST-KDBRI1 (pUFV776) e pGST-SERK (pUFV777). A expressão nestes vetores permite a síntese das proteínas fusionadas a uma cauda de GST (*Glutathione S-transferase*) e histidina no amino-terminal, respectivamente.

Os cDNAs de L10 e L18 foram transferidos de pDONR201 para o vetor binário de transformação de plantas pK7FWG2. Os clones pK7FWG2-L10 (pUFV756) e pK7FWG2-L18 (pUFV838) contêm os cDNAs de *L10* e *L18*, respectivamente, fusionados à *GFP* no carboxi-terminal e sob o controle do promotor 35S. Adicionalmente os cDNAs de L10 e L18 foram transferidos de pDONR207 para o vetor binário de transformação de plantas 35S-pYFP-casseteA-Nos-pCambia1300 (cedido gentilmente pelo Dr. Steve Slocombe da Universidade de Leeds, Reino Unido), por meio da LR clonase (Invitrogen Life Technologies, Inc.), através de recombinação homóloga, dando origem aos clones pYFP-L10 (pUFV922) e pYFP-L18 (pUFV823), que contêm os respectivos cDNAs fusionados ao gene *YFP* no amino-terminal e sob o controle do promotor 35S.

Os clones obtidos foram utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α , pelo método do choque

térmico (Sambrook *et al.*, 1989), selecionados com o antibiótico apropriado e diagnosticados por PCR.

3- Expressão heteróloga em *E. coli* e purificação de proteínas recombinantes

3.1- Preparo das células competentes e transformação de *E. coli* BL21:DE3 (pLYSs)

As colônias individuais de *E. coli*, transformadas com os clones pHIS-L10 (pUFV778), pHISL18 (pUFV836), pGST-L10 (pUFV730), pGST-L18 (pUFV835), pGST-KDBR11 (pUFV776), pGST-SERK (pUFV777) (descritos acima) e pGST-NIK1, pGSTNIK2, pGST-NIK3, previamente descritos (Fontes *et al.*, 2004), foram incubadas em 2 mL de meio LB, com ampicilina 100 mg.L⁻¹, a 37° C e 180 rpm, por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o *Plasmid Midi Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante e, em seguida, foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* da estirpe BL21:DE3(pLYSs). As células competentes foram preparadas em CaCl₂ 0,1 M, de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

Cerca de 75 µL de células competentes foram transformadas, por choque térmico, com os plasmídeos de interesse, e selecionadas em meio suplementado com o antibiótico apropriado. Os transformantes foram confirmados via PCR, com oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene de interesse, e o produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% (P/V). As colônias recombinantes foram armazenadas em glicerol 50% (V/V), a -80°C.

Tabela 1– Oligonucleotídeos usados em reações de PCR

Nome	Oligonucleotídeos	Seqüências (5' → 3')
L10	5196 (<i>senso</i>)	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGAAGAAGACCTGT
	5264 com <i>stop</i> (<i>anti-senso</i>)	AGAAAGCTGGGTCTCAGTAGTGGGCTGGCAAAA
	5265 sem <i>stop</i> (<i>anti-senso</i>)	AGAAAGCTGGGTTCGTAGTGGGCTGGCAAAAAGGC
L18	L18Fwd (<i>senso</i>)	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGTGCTTTTCAGGTT
	L18Rvs com <i>stop</i> (<i>anti-senso</i>)	AGAAAGCTGGGTCTTACATGAACAAGTTGGGC
	L18Rvs sem <i>stop</i> (<i>anti-senso</i>)	AGAAAGCTGGGTCCATGAACAAGTTGGGCTTG
KDSERK-1	KDSERK-1Fwd (<i>senso</i>)	AAAAAGCAGGCATGGGACAGCTCAAGAGGT
	KDSERK-1Rvs com <i>stop</i> (<i>anti-senso</i>)	AGAAAGCTGGGTCTTACCTTGGACCAGATAACTC
KDBRI-1	KDBRI-1Fwd (<i>senso</i>)	AAAAAGCAGGCTTCACAATGCTTGTTGGTAGAG
	KDBRI-1Rvs com <i>stop</i> (<i>anti-senso</i>)	AGAAAGCTGGGTCTCATAATTTTCCTTCAGGAAC
attb1	Primers Gateway	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attb2	Primers Gateway	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
pDONR201 ou pDONR207 Fwd	3392	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC
pDONR201 ou pDONR207 Rvs	3393	TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
GST	4798 (<i>anti-senso</i>)	CCAATGTGCCTGGATGCGTTCC
35S	MC36 (<i>senso</i>)	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
GFP ou YFP	4799-pK7FGFPRvs (<i>anti-senso</i>)	CGCCCTCGCCCTCGCCGGACAC
CaLCuV-B	PCRc1	CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA
	PBL1V2040	GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA
Aractin	ARACTIN2-Rvs	GATTGATCCTCCGATCCAGA
	ARACTIN2-Fwd	TACAACGAGCTTCGTGTTGC
Genotipagem de I18	Rvs014456RP	GAAGAACCCAACAACGATCAAG
	Fwd014456LP	TGAGGGGAATAAATCGTATCAAG
T-DNA	LB1-18	GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG
Genotipagem de I10	010170-LP	ATGATCCAACAAGGCAATCAC
	RP-010170	TCATGGGAGAAGGAGAATGTG
T-DNA	LBB1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT

3.2- Indução da expressão em *E. coli*

Os clones pHIS-L10 (pUFV781), pHIS-L18 (pUFV860), pGST-L10 (pUFV741), pGST-L18 (pUFV875), pGST-KDNIK1 (pUFV648), pGST-KDNIK2 (pUFV761), pGST-KDNIK3 (pUFV762), pGST-KDBRI1 (pUFV876) e pGST-KDSERK1 (pUFV780) em *E. coli* estirpe BL21:DE3 (pLYSs) foram crescidos em 2 mL de meio LB, contendo ampicilina (100 mg.L⁻¹), até D.O. igual a 0,5, quando foram transferidos para 250 mL do mesmo meio. Ao atingirem a D.O. igual a 0,5, foram induzidos pela adição de 0,4 mM de isopropilil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Após incubação a 22°C e 200 rpm, por 16 horas, procedeu-se à purificação das proteínas.

3.3- Obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis

Para obtenção de extrato de proteína total, 1 mL da cultura de células foi centrifugado a 10.000 X g por 1 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 100 μL de PBS-1X (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH7,3, PMSF 0,8 mM), e 100 μL de 2X SDS-*sample buffer* (Laemmli, 1970). Posteriormente, foi sonificado sobre o gelo, com o aparelho ajustado para as condições de amplitude entre 60 e 80; timer(zero); pulser(>6), por quatro tempos. Esse extrato de proteínas totais foi aquecido por 3 min a 70 °C, para desnaturar as proteínas. Foram aplicados 10 μL em gel de poliacrilamida 10% (Laemmli, 1970), e a revelação foi feita com *Comassie Brilliant Blue*.

Para extração de proteína solúvel e insolúvel foram utilizados 4 mL de cultura, que foram centrifugados a 6.500 X g por 15 min a 4 °C. O *pellet* foi ressuscitado em 500 μL de tampão de extração (tris-HCl 50 mM pH8, EDTA 2 mM), no vortex, e incubado no gelo. Em seguida foram adicionados 5 μL de

lisozima (10 mg.mL^{-1}) e $5 \text{ }\mu\text{L}$ de Triton X-100 10 % (v/v), seguido por incubação a 30°C por 15 min. Posteriormente, a mistura foi transferida para o gelo e ultrassonicada quatro vezes. Após centrifugação a $12.000 \times g$ por 15 min, a 4°C , o sobrenadante foi retirado e transferido para microtubo (fração solúvel) e o *pellet* ressuspendido em $100 \text{ }\mu\text{L}$ de SDS buffer 1X (fração insolúvel). Foram aplicados, no gel de poliacrilamida 10 %, $10 \text{ }\mu\text{L}$ de cada uma das frações.

3.4- Purificação e quantificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes fusionadas à GST foram purificadas por cromatografia de afinidade com resina Glutathione Sepharose 4B. Para purificação em grande escala, 250 mL de células induzidas foram centrifugadas a $5.000 \times g$ por 10 min, e ressuspendidas em PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH7,3, PMSF 0,8 mM). Adicionaram-se $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de lisozima, mantendo-se por 30 min no gelo. O rompimento das células ocorreu por ultra-sonicação com os padrões de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos. Em seguida, o material foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 20 min, para a remoção de restos celulares e obtenção do sobrenadante. Este foi ligado à resina Glutathione Sepharose 4B (Amersham), previamente equilibrada com o tampão de ligação, e purificado de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas foram então quantificadas, pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando como padrão a proteína do soro bovino (BSA).

As proteínas L10 e L18 fusionadas à histidina (His) foram purificadas de acordo com Rocha et al. (2007).

4- Ensaio de fosforilação in vitro

Para o ensaio de fosforilação, aproximadamente $2 \text{ }\mu\text{g}$ das proteínas KDNK1, KDNK2, KDNK3, KDBR11, fusionadas à GST, foram incubadas na

presença de 10 µL de substrato (GST-L10 ou GST-L18), separadamente, em tampão contendo HEPES 18 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM, MnSO₄ 10 mM, DTT 1 mM, ATP 10 µM, e 5 µCi de [³²P]ATP. No caso de GST-KDSERK1, o tampão usado não continha MnSO₄, de acordo com Shah et al. (2001). O término da reação se deu com a adição do tampão de amostra, SDS 1X. As fosfoproteínas foram resolvidas por SDS-PAGE. O gel foi corado com *Comassie Brilliant blue*, para verificar o carregamento de proteína, foi então seco e submetido à autoradiografia. A banda de radioatividade foi quantificada por densitometria. As bandas das proteínas coradas foram usadas para normalizar os sinais de radioatividade.

5 - Análises de possíveis sítios de fosforilação das proteínas L10 e L18

A identificação de possíveis sítios de fosforilação das proteínas L10 e L18 foi feita com o auxílio do programas NetPhos 2.0 Server, disponível no ExPASy Proteomics tools (<http://www.expasy.org/>).

6 - Obtenção de plantas de *Arabidopsis* mutantes knockout para os genes L10 e L18

6.1 - Genotipagem dos mutantes T-DNA insercionais Salk_010170 (I10) e Salk_014456 (I18)

As linhagens de *Arabidopsis* Salk_010170 (I10) e Salk_014456 (I18) foram obtidas na biblioteca de mutantes T-DNA insercionais, do *Salk Institute for Biological Studies*. As sementes foram esterilizadas, plaqueadas em meio MS ½ força, incubadas a 4°C por 4 dias, e em seguida a 22°C por 15 dias, com fotoperíodo de 16 horas. Em seguida, foram transplantadas para vasos, e mantidas sob temperatura e luminosidade controladas. Uma semana depois de transplantadas, foram coletadas folhas de cada uma delas, separadamente, para

extração de DNA genômico. A genotipagem foi feita em uma reação de PCR, com oligonucleotídeos específicos para os genes *I10* e *I18* e com oligonucleotídeos específicos para o T-DNA (LB1-18 e LBB1) respectivamente (Tabela 1).

6.2 - Extração de RNA total das plantas mutantes *I10* e *I18*

Para isolamento de RNA total, plântulas de *Arabidopsis* foram maceradas em nitrogênio líquido e aproximadamente 200 mg do tecido vegetal foram homogeneizados com o reagente TRIZOL (Invitrogen). Incubou-se à temperatura ambiente, por 5 min, e adicionaram-se 200 μL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada manualmente por 15 s, incubada à temperatura ambiente por 3 min, e submetida à centrifugação a 12.000 x *g* por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, livre de RNase, e foram adicionados 500 μL de isopropanol. Em seguida, incubou-se à temperatura ambiente por 10 min e centrifugou-se a 12.000 x *g* por 10 min. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) e centrifugado a 7.500 x *g* por 10 min. Em seguida, o material foi seco à temperatura ambiente, por aproximadamente 10 min e os *pellets* ressuspensos em 20 μL de água livre de RNase e estocados a -80°C. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em NBC, corado com brometo de etídeo 0,1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

6.3 - Análise da expressão de plantas mutantes *I10* e *I18* por RT-PCR

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro DU 650 BECKMAN, a 260 nm, e sua concentração expressa em $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. Para a obtenção do cDNA, 2 μg do RNA total foram utilizados como molde, juntamente com 5 μM do oligonucleotídeo oligodT e 0,5 mM de dNTPs, em um volume final de 15 μL . A

mistura foi aquecida a 70° C por 5 min e depois imediatamente incubada no gelo. Em seguida, foram adicionados o tampão da enzima transcriptase reversa (Invitrogen) (Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl , 3 mM MgCl₂ 75 mM e DTT 10 mM), para um volume final de 20 µL. A mistura foi mantida a 37°C, por 2 min. Após esse tempo, foi adicionado 1 µL de M-MLV RT Transcriptase Reversa (Invitrogen Life Technologies, Inc.), incubando-se a 37°C por 1 h. A enzima foi inativada a 70°C por 15 min.

Para a análise de expressão por RT-PCR foram utilizados 1 µL de cDNA, 0,1 mM de dNTPs, 0,4 mM de cada um dos oligonucleotídeos específicos para os genes *L10* e *L18* (Quadro 1), tampão (MgCl₂ 2,0 mM, tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM) e 1 µL de Taq DNA polimerase, em um volume final de 25 µL. As condições de reação foram de 3 min a 94°C, seguido de 40 ciclos (45 s a 94°C; 45 s a 50°C; e 1 min a 72°C), e 10 min a 72° C. Como controle interno, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para actina. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador MJ RESEARCH PTC 200 e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹.

7 - Infecção de Arabidopsis com o CaLCuV e ensaios de infectividade

As sementes de plantas ColØ, *I10* e *I18* foram esterilizadas e plaqueadas em meio MS ½ força, sem antibiótico. Após quatro semanas, 20 plantas de cada linhagem foram transplantadas para vasos individuais, contendo substrato. Quando atingiram o estágio de sete folhas, as plantas foram inoculadas com os componentes A e B do vírus CaLCuV por meio de biobalística (Schaffer *et al.* 1995). Para isso, o DNA plasmidial dos clones CaLCuVA002 e CaLCuVB002, contendo repetições parciais em de cada um dos componentes, respectivamente, foi extraído utilizando o “Plasmid Midi Kit” (Qiagen), segundo

as recomendações do fabricante. A qualidade e integridade do DNA foram analisadas em gel de agarose 1% (p/v) e a concentração foi avaliada por espectrofotometria a 260 nm. Aproximadamente 10 mg de cada componente de DNA foram precipitados com micropartículas de tungstênio na presença de CaCl₂ 1 M e espermidina 15 mM, e lavados com etanol absoluto. Cada preparação foi distribuída em 5 membranas carreadoras. As membranas preparadas foram encaixadas no acelerador de partículas e lançadas, sob vácuo formado com gás hélio a uma aceleração de 160 psi, contra as plantas de *Arabidopsis* citadas acima. Como controle negativo, cinco plantas de cada linhagem foram inoculadas somente com micropartículas de tungstênio. As plantas bombardeadas foram transferidas para câmara de crescimento a 22°C com fotoperíodo de 16 horas, e observadas quanto ao aparecimento de sintomas até 21 dias após a inoculação. As análises foram feitas em intervalos de dois dias, sendo observados sintomas como clorose, epinastia, deformação foliar e morte de folhas jovens, os quais foram fotodocumentados.

8 - Diagnóstico molecular da infecção viral

8.1 - Extração de DNA das plantas e confirmação por PCR

Uma folha de cada planta inoculada com vírus foi coletada a cada sete dias, após a inoculação, até a 21 dias. A folha foi macerada em nitrogênio líquido, em microtubos, com auxílio de pistilos. A extração de DNA foi processada de acordo com Dellaporta et al. (1983).

Para confirmar a presença do genoma viral em plantas sintomáticas, o DNA extraído foi usado como molde em reação de PCR, com oligonucleotídeos degenerados que amplificam fragmentos específicos do componente B de

begomovírus (Rojas *et al.*, 1993). Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

8.2 - Análises dos dados do ensaio de infecção

A percentagem de plantas infectadas foi avaliada, de acordo com a sintomatologia, a cada dois dias, e a presença de DNA viral, a cada sete dias. Os dados foram plotados em um gráfico (percentagem de plantas infectadas X dias pós-infecção), juntamente com o desvio padrão entre as repetições.

9 – Análise da localização subcelular das proteínas L10 e L18

9.1 – Transformação transiente de plantas de tabaco

Crescimento e transformação transiente de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. havana) foi realizado como descrito anteriormente (Kotzer *et al.*, 2004). As culturas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas foram crescidas em 2 mL de meio Rhizo, com antibióticos adequados, a 28°C, por 16 horas. Procedeu-se à centrifugação a 2.205 x g por 3 min. O *pellet* foi lavado 2 vezes com tampão de infiltração (MgCl₂ 10 mM, EDTA 10 mM, acetosiringona 10 μM), e depois ressuspendido em 1 mL do mesmo tampão. Células da epiderme de tabaco foram infiltradas com *A. tumefaciens* contendo as construções L10-GFP, YFP-L10, L18-GFP, YFP-L18, NIK1-GFP, NIK2-GFP, NIK3-GFP, NIKG474V/T468A-GFP e NIKT474D-GFP em uma D.O. de 0,2.

A expressão das proteínas foi confirmada por microscopia confocal, três dias após a infiltração. A análise foi realizada nas folhas, com explantes de aproximadamente 0,5 cm², montados em água, dos quais se observou, principalmente, a lâmina foliar. Foram utilizadas duas repetições, consistindo de diferentes folhas de diferentes plantas.

9.2 – Microscopia confocal e processamento de imagens

As imagens de microscopia confocal foram obtidas utilizando-se o sistema LSM 510 META invertido (ZEISS) com laser de argon e laser de hélio neon com as objetivas de imersão de óleo de 40x e de 60x. Para a obtenção de imagens de co-expressão de GFP e YFP, foram usados alternativamente os comprimentos de onda de 458 nm para GFP e 514 nm para YFP com mudança de fase no modo de multi-trilha do microscópio. A fluorescência foi detectada usando o comprimento de onda de 458 nm/514 nm com filtro dicromático de 515 nm e filtro de passagem de 475 a 525 nm para GFP e 535 a 590 nm para YFP. O *pinhole* foi fixado fornecendo uma faixa óptica de 1 a 1,5 μ m. Foram utilizados os vetores GFP e YFP vazios como controles. As imagens foram processadas com auxílio do *software* “LSM Image Browser 4” (ZEISS) e do programa *Adobe Photoshop 7.0.1*.

10- Análise de transativação em levedura

A presença de um possível domínio de ativação nas proteínas L10 e L18 foi avaliada por meio do ensaio de transativação em levedura, conforme Fujita et al., (2004). O cDNA dessas proteínas foram clonados dentro do vetor pDEST32, de forma que as proteínas pudessem ser produzidas fusionadas ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 quando as células de leveduras fossem transformadas. Foi usado uma linhagem de levedura AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL_{TATA}::MEL_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ) a qual contém os genes repórteres LacZ e HIS3. As culturas transformadas foram plaqueadas em meio sem histidina e na presença de X-GAL.

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão em E. coli e purificação das proteínas L10, L18, KDNIK1, KDNIK2, KDNIK3, KDBRI1 e KDSERK1, fusionadas a GST e a His

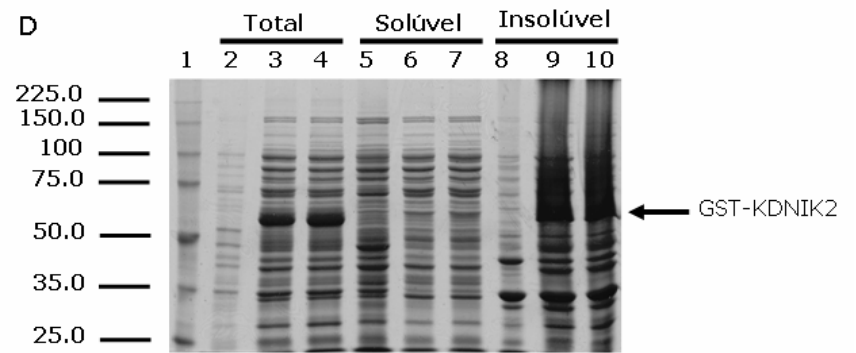
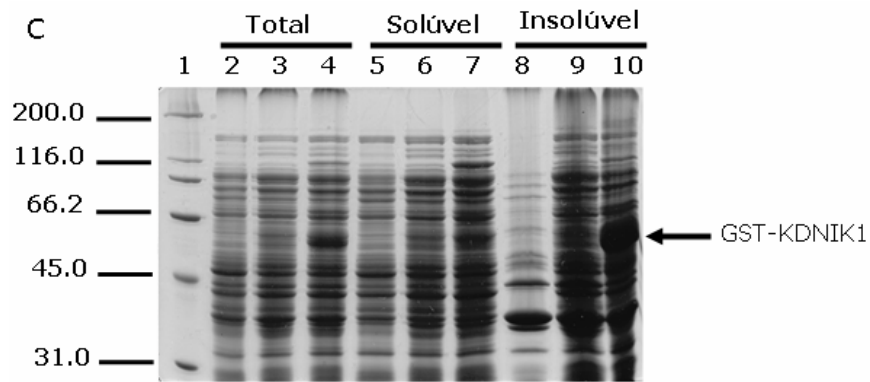
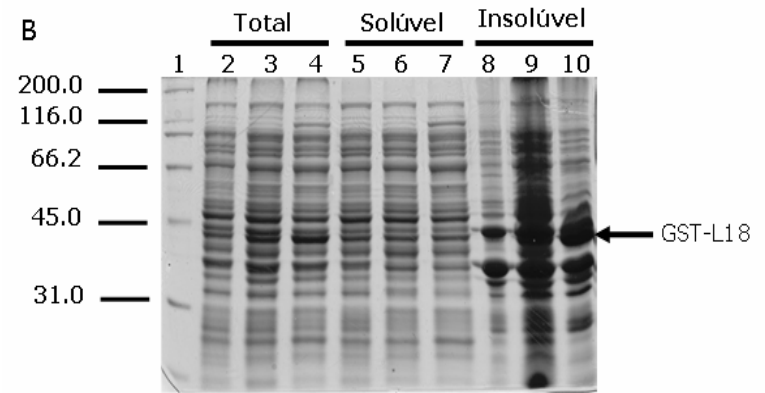
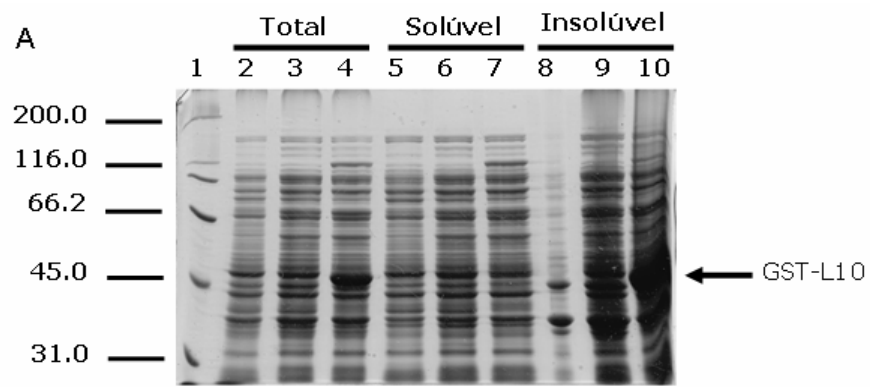
Com a finalidade de analisar a participação das proteínas L10 e L18 na via de defesa contra geminivírus mediada pela proteína NIK, e avaliar a especificidade dos substratos dentro da família das LRR-RLKs, foi realizado o ensaio de fosforilação *in vitro* das proteínas L10 e L18 com NIK1, NIK2, NIK3, BRI1 e SERK1. Para isso, as regiões correspondentes ao domínio quinase de NIK1, NIK2, NIK3, BRI1 e SERK1, bem como os cDNAs de *L10* e *L18* foram fusionados a GST no amino-terminal da proteína ou a histidina. Todas as proteínas recombinantes foram expressas eficientemente (Figura 2) e purificadas fusionadas à GST, em *E. coli* BL21(DE3) pLysS, como mostrado nas Figuras 3 e 4.

As proteínas GST-L10 e GST-L18, com massas moleculares de aproximadamente 50 e 44 kDa, respectivamente (Figuras 2A e 2B), foram expressas eficientemente em bactéria, porém acumularam na fração insolúvel (canaleta 10). Isso dificultou sua purificação por cromatografia de afinidade (Figuras 3A e 3B), pois a interação de GST com a glutationa da resina necessita do GST na conformação nativa. Da mesma forma, obteve-se uma quantidade reduzida de GST-KDNIK2 (63 kDa) e GST-KDNIK3 (63 kDa) na fração solúvel (Figuras 2D e 2E, respectivamente), justificando a baixa eficiência na purificação dessas proteínas recombinantes (Figuras 3D e 3E). Ao contrário, as proteínas recombinantes GST-KDNIK1 (63 kDa), GST-KDBRI1 (66 kDa) e GST-KDSERK1 (63 kDa) acumularam eficientemente na fração solúvel (Figuras 1C, 1F e 1G,

respectivamente), possibilitando a obtenção de altas concentrações de proteínas eluídas da resina de Glutathione Sepharose (Figuras 2C, 2F e 2G).

Similarmente, as proteínas recombinantes His-L10 (28 kDa) e His-L18 (22 kDa) foram induzidas eficientemente, fusionadas à histidina, com acúmulo predominante na fração insolúvel (dados não mostrados). As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em resina de níquel (Ni-NTA) em condições desnaturantes, utilizando uréia 8M, (Apêndice, Figuras 16A e 15B). A proteína recombinante His-L10 purificada foi utilizada para produção de anticorpos (Apêndice, Figura 17).

Todas as proteínas fusionadas à GST foram quantificadas e analisadas por SDS-PAGE para normalização da concentração (Figura 4).



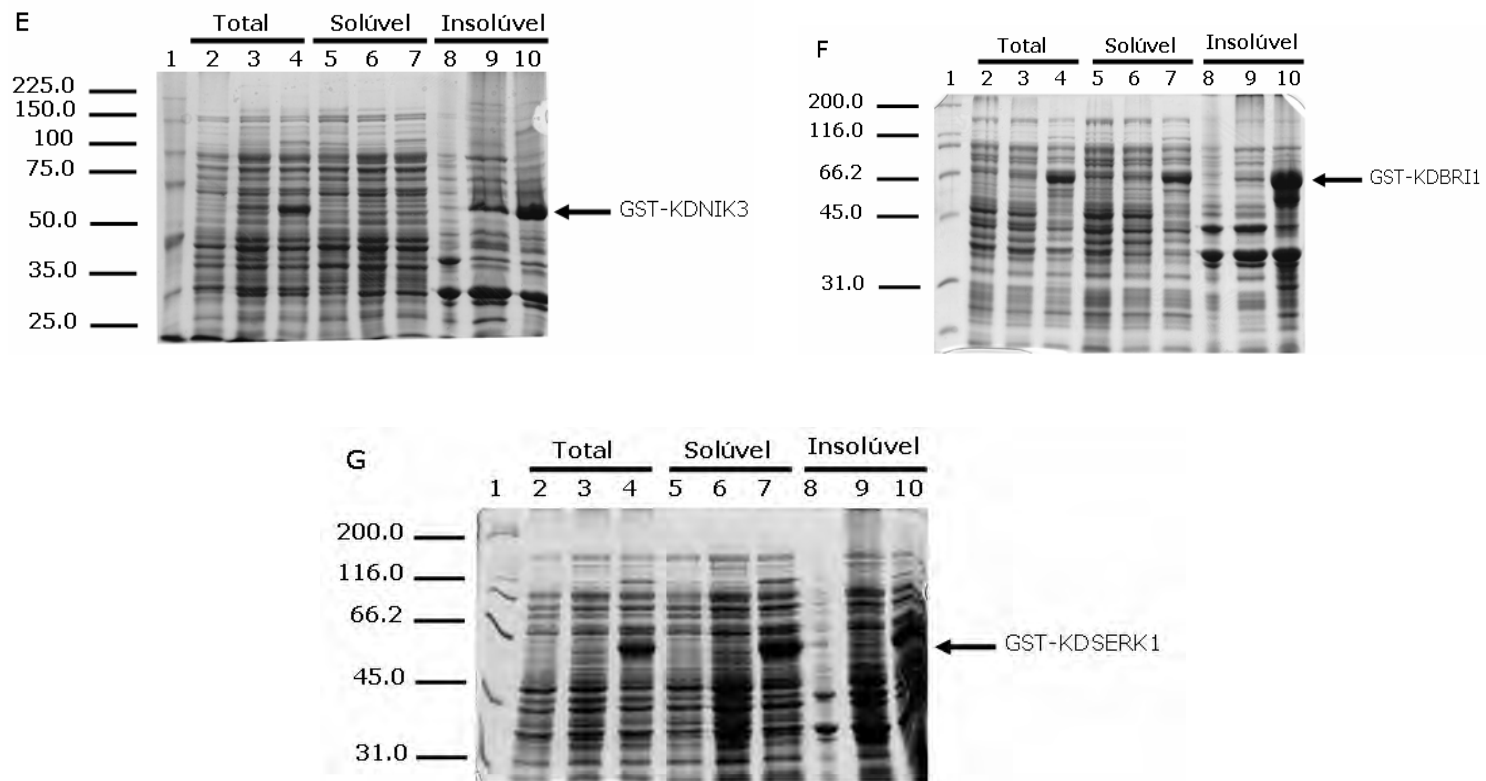


Figura 2: Análise em SDS-PAGE das proteínas celulares totais, solúveis e insolúveis de bactérias transformadas com a construção indicada. Extratos proteicos total (2, 3 e 4), solúvel (5, 6 e 7) e insolúvel (8, 9 e 10) da *E. Coli* BL21 (DE3) pLySS não transformada (2, 5 e 8), transformada com o clone na ausência do indutor IPTG (3, 6 e 9) e na presença do indutor IPTG (4, 7 e 10). O marcador de massa molecular corresponde a (1).

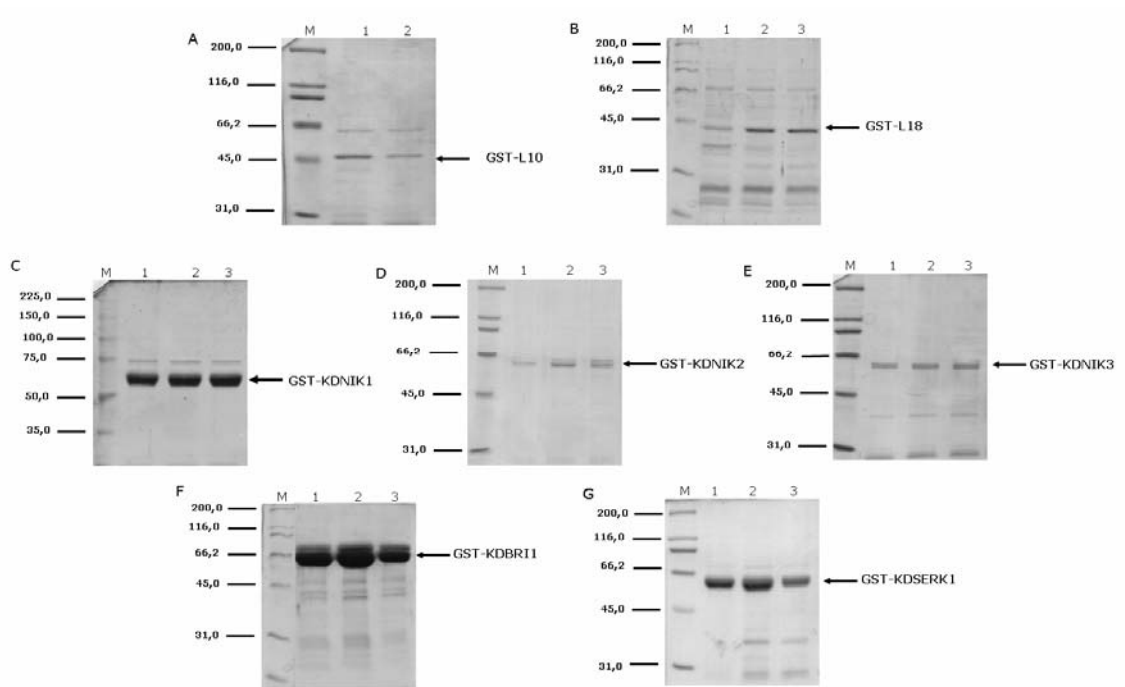


Figura 3: Purificação das proteínas recombinantes L10 e L18, NIK1, NIK2, NIK3, BRI1 e SERK1 fusionadas à GST. As proteínas purificadas foram reveladas por *Comassie Brilliant Blue*. As canaletas (1), (2) e (3) correspondem, respectivamente, à proteína no 1º, 2º e 3º eluato. M corresponde ao marcador de massa molecular.

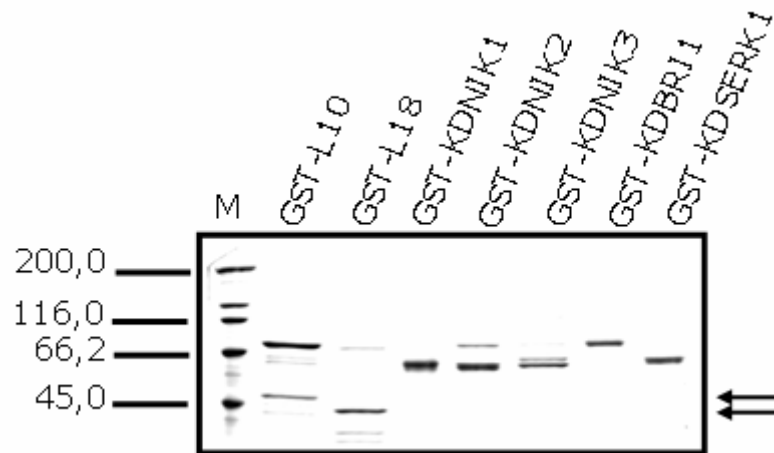


Figura 4: Análise em SDS-PAGE das proteínas fusionadas à GST - As proteínas purificadas foram reveladas por *Comassie Brilliant Blue*. As canaletas correspondem às frações do 1º, 2º e 3º eluato, reunidas e quantificadas. M corresponde ao marcador de massa molecular de ampla faixa.

Especificidade de interação de L10 e L18 com membros da família LRR-RLK

As proteínas L10 e L18 foram identificadas pela suas capacidades de interagir com o domínio quinase de NIK1 de *Arabidopsis*, através de um ensaio duplo híbrido de levedura (Fontes E.P.B., comunicação pessoal). Para determinar a especificidade dessa interação e analisar a participação de L10 e L18 na via de resposta à infecção viral mediada por NIK, foi inicialmente avaliado se as proteínas ribossomais serviam como substrato para o receptor serina/treonina quinase. Em ensaio de fosforilação *in vitro*, NIK1 fosforilou eficientemente L10, mas não L18 (Figuras 5A e 5E). A fosforilação de L10 foi devida à interação com o domínio quinase de NIK1, e não a alguma proteína contaminante da bactéria, porque a condução da reação de fosforilação na ausência da quinase não causou incorporação de radioisótopo na proteína L10 (Figura 5B). Além disso, L10 na presença de uma proteína NIK1 mutante inativa não é fosforilada (dado não mostrado).

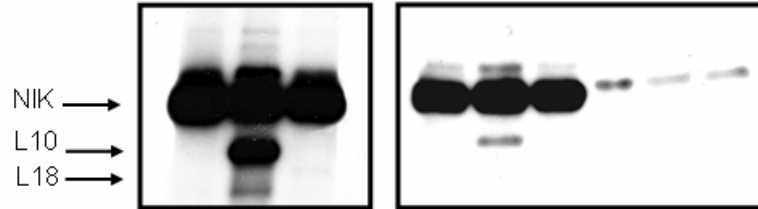
O receptor NIK1 pertence à subfamília LRR-RLK, cujos membros têm sido funcionalmente identificados como genes de defesa (*NIK1*, *NIK2* e *NIK3*) ou genes de desenvolvimento (*SERK1*, *SERK2*, *SERK3*) (Shiu e Bleeker, 2001). Com a finalidade de avaliar a especificidade de fosforilação de L10, as proteínas de defesa NIK2 e NIK3 e a proteína de desenvolvimento SERK1 foram incluídas nas reações de fosforilação (Figura 5). Além disso, o receptor BRI1 foi avaliado como um representante da família LRR-RLK, mas não pertencente à família de NIK1. Enquanto que NIK2 é capaz de fosforilar L10 embora com menor eficiência do que NIK1, L10 não é fosforilada por NIK3 e SERK1 (Figuras 5A, 5C e 5E). A atividade das proteínas quinases purificadas pode ser comprovada pela capacidade de autofosforilação (Figura 5D). A menor eficiência de autofosforilação de NIK2 e principalmente NIK3 em comparação à NIK1 parecer ter comprometido a fosforilação do substrato L10 (Figuras 5A, 5D e 5E). Assim sendo, estes experimentos não permitem descartar totalmente a possibilidade de L10 ser substrato para NIK3. As proteínas L10 e L18 possuem regiões preditas, possíveis

de serem fosforiladas (Figura 6). L10 possui dois resíduos de treonina e um de serina, como sítios potenciais de fosforilação, enquanto L18 possui cinco resíduos de treonina e quatro de serina. Os resultados demonstraram que L10 é substrato específico para as NIKs, sendo NIK1 a que possui maior afinidade por esta proteína. No caso de L18, as proteínas NIKs e SERK1 não foram capazes de promover sua fosforilação (Figuras 5A, 5C e 5E). Em contraste, BRI1 fosforilou L18 com alta eficiência (Figuras 5B e 5E). Estes resultados sugerem que a via de sinalização de BRI1 pode estar modulando o controle da tradução de proteínas. Consistente com esta hipótese, tem sido demonstrado que um componente do fator de iniciação de tradução TRIP-1 também é fosforilado por BRI1 *in vitro*, podendo levar à formação do complexo de tradução eIF3 e, conseqüentemente, iniciação da tradução de proteínas. Além disso, TRIP-1, uma vez fosforilado por BRI1, poderia estar sendo translocado para o núcleo, levando a regulação na expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento celular (Ehsan et al., 2005).

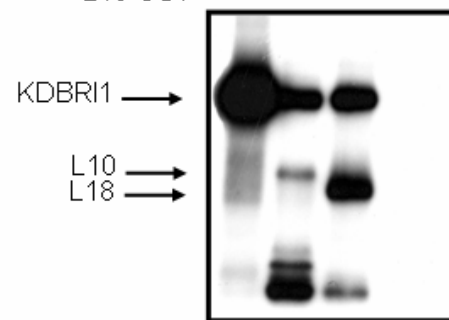
Por outro lado, a proteína L10 é substrato específico para NIK, e pode estar atuando na via de infecção viral mediada por NIK. Estudo realizado com um homólogo da proteína L10 em leveduras (GRC5) indicou que L10 participa no controle da expressão gênica (Karl et al., 1998). A fim de avaliar esta alternativa foi analisada a localização subcelular das proteínas L10 e L18, na presença e ausência de NIK. Além disso, foi realizado um ensaio de transativação em leveduras, a fim de examinar a presença de um possível domínio de ativação da transcrição nessas proteínas.

A

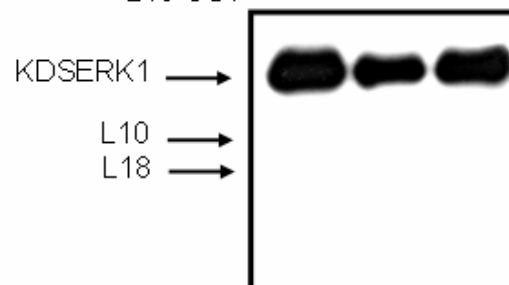
NIK1-GST	+	+	+	-	-	-	-	-	-
NIK2-GST	-	-	-	+	+	+	-	-	-
NIK3-GST	-	-	-	-	-	-	+	+	+
L10-GST	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L18-GST	-	-	+	-	-	+	-	-	+

**B**

BRI1-GST	+	+	+	-	-
L10-GST	-	+	-	+	-
L18-GST	-	-	+	-	+

**C**

SERK1-GST	+	+	+
L10-GST	-	+	-
L18-GST	-	-	+



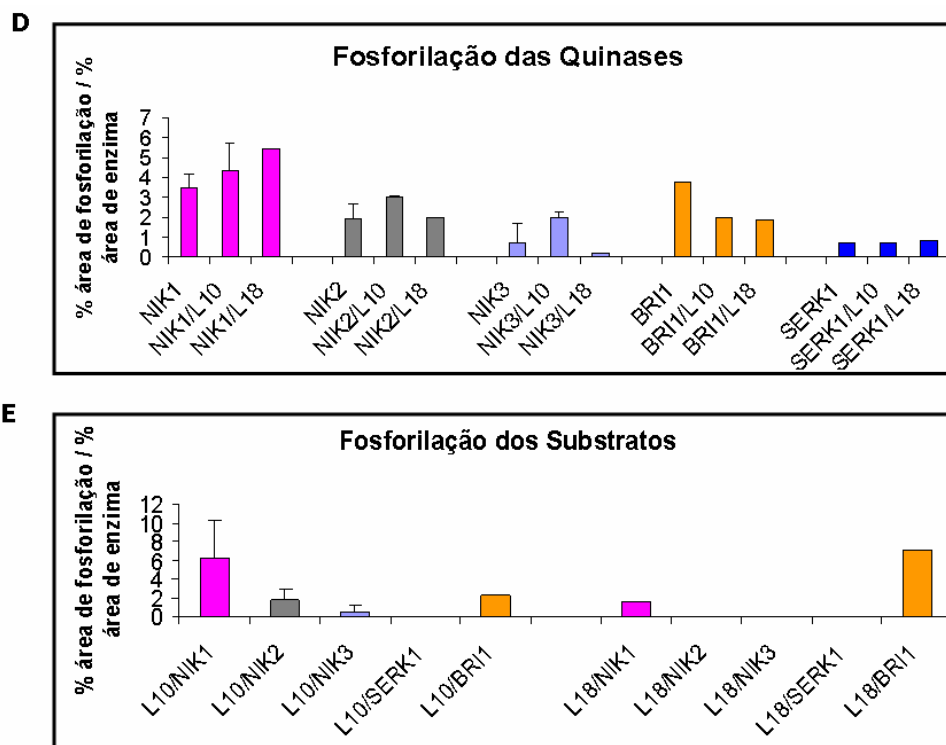


Figura 5. Ensaio de fosforilação *in vitro*. L10 e L18 fusionadas à GST foram produzidas em bactéria purificadas e utilizadas em um ensaio de fosforilação *in vitro*, na presença das proteínas quinases (KDNIKs, KDBRI1 e KDSEK1) usando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Após a reação, as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% e visualizadas por auto-radiografia. (A) Fosforilação de L10 e L18 pelas proteínas NIKs. (B) Fosforilação de L10 e L18 pela proteína BRI1. (C) Fosforilação de L10 e L18 pela proteína SERK1. Autofosforilação (D) e fosforilação dos substratos (E) quantificadas com o auxílio do programa *phosphorimaging*. As barras mostram o desvio padrão dos experimentos com repetição.

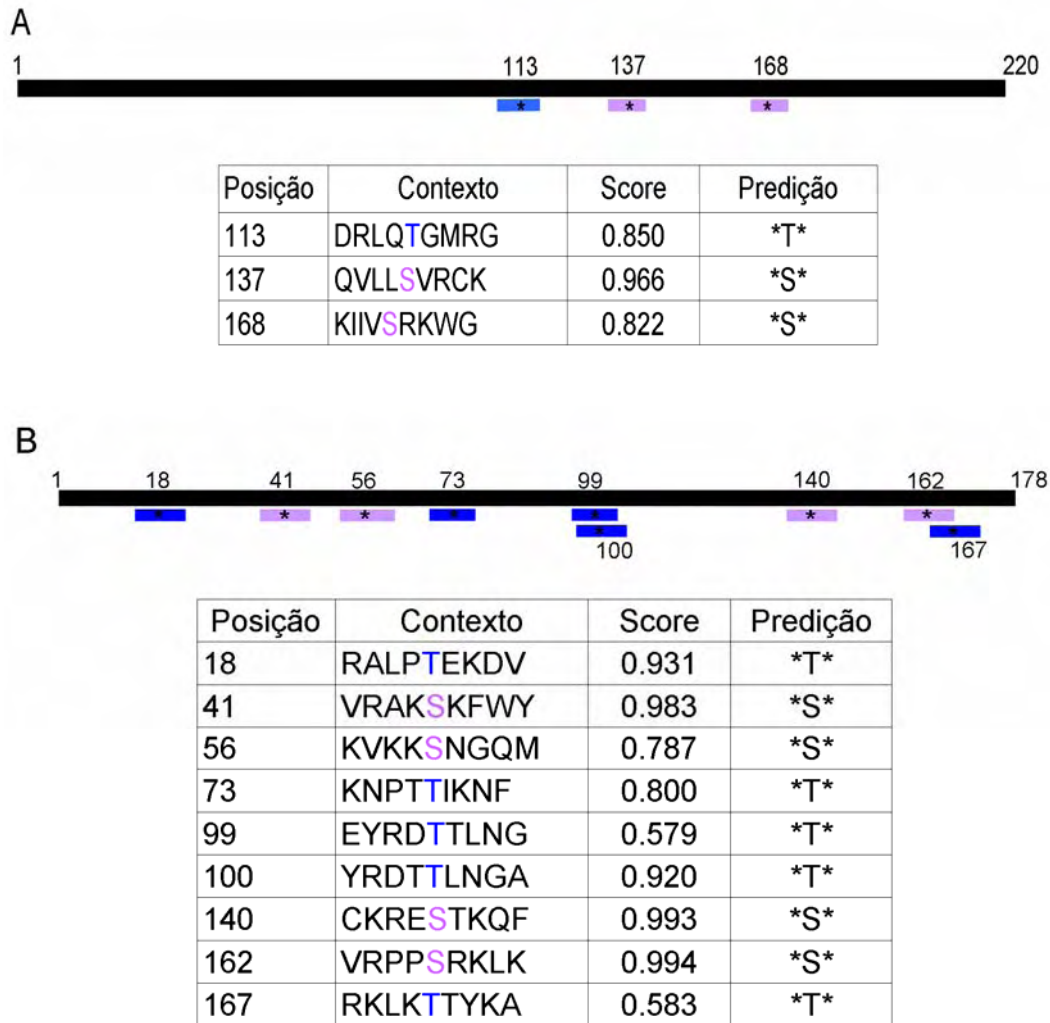
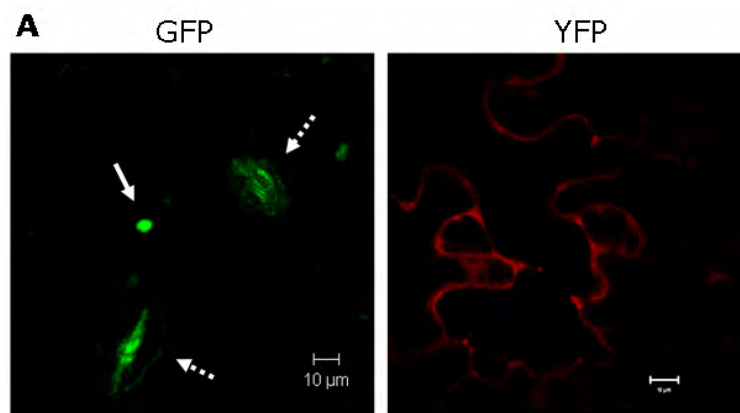


Figura 6: Esquema da predição de sítios possíveis de fosforilação. Representação esquemática dos prováveis sítios de fosforilação presentes nas proteínas L10 (Figura A) e L18 (Figura B) deduzidos pelo programa NetPhos 2.0 Server. A proteína completa é representada por uma barra preta. As barras em azul e lilás indicam, respectivamente, o contexto no qual os resíduos de treonina (T) e serina (S) estão inseridos. A posição exata do aminoácido (T ou S) possível de ser fosforilado é representada por um asterisco.

As proteínas L10 e L18 foram encontradas preferencialmente no citoplasma de células epidérmicas de tabaco

No intuito de melhor compreender a função das proteínas ribossomais, L10 e L18 foram fusionadas a GFP e YFP e expressas transientemente em folhas de tabaco para análise de sua localização subcelular (Figura 7). Ensaio de fracionamento celular demonstrou que a proteína L10 de levedura está localizada no citoplasma e preferencialmente no retículo endoplasmático (Nguyen et al., 1998). Esses resultados

sugerem que a proteína ribossomal L10 é adicionada ao complexo ribossomal no citoplasma e não no núcleo, onde ocorre sua montagem. No entanto, L10-GFP e YFP-L10 foram localizadas no citoplasma de todas as células expressas, embora em aproximadamente 3% das células, L10 tenha sido encontrada também no núcleo (Figura 7B). Para a proteína L18, foi observada a localização citoplasmática em todas as células transformadas, havendo também, em algumas células, sua localização no nucléolo (Figura 7C). Como complexo ribossomal é montado no nucléolo e posteriormente translocado para o citoplasma, justifica-se o fato de essas proteínas terem sido encontradas no compartimento nuclear de algumas células. A localização de L10 e L18 não foi alterada com a fusão de proteínas repórteres diferentes em extremidades opostas, o que reforça o argumento de que a expressão transiente das proteínas quiméricas reflete a real localização de L10 e L18 nas células vegetais.



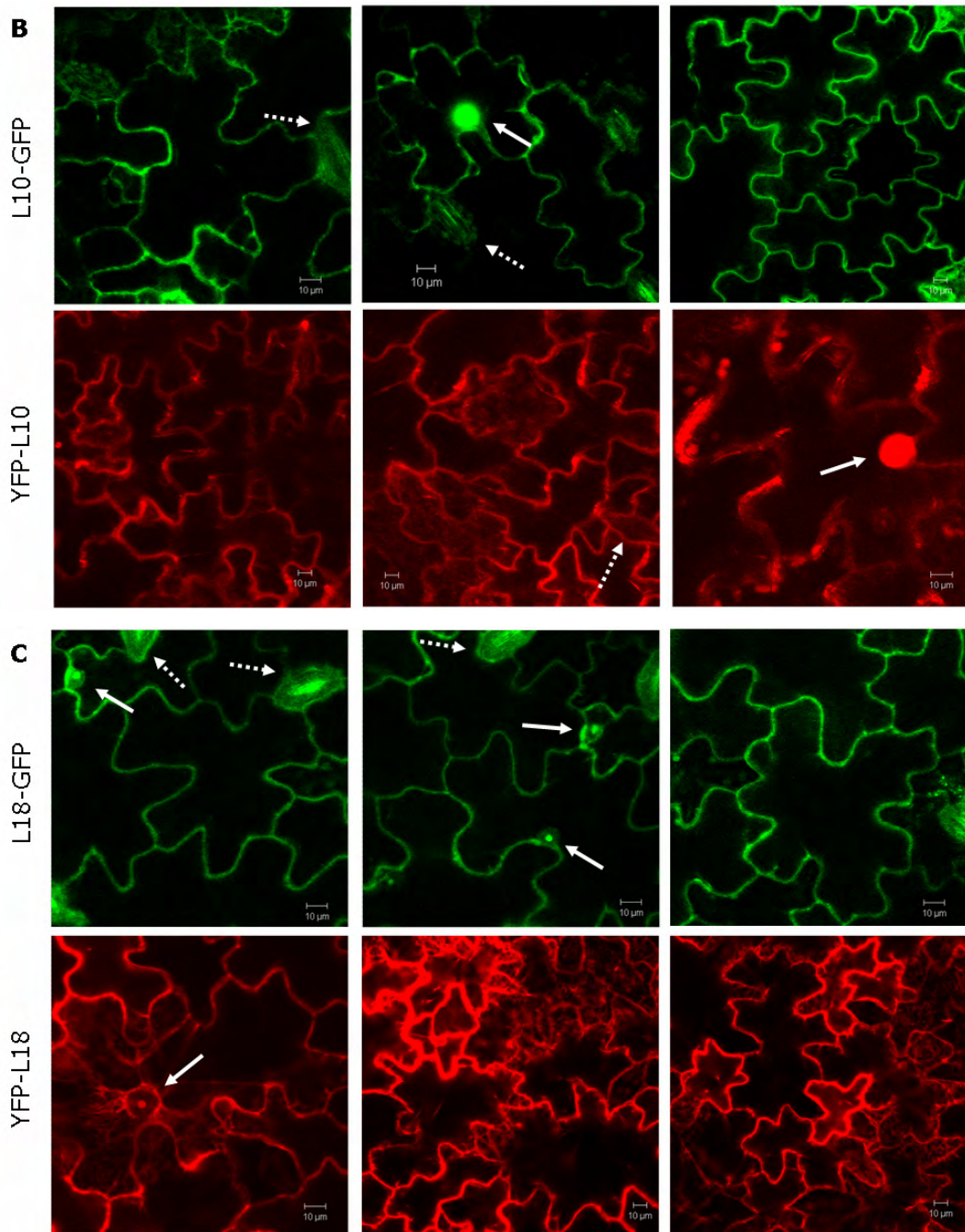


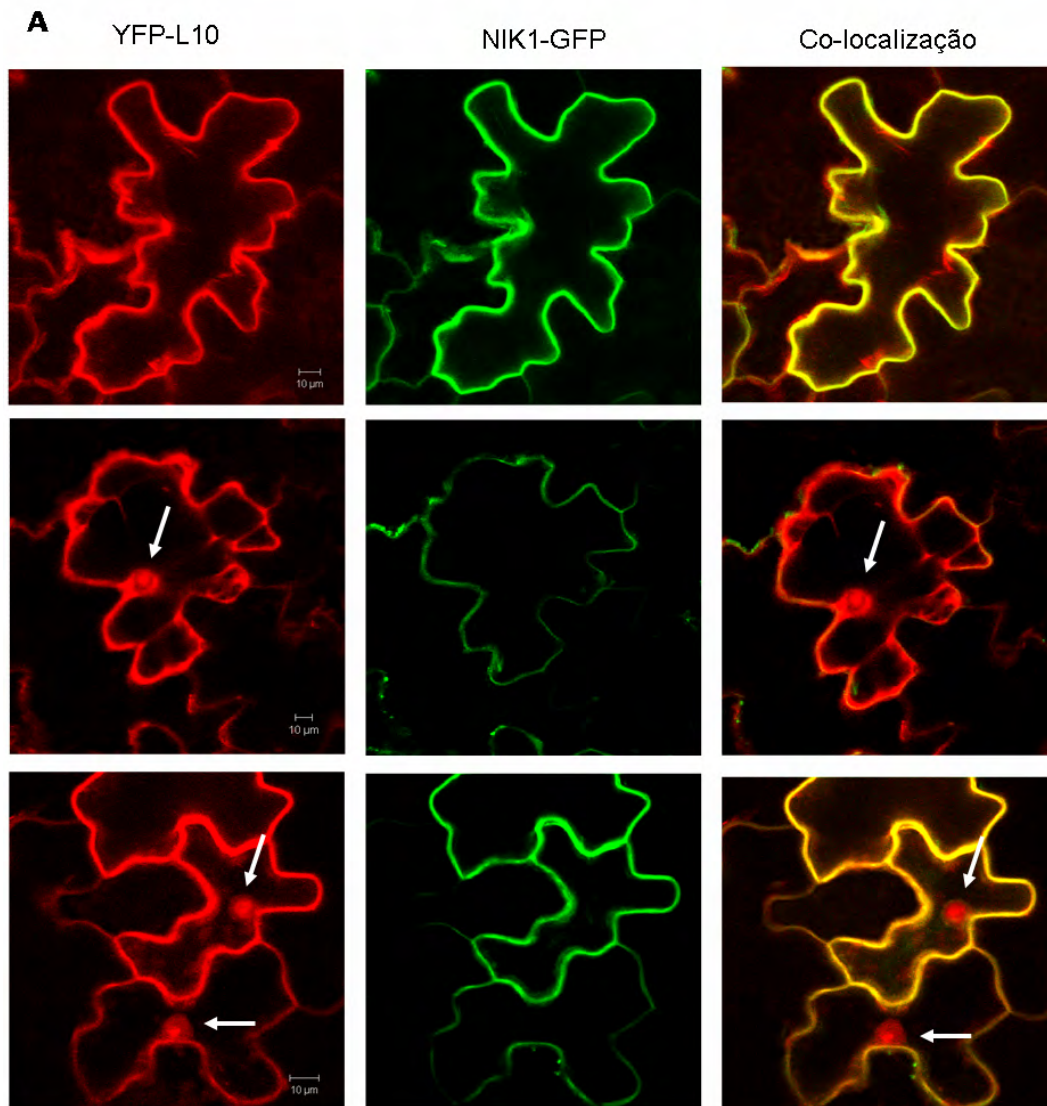
Figura 7- Localização citoplasmática preferencial das proteínas L10 e L18. As proteínas L10 e L18 foram fusionadas a GFP e YFP sob controle do promotor 35S, e expressas transientemente em células epidérmicas de tabaco. A análise foi realizada por meio de microscopia confocal. As barras representam 10 μ m. As setas cheias apontam o núcleo e as setas pontilhadas indicam estômatos, capazes de emitir autofluorescência (A) Localização nuclear do plasmídeo vazio de pGFP e localização citoplasmática de pYFP (foto do vetor pYFP cedido gentilmente por Claudine Márcia Carvalho). (B) Expressão de GFP-L10 e YFP-L10. Cada quadro representa diferentes células superexpressando L10 no citoplasma e no núcleo de algumas células. (C) Expressão de GFP-L18 e YFP-L18. Cada quadro representa diferentes células superexpressando L18 no citoplasma e em alguns nucléolos.

A superexpressão de NIK redireciona a proteína L10 para o núcleo, mas L18 permanece no citoplasma

Para analisar o fenômeno biológico da atuação de NIK sobre as proteínas L10 e L18, foi analisada a co-localização de tais proteínas em células epidérmicas de tabaco. NIK fusionada à GFP foi co-expressa transientemente com as proteínas L10 e L18 fusionadas a YFP. Foi observado um aumento significativo, de aproximadamente 30%, de YFP-L10 no núcleo quando co-expressa com NIK1-GFP (Figura 8A e 9) e NIK2-GFP (dado não mostrado), se comparada à expressão de L10 na ausência de NIK1 e NIK2, enquanto que NIK3 não redirecionou L10 para o núcleo (dado não mostrado). Em contraste, nenhuma mudança de localização foi observada quando NIK-GFP foi co-expressa com YFP-L18 (Figura 8B). Uma explicação para estes resultados seria que NIK possa estar fosforilando L10 *in vivo* e, então, redirecionando-a para o núcleo, para que atue na ativação ou repressão de genes. Exemplo desse tipo de regulação tem sido demonstrado para a proteína humana MADR2, que quando fosforilada pelo receptor quinase (TGF β) é translocada para o núcleo. Esta observação demonstra que a fosforilação do substrato é necessária para a sua regulação e função na célula (Silva et al., 1996). Para avaliar essa possibilidade em se tratando de L10 e/ou L18, foi realizado um ensaio de transativação em levedura. Expressão de L10 ou L18 fusionadas ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 (BDGAL4) não ativou os genes repórteres, conforme o controle positivo, NAC-BDGAL4, que promoveu crescimento da levedura em meio na ausência de histidina, além de mostrar atividade de β -galactosidase (dado não mostrado). Isto confirma que L10 e L18 não possuem atividade de ativação transcricional. Desta forma, acredita-se que L10 possa atuar juntamente com algum transfator, inibindo sua atividade ou controlando-a positivamente, enquanto L18, possivelmente, atue modulando a tradução.

Foi investigado ainda se mutantes de NIK1 incapazes de fosforilar a proteína L10 *in vitro* e outro com atividade quinase superior a NIK1 (Santos A.A., tese de

doutorado no prelo), redirecionam o substrato para o núcleo. Para isso os mutantes NIKT474D e NIKG473V/T474A fusionados a GFP foram co-expressos com YFP-L10. Consistente com os resultados obtidos no ensaio de fosforilação *in vitro*, o mutante superativo de NIK1 (NIKT474D) redirecionou a proteína para o núcleo em torno de 57% das células expressas, enquanto o mutante inativo não relocalizou a proteína para o núcleo (Figura 9). Estes resultados demonstram que o redirecionamento de L10 para o núcleo acionado por NIK depende da atividade de quinase da proteína, o que reforça a hipótese de que fosforilação de L10 por NIK promove a localização nuclear da proteína. No entanto, novos experimentos serão necessários para avaliar a verdadeira função de L10 no núcleo.



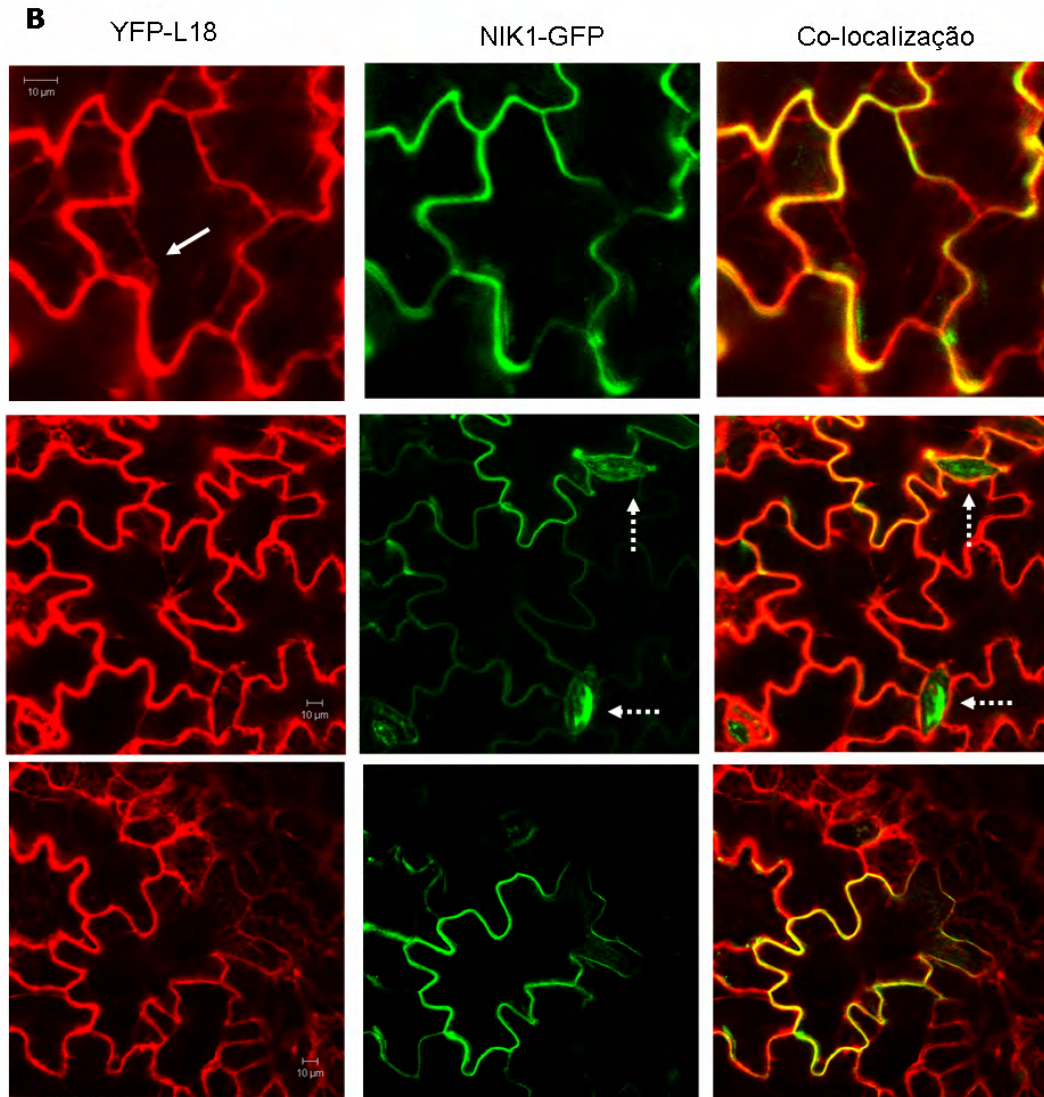


Figura 8- Localização subcelular das proteínas L10 e L18, na presença e ausência de NIK. As expressões das proteínas L10 e L18 foram monitoradas através da fluorescência emitida pela proteína YFP (*yellow fluorescent protein*), enquanto que a proteína NIK1 foi detectada pela fluorescência da proteína GFP (*green fluorescent protein*), por meio de microscopia confocal, em células epidérmicas de tabaco. As barras indicam 10 μ m. As setas cheias apontam o núcleo e as setas vazias indicam os estômatos que autofluorescem. (A) Co-localização de L10 e NIK. (B) Co-localização de L18 e NIK.

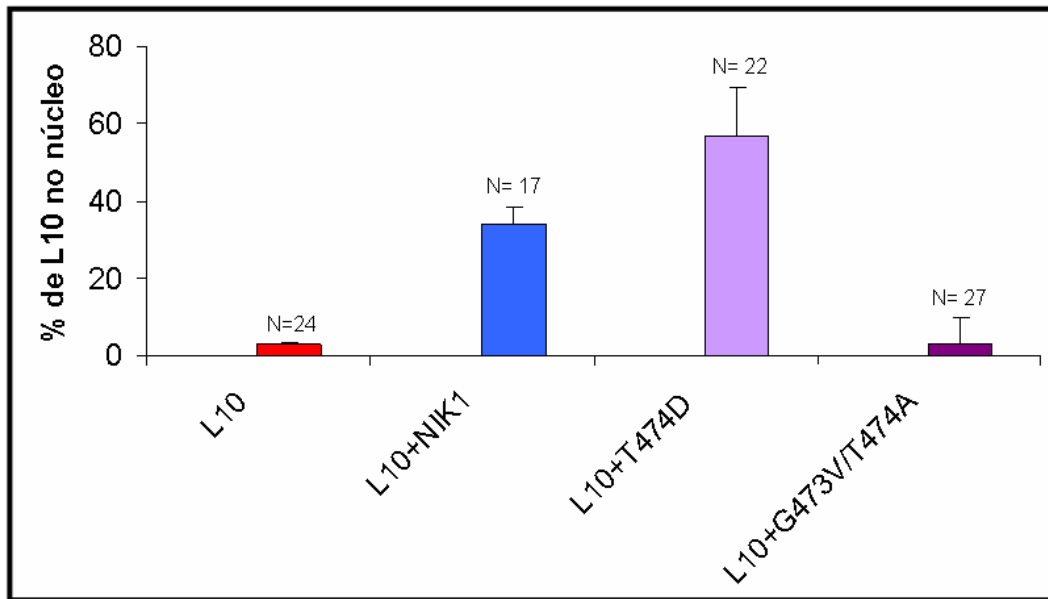


Figura 9: Redirecionamento de L10 para o núcleo depende da atividade de quinase de NIK1. O gráfico representa o redirecionamento da proteína L10 para o núcleo quando expressa em células epidérmicas de tabaco e quando co-expressa com NIK1, NIK1T474D, e NIK1G473V/T474A. As barras mostram o desvio padrão dos experimentos com três repetições. N indica o número total de células analisadas.

Análise da expressão de L10 e L18 e co-localização com NIK1 na presença de TGMV

As proteínas NSP do TGMV e do CaLCuV são capazes de interagir com NIK inibindo sua autofosforilação e, conseqüentemente, impedindo a sua atividade quinase (Fontes et al., 2004). Com base nessa informação, as localizações subcelulares de YFP-L10 e YFP-L18 foram analisadas na presença e ausência de NIK-GFP em plantas de tabaco infectadas pelo TGMV. As plantas foram bombardeadas com os componentes A e B do TGMV, e monitoradas quanto ao aparecimento de sintomas (Figura 10A) e presença dos componentes virais por PCR (Figura 10B). Plantas de tabaco infectadas pelo TGMV mostraram uma mudança na localização citoplasmática de YFP-L10, acumulando-se na forma de agregados no citoplasma (Figura 11A). Este fenômeno não ocorreu em plantas inoculadas apenas com micropartículas de tungstênio, mostrando que a mudança na localização de L10 não é devida à presença do tungstênio nas plantas bombardeadas (dado não mostrado). Tal mudança pode ter ocorrido como resultado da inativação de NIK por NSP. A integridade da célula analisada permite excluir a possibilidade de que tenha ocorrido morte celular (Figura

11B). Por sua vez, YFP-L18 não sofreu nenhuma mudança em sua localização quando expressa em plantas infectadas pelo TGMV (Figura 11C).

A inativação de NIK por NSP pode evitar a fosforilação de L10 e, conseqüentemente, comprometer sua localização celular. Neste caso a super-expressão de NIK poderia compensar este efeito e restaurar a fosforilação e a localização correta de L10. Para avaliar esta possibilidade, as proteínas NIK-GFP e YFP-L10 ou YFP-L18 foram co-expressas em folhas infectadas de tabaco e analisadas quanto à localização subcelular (Figuras 12A a 12F). O aumento da expressão de NIK parece ter reduzido a inibição por NSP, já que a proteína L10 manteve seu padrão normal de localização subcelular.

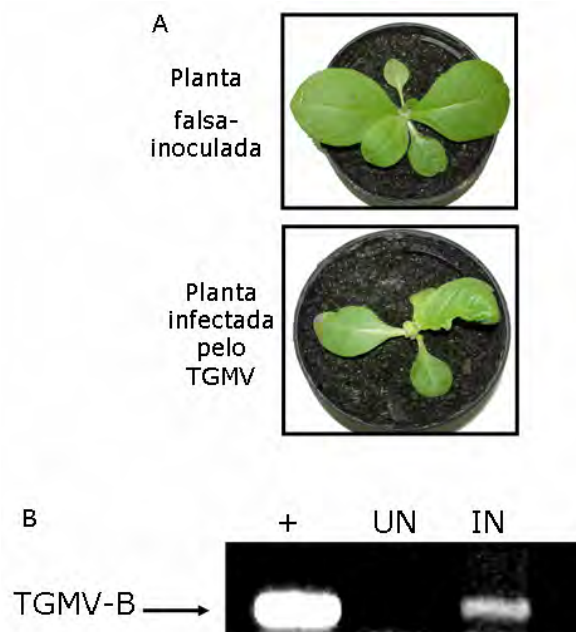


Figura 10: Plantas de tabaco infectadas com TGMV. (A) Plantas de tabaco foram bombardeadas com os componentes A e B do vírus TGMV. Como controle, foi usado uma planta de tabaco bombardeada apenas com tungstênio. (B) Confirmação da infecção viral, por PCR, usando oligonucleotídeos degenerados para o componente B de begomovírus. DNA do componente B de TGMV foi usado como controle positivo da reação. UN indica planta falsa inoculada e IN planta bombardeada com TGMV.

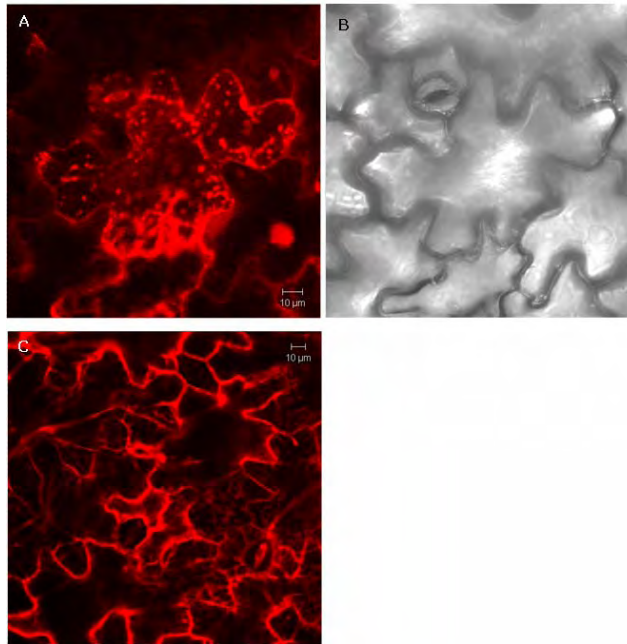


Figura 11- Análise da localização subcelular das proteínas L10 e L18, na presença de TGMV. A fluorescência emitida pela proteína YFP (*yellow fluorescent protein*) foi monitorada por meio de microscopia confocal, em células epidérmicas de tabaco, na presença do vírus TGMV. As barras indicam 10µm. (A) Expressão da proteína L10 na presença de TGMV, mostrando um acúmulo da proteína em pontos no citoplasma. (B) Integridade da célula visualizada através do campo branco da foto A. (C) Expressão da proteína L18 na presença de TGMV, e sua manutenção no citoplasma.

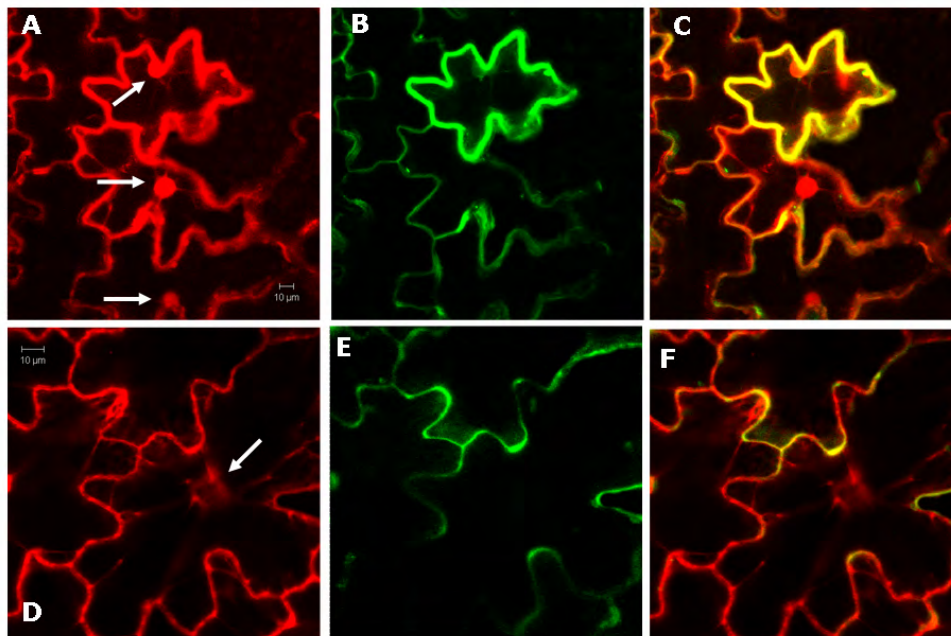
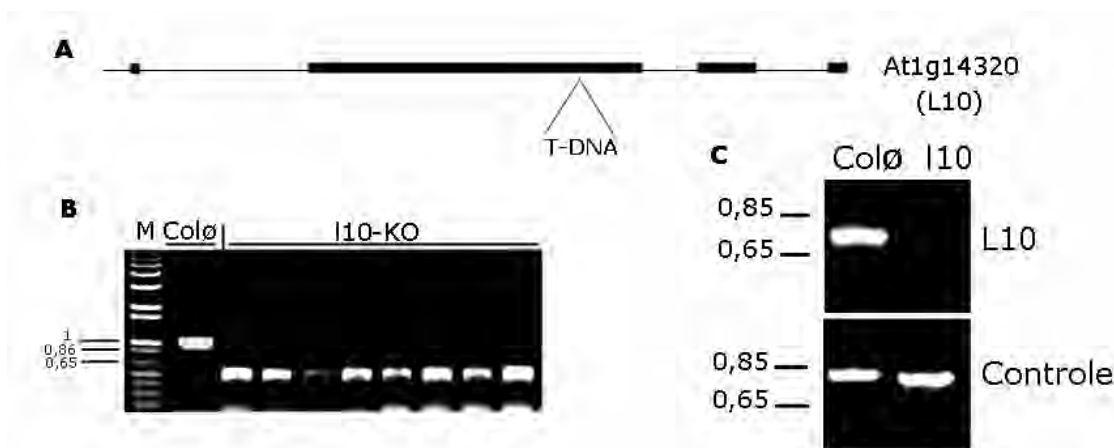


Figura 12- Co-localização das proteínas L10 e L18 com NIK1, na presença de TGMV. A fluorescência emitida pela proteína YFP (*yellow fluorescent protein*) e GFP (*green fluorescent protein*) foi monitorada por meio de microscopia confocal, em células epidérmicas de tabaco, na presença do vírus TGMV. As barras representam 10µm. As setas indicam o núcleo. (A) Localização subcelular de YFP-L10 (B) Localização subcelular de NIK-GFP (C) Co-localização de L10 e NIK. (D) Localização subcelular de YFP-L18 (E) Localização subcelular de NIK-GFP (F) Co-localização de L18 e NIK.

Identificação de linhagens knockout de L10 e L18

Para analisar geneticamente a participação das proteínas L10 e L18 na via de resposta à infecção viral mediada por NIK e determinar a relevância biológica da interação L10-NIK e L18-NIK, foram identificados mutantes para os genes *L10* e *L18*, obtidos por inserção de T-DNA (Figuras 13A e 13D, respectivamente). O gene *L10* (At1g14320) possui 4 exons e 3 introns, sendo que o T-DNA interrompe o gene no 4º exon. O gene *L18* consiste em 3 exons e 3 introns, e o T-DNA interrompe o gene no 3º exon. As plantas *l10* e *l18* foram selecionadas por meio de PCR, utilizando um conjunto de dois oligonucleotídeos senso e anti-senso específicos para *L10* ou *L18*, além de um oligonucleotídeo senso que anela no T-DNA. A amplificação de um fragmento de 1000 pb demonstra a presença de alelos selvagens (Figuras 13B e 13E, canaleta Col-0), enquanto que a presença de uma única banda em torno de 700 pb confirma a inserção do T-DNA nos dois alelos de At1g14320 (*L10*) e de At2g34480 (*L18*). A banda amplificada corresponde ao comprimento entre o T-DNA e a extremidade 3' do gene.

Para certificar que os mutantes *l10* e *l18* selecionados eram, de fato, alelos nulos, foi realizado um RT-PCR de amostra de RNA de plântulas selvagem Col-0, *l10* e *l18*. Não houve expressão do gene nos mutantes, confirmando que as plantas com inserção de T-DNA, *l10* e *l18*, eram *knockout* (Figuras 13C e 13F).



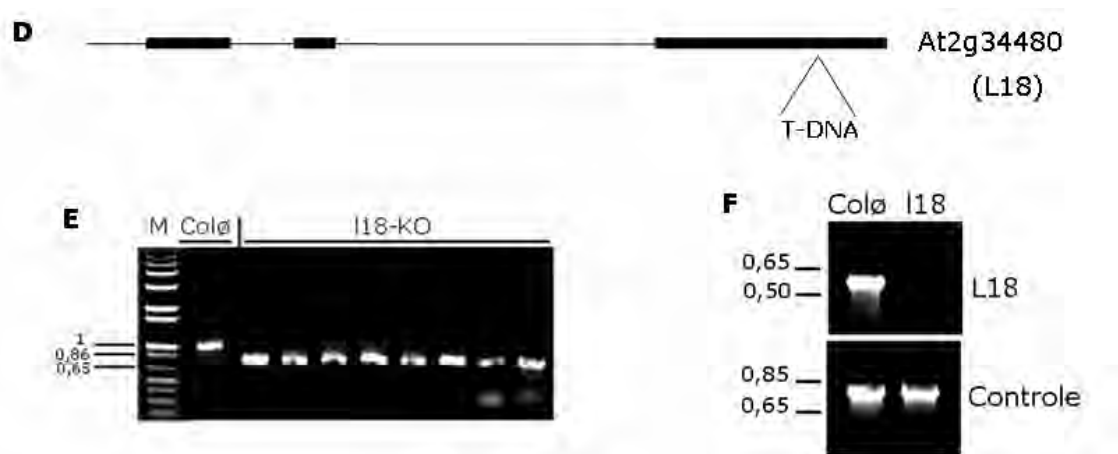


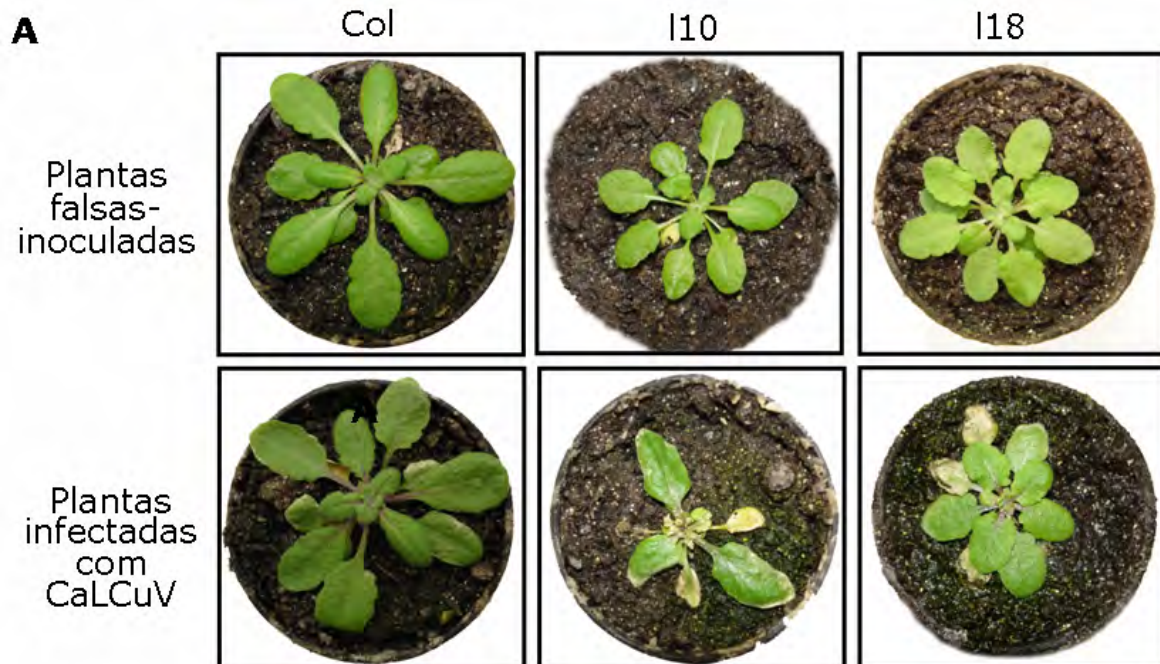
Figura 13 – Identificação de alelos nulos de *L10* e *L18*. (A) e (D) Esquema dos genes At1g14320 e At2g34480, indicando os introns (linhas) e exons (caixas pretas) de *L10* e *L18*, respectivamente. O local de inserção do T-DNA indicado não é apresentado em escala e o gene está mostrado na orientação 5'-3'. (B) e (E) Genotipagem, por PCR, de plantas *I10* e *I18* em homocigose. Os tamanhos indicados ao lado estão em kb. Wt indica a planta selvagem Col-0. M é o marcador de tamanho molecular, 1Kb DNA plus. (C) e (F) RT-PCR confirmando a expressão nula de transcritos de *L10* e *L18* nas plantas *I10* e *I18*, respectivamente, e a presença de expressão normal na linhagem selvagem Col-0. Como controle interno, é mostrada a amplificação utilizando oligonucleotídeos para o gene da aractina, a partir do mesmo cDNA.

Linhagens I10 e I18 exibem aumento de suscetibilidade à infecção por geminivírus

A fim de avaliar a suscetibilidade das plantas *knockout I10* e *I18* a infecção por geminivírus, foi realizado um experimento de infectividade, no qual as plantas selvagem Col-0, e os mutantes *I10* e *I18* foram inoculadas por biobalística com DNA-A e DNA-B do CaLCuV. Por meio da análise dos sintomas das plantas e do acúmulo do DNA viral, foi avaliada a porcentagem de plantas infectadas ao longo do tempo, após a infecção (Figura 14D). Plantas inoculadas somente com micropartícula de tungstênio foram usadas como controle negativo. Tanto plantas Col-0 quanto *I10* e *I18* desenvolveram os sintomas típicos de infecção por CaLCuV, porém com intensidade distinta. Para plantas *I10* e *I18 infectadas*, foram observadas redução no crescimento, clorose e deformação foliar, embora os sintomas tenham sido mais severos nos mutantes *I10*. O componente A do CaLCuV possui uma mutação na proteína da capa,

produzindo um códon de parada, no qual permite atenuação dos sintomas em plantas infectadas. De fato, as plantas de Col-0 não apresentaram sintomas aparente, em função dessa atenuação dos sintomas (Figuras 14A). O acúmulo do DNA viral foi detectado em plantas sintomáticas (Figuras 14B e 14C).

A identificação genética de componentes de vias de sinalização lineares ou integradas baseia-se na similaridade do fenótipo resultante da inativação gênica de qualquer um dos componentes da referida via. Por exemplo, um componente da via de sinalização mediada por BRI1 (*Brassinosteroid-insensitive 1*), quando silenciado por RNA anti-senso, apresenta características morfológicas similares ao fenótipo do *BR-insensitive* (Ehsan et al., 2005). Os resultados aqui apresentados indicam que inativação do gene *L10* recapitulou o fenótipo de *nik1*, ou seja, suscetibilidade aumentada à infecção viral, sugerindo que *L10* é um componente *downstream* da via de defesa mediada por NIK.



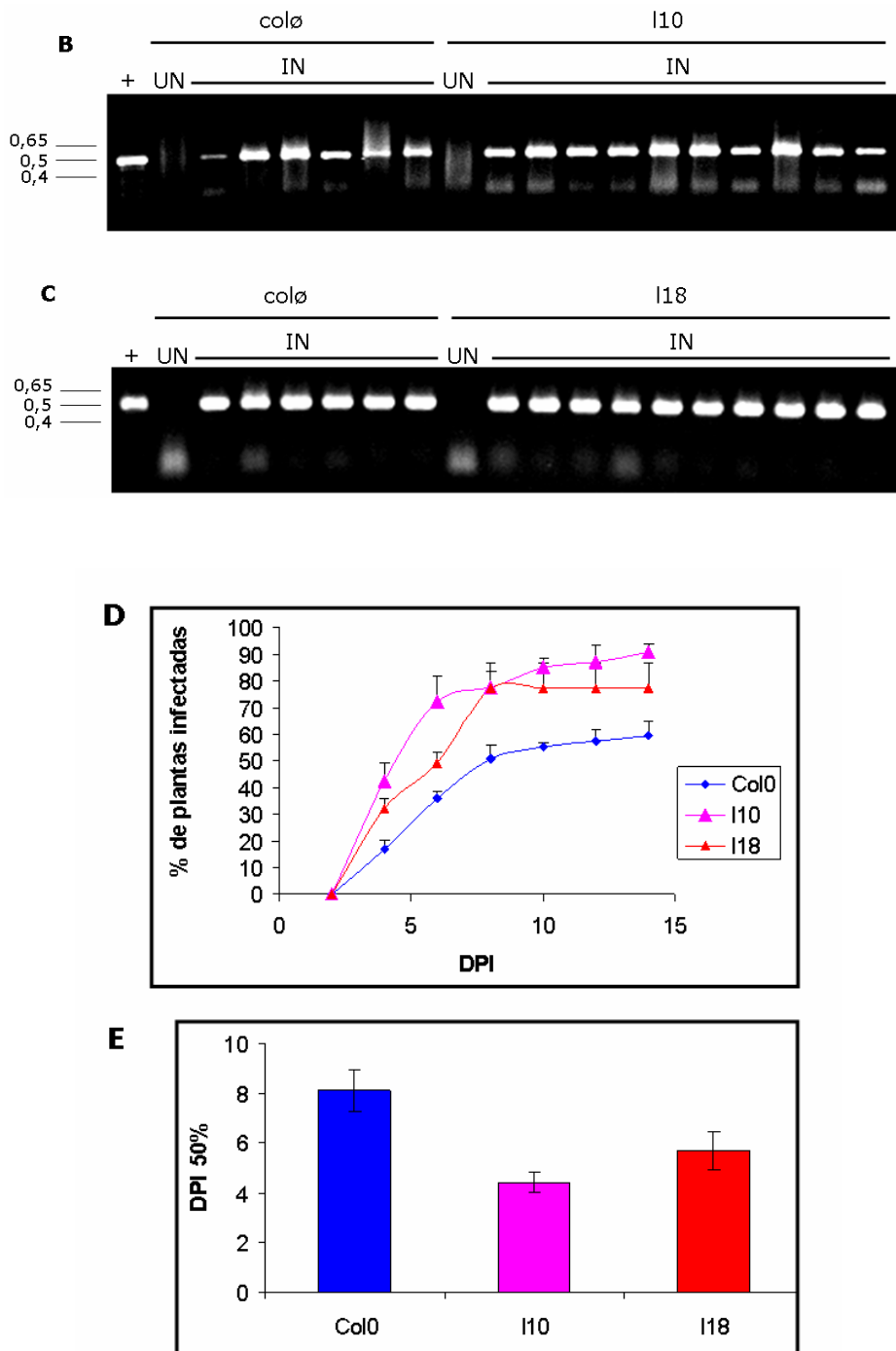


Figura 14 – Susceptibilidade de linhagens *I10* e *I18* à infecção por geminivírus. (A) Sintomas associados com a infecção por CaLCuV em linhagens *knockout*. O DNA-A e DNA-B virais foram introduzidos nas plantas por inoculação por biobalística. Acima, Col-0 (esquerda) e *I10* e *I18* (direita) são plantas falsamente inoculadas, bombardeadas somente com partículas de tungstênio, sem DNA viral. Abaixo, Col-0 (esquerda) e *I10* e *I18* (direita) são plantas infectadas por CaLCuV. (D) Gráfico dos valores da porcentagem de plantas sistematicamente infectadas em diferentes dias pós-inoculação (DPI). O desvio padrão (+) de três experimentos independentes foi determinado. B) e (C) Acúmulo do DNA viral em plantas infectadas. (E) Taxa de infecção em alelos nulos *I10* e *I18*. A taxa de infecção foi expressa como número de DPI (dias após a infecção) requerido para que 50% das plantas estivessem infectadas (DPI 50%). (O DNA total foi isolado de plantas Col-0 e *I10* e *I18*, com 7 DPI, e diagnosticado por PCR com oligonucleotídeos degenerados para o componente B de begomovírus. IN refere-se às plantas inoculadas com DNA viral e UN refere-se às plantas inoculadas somente com tungstênio.

Modelo proposto para a via de sinalização mediada pela proteína NIK

Coletivamente, os resultados da presente investigação e aqueles publicados anteriormente (Fontes et al., 2004; Mariano et al., 2004) sugerem um modelo para a via de sinalização anti-viral mediada por NIK (Figura 15). Diante de um estímulo de natureza desconhecida, o domínio LRR extracelular de NIK promove a oligomerização da proteína, aproximando os domínios de quinase intracelulares dos monômeros. Isto permite que um monômero trans-fosforile a alça de ativação do outro, promovendo a ativação da quinase e levando, provavelmente, à fosforilação do substrato L10. Esta fosforilação, por sua vez, redirecionaria a proteína L10 para o núcleo, levando à ativação de uma resposta adaptativa que causaria um impacto negativo na replicação ou no movimento do vírus. A ligação da proteína viral NSP no domínio intracelular de NIK, inibia a ativação da quinase e, conseqüentemente, da via de sinalização anti-viral mediada por NIK.

Por outro lado, NIK interage com L18 sem levar à fosforilação desta proteína. Isso, juntamente com o fato de L18 ser substrato para BRI1, pode ser um indicativo de que NIK estaria recrutando L18 do receptor BRI1, impedindo que esta fosse fosforilada e, assim, atuasse na tradução de proteínas. A ativação de vias de sinalização associada a eventos de desenvolvimento da planta é um fator positivo para a infecção sistêmica do vírus, uma vez que este depende de diversas interações com proteínas do hospedeiro, as quais facilitem sua replicação e seu movimento nas células infectadas. Nesse sentido, a inibição desta via de desenvolvimento mediada por BRI1 dificultaria o estabelecimento da infecção viral na planta.

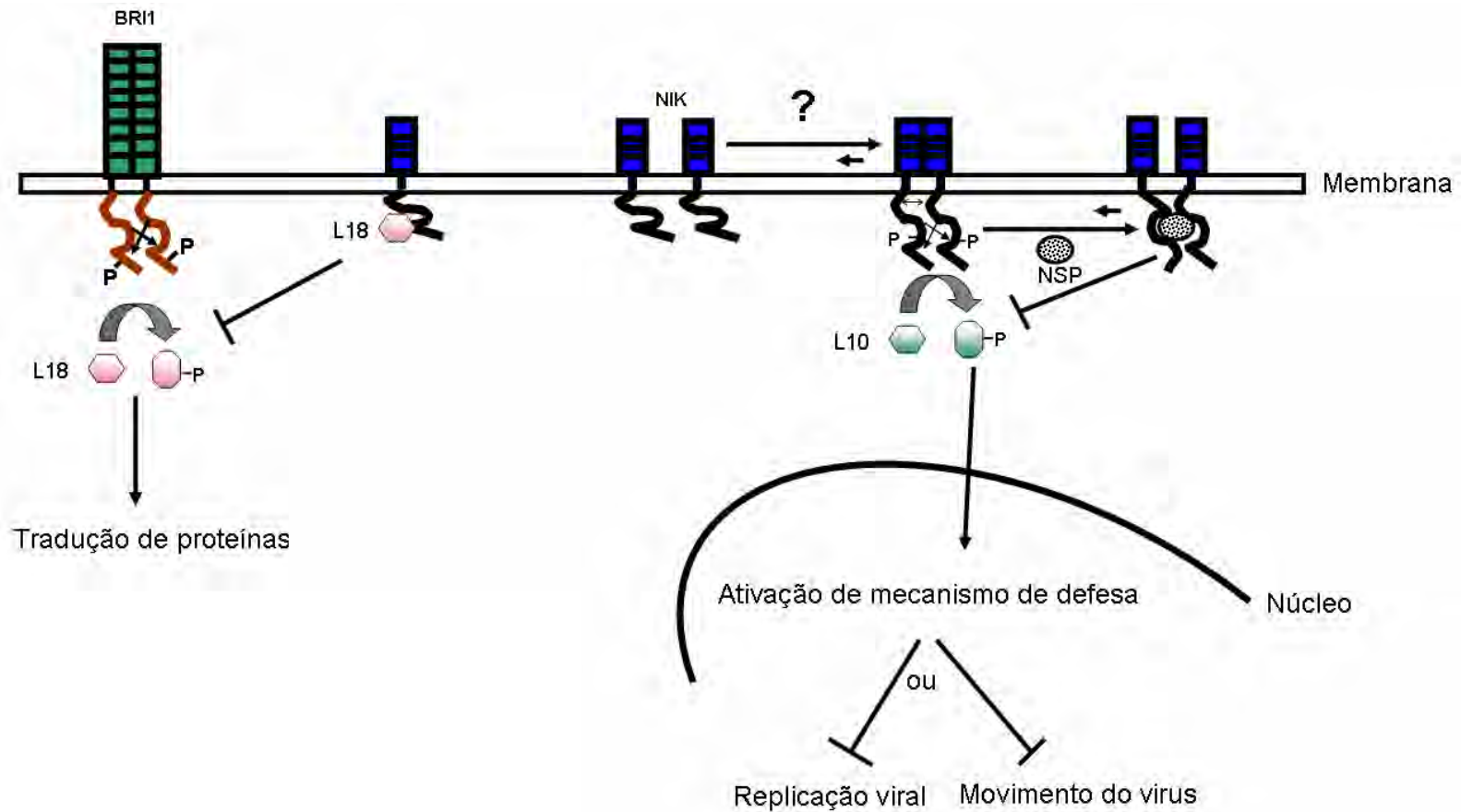


Figura 15 - Modelo proposto para a via de sinalização mediada pela proteína NIK. O esquema mostra um modelo para a via de defesa antiviral mediada pela proteína NIK com a possível função desempenhada pelas proteínas ribossômicas L10 e L18. NSP (*Nuclear Shuttle Protein*), NIK (*NSP Interacting Kinase*), BR1 (*Brassinosteroid-Insensitive1*), P (fósforo).

VI – CONCLUSÕES

As proteínas ribossomais L10 e L18 participam da via de sinalização mediada pela proteína NIK, em resposta à infecção por geminivírus. No entanto, essas proteínas parecem atuar de forma independente e com funções distintas. Os resultados mostraram que NIK é capaz de interagir com ambas as proteínas ribossomais, embora seja capaz de fosforilar apenas L10. A fosforilação de L10 por NIK é específica para as proteínas de defesa da família das LRR-RLK, uma vez que a proteína de desenvolvimento SERK1, pertencente à mesma família de NIK (LRR-II-RLK), não foi capaz de utilizar L10 como substrato. Por sua vez, a proteína receptora quinase BRI1 foi capaz de fosforilar L18, mas não L10. Experimentos de localização subcelular mostraram que L10 e L18 estão localizadas preferencialmente no citoplasma e, em algumas células, no núcleo. Quando co-expressas com NIK, a localização nuclear de L10 aumentou de 3% para 30%, enquanto L18 não apresentou mudança na sua localização. Além disso, em plantas infectadas pelo TGMV, a localização celular de L10 também é afetada e a proteína parece acumular em pontos do citoplasma. Estas observações indicam uma possível intervenção do vírus na via de sinalização mediada por NIK durante o ciclo de infecção. Ensaios de infectividade com plantas *knockout* para os genes *L10* e *L18* mostraram que essas plantas são mais susceptíveis ao CaLCuV. As plantas *knockout L10* apresentaram sintomas mais severos, recapitulando o fenótipo de suscetibilidade aumentada de *nik1*. Coletivamente, os resultados dessa investigação forneceram evidências bioquímicas e genéticas que posicionam a proteína L10 na via de sinalização de defesa, imediatamente *downstream* ao receptor NIK.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTER, B.; ALI REZAIAN, M.; JESKE, H. Replicative intermediates of *Tomato leaf curl virus* and its satellite DNAs. **Virology**, 331: 441–448, 2005.

BRAUN, D.M.; WALKER, J.C. Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. **Trends in Biochemical Sciences**, 21: 70–73, 1996.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-54, 1976.

CHEN, C.; WANDURAGALA, S.; BECKER, D. F.; DICKMAN, M. B. Tomato QM-like protein protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress by regulating intracellular proline levels. **Applied and Environmental Microbiology**, 72: 4001–4006, 2006.

CLARK, S.E.; WILLIAMS, R.W.; MEYEROWITZ, E.M. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. **Cell**, 89: 575–585, 1997.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1: 19–21, 1983.

DOWDY, S. F.; FASCHING, C. L.; ARAUJO, D.; LAI, K. M.; LIVANOS, E.; WEISSMAN, B. E.; STANBRIDGE, E. J. Suppression of tumorigenicity in Wilms tumor by the P15.5-P14 region of chromosome 11. **Science**, 254: 293–295, 1991.

EHSAN, H.; RAY, W. K.; PHINNEY, B.; WANG, X.; HUBER, S. C. E CLOUSE; S. D. Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF- β receptor interacting protein. **The Plant Journal**, 43: 251–261, 2005.

- ELMER, J. S.; BRAND, L.; SUNTER, G.; GARDINER, W.; BISARO, D. M.; ROGERS, S. G. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Resort**, v.16, p.7043–7060, 1998.
- FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M. Família geminiviridae-taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 8: 27–57, 2000.
- FARMER, A. A.; T. M. LOFTUS; A. A. MILLS; K. Y. SATO; J. D. NEILL; T. TRON; M. J. YANG; B. L. TRUMPOWER; E. J. STANBRIDGE. Extreme evolutionary conservation of QM, a novel C-Jun associated transcription factor. **Human Molecular Genetics**, 3: 723–728, 1994.
- FAUQUET, C. M.; STANLEY, J. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. **Annals of Applied Biology**, 142: 165-189, 2003.
- FLORENTINO, L. H.; SANTOS, A. A.; FONTENELLE, M. R.; PINHEIRO, G. L.; ZERBINI, F. M.; PEREIRA, M. C. B.; FONTES, E. P. B. A PERK-Like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates Viral infection. **Journal of Virology**, 80: 6648–6656, 2006.
- FONTES, E. P. B.; SANTOS, A. A.; LUZ, D. F.; WACLAWOVSKY, A. J.; CHORY, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. **Genes & Development**, 18: 2545–2556, 2004.
- FONTES, E. P. B.; EAGLE, P. A.; SIPE, P. S.; LUCKOW, V. A.; HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, 269: 8459–8465, 1994a.
- FONTES, E. P. B.; GLADFELTER, H. J.; SCHAFFER, R. L.; PETTY, I. T. D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **The Plant Cell**, 6: 405–416, 1994b.
- FUJITA, M.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, K.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; TRAN, L.-S.P.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A dehydration-induced nac protein, rd26, is involved in a novel aba-dependent stress-signaling pathway. **The Plant Journal**, 39: 863–876, 2004.

- GAFNI, Y.; EPEL, B. L. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 60: 231-241, 2002.
- GODIARD, L.; SAUVIAC, L.; TORII, K. U.; GRENON, O.; MANGIN, B. ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. **Plant Journal**, 36: 353–365, 2003.
- GUTIERREZ, C.; RAMIREZ-PARRA, E.; CASTELLANO, M.; SANZ-BURGOS, A.P.; LUQUE, A.; MISSICH, R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. **Veterinary Microbiology**, 98: 111–119, 2004.
- GUTIERREZ, C. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. **The EMBO Journal**, 19: 792–799, 2000.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGA, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR S.; ROBERTSON, D. Geminoviruses models for plant DNA replication transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 1: 71–106, 1999.
- HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J.P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; VRIES, S.C. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, 127: 803–816, 2001.
- HEHNLE, S.; WEGE, C.; JESKE, H. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. **Journal of Virology**, 78: 7698–7706, 2004.
- HILL, J.E.; STRANDBERG, J.O.; HIEBERT, E.; LAZAROWITZ, S.G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. **Virology**, 250: 283-292, 1998.
- HÖHNLE, M.; HÖFER, P.; BEDFORD, I. D.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P. G.; FRISCHMUTH, T. 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, 2001.

- IMAFUKU, I.; MASAKI, T.; WARAGAI, M.; TAKEUCHI, S.; KAWABATA, M.; HIRAI, S.-I.; OHNO, S.; NEE, L.E.; LIPPA, C.F.; KANAZAWA, I.; IMAGAWA, M.; OKAZAWA, H. Presenilin 1 Suppresses the Function of c-Jun Homodimers via Interaction with QM/Jif-1. **The Journal of Cell Biology**, 147: 121–133, 1999.
- KANDOTH, P. K.; RANF, S.; PANCHOLI, S. S.; JAYANTY, S.; WALLA, M. D.; MILLER, W.; HOWE, G. A.; LINCOLN, D. E.; STRATMANN, J. W. Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, 104: 12205-12210, 2007.
- KARL, T.; ONDER, K.; KODZIUS, R.; PICHOVA, A.; WIMMER, H.; THUR, A.; HUNDSBERGER, H.; LOFFLER, M.; KLADE, T.; BEYER, A.; BREITENBACH, M.; KOLLER, L. GRC5 and NMD3 function in translational control of gene expression and interact genetically. **Current Genetics**, 34: 419–429, 1998.
- KONG, L. J.; OROZCO, B. M.; ROE, J. L.; NAGAR, S.; OU, S.; FEILER, H. S.; DURFEE, T.; MILLER, A. B.; GRUISSEM, W.; ROBERTSON, D.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. **The EMBO Journal**, 19: 3485–3495, 2000.
- KOTZER, A.M.; BRANDIZZI, F.; NEUMANN, U.; PARIS, N.; MOORE, I.; HAWES, C. AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. **Journal of Cell Science**, 117: 6377–6389, 2004.
- KUMAR, K. U.; SRIVASTAVA, S. P.; KAUFMAN, R. J. Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase (PKR) Is Negatively Regulated by 60S Ribosomal Subunit Protein L18 **Molecular and Cellular Biology**, 19: 1116–1125, 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680–685, 1970.
- LAZAROWITZ, S. G.; BEACHY, R. N. Viral movement proteins as probes or intracellular and intercellular trafficking in plants. **The Plant Cell**, 11: 535–548, 1999.
- LAZAROWITZ, S. G. Geminivirus: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Science**, 11: 327–349, 1992.

- LEH, V.; YOT, P.; KELLER, M. The cauliflower mosaic virus translational transactivator interacts with the 60S ribosomal subunit protein L18 of *Arabidopsis thaliana*. **Virology**, 266: 1–7, 2000.
- LI, J.; CHORY, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. **Cell**, 90: 929–938, 1997.
- LI, J.; WEN, J.; LEASE, K.A.; DOKE, J.T.; TAX, F.E.; WALKER, J.C. BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. **Cell**, 110: 213–222, 2002.
- MALIK, P.S.; KUMAR, V.; BAGEWADI, B.; MUKHERJEE, S.K. Interaction between coat protein and replication initiation protein of *Mung Bean Yellow Mosaic India Virus* might lead to control of viral DNA replication. **Virology**, 337: 273–283, 2005.
- MARIANO, A.C.; ANDRADE, M.O.; SANTOS, A.A.; CAROLINO, S.M.B.; OLIVEIRA, M.L.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; BROMMONSHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology**, 318: 24–31, 2004.
- MCGARRY, R. C.; BARRON, Y. D.; CARVALHO, M. F.; HILL, J. E.; GOLD, D.; CHEUNG, E.; KRAUS, W. L.; LAZAROWITZ, S. G. A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. **Plant Cell**, 15:1605–1618, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.
- NAGAR, S.; PENDERSEN, T. J.; CARRICK, K.; HANLEY-BOWDOIN, L.; ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cell. **Plant Cell**, 7: 705-719, 1995.
- NAM, K.H.; LI, J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. **Cell**, 110: 203–212, 2002.

- NGUYEN, Y. H.; MILLS, A. A., STANBRIDGE, E. J. Assembly of the QM protein onto the 60S ribosomal subunit occurs in the cytoplasm **Journal of Cellular Biochemistry**, 68: 281–285, 1998.
- NOUEIRY, A. O.; W. J. LUCAS; R. L. GILBERTSON Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, 76: 925–932, 1994.
- 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. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, 148: 281–95, 2003.
- ROCHA, C.S.; LUZ, D.F.; OLIVEIRA, M.L.; PEREIRA, M.C.; MEDRANO, F.J.; FONTES, E.P.B. Expression of the sucrose binding protein from soybean: Renaturation and stability of the recombinant protein **Phytochemistry**, 68: 802–810, 2007.
- ROJAS, M. R.; HAGEN, C.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses **Annual Review of Phytopathology**, 43: 361–394, 2005.
- ROJAS, M.R.; JIANG, H.; SALATI, R.; ZARES, B.X; SUDARSHANA, M.R.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite Begomovirus, *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*. **Virology**, 291: 110–125, 2001.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSEL, D.R.; MAXWELL, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, 77: 340–347, 1993.
- RYBICKI, E.P.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; MAXWELL, D.P, HARRISON, B.D.; MARKHAM, P.G.; BISARO, D.M.; ROBINSON, D.; STANLEY, J. Geminiviridae. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.; ESTES, M.K.; LEMON, S.; MANILOFF, J.; MAYO, J.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R. (Eds.) **Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, Nova York: Academic Press, p. 285–297, 2000.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, New York: Cold Spring harbor, 1989.
- SCHAFFER, R. L.; MILLER, C. G.; PETTY, I. T. D. Virus and hostspecific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. **Virology**, v.214, p.330–338, 1995.
- SCHEER, J. M.; C. A. RYAN, JR. The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99: 9585–9590, 2002.
- SELTH, L. A.; DOGRA, S. C.; RASHEED, M. S.; HEALY, H.; RANGLES, J. W.; REZAIAN, M. A. A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. **Plant Cell**, 17: 311–325, 2005.
- SETTLAGE, S. B.; MILLER, A. B.; GRUISSEM, W.; HANLEY-BOWDOIN, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. **Virology**, 279: 570–576, 2001.
- SHAH, K.; VERVOORT, J.; VRIES, S. C. Role of Threonines in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, 276: 41263–41269, 2001.
- SHIU, S. H.; BLEECKER, A. B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 98: 10763–10766, 2001.
- SHIU, S. H.; BLEECKER A. B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. **Science stke**, Review 2001.
- SILVA, M. M.; ABDOLLAH, S.; HOODLESS, P. A.; PIRONE, R.; ATTISANO, L.; WRANA, J. L. MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. **Cell**, 87: 1215–1224, 1996.
- STANLEY, J., BISARO, D. M., BRIDDON, R. W., BROWN, J. K., FAUQUET, C. M., HARRISON, B. D., RYBICKI, E. P. & STENGER, D. C. Family Geminiviridae. In

Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. Amsterdam: **Elsevier Academic Press**. 301-326, 2005.

TORII, K.U. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: Structure, function, and signal transduction pathways. **International Review of Cytology**, 234: 1–46 2004.

TORII, K.U.; MITSUKAWA, N.; OOSUMI, T.; MATSUURA, Y.; YOKOYAMA, R.; WHITTIER, R.F.; KOMEDA, Y. The Arabidopsis *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. **Plant Cell**, 8: 735–746, 1996.

WARD, B. M.; R. MEDVILLE, LAZAROWITZ, S. G.; TURGEON, R. The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum- derived tubules in developing phloem cells. **The Journal of Virology**. 71: 3726–3733, 1997.

ZHANG, X. S.; CHOI, J. H.; HEINZ, J.; CHETTY, C. S. Domain-specific positive selection contributes to the evolution of Arabidopsis leucine-rich repeat Receptor-like kinase (LRR-RLK) genes. **Journal of Molecular Evolution**, 63: 612–621, 2006.

ZHANG, W.; OLSON, N.H.; BAKER, T.S.; FAULKNER, L.; AGBANDJE-MCKENNA, M.; BOULTON, M.I.; DAVIES, J.W.; MCKENNA, R. Structure of the maize streak virus geminate particle. **Virology**, 279: 471–477, 2001.

APÊNDICE

Produção de anticorpos contra a proteína L10 e avaliação do soro imune.

A proteína purificada a partir das células bacterianas foi dialisada em tampão PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM; pH 7,4). A proteína foi quantificada pelo método de BRADFORD (1976) em espectrofotômetro DU 650 BECKMAN com comprimento de onda de 595nm.

O anticorpo foi produzido em coelhos brancos, da raça Nova Zelândia, com 60 dias de idade, nos quais foram feitas três inoculações da proteína. A primeira com 50 µg de proteína em PBS 1X com adjuvante de Freund completo (GIBCO BRL) por via intramuscular, e as duas subseqüentes também com 50 µg de proteína porém, com adjuvante de Freund incompleto (GIBCO BRL). Os intervalos usados entre cada aplicação foram de 15 dias. Previamente às inoculações, foi coletado o sangue obtendo o anti-soro normal (pré-imune). As coletas de sangue foram feitas em veias periféricas da orelha com auxílio de um bisturi e usando-se xilol como dilatador de veias. A primeira coleta foi feita uma semana após a 1ª inoculação, totalizando três coletas com intervalo de duas semanas entre elas. Em torno de 10 mL de sangue foi coletado em um béquer embalsamado de vaselina. O béquer foi deixado em banho-maria a 37°C por 2 horas, depois a 4°C durante 16 horas. O soro separado foi coletado em microtubos no gelo e centrifugado a 8.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo e etiquetado.

A qualidade do anti-soro foi avaliada utilizando 50 ng da proteína purificada HIS-L10 e fixadas em membrana de nitrocelulose por meio de Western blot. Diluição do anti-soro em TBS 1X (Tris 10 mM, NaCl 1,5 mM), 1:1.000 foi testada (Figura 13). As membranas foram mantidas sob agitação com os anti-soros por

16 horas. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T 1X e incubados com o segundo anticorpo monoclonal anti-*rabbit*, imunoglobulinas Clone RG-16 conjugado à enzima fosfatase alcalina (SIGMA), diluído 1:100.000. As membranas foram reveladas com os substratos da fosfatase alcalina NBT ($8,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e BCIP ($4,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (PROMEGA) com 5mL tampão apropriado (Tris-HCl 100 mM pH 9.8, NaCl 100 mM, MgCl_2 50 mM).

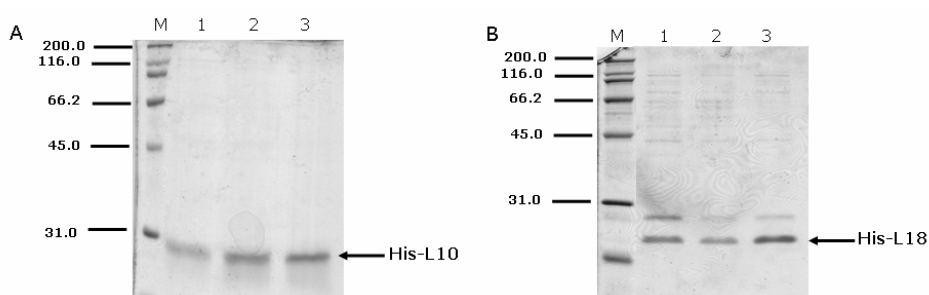


Figura 16: Purificação das proteínas recombinantes L10 e L18 fusionadas à. As proteínas purificadas foram reveladas por *Comassie Brilliant Blue*. As canaletas (1), (2) e (3) correspondem, respectivamente, à proteína no 1º, 2º e 3º eluato. M corresponde ao marcador de massa molecular.



Figura 17: Western Blot do soro imune anti-L10. Foi testado a concentração de 50ng de proteína purificada HIS-L10 com diluição do antisoro de 1:1.000. As três coletas foram analisadas para escolher qual seria utilizada.