

LEONARDO AUGUSTO DE ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DE UMA FERREDOXINA QUE
INTERAGE COM A PROTEÍNA SW-5 QUE CONFERE
RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS**

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
2006

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

T

A447i
2006

Almeida, Leonardo Augusto de, 1981-

Identificação de uma ferredoxina que interage com a
proteína SW-5 que confere resistência a tospovírus /
Leonardo Augusto de Almeida. – Viçosa : UFV, 2006.
x, 52f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 45-52.

1. Salanacea - Resistência a tospovírus. 2. Relação
vírus-vetor. 3. Genética molecular. 4. Tomate genética.
5. Transdução de sinal celular. 6. *Nicotiana benthamiana*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed.

LEONARDO AUGUSTO DE ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DE UMA FERREDOXINA QUE
INTERAGE COM A PROTEÍNA SW-5 QUE CONFERE
RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS**

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: 19 de setembro de 2006.

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Co-orientador)

Profa. Elza Fernandes de Araújo
(Co-orientadora)

Prof. Marisa Vieira de Queiroz

Dr. Douglas Lau

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel pela orientação e pela oportunidade de realizar este trabalho tão importante para minha formação.

Aos professores co-orientadores, Francisco Murilo Zerbini Júnior e Elza Fernandes de Araújo, pelo incentivo e disponibilidade de participar em momento tão importante para mim.

Ao grande amigo Dr. Douglas Lau que sempre teve paciência para comigo, me ensinando e sempre disposto a uma boa discussão.

À grande amiga Dra. Elene Yamazaki Lau pelo auxílio na realização dos experimentos e pelos valiosos ensinamentos.

Ao grande amigo Dr. Lúcio Mauro S. Guimarães sempre disposto a ajudar e dividir seu vasto conhecimento.

Às amigas Fernanda Rausch Fernandes e Sonia R. Nogueira pelo auxílio nos experimentos em casa de vegetação e por me ajudar na correção da tese.

À amiga Maria Andréia pelo auxílio na formatação da tese e também pelos momentos agradáveis.

Aos demais amigos do Laboratório de Genômica: André, Bruno, Brunão, Cynthia, Edgard, Evandro, Francis, Gus, Janaína, João Paulo, Klaus, Luana, Michelle, Régis, Sônia, Stefânia, Taís, Tiago e Virgínia.

Agradeço pela sincera amizade, riquíssimas contribuições e por tornar mais agradável os anos de mestrado.

Aos meus ex-professores e ex-orientadores que participaram da minha formação acadêmica.

Aos amigos de curso, principalmente Fran, Carol, Evandro, Tati, Milene, Janaina, Maíra, Fernanda e Welisson, pela atenção e pelos momentos compartilhados.

Aos grandes amigos de Viçosa que não estão ligados ao curso mas que sempre me apoiaram quando precisei, principalmente aos meus companheiros de república em Belo Horizonte, Levi e Rafael.

Aos funcionários Luís Carlos Costa e Tadeu que muito me ajudaram, seja nos trabalhos de laboratório ou nos trabalhos em casa de vegetação. Nem sei como agradecê-los por tudo.

À Conceição e à Rita, secretárias da Genética e Melhoramento, pela grande amizade e ajuda nas questões burocráticas.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-graduação Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar mais uma etapa na minha vida.

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho e pela participação em minha vida. Muito obrigado.

BIOGRAFIA

LEONARDO AUGUSTO DE ALMEIDA, filho de Rita de Cássia Almeida Leite, nasceu em 01 de dezembro de 1981, em Viçosa – MG.

No ano de 2004, recebeu o grau de Bacharel em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Viçosa.

No período de 2001 a 2002, foi bolsista do Programa de Tutoria em Bioquímica, pelo departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

No período de 2002 a 2004, foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, no Laboratório de Genômica, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), do Departamento de Fitopatologia sob a orientação do Prof. Dr. Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submentendo-se à defesa de tese em setembro de 2006.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1 Isolado viral e material vegetal	8
2.2. Vetores de clonagem utilizados para a os ensaios de duplo híbrido em leveduras	9
2.3. Estirpes de leveduras utilizadas nos ensaios de duplo híbrido em leveduras	11
2.4. Clonagem da seqüência completa do gene Sw-5 e de regiões truncadas do gene no vetor pGBKT7 para construção dos vetores “isca” para ensaios de duplo híbrido em leveduras	12
2.5. Isolamento de RNA mensageiro e construção da biblioteca de cDNAs fusionados à seqüência que codifica o domínio AD do ativador GAL4 para construção dos vetores “presas” para ensaios de duplo híbrido em leveduras	15
2.6. Detecção de interações com a proteína Sw-5 e caracterização parcial dos cDNAs obtidos	18

2.7. Verificação da especificidade das interações proteína-proteína detectadas	19
2.8. Caracterização molecular dos cDNAs identificados.....	20
2.9. Ensaio funcional dos cDNAs identificados.....	20
2.9.1. Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)	20
2.9.2. Confirmação do silenciamento gênico por meio da análise de expressão por PCR em tempo real	23
3. RESULTADOS.....	25
3.1. Isolamento de RNA mensageiro e construção da biblioteca de cDNAs fusionados à seqüência que codifica o domínio AD do ativador GAL4 no vetor pGADT7-Rec para construção dos vetores “isca” para ensaios de duplo híbrido em leveduras	25
3.2. Clonagem da seqüência completa do gene <i>Sw-5</i> e de regiões truncadas do gene no vetor pGBKT7 para construção dos vetores “isca” para ensaios de duplo híbrido em leveduras	26
3.3. Detecção de interações com a proteína <i>Sw-5</i> e caracterização parcial dos cDNAs obtidos	28
3.4. Análise da especificidade das interações proteína-proteína detectadas	32
3.5. Caracterização molecular do cDNA identificado por meio de análises de similaridades em banco de dados	33
3.6. Ensaio funcional do cDNA “presa” identificado por meio de VIGS	35
4. DISCUSSÃO.....	40
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

ALMEIDA, Leonardo Augusto de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2006. **Identificação de uma ferredoxina que interage com a proteína Sw-5 que confere resistência a tospovírus.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-Orientadores: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Elza Fernandes de Araújo.

A proteína Sw-5 codificada pelo gene Sw-5 de tomateiro confere resistência de amplo espectro a tospovírus. Essa proteína contém um domínio amino-terminal *coil-coiled*, um domínio central de ligação a nucleotídeos fosfatados e uma região carboxi-terminal com repetições ricas em leucina. Esses domínios sugerem que a proteína Sw-5 reconhece direta ou indiretamente elicitores produzidos pelo vírus e participa de uma cadeia de transdução de sinais que leva à morte das células inicialmente infectadas pelos tospovírus e, ou, ativação de respostas de defesa da planta. Este trabalho teve como objetivo a identificação e a caracterização molecular de genes que codificam proteínas capazes de interagir fisicamente com a proteína codificada pelo gene de resistência Sw-5 por meio da utilização do sistema duplo-híbrido de leveduras. A triagem 5×10^7 clones de cDNAs de *Nicotiana benthamina* por meio da obtenção de diplóides, não revelou nenhum cDNA que codifica proteína capaz de interagir com a proteína Sw-5. A análise de $1,8 \times 10^5$ clones pelo processo de co-transformação resultou na identificação de um cDNA que codifica uma proteína ferredoxina I de cloroplasto (Nb-Fd1), capaz de interagir

com a proteína Sw-5. Essa proteína contém um domínio e uma assinatura característicos de proteínas 2Fe-2S. Resultados preliminares mostraram que o silenciamento do gene que codifica Nb-Fd1 resulta em uma maior quantidade de lesões necróticas locais e lesões no ápice das plantas resistentes desafiadas com tospovírus evidenciando a não contenção do vírus no sítio de infecção. Esse fenótipo demonstra um papel de Nb-Fd1 na resistência a tospovírus. Assim, é possível que esta proteína participe do processo de alteração do potencial redox da célula, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e ativação de morte celular programada que caracterizam a resposta de hipersensibilidade mediada pelo gene Sw-5.

ABSTRACT

ALMEIDA, Leonardo Augusto de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September 2006. **Identification of a ferredoxin that interacts with the Sw-5 protein that confers resistance to tospovirus.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-Advisers: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Elza Fernandes de Araújo.

The Sw-5 protein codified by the tomato Sw-5 gene confers broad spectrum tospovirus resistance. This protein contains a coil-coiled amino-terminal domain, a central nucleotide binding site domain and a leucine-rich repeat carboxi-terminal domain. These domains suggest that Sw-5 recognizes directly or indirectly virus elicitors and it participates in a signal transduction pathway that leads to the death of infected cells and activation of plant defense responses. The objective of this work was to identify and characterize genes encoding proteins that interacts physically with Sw-5 in the yeast two hybrid system. The screening of 5×10^7 *Nicotiana benthamina* cDNA clones, using the yeast mating strategy, did not yield any protein capable to interact with Sw-5. Analyzing $1,8 \times 10^5$ clones by co-transformation strategy, it was possible identify a cDNA that encodes an chloroplast ferredoxin I (Nb-Fd1) capable to interact with Sw-5. This protein contains a domain and a signature of 2Fe-2S proteins. Virus-induced silencing of the Nb-Fd1 gene leads to a grater number of local necrotic lesions and apical lesions in resistance plants challenged with tospovirus showing that this gene is important for tomato tospovirus resistance.

This phenotype indicates that Nb-Fd1 is possibly involved in cellular redox state alteration, reactive oxygen species accumulation and programmed cell death activation processes mediated by *Sw-5*.

1. INTRODUÇÃO

As plantas apresentam vários mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos (Durrang e Dong, 2004; Gur e Rushton, 2005). Uma das mais efetivas e mais estudadas respostas de defesas das plantas é mediada pelos genes de resistência (genes *R*). Estes genes conferem resistência a uma grande variedade de patógenos incluindo fungos, bactérias, nematóides, vírus e também insetos (Feys e Parker, 2000; Hammond-Kosack e Jones, 2000).

De acordo com a teoria gene-a-gene proposta por Flor (1971), que mais tarde foi traduzida no modelo receptor-ligante, o produto de um gene do patógeno (gene de avirulência *Avr*) interagiria com o produto de um gene de resistência (gene *R*), que serviria de receptor para a molécula *Avr* e desencadearia a resposta de resistência ao patógeno (Keen, 1992). A especificidade deste reconhecimento levou à idéia de que as proteínas *R* evoluíram como receptores para moléculas derivadas do patógeno (Ellis *et al.*, 2000). A limitação do repertório de genes *R* em plantas (Hammond-Kosack e Jones, 2000), a descoberta de funções biológicas para os produtos dos genes *Avr* na adaptação seletiva dos patógenos (Buell *et al.*, 2003; Innes, 2003; Zhu *et al.*, 2004), e a falta de evidências de interações diretas entre a maioria das proteínas *R* e seus elicitores têm levado a novos modelos para explicar a teoria gene-a-gene proposta por Flor. No modelo guardião, a interação de uma proteína *Avr* e uma proteína alvo do hospedeiro são de alguma forma detectada pela proteína *R* (que atua como sentinela), e resulta no desencadeamento das respostas de defesa típicas de plantas resistentes. De

acordo com o modelo, efetores do patógeno teriam como alvo proteínas da célula hospedeira com a finalidade de suprimir a resposta de defesa (van der Biezen e Jones, 1998; Dangl e Jones, 2001; van der Hoorn *et al.*, 2002; Belkhadir *et al.*, 2004; Xia, 2004, van Bentem *et al.*, 2005). Uma vez que os alvos das proteínas de virulência são limitados, esse modelo poderia explicar como plantas contendo poucas centenas de genes *R* são capazes de detectar e resistir a milhares de patógenos (Innes, 2003).

Os genes de resistência podem ser classificados com base nos tipos de domínios encontrados nas proteínas por eles codificadas (Van Bentem *et al.*, 2005). A maioria das proteínas *R* possui um domínio central contendo um sítio de ligação de nucleotídeos (*nucleotide binding site* - NBS) e um domínio C-terminal rico em resíduos de leucina (*leucine rich repeat* - LRR). O domínio LRR está envolvido na regulação da atividade sinalizadora das proteínas *R* (Huang e Willianson, 2003; Hwang *et al.*, 2000). Na região N-terminal das proteínas *R* da classe NBS-LRR podem ocorrer domínios TIR (homólogos ao domínio Toll e receptores de interleucina I de animais), ou um domínio *coiled-coil* (CC) (Dangl e Jones, 2001; Martin *et al.*, 2003). A estrutura NBS-LRR corrobora a hipótese de que as proteínas *R* atuam na detecção de proteínas de virulência do patógeno e ativação de uma cascata de sinalização que culmina com a resposta de resistência (Van der Biezen e Jones, 1998).

O gene dominante *Sw-5*, introduzido no tomateiro cultivado (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a partir da espécie selvagem *L. peruvianum*, confere resistência aos tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (Stevens *et al.*, 1992; Boiteux e Giordano, 1993; Brommonschenkel e Tanksley, 1997). Os tospovírus são vírus envoltos por um envelope lipídico glicoprotéico proveniente das membranas do retículo endoplasmático e/ou do complexo de Golgi da célula vegetal hospedeira, e suas partículas são quase isométricas com tamanho variando de 80 a 120nm (German *et al.*, 1992; Whitfield *et al.*, 2005). No interior do envelope lipídico são encontrados três diferentes tipos de RNAs (RNA L, RNA M e RNA S, designados pelo seu tamanho relativo), e a polimerase viral. Em TSWV, o membro típico do gênero *Tospovirus*, o RNA L (8.9 kb) codifica a polimerase viral de 331,5 kDa (de Haan *et al.*, 1991). O RNA M (4.8

kb) possui duas ORFs com estratégia de codificação do tipo ambisenso (Kormelink *et al.*, 1992). A ORF traduzida diretamente do RNA viral codifica as proteínas estruturais G1 e G2 presentes no envelope (Kormelink *et al.*, 1992). A ORF traduzida da sequência complementar do RNA viral codifica a proteína NSm, responsável pelo movimento viral através dos plasmodesmas (Kormelink *et al.*, 1992; Soellick *et al.*, 2000). O RNA S (2.9 kb) também possui estratégia de codificação do tipo ambisenso, sendo que a ORF traduzida diretamente do RNA viral codifica a proteína N (29 kDa) que compõe o nucleocapsídeo, e a ORF traduzida da sequência complementar do RNA viral codifica a proteína NSs (52.4 kDa), capaz de suprimir o silenciamento gênico (De Haan *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 2002, Bucher *et al.*, 2003).

Sw-5 codifica uma proteína hidrofílica constituída por 1246 aminoácidos, possivelmente citoplasmática, e contém as características estruturais típicas das proteínas da classe CC-NBS-LRR (Brommosnchenkel *et al.*, 2000). A resistência conferida por Sw-5 caracteriza-se pela ausência de sintomas na planta inoculada ou pela ocorrência de lesões necróticas nos sítios de infecção. Este tipo de reação, denominada resposta de hipersensibilidade (HR - *hypersensitive response*), é um mecanismo de resistência induzível das plantas hospedeiras, caracterizado por uma morte celular rápida e localizada no sítio de infecção (Dangl e Jones, 2001). Esta morte celular localizada leva à ativação de respostas de defesa local e sistêmica (*Systemic Acquired Resistance* - SAR). Reguladores positivos e negativos do processo de morte celular têm sido determinados e relacionados aos processos de sinalização celular que culmina com a resposta de resistência. (Greenberg e Yao, 2004).

As classes funcionais dos reguladores positivos da HR são diversas. A proteína MEK (*mitogen regulated kinase*), uma MAP quinase que é componente de cascata de fosforilação protéica, quando ativada em tabaco confere morte celular dependente de Nbrboh (*Nicotiana benthamiana respiratory burst oxidase homologs*) (Yoshioka *et al.*, 2003). Além disso, a redução da expressão de NbrohA/NbrohB, componentes do complexo NADPH oxidase, reduz a formação de HR em folhas de tabaco infectadas com *P. infestans* (Yoshioka *et al.*, 2003). A proteína RAR1 (*required for Mla₁₂ resistance*), que interage com SGT1 (*supressor of the G2 allele of skp1*), é componente do sistema de proteólise dependente de

ubiquitinação. A proteína RAR1 é requerida para HR mediada por *Mla*₁₂ em cevada, mas é dispensada na HR mediada por *Mlg* durante a infecção por *Blumeria graminis* (Freilidhoven *et al.*, 1994). SGT1 e RAR1 também são importantes no desencadeamento da resposta de resistência mediada por vários outros genes de resistência (Shirasu e Schulze-Lefert, 2003). Fatores de transcrição também podem ser considerados como reguladores positivos do processo de desencadeamento da HR, como AtMYB30, que é importante para a indução de HR em arábida e tabaco quando infectados por uma série de patógenos (Vailleau *et al.*, 2002). Outra proteína também relacionada positivamente ao processo é Pti, componente da cascata de sinalização mediada por Pto, uma serina/treonina cinase codificada pelo gene *Pto* (Zhou *et al.*, 1995).

Os reguladores negativos do processo de desencadeamento da HR também não seguem um padrão funcional determinado. FtsH, uma protease de plastídeo ativada durante estresses celulares, quando superexpressa em tabaco acarreta aumento da resistência a TMV e sua expressão reduzida provoca a redução da resposta de resistência (Seo *et al.*, 2000). A perda da subunidade NAD7, do complexo I de mitocôndria, acarreta num aumento da resistência a TMV em tabaco, e os mutantes para *nad7* têm suas enzimas antioxidantes reguladas positivamente (Dutilleul *et al.*, 2003).

Apesar da diversidade de classes funcionais entre os reguladores já identificados, várias evidências sugerem que a HR é resultado da ativação dos mecanismos de morte celular programada com características relacionadas ao processo de apoptose em animais (Xie e Chen, 2000). Os eventos de sinalização como a fosforilação protéica e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), envolvidos na apoptose animal também foram relatados na HR em plantas (Samuilov *et al.*, 2003; Apel e Hirt, 2004). A explosão oxidativa, gerada pela liberação de ROS, é considerada um dos primeiros marcadores bioquímicos da HR em plantas (Lamb e Dixon, 1997). As espécies reativas de oxigênio possuem atividades antimicrobianas e podem reduzir a viabilidade do patógeno. ROS também estão relacionadas com a destruição de células de plantas desafiadas, por meio da peroxidação lipídica ou atuando como fator essencial mediando a morte celular programada (Greenberg, 1997; Bethke e Jones, 2001).

Várias são as fontes celulares de ROS nas plantas e vários os tipos de estresse bióticos e abióticos que podem estimular a explosão oxidativa. Fontes

enzimáticas potenciais de ROS incluem NADPH oxidase localizada na membrana plasmática e peroxidases ligadas à parede celular (Desikan *et al.*, 1998). Além das fontes enzimáticas, o processo de transporte de elétrons nos cloroplastos, nas mitocôndrias e nos peroxissomos são considerados fontes de ROS (Dai *et al.*, 2000). Vários trabalhos sugerem que ROS podem ser fatores comuns na regulação de várias vias de sinalização celulares (Lamb e Dixon, 1997; Dai *et al.*, 2000). A sinalização e a regulação celular dependentes de alterações redox têm se tornado interessantes áreas de investigação dado que vários eventos celulares como transcrição, tradução, apoptose e atividades enzimáticas são dependentes deste tipo de regulação (Dai *et al.*, 2000).

Como as proteínas R aparentemente têm a função de reconhecer uma perturbação celular após a infecção por um fitopatógeno e ativar cascatas de sinalização que culminam com a resposta de resistência, o sistema duplo híbrido em leveduras se destaca como uma alternativa para a identificação dos componentes das vias de sinalização celular que participam na resposta de resistência. Esse sistema se baseia na natureza modular de ativadores transcricionais (Fields e Song, 1989). Os ativadores são proteínas que possuem dois domínios funcionais, denominados domínio de ligação ao DNA (BD – *binding domain*) e domínio de ativação (AD – *activation domain*) da transcrição. Os aminoácidos que constituem o domínio BD reconhecem eficientemente uma seqüência de ativação, denominada UAS (*upstream activating sequence*) nos promotores dos genes ativados, enquanto a seqüência de aminoácidos que constitui o domínio de ativação interage com fatores de transcrição que, por sua vez, interagem com a RNA polimerase II ativando a transcrição. Estes módulos são capazes de funcionar quando fusionados a diferentes proteínas que interagem entre si. Se as proteínas fusionadas (também denominadas "iscas" e "presas") interagem em uma célula de levedura, um ativador transcricional funcional é reconstituído. O grau de interação é monitorado por meio da expressão de um gene "repórter" que apresenta, na sua região promotora, uma seqüência reconhecida especificamente pelo domínio de ligação ao DNA do ativador de transcrição. Diferentes BDs e ADs têm sido usados com sucesso neste sistema, incluindo os BDs dos ativadores GAL4, LexA e os ADs do GAL4 e VP16 (Fields e Song, 1989; Zervos *et al.*, 1993). Os genes "repórteres" comumente utilizados são o gene *HIS3* de *Saccharomyces cerevisiae* e o gene *lacZ* de *Escherichia coli*.

Assim, a interação entre as proteínas fusionadas é detectada através de um ensaio fenotípico baseado no crescimento em meio seletivo e/ou no desenvolvimento de coloração azulada em colônias crescidas em meio com o substrato X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosídeo).

Este sistema tem sido utilizado com sucesso na dissecação de várias cadeias de transdução de sinais em células animais (Brent e Filley, 1997). Em estudos da interação planta-patógeno, o emprego deste sistema proporcionou, por exemplo, a identificação de genes que participam na cadeia de transdução de sinais do processo de resistência mediada pelo gene *Pto* (Zhou *et al.*, 1998), e a demonstração da interação física da proteína *Pto* com a proteína de avirulência *Avrp_{to}* (Tang *et al.*, 1996). Recentemente foi identificada uma tioredoxina (CITRX) que interage com a proteína de resistência Cf9 de tomate, que confere resistência a raças do fungo *Cladosporium fulvum* que contém o gene de avirulência *Avr9*. Por meio da técnica de VIGS (*virus-induced gene silencing*) foi demonstrado que a proteína CITRX regula negativamente a resposta de defesa mediada por Cf9 (Rivas *et al.*, 2004).

VIGS tem-se mostrado como uma importante técnica na genética reversa de plantas. As vantagens de VIGS sobre outras técnicas, como a utilização de interrupção gênica por T-DNA (*transferred DNA*) ou transposons (*transposon tagging*), incluem a não necessidade de transformação genética, a simplicidade metodológica e os rápidos resultados gerados. Essas características tornam VIGS um instrumento para estudos de genômica funcional. O silenciamento gênico induzido por vírus utiliza do conhecimento de que vetores virais podem induzir o processo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS - *post-transcriptional gene silencing*) em plantas (Baulcombe, 1999). PTGS pode ser ativado pela presença de transgenes na planta produzindo transcritos com repetições invertidas formando estruturas secundárias denominadas de *harpins* (*harpin* RNA, hpRNA), pela tecnologia do RNA antisenso (asRNA) ou pela superexpressão de um gene (co-supressão) (Smith *et al.*, 2000). O tabaco selvagem *Nicotiana benthamiana* tem sido utilizado como planta modelo para os estudos de VIGS, uma vez que é uma planta suscetível a uma ampla gama de vírus e os sintomas do processo são geralmente mais pronunciados e persistentes. Apesar disso, VIGS pode ser utilizado em outras espécies como *Arabidopsis* e o tomateiro.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo geral a identificação e caracterização de proteínas que interagem com a proteína codificada pelo gene de resistência *Sw-5*, por meio da utilização do sistema duplo-híbrido de leveduras. Os objetivos específicos incluíram: *i*) construir uma biblioteca de cDNAs fusionados à seqüência que codifica o domínio AD da proteína GAL4; *ii*) clonar a seqüência completa do gene *Sw-5* e regiões truncadas do gene no vetor pGBKT7, de modo a obter a expressão do gene e de regiões do gene na forma de uma proteína fusionada ao domínio BD da proteína GAL4; *iii*) efetuar a triagem da biblioteca de cDNAs por meio do sistema duplo-híbrido de leveduras, utilizando-se como “isca” as construções obtidas no objetivo *ii*; *iv*) caracterizar os cDNAs, por meio de seqüenciamento e comparação com seqüências depositadas em banco de dados; e *v*) avaliar a função biológicas das proteínas codificadas pelos cDNAs por meio da técnica de silenciamento gênico mediado por vírus (VIGS).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolado viral e material vegetal

O isolado viral AL (GRSV) utilizado neste trabalho é originário do Brasil e faz parte da coleção do Laboratório de Genômica (BIOAGRO/UFV), sendo sua identificação baseada no sequenciamento do gene *N* que codifica o nucleocapsídeo. O número de acesso da seqüência do gene que codifica para o nucleocapsídeo do isolado AL no GenBank é [AF513219](#).

Para fins de inoculação das plantas o inóculo original, mantido a -80°C, foi multiplicado em plantas de *Nicotiana tabacum* 'Havana 425'. Folhas infectadas foram maceradas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,01M e carborundum 600 mesh. O extrato foi esfregado em folhas saudáveis de *N. benthamiana* e de *N. benthamiana* transformada com o gene *Sw-5* (linhagem B5-5), com auxílio de gaze.

Após a inoculação as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação e avaliadas diariamente observando o desenvolvimento de sintomas locais e sistêmicos.

2.2. Vetores de clonagem utilizados para a os ensaios de duplo híbrido em leveduras

Os vetores pGBKT7 e pGADT7-Rec são vetores de clonagem e expressão do kit MATCHMAKER Library Construction & Screening da Clontech™, específicos para ensaios de duplo híbridos em leveduras.

O vetor pGADT7-Rec (Figura 1) expressa uma proteína de interesse fusionada ao domínio de ativação de GAL4 (GAL4AD). A transcrição está sob o controle do promotor P_{ADH1} e do terminador T_{ADH1} , ambos os elementos controladores da expressão do gene que codifica álcool desidrogenase 1A. Em leveduras, o promotor P_{ADH1} de cada plasmídeo recombinante controla a expressão constitutiva de uma proteína fusionada que contém os aminoácidos do domínio de ativação da proteína GAL4 e os aminoácidos codificados pela seqüência do cDNA clonado na mesma seqüência aberta de leitura traducional de GAL4AD. A seqüência quimérica ainda contém o sinal de localização nuclear SV40, translocando a proteína quimérica quando expressa para o núcleo da levedura transformada com este plasmídeo. O vetor ainda contém o epitopo HA (hemaglutinina) para fácil identificação da expressão da proteína quimérica utilizando o anticorpo monoclonal que interage com o epitopo. As origens de replicação dos plasmídeos pUC e 2μ , permitem a replicação autônoma do plasmídeo em *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, e os genes *LEU2* e *Amp^r*, são utilizados para seleção de leveduras e bactérias recombinantes, respectivamente. O vetor pGADT7-Rec foi engenheirado para a construção de bibliotecas GAL4AD – cDNA por meio de recombinação homóloga (ver item 2.4).

O vetor pGBKT7 (Figura 1) possui um sítio múltiplo de clonagem com sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI, *Nde*I, *Eco*RI, *Nco*I, *Sfi*I, *Xma*I, *Sma*I, *Sal*I e *Pst*I, as origens de replicação dos plasmídeos pUC e 2μ e os genes *TRP1* e *Kan^r*, que são utilizados para seleção de levedura e bactérias recombinantes, respectivamente. Em leveduras, o promotor P_{ADH1} de cada plasmídeo recombinante controla a expressão constitutiva de uma proteína híbrida constituída dos aminoácidos do domínio de ligação de GAL4 e dos aminoácidos codificados pela seqüência do DNA clonado na mesma seqüência aberta de leitura traducional

de GAL4BD. O vetor contém, ainda, o epítipo c-Myc para detecção da proteína quimérica utilizando o anticorpo monoclonal específico.

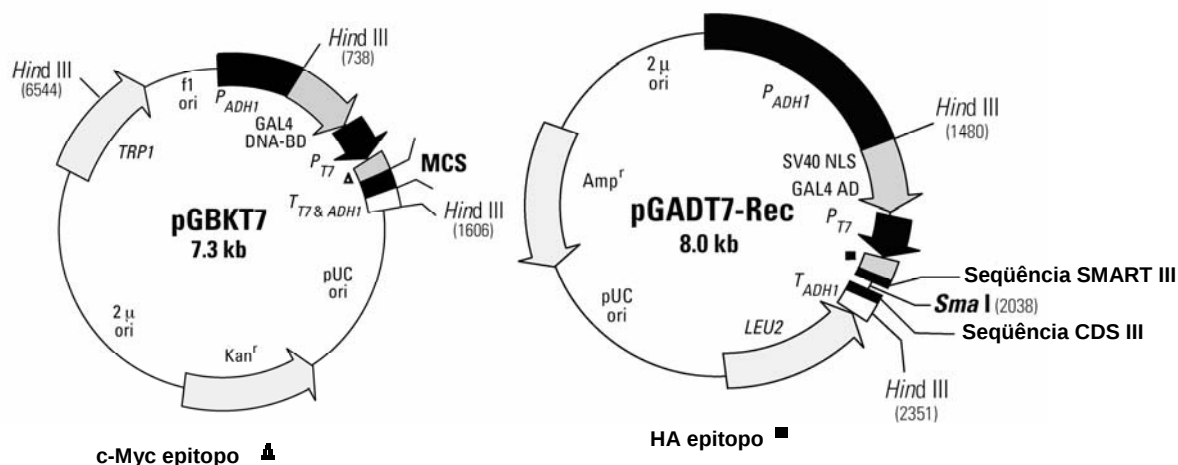


Figura 1. Mapa físico dos vetores pGBKT7 e pGADT7-REC. O vetor pGBKT7 expressa proteínas fusionadas ao domínio de ligação ao DNA de GAL4. O vetor contém a marca de seleção Kan^r para seleção de *E. coli* transformante e a marca nutricional *TRP1* para seleção de leveduras transformantes. O vetor pGADT7-Rec foi engenheirado para a construção de bibliotecas GAL4AD – cDNA por meio de recombinação homóloga em leveduras. O vetor pGADT7-Rec expressa proteínas fusionadas ao domínio de ativação de GAL4 e contém marca de seleção Amp^r para seleção de *E. coli* transformante e a marca nutricional *LEU2* para seleção de leveduras transformantes. A transcrição está sob o controle do promotor P_{ADH1} e do terminador T_{ADH1} em ambos vetores. (Fonte: ClontechTM).

Como controle nos diferentes ensaios foram utilizados os vetores que expressam proteínas que interagem ou não interagem em ensaios de duplo híbrido em leveduras (Tabela 1), que fazem parte do kit do sistema duplo híbrido da ClontechTM. O vetor pGBKT7-53 codifica uma proteína de fusão contendo o BD de GAL4 e a proteína murínica 53 que interage em um ensaio de duplo híbrido em leveduras com a proteína de fusão contendo o AD de GAL4 e o antígeno T. Já o vetor pGBKT7-Lam codifica uma proteína de fusão contendo o BD de GAL4 e a proteína lamina C humana que não interage com a a proteína de fusão contendo o AD de GAL4 e o antígeno T em um ensaio de duplo híbrido em leveduras.

Tabela 1. Principais características dos vetores de clonagem e vetores-controle para ensaios de interação proteína-proteína utilizando o sistema duplo híbrido em leveduras da Clontech™.

VETORES	FUSÃO	EPITOPO	SELEÇÃO EM LEVEDURAS	SELEÇÃO EM BACTÉRIAS
pGADT7-T	AD/antígeno T	HA	LEU2	Ampicilina
pGBKT7-53	BD/p53	c-Myc	TRP1	Canamicina
pGBKT7-Lam	BD/lamina C	c-Myc	TRP1	Canamicina

2.3. Estirpes de leveduras utilizadas nos ensaios de duplo híbrido em leveduras

Nos diferentes ensaios do sistema duplo híbrido foram utilizadas as estirpes AH109 e Y187 de *Saccharomyces cerevisiae* que são auxotróficas para os aminoácidos leucina (*leu2*), triptofano (*trp1*) e histidina (*his3*). Os marcadores auxotróficos *trp1* e *leu2* permitem a seleção das células de levedura transformadas com os vetores BD e AD, respectivamente, e o marcador auxotrófico *his3*, a seleção de leveduras transformadas com os genes que codificam proteínas que interagem. A estirpe AH109 também contém outros dois sistemas de seleção de interações proteína-proteína baseado no gene repórter *lacZ* (β -galactosidase), e *MEL1* (α -galactosidase), e na seleção nutricional do gene *ADE2* (phosphoribosilaminoimidazole carboxilase), que sozinho é responsável por uma forte seleção nutricional. Os cassetes repórteres *lacZ* e *MEL1* consistem em três cópias da sequência consenso (GAL-17mer) de ligação à proteína GAL4 e a região TATA do promotor (*P_{cyc1}*) do gene *cyo-1* - citocromo c (*CYC1*), que fusionadas ao gene repórter *lacZ* regulam a sua expressão. O cassete *HIS3* compreende a sequência ativadora do gene *GAL1* (UASGAL1) e a região TATA do promotor do gene *GAL1* (*p_{GAL1}*) fusionadas ao gene repórter *HIS3*. A sequência UASGAL1 contém quatro sítios de ligação ao domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4. A proteína híbrida GAL4-BD liga-se às sequências UASGAL1 e GAL17-mer localizadas na região 5' anterior à região TATA dos genes repórteres. Se as proteínas híbridas interagem, os domínios AD e BD entram em contato e atuam

conjuntamente determinando o início de transcrição dos repórteres (*lacZ* e *his3*), evidenciando a ocorrência de interações proteína-proteína (Tabela 2).

Tabela 2. Genótipos e fenótipos das estirpes de levedura AH109 e Y187 utilizadas nos ensaios de duplo híbrido em leveduras.

ESTIRPE	GENÓTIPO ^a	FENÓTIPO	
		SD/-Ade	-
AH 109 ^b	MAT α , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4</i> Δ , <i>gal80</i> Δ , <i>LYS2::GAL1_{UAS} – GAL1_{TATA} – HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS} – GAL2_{TATA} – ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS} – MEL1_{TATA} – lacZ</i> , <i>MEL1</i>	SD/-Met	+
		SD/-Trp	-
		SD/-Leu	-
		SD/-His	-
		SD/-Ura	+
		YPAD	+
		SD/-Ade	-
Y 187	MAT α , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4</i> Δ , <i>gal80</i> Δ , <i>met-</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS} – GAL1_{TATA} – lacZ</i> , <i>MEL1</i>	SD/-Met	-
		SD/-Trp	-
		SD/-Leu	-
		SD/-His	-
		SD/-Ura	+
		YPAD	+
		SD/-Ade	-

^a As seqüências UAS são responsivas ao ativador transcricional GAL4. As mutações *trp1*, *his3*, *gal4* e *gal80* foram geradas por deleção. *leu2-3,112* são mutações duplas. ^b AH109 é derivada da estirpe PJ69-2 onde a mutação *ade2-101* foi trocada por recombinação com o cassete repórter *GAL2-ADE2*. Na ausência de GAL4, AH109 possui um fenótipo Ade⁻. O gene repórter *lacZ* foi introduzido em PJ69-2A para criar a estirpe AH109.

2.4. Clonagem da seqüência completa do gene *Sw-5* e de regiões truncadas do gene no vetor pGBKT7 para construção dos vetores “isca” para ensaios de duplo híbrido em leveduras

A ORF (*open reading frame*) de *Sw-5*, bem como as regiões que codificam os domínios CC, NBS e LRR separadamente ou em combinação (Figura 2), foram clonadas no vetor pGBKT7, o qual em levedura produz uma proteína híbrida contendo o domínio de ligação ao DNA (BD) de GAL4.

Por meio de PCR, utilizando como DNA molde o clone pGPP23, que contém a ORF completa de *Sw-5*, foram amplificados os diferentes domínios do gene. Para a amplificação dos domínios de *Sw-5* foi utilizado o kit Advantage[®]2 PCR (Clontech[™]) utilizando um programa de PCR longa no aparelho Mastercycler (Eppendorf[®]), composto de 30 ciclos que compreenderam 95°C por 1 minuto, 95°C

por 15 segundos, 56°C por 15 segundos, 68° por 5 minutos e uma extensão final de 68° por 5 minutos.

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação contêm sítios para as enzimas de restrição *Sma*I (posição 5') e *Pst*I (posição 3') necessários para a clonagem no vetor pGBKT7 de modo a obter a seqüência aberta de leitura (ORF) do gene na mesma seqüência de leitura traducional de GAL4-BD. Para a clonagem dos produtos amplificados foi utilizado o kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) específico para a clonagem de produtos de PCR, onde a 1 µL do produto de PCR foi adicionado 1 µL de solução salina, 1 µL do vetor pCR®2.1-TOPO®, e 3 µL de água deionizada para um volume final de 6 µL. Para a transformação de bactérias, a reação de ligação foi adicionada às bactérias da estirpe TOP 10. As células, juntamente com a ligação, foram deixadas à temperatura ambiente por 30 minutos, sendo logo em seguida incubadas por 30 minutos no gelo. Um choque térmico de 42°C por 30 segundos foi dado seguido de um período de incubação no gelo por 1 minuto. As bactérias se recuperaram em meio LB por um período de 1 hora a 37°C em agitação (200 rpm). As células foram plaqueadas em meio LB contendo canamicina (50 µg/mL), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) e IPTG (isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo). Colônias brancas foram recuperadas e crescidas em meio líquido por um período de 16 horas. As colônias foram submetidas à extração dos plasmídeos recombinantes por meio de lise alcalina.

Os fragmentos de DNA obtidos da restrição com as enzimas *Sma*I (posição 5') e *Pst*I (posição 3') da ligação em pCR®2.1-TOPO® foram recuperados e clonados sob controle do promotor *ADH* e terminador *T7* do vetor pGBKT7. As construções obtidas foram utilizadas na transformação genética de leveduras das estirpes AH109 e Y187 utilizando solução PEG/acetato de lítio seguida de um período de 5 segundos ao vortex e, em seguida, a mistura foi incubada a 42°C por 1 hora. Para confirmar a inserção dos fragmentos na mesma ORF de GAL4-BD, as moléculas recombinantes foram seqüenciadas utilizando o equipamento MegaBACE 500 (GE Healthcare, Freiburg, Germany).

As seqüências de nucleotídeos do inserto do vetor de alguns dos clones obtidos foram utilizadas para verificar se estes insertos não continham mutações. As leveduras transformadas também foram analisadas para expressão dos genes repórteres *MeI1* e *HIS3*, para determinar se a proteína quimérica BD:Sw5 seria capaz de ativar a transcrição isoladamente. Adicionalmente, foi efetuada a análise

da expressão das proteínas quiméricas por meio da técnica de *Western blotting* (Burnette, 1981). A extração de proteínas totais seguiu o método Uréia/SDS segundo especificações do protocolo presente no *Yeast Protocol Handbook* da ClontechTM. O extrato protéico total foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferido para membrana de nitrocelulose por uma hora a 4°C em voltagem constante (50-60 V, 0,37A). A reação de bloqueio foi feita utilizando leite em pó diluído em TBS-T 1X por uma hora sob agitação. A membrana foi lavada três vezes por 15 minutos em TBS-T sob agitação constante. O primeiro anticorpo contra o epitopo c-Myc foi adicionado à membrana e mantido por um período de 2 horas sob agitação constante. A membrana foi lavada por três vezes, 15 minutos cada lavagem, em TBS-T sob agitação. O segundo anticorpo (anti-*mouse*) foi adicionado à membrana e incubado por um período de 2 horas sob agitação constante. A membrana foi novamente lavada com TBS-T 1X. Em seguida a membrana foi lavada com tampão da enzima fosfatase alcalina (Tris-HCl pH9.8 (1M), NaCl (1M), MgCl₂ (1M) seguido da revelação com NBT e BCIP. A revelação foi cessada lavando a membrana com água destilada.

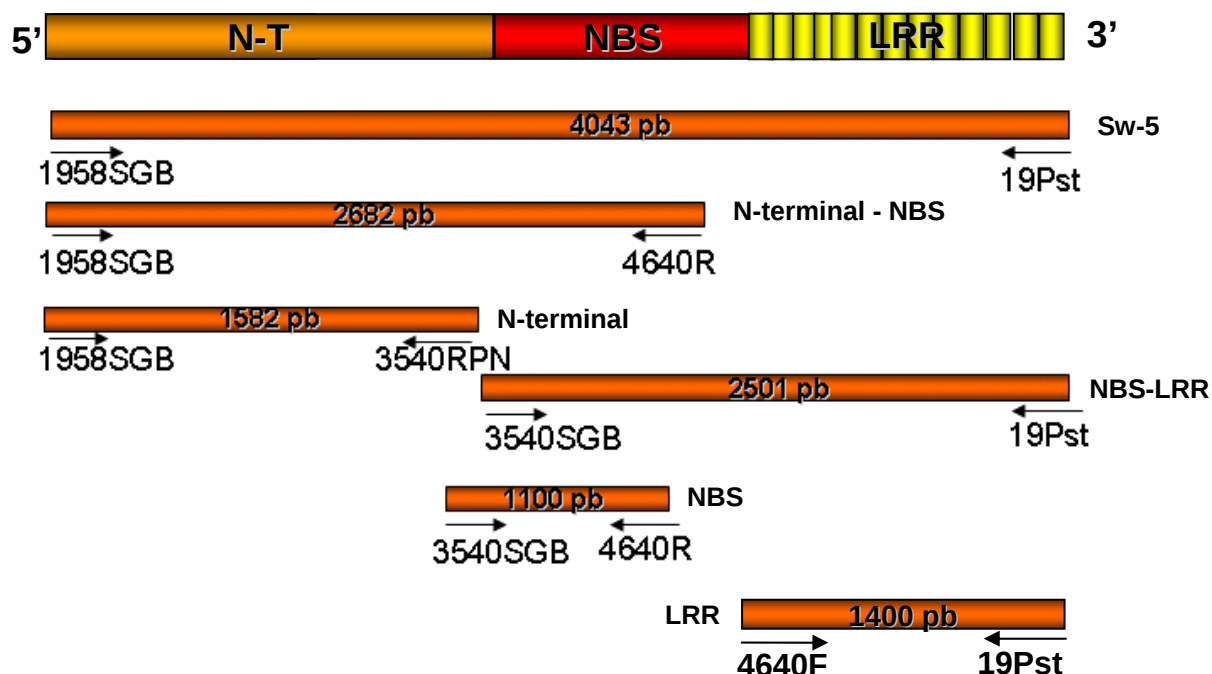


Figura 2. Representação diagramática das construções iscas utilizadas nos ensaios de duplo híbrido. Barras: regiões dos genes amplificadas para as clonagens no vetor pGBKT7 e os respectivos oligonucleotídeos utilizados (setas). N-T: região N-terminal. NBS: sítio de ligação de nucleotídeos. LRR: região de repetições ricas em resíduos de leucina.

2.5. Isolamento de RNA mensageiro e construção da biblioteca de cDNAs fusionados à sequência que codifica o domínio AD do ativador GAL4 para construção dos vetores “presas” para ensaios de duplo híbrido em leveduras

Plantas da linhagem B5-5 de *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene Sw-5 foram inoculadas, via extrato vegetal tamponado, com o isolado AL da espécie *Groundnut ringspot virus* (GRSV) de tospovírus. O RNA mensageiro foi isolado a partir de tecido foliar inoculado coletado a 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96 e 120 horas após a inoculação. A extração de RNA total foi conduzida utilizando o kit ConcertTM Plant RNA Isolation (Invitrogen). A purificação do mRNA foi feita de acordo com especificações do NucleoTrap[®] mRNA Purification kit (ClontechTM). Quantidades iguais de mRNA derivadas destes tratamentos foram combinadas e utilizadas na síntese de cDNA. Um oligonucleotídeo dT modificado (CDS III Oligonucleotídeo) foi utilizado para iniciar a transcrição reversa. Para a síntese da primeira fita do cDNA, 2 µL do RNA amostral, composto por aproximadamente 0,5 µg de mRNA, foi misturado a 1 µL do oligonucleotídeo CDS III e 1 µL de água deionizada totalizando um volume final de 4 µL. A mistura foi incubada a 72°C por 2 minutos, e por 2 minutos em gelo. Foi então adicionado ao tubo de reação 2 µL do tampão 5X *First-Strand* Buffer, 1 µL de DTT (20 µM), 1 µL do mix dNTP (10 µM), e 1 µL da transcriptase reversa MMLV para um volume final de 9 µL. A reação foi incubada a 42°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 1 µL do oligonucleotídeo SMART IIITM para a extensão do molde. A reação foi incubada por 1 hora a 42°C em termociclador. Em seguida a reação foi incubada a 75°C por um período de 10 minutos para a síntese final da primeira fita. Sobre a reação foram adicionadas 2 unidades de RNase H. A reação foi incubada a 37°C por 20 minutos.

O produto da reação foi convertido em DNA de fita dupla estável (cDNA) que foi amplificado por PCR de longa distância (Id-PCR) utilizando o kit Advantage[®] cDNA PCR Kit & Polimerase Mix (ClontechTM). A reação consistiu da utilização de 2µL da primeira fita de cDNA, 10 µL do Tampão 10X Advantage 2 PCR, 2 µL do mix 50X dNTP, 2 µL do *oligonucleotídeo* 5', 2 µL do *oligonucleotídeo* 3', 10 µL da solução 10X GC-Melt, 2 µL da Polimerase 50X Advantage Mix e 70 µL de água

para um volume final de 100 µL da reação de amplificação. As reações de amplificações foram realizadas no aparelho Mastercycler (Eppendorf®), compostas de 23 a 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 95°C por 10 segundos, 68°C por seis minutos (extensão), seguidos por uma extensão final a 68°C por cinco minutos. A cada ciclo foi acrescentado 5 segundos ao tempo de extensão.

A população de cDNAs amplificada foi, então, utilizada para a construção de uma biblioteca de cDNA por meio do uso do SMART™ cDNA Library Construction Kit que se caracteriza por maximizar a representação de seqüências (ORFs) completas na construção de uma biblioteca de alta qualidade partindo de uma pequena quantidade de amostra, uma vez que somente seqüências de cDNAs contendo o oligo SMART em seu terminal 5' foram amplificados enquanto a amplificação de cDNAs incompletos foram eliminados. Utilizando esta técnica, uma alta porcentagem de seqüências completas de cDNA dupla fita foi obtida.

O cDNA foi purificado utilizando a coluna CHROMA SPIN™. Para cada coluna foram utilizados 95 µL de amostra. Sobre a matriz semi-seca foi adicionada a amostra evitando-se que esta escorresse através da parede da coluna. A coluna foi centrifugada a 700Xg por 5 minutos e a amostra contida no tubo coletor foi combinada em duplicatas e sobre cada duplicata foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, pH 4,8 e 2,5 volumes de etanol 95% gelado para precipitar a amostra de cDNA. Os tubos foram incubados a -20°C por um período de 1 hora e então foram centrifugados a 16000Xg por 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido cuidadosamente para não dispersar o sedimento que foi deixado secando por 10 minutos ao ar. O sedimento foi ressuspendido em um volume final de 11 µL.

2.5.1. Construção da biblioteca de cDNAs fusionados em pGADT7-Rec e transformação de leveduras AH109 para ensaios de duplo híbrido por meio da formação de diplóides

O vetor utilizado para a construção da biblioteca, o pGADT7-Rec, foi engenheirado para construção de bibliotecas GAL4AD – cDNA por meio de recombinação homóloga em leveduras. Para a construção da biblioteca, foi primeiramente gerado cDNA dupla fita segundo o protocolo presente no manual

MATCHMAKER *Library Construction & Screening Kit*, como já descrito, seguido da contr transformação de leveduras competentes com o dscDNA e pGADT7-Rec.

Sobre 600 µL células competentes de leveduras da estirpe AH 109 descongeladas à temperatura ambiente foi adicionado o precipitado de 20 µL do cDNA purificado, 6 µL do vetor pGADT7-Rec *Sma* I linearizado (3 µg) e 20 µL de *Herring Testes Carrier* DNA desnaturado. À mistura foi adicionado 2,5 mL de solução PEG/acetato de lítio, seguido de incubação a 30°C por um período de 45 minutos. Após o tempo de incubação foi adicionado 160 µL de DMSO e a mistura foi mantida em banho a 42°C por 20 minutos. O sedimento foi recuperado por centrifugação e ressuspendido em 3mL de YPD Plus Liquid Medium e incubado a 30°C por 90 minutos sob agitação constante. O sedimento foi novamente recuperado e ressuspendido em 15 mL de NaCl 0,9% e as células transformadas foram selecionadas em meio SD-LEU. As placas contendo os transformantes foram esfriadas a 4°C por 3-4 horas e, sobre as colônias, foram adicionados 5mL de Freezing Medium (Clontech™) por placa. Cuidadosamente, as colônias foram raspadas utilizando uma pipeta Pasteur retorcida. Todo o líquido obtido foi combinado em um frasco estéril e a densidade celular foi ajustada para 2×10^7 células/mL. Alíquotas de 1 mL foram feitas em tubos de 1,5 mL e estocadas a -80°C. Para a determinação do tamanho da biblioteca, foram plaqueadas diluições sucessivas em placas contendo meio SD-LEU. As placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento das colônias.

2.5.2. Construção da biblioteca de cDNAs fusionados em pGADT7-Rec para ensaios de duplo híbrido por meio da co-transformação

Sobre 600 µL células competentes de leveduras da estirpe AH 109 descongeladas à temperatura ambiente foi adicionado o precipitado de 20 µL do cDNA purificado e aproximadamente 5 µg da construção pGBKT7-NBS-LRR (“isca”), ressuspendidos em 14 µL de água deionizada, e 6 µL do vetor pGADT7-Rec *Sma* I linearizado. Sobre a mistura foram adicionados 0,3 mL de solução PEG/Acetato de lítio seguido de um período de 5 segundos ao vortex e, em seguida, a mistura foi incubada a 42°C por 15 minutos. As células foram sedimentadas a 16000Xg por 15 segundos e ressuspendidas em 0,2 mL de meio

de recuperação e incubadas a 30°C por um período de 90 minutos. As células foram sedimentadas novamente e ressuspensas em 0,5 mL de TE 1X totalizando 2 mL de ressuspensão. Foi plaqueada uma quantidade igual a 150 µL por placa contendo meio QDO + 3-AT. Como controles para o cálculo de eficiência, 100 µL da suspensão final foi diluída 1:10, 1:100 e 1:1000 e plaqueadas em meios SD-TRP para cálculo de eficiência de transformação com o vetor “isca”, SD-LEU para cálculo de eficiência de recombinação homóloga, restabelecendo a topologia circular do vetor, e em SD-TRP-LEU para cálculo de eficiência de co-transformação.

2.6. Detecção de interações com a proteína Sw-5 e caracterização parcial dos cDNAs obtidos

Com um único passo de transformação, os três componentes necessários para a seleção de estirpes de leveduras repórteres foram introduzidos em uma mesma levedura como descrito no item 2.5.2. Uma vez que o vetor pGADT7-Rec é recircularizado pela recombinação com o dsDNA, duplos híbridos positivos puderam ser imediatamente identificados após o processo de transformação pelo plaqueamento dos transformantes em meio seletivo para os genes repórteres *ADE2* e *HIS3* (meio SD-TRP-LEU-ADE-HIS). As placas foram incubadas invertidas a 30° C até surgirem colônias visíveis (3-7 dias). Ensaio adicional foram feitos utilizando um terceiro gene repórter, *MEL1* que codifica uma α -galactosidase. Uma vez que essa enzima é secretada, é possível determinar a expressão desse gene repórter em meio contendo o indicador X- α -gal.

Apesar da co-transformação, acima descrita, ser o modo mais rápido para construir a biblioteca e selecionar os duplos híbridos positivos, é possível fazer a seleção por meio da obtenção de diplóides. A formação de diplóides baseada na diferença de *mating type* entre as duas estirpes é um método eficiente para introduzir dois plasmídeos na mesma célula hospedeira (Finley e Brent, 1994; Harper *et al.*, 1993). A estirpe Y187 (Mat α) foi transformada com o plasmídeo pGBKT7 contendo o gene *Sw-5* e as formas truncadas do gene clonadas (obtidos no item 2.4), com o vetor vazio, e com o vetor controle pGBKT7-*Lam*. Para a obtenção dos diplóides, foram utilizados como “iscas” os vetores pGBKT7-NBS-LRR e pGBKT7-Nterminal-NBS transformados em Y187 numa densidade celular

de aproximadamente 10^9 células/mL. Sobre as células contendo as “iscas” foi adicionado 1 mL da biblioteca ($\sim 2 \times 10^7$ células) em um erlenmeyer de 2 L e a mistura celular foi incubada a 30°C por um período de 20-24 horas. A mistura celular total foi centrifugada e ressuspensa em meio 0,5 X YPAD num volume final de 12,5 mL e as células plaqueadas em meio SD sem histidina, leucina e triptofano. As placas foram incubadas invertidas a 30° C até surgirem colônias visíveis (3-7 dias). O crescimento de colônias neste meio indica uma fraca expressão do gene repórter *HIS3* ou interação específica entre a proteína alvo e a proteína isca, resultando na expressão deste gene. Para distinguir entre estas possibilidades, foi efetuada a detecção da expressão do segundo gene repórter (*MEL1*) por meio do plaqueamento dos clones obtidos em meio SD-ágar sem histidina, leucina e triptofano e contendo X- α -gal. Neste ensaio, as colônias desenvolvidas foram analisadas para a detecção da atividade enzimática, onde neste substrato colônias que expressam o gene *MEL1* produzem α -galactosidase e desenvolvem uma coloração azulada.

Como controle positivo das interações, leveduras da estirpe AH 109 foram co-transformadas com os plasmídeos controles pGADT7- T e pGBKT7- 53 que codificam, respectivamente, a fusão entre o domínio AD e o antígeno T e a fusão entre o domínio BD e a proteína murínica p53 que interagem em um ensaio de duplo híbrido. Como controle negativo das interações, leveduras da estirpe AH 109 foram co-transformadas com os plasmídeos controles pGADT7- T e pGBKT7- Lam que codifica a fusão entre o domínio BD e a lamina C humana que não formam complexos assim como não interage com a maioria das proteínas em um ensaio de duplo híbrido levando à ausência de expressão de qualquer gene repórter.

2.7. Verificação da especificidade das interações proteína-proteína detectadas

Para verificar se as interações positivas foram devido à interação específica da proteína isca com Sw-5 e não com o domínio BD de GAL4, o DNA plasmidial das colônias positivas foi isolado e resgatado por transformação de *E. coli* e seleção das células transformadas em meio LB com ampicilina. Estes plasmídeos

foram isolados e retransformados em AH109 que contém os plasmídeos pGBKT7 sem inserto clonado.

A seleção das leveduras transformadas e a avaliação da expressão dos genes repórteres *HIS3* e *Mel1* foram efetuadas comparando-se a expressão destes genes em leveduras, que foram anteriormente transformadas com os plasmídeos controles pGBKT7-53, pGBKT7-Lam e pGADT7-T.

2.8. Caracterização molecular dos cDNAs identificados

Para identificar a proteína codificada pelos clones positivos, a sequência de nucleotídeos dos respectivos cDNAs foi determinada por meio do sequenciamento automático no equipamento MegaBACE 500 (GE Healthcare, Freiburg, Germany), e foram comparadas às sequências depositadas em bancos de dados por meio dos programas BLASTn e BLASTx. A classificação de uma família funcional da proteína presa foi determinada pela comparação da sequência obtida com o banco de dados do programa PROSITE. As similaridades com sequências depositadas nos bancos de dados foram avaliadas por meio do alinhamento dessas sequências utilizando o programa Clustal W. Com base nos elementos estruturais presentes nas proteínas identificadas, a significância fisiológica das interações detectadas foi avaliada e testada em experimentos posteriores.

2.9. Ensaio funcional dos cDNAs identificados

2.9.1. Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

Um fragmento do cDNA identificado e caracterizado foi clonado no vetor pTRV (cDNA do RNA 2) (Liu *et al.*, 2002), baseado no vírus TRV, no sentido antisenso. Uma sequência de 74 pares de bases terminais do clone presa caracterizado (pGPP623), foi clonada de forma invertida no vetor pTRV utilizando as enzimas *Bam*HI e *Sst*II (pGPP903) (Figura 3).

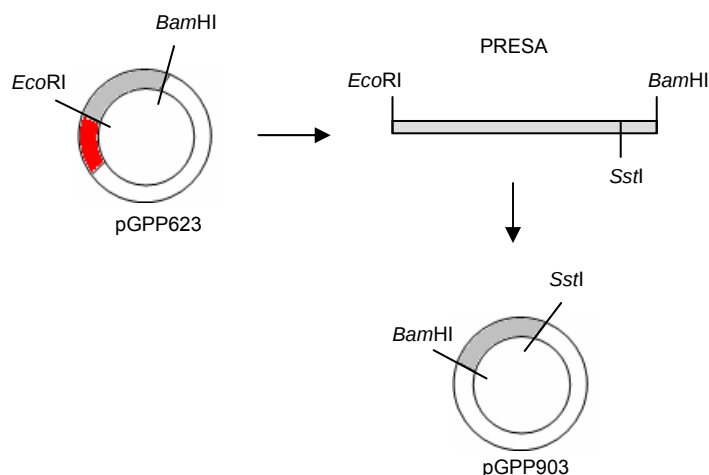


Figura 3. Clonagem de 74 pb da região terminal da sequência presa no vetor pTRV para ensaio de silenciamento mediado por VIGS. A sequência de 74 pb terminal da presa foi clonada na orientação anti-senso no vetor pTRV utilizando as enzimas *Bam*HI e *Sst*I. pGPP903 representa o clone recombinante obtido em *E. coli*.

Os clones recombinantes foram transferidos para *Agrobacterium tumefaciens* e utilizados na inoculação de plantas de *Nicotiana benthamiana* selvagem e de *N. benthamiana* transformada com o gene *Sw-5* (B5-5) (Tratamentos *N.benthamiana*/B5-5 Ferredoxina), juntamente com *A. tumefaciens* transformada com pTRV-RNA1. A inoculação dos clones de *A. tumefaciens* contendo os clones recombinantes foi realizada pelo com o auxílio de palitos de dente estéreis, os quais foram utilizados para tocar na cultura bacteriana e, a seguir, inserir no pecíolo das três folhas mais apicais das plantas perfazendo oito furos por pecíolo. A transferência e a expressão do vetor recombinante produz o inóculo inicial para a infecção viral. Ao se replicar, o vírus expressa os genes necessários para completar seu ciclo assim como as sequências de interesse, Como controle do processo de silenciamento, um fragmento de aproximadamente 540 pb do gene *Sw-5* que compreende uma porção terminal do domínio NBS e uma porção inicial do LRR foi clonado no vetor pTRV (cDNA do RNA 2) no sítio referente à enzima *Eco*RI (Tratamento: B5-5/*N.benthamiana* Sw-5).

Foram agroinoculadas 77 plantas de *N. benthamiana* e 77 de B5-5 com os vetores recombinantes contendo os cDNAs obtidos. Dentre as plantas agroinoculadas, 34 de cada foram inoculadas com o isolado AL de GRSV via

extrato vegetal tamponado após 12 dias da agroinoculação para, assim, determinar o efeito do silenciamento dos cDNAs previamente caracterizados. Como controles foram utilizadas 20 plantas de cada material agroinoculadas somente com o vetor pTRV (Tratamento: B5-5/N. benthamiana TRV), e 10 plantas contendo parte do gene PDS (fitoeno desaturase) como controle visual do processo de silenciamento mediado pelo vírus (Tratamento: B5-5/N. benthamiana PDS) (Liu *et al.*, 2002). Os controles também foram desafiados com tospovírus para que se pudesse determinar os possíveis efeitos da inoculação e de infecção pelo TRV na resistência.

Os tratamentos utilizados podem ser vistos na Tabela 3.

Avaliou-se a ocorrência de sintomas virais, tempo de início do aparecimento de lesões locais típicas de HR, tamanho e aspecto das lesões e ocorrência de infecção sistêmica.

Tabela 3. Tratamentos utilizados para ensaio da análise funcional utilizando VIGS

Tratamentos	COLETA ^f		TOSPOVÍRUS ^g		TAMPÃO ^h		NÃO INOCULADAS ⁱ	
	<i>N. benthamiana</i>	B5-5	<i>N. benthamiana</i>	B5-5	<i>N. benthamiana</i>	B5-5	<i>N. benthamiana</i>	B5-5
Ferredoxina ^a	5	5	8	8	2	2	2	2
Sw-5 ^b	5	5	8	8	2	2	2	2
TRV ^c	8	8	8	8	2	2	2	2
PDS ^d	-	-	5	5	2	2	2	2
Palito ^e	5	5	5	5	2	2	2	2

^a Tratamento onde foi silenciado o gene que codifica para a ferredoxina I de cloroplasto, utilizando o clone pTRV1-*Nb-Fd1* anti-senso como vetor viral responsável pelo processo de silenciamento. ^b Tratamento onde foi silenciado o gene *Sw-5*, utilizando o clone pTRV1-*Sw-5* como vetor viral responsável pelo processo de silenciamento. ^c Tratamento utilizando o vetor viral vazio (pTRV1) como controle do processo de infecção por TRV. ^d Tratamento utilizado como controle visual do processo de silenciamento utilizando o clone pTRV1-*PDS* como vetor viral responsável pelo processo de silenciamento do gene que codifica a enzima fitoeno desaturase, requerida para a formação normal de pigmentos. ^e Tratamento onde foi somente utilizado o palito de dente estéril como controle do processo de inoculação. ^f Relacionado às plantas que foram utilizadas para a coleta de material vegetal para análises de expressão gênica. ^g Plantas que foram desafiadas com o tospovírus após sofrerem os tratamentos já descritos. ^h Plantas somente inoculadas com tampão. ⁱ Plantas utilizadas como controles do processo de inoculação com tospovírus.

2.9.2. Confirmação do silenciamento gênico por meio da análise de expressão por PCR em tempo real

A análise da expressão dos genes silenciados foi feita utilizando PCR em tempo real. Folhas das plantas agroinoculadas e das plantas controles foram coletadas momentos antes da inoculação com o tospovírus e congeladas em nitrogênio líquido. O tecido foi mantido a -80°C . O RNA total das plantas foi extraído. Cerca de 70 μg de RNA total de cada amostra foram tratados com DNase I livre de RNase (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e purificados em colunas do kit *Plant RNeasy Mini* (Qiagen). A ausência de contaminação por DNA genômico foi comprovada por PCR utilizando oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 77 pb do gene que codifica para ferredoxina. A integridade do RNA após o tratamento com DNase I foi confirmada em gel desnaturante de agarose 1,2%. O cDNA foi sintetizado conforme o protocolo do kit *SuperScriptTM III Platinum[®] Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR[®] Green* (Invitrogen), utilizando o oligonucleotídeo oligo-dT a partir de cerca de 10 μg de RNA total. Após a síntese, a solução contendo o cDNA foi diluída para 100 ng/ μl de RNA total inicial. A confirmação da síntese foi feita por meio de PCR utilizando um par de oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 66 bp no cDNA, sintetizados com base no unigene AY206004 (EF1 α). Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nos unigenes correspondentes a actina 2 (AY179605) e EF1 α (AY206004).

Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o software Oligonucleotídeos Express 2.0 (Applied Biosystems), com *amplicons* variando de 58 a 77 bp (Tabela 4).

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão gênica por PCR em tempo real

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA	PROTEÍNA CODIFICADA PELOS GENES (AMPLICON)
RT-NbActin-F	5'- CGAGCTGCCTGATGGACAA-3'	Actina 2 (58bp)
RT-NbActin-R	5'- TTCTGGGCAGCGGAATCTC-3'	
RT-NbEF1-F	5'- CAAACCCCTACGTCTTCCACTT-3'	Fator de elongação 1 α (66bp)
RT-NbEF1-R	5'- CCAACAGGGACAGTACCAATACC-3'	

RT-NbFerredox-F	5'- CACCAGAGGGAGCTGTTGAATT-3'	Ferredoxina I de cloroplasto (77bp)
RT-NbFerredox-R	5'- ATCATGTCCCATTTCTCAGCTT-3'	
RT-Sw5NT-F	5'-TTTTGCCTGATTCCTTAGTCGAA-3'	Sw-5 (71bp)
RT-Sw5NT-R	5'- CAACACCCGGTGAAGTATTTCC-3'	

Uma vez que a região utilizada como sequência complementar aos mRNAs da ferredoxina I de cloroplasto possui 95% de identidade (3e-162), com a porção final do gene que codifica para uma fosfolipase C2 de *N. tabacum* (AF223573), a expressão dessa molécula também foi monitorada por meio do PCR em tempo real.

As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando SYBR® Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. O volume das reações foi de 20 µL, contendo 10 µl de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM de cada oligonucleotídeo e 0,75 µL da solução contendo cDNA (correspondente a 75 ng de RNA total submetido à síntese de cDNA). A mistura contendo o cDNA foi aliquoteada com o auxílio de pipeta multicanal eletrônica, assim como a solução contendo os oligonucleotídeos, a fim de minimizar os erros de pipetagem. As condições de termociclagem utilizadas consistiram de aquecimento a 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). O controle endógeno utilizado foi actina 2. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. Caso ocorra a amplificação de mais de um produto, diferentes temperaturas de dissociação são detectadas.

3. RESULTADOS

3.1. Isolamento de RNA mensageiro e construção da biblioteca de cDNAs fusionados à sequência que codifica o domínio AD do ativador GAL4 no vetor pGADT7-Rec para construção dos vetores “isca” para ensaios de duplo híbrido em leveduras

Com o objetivo de construir uma biblioteca de cDNAs de *N. benthamiana* fusionados ao domínio AD do ativador transcricional GAL4, isolou-se mRNA de folhas de plantas da linhagem transgênica B5-5 de *N. benthamiana* transformada com o gene *Sw-5* isolado de tomate, e que foram inoculadas com o isolado AL do tospovírus *Groundnut ringspot virus*. As plantas inoculadas exibiram reações locais necróticas, típicas da resposta de hipersensibilidade, após 48 horas da inoculação. Transcorridas 72 horas, estas lesões se tornaram completamente desenvolvidas.

Os mRNAs, isolados de folhas coletadas em diversos tempos após a inoculação, foram combinados em quantidades iguais e utilizados na construção de duas bibliotecas de cDNA que a seguir foram fusionados ao domínio AD de GAL-4 presente no vetor pGADT7-Rec. A biblioteca em AH 109 para o ensaio de duplo híbrido por formação de diplóides contém cerca de 5×10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de suspensão. Como o volume total desta biblioteca é 120 mL, a mesma é constituída por cerca de $6,84 \times 10^9$ UFC.

3.2. Clonagem da sequência completa do gene *Sw-5* e de regiões truncadas do gene no vetor pGBKT7 para construção dos vetores “isca” para ensaios de duplo híbrido em leveduras

Por meio de PCR longa, a ORF completa de *Sw-5*, bem como seus domínios, foram amplificados e clonados no vetor pGBKT7. A confirmação dos transformantes foi efetuada por PCR avaliando diretamente as colônias bacterianas ou por isolamento dos plasmídeos e detecção dos insertos por meio da análise com enzimas de restrição. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar leveduras hospedeiras apropriadas e os clones foram nomeados e estocados (Tabela 5).

Tabela 5. Nomenclatura dos clones de leveduras transformadas com as construções contendo o gene *Sw-5* ou regiões do gene.

NOME DO CLONE RECOMBINANTE	DESCRIÇÃO DO FRAGMENTO CLONADO	DESCRIÇÃO DO DOMÍNIO CLONADO	LEVEDURA HOSPEDEIRA
pGPP523	3540SGB/19PST <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	NBS-LRR	AH109
pGPP524	3540SGB/4640R <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	NBS	AH109
pGPP525	1958SGB/3540RPN <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	CC	AH109
pGPP526	1958SGB/19PST <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	CC-NBS-LRR	AH109
pGPP527	1958SGB/4640R <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	CC-NBS	AH109
pGPP529	3540SGB/19PST <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	NBS-LRR	Y187
pGPP530	3540SGB/4640R <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	NBS	Y187
pGPP531	1958SGB/3540RPN <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	CC	Y187
pGPP532	1958SGB/19PST <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	CC-NBS-LRR	Y187
pGPP533	1958SGB/4640R <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I em pGBKT7	CC-NBS	Y187

As colônias das leveduras transformantes plaqueadas em meios seletivos apresentaram o padrão de crescimento condizente com a seleção determinada pelos vetores (Figura 4).

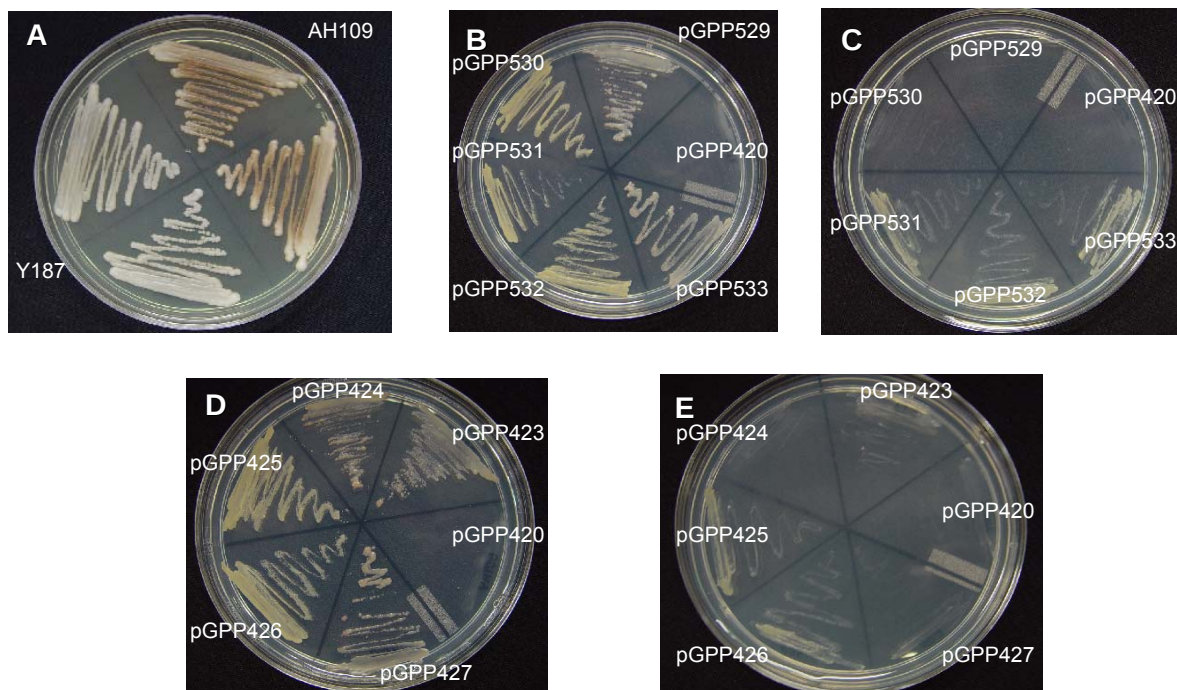


Figura 4. Confirmação do padrão de crescimento das colônias de leveduras transformadas com o plasmídeo isca crescidas em meios seletivos. A – Estirpes selvagens AH 109 e Y187 em YPAD. B e C – Transformantes em Y187, contendo o plasmídeo pGBKT7 e os fragmentos descritos, em meios seletivos SD – TRP (meio mínimo suplementado com aminoácidos exceto triptofano), e SD – LEU (meio mínimo suplementado com aminoácidos exceto leucina) respectivamente. D e E - Transformantes em AH 109, contendo o plasmídeo pGBKT7 e os fragmentos descritos, em meios seletivos SD – TRP e SD – LEU, respectivamente.

O seqüenciamento das construções contidas nas leveduras transformantes e a expressão das proteínas quiméricas comprovou a integridade da ORF, e a clonagem de Sw-5 e seus subclones na mesma fase de leitura com GAL4-BD. Por exemplo, proteínas com aproximadamente 90 kDa referente aos domínios BD+NBS+LRR e 100 kDa referentes à região BD+CC+terminal+NBS, foram expressas nas leveduras, em concordância com a massa molecular estimada com base na tradução da sequência clonada (Figura 5).



Figura 5. Detecção da expressão das proteínas quiméricas BD+NBS+LRR (canaleta 3 – aproximadamente 90kDa) e BD+CC+NBS (canaleta 7 – aproximadamente 100kDa) em levedura, por meio da análise de *Western blotting*. Sondas baseadas no anticorpo primário anti-c-Myc e no anticorpo secundário anti-mouse foram utilizados para a detecção das proteínas recombinantes utilizando o Immuno-Blot Assay Kit (Bio-Rad).

3.3. Detecção de interações com a proteína Sw-5 e caracterização parcial dos cDNAs obtidos

3.3.1. Ensaios de duplo híbrido em leveduras por meio da formação de diplóides

Tentou-se inicialmente detectar interações pelo sistema duplo-híbrido de leveduras por meio da obtenção de diplóides. Os clones pGPP529 (Y187 [pGBKT7-NBS-LRR]), e pGPP533 (Y187 [pGBKT7-CC-NBS]) foram utilizados em ensaios independentes como iscas para verificar interações a partir da biblioteca em AH109. Aproximadamente 10^9 células por mL de cada estirpe de levedura contendo o plasmídeo isca foi acrescentado a 1 mL da suspensão de células da biblioteca (cerca de $5,7 \times 10^7$ clones), para a obtenção dos diplóides. A viabilidade das iscas foi analisada pelo plaqueamento da mistura em meio SD-TRP sendo de $1,112 \times 10^8$ UFC/mL para pGPP529 e de $7,27 \times 10^7$ UFC/mL para pGPP533. A viabilidade da biblioteca foi analisada pelo plaqueamento da mistura dos diplóides em meio SD-LEU, sendo de $1,14 \times 10^8$ UFC/mL. A viabilidade dos diplóides foi analisada pelo plaqueamento em meio SD-TRP-LEU (meio mínimo suplementado com aminoácidos exceto triptofano e leucina) sendo de $6,47 \times 10^7$ UFC/mL para a

combinação pGPP529 + AH109 [pGADT7-Rec-cDNA] e de $4,27 \times 10^7$ UFC/mL para a combinação pGPP533 + AH109 [pGADT7-Rec-cDNA]. A porcentagem de diplóides formados na primeira combinação foi de 58,18%, e na segunda foi de 58,73%. Devido a um grande número de falsos positivos presentes nos meios seletivos para interação, um novo ensaio de formação de diplóides foi realizado adicionando-se 5mM de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole), um inibidor competitivo da proteína HIS3 de levedura. A viabilidade da biblioteca foi de, aproximadamente, 4×10^7 UFC/mL, e das iscas foram de $5,42 \times 10^7$ UFC/mL para pGPP529 e $2,16 \times 10^7$ UFC/mL para pGPP533. A viabilidade dos diplóides foi cerca de $2,1 \times 10^6$ UFC/mL para as duas combinações. A porcentagem de diplóides foi de 5,6% para a primeira combinação e de 9,72% para a segunda combinação.

Colônias isoladas de leveduras presentes em meio SD-TRP-LEU-HIS + 3-AT (meio mínimo suplementado com aminoácidos, exceto triptofano, leucina e hisitina, e 3-AT) apareceram com 48 horas de cultivo a 30°C e foram repicadas para novas placas. Cento e oitenta colônias da combinação pGPP529 + AH109 [pGADT7-Rec-cDNA] e 274 colônias da combinação pGPP533 + AH109 [pGADT7-Rec-cDNA] foram selecionadas. Placas réplicas, contendo o meio SD-TRP-LEU-HIS + 3-AT + X- α -Gal (meio mínimo suplementado com aminoácidos, exceto triptofano, leucina e hisitina, e 3-AT e X- α -Gal), das colônias obtidas foram feitas para a análise do terceiro gene repórter do sistema (*MEL1*). Nenhuma colônia foi capaz de ativar todos os genes repórteres do sistema.

3.3.2. Ensaio de duplo híbrido por meio da co-transformação

Em função do insucesso na triagem por meio da obtenção de diplóides, uma segunda estratégia realizada para a obtenção de duplo-híbridos foi a realização de co-transformação do plasmídeo isca pGBKT7-NBS+LRR, do cDNA amplificado e do vetor pGADT7-Rec linearizado com *Sma*I. Para a análise de eficiência de co-transformação e controle do processo, alíquotas da suspensão final da transformação foram plaqueadas em meio SD-TRP eficiência da transformação do vetor isca pGBKT7-NBS+LRR, SD-LEU (eficiência de recombinação *in vivo*) e em meio SD-TRP-LEU (eficiência de co-transformação). A eficiência da transformação do vetor isca pGBKT7-NBS+LRR foi de $1,14 \times 10^5$ UFC/ μ g de DNA, da recombinação foi de $6,07 \times 10^4$ UFC/ μ g de DNA, caracterizando cerca de $1,8 \times 10^5$

clones, e da co-transformação de $4,2 \times 10^4$ UFC/ μ g de DNA. Do processo de co-transformação, três colônias cresceram no meio seletivo SD-TRP-LEU-HIS + 3-AT após 24 horas a 30°C. Nenhuma outra colônia foi observada durante cerca de 120 horas de incubação das placas. As colônias foram repicadas para o meio SD-TRP-LEU-HIS-ADE + 3-AT + X- α -Gal para análise do terceiro gene repórter do sistema (*MEL1*). Um clone apresentou ativação de todos os genes repórteres e foi denominado de pGPP612 (Figura 6). Este clone foi cultivado em meio SD-TRP-LEU-HIS + 3-AT para extração dos plasmídeos isca e presa. Os plasmídeos obtidos, tanto o plasmídeo carregando a isca quanto o plasmídeo contendo a presa, foram recuperados via transformação de bactérias por eletroporação e plaqueamento em meio LB contendo canamicina ou ampicilina (ver Tabela 1). O plasmídeo recombinante pGAT7Rec+cDNApresa foi denominado pGPP623.

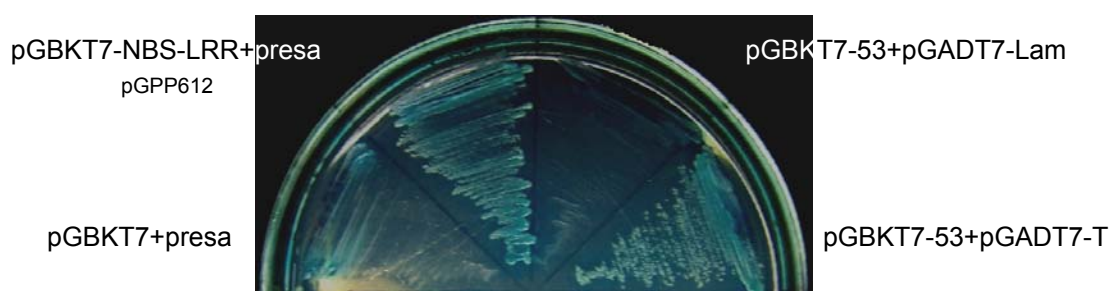


Figura 6. Confirmação da especificidade da interação da proteína codificada pelo plasmídeo presa contido no clone pGPP612 com a porção NBS-LRR da proteína Sw-5. pGBKT7-NBS-LRR+presa representa o clone positivo para interação por meio do sistema duplo híbrido em leveduras denominado pGPP612. pGBKT7-53+pGADT7-Lam representa o controle negativo para ensaios de duplo híbrido em leveduras, não ativando nenhum dos genes repórteres. pGBKT7-53+pGADT7-T representa o controle positivo para ensaios de duplo híbrido em leveduras, ativando os genes repórteres analisados. pGBKT7+presa representa uma levedura da estirpe AH109 transformada com o plasmídeo recombinante pGAT7Rec+cDNApresa (pGPP623) e com o vetor pGBKT7 sem inserto. A levedura recombinante representa mais um controle do processo de interação mostrando a especificidade de interação entre o cDNA presa e a porção NBS-LRR da proteína Sw-5.

Com o objetivo de determinar a menor porção da proteína Sw-5 que é responsável pela interação, foi feita a co-transformação do plasmídeo presa recuperado via transformação de bactérias, com os plasmídeos isca com a região do gene Sw-5 que codifica os domínios truncados da proteína Sw-5. Três

combinações mostraram ativar os genes repórteres: [pGBKT7 – NBS-LRR] + [pGADT7-Rec-presa], [pGBKT7 – NBS] + [pGADT7-Rec-presa], e [pGBKT7 – Sw-5] + [pGADT7-Rec-presa]. A ativação dos genes repórteres foi consistente com o obtido pela co-transformação do plasmídeos controle pGBKT7-53 e pGADT7-T (controle positivo), e pGBKT7-Lam e pGADT7-T (controle negativo) (Figura 7).

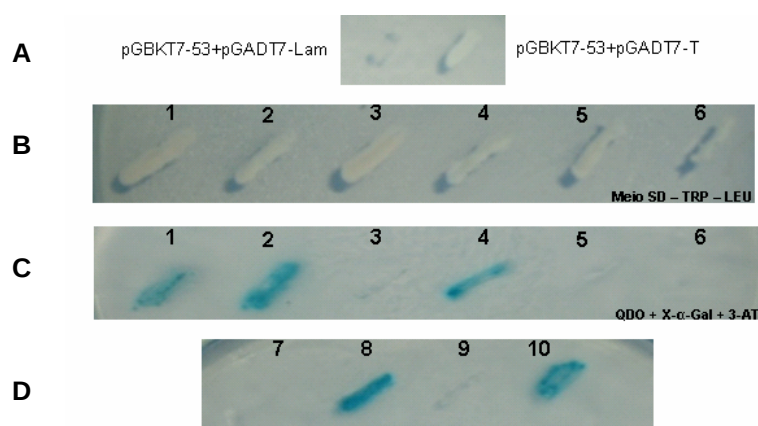


Figura 7. Menor porção da proteína Sw-5 capaz de interagir com a proteína presa. A: Controles negativo e positivo, respectivamente, em meio QDO - X-α-Gal. B: Colônias transformantes contendo os dois plasmídeos em meio SD -TRP-LEU. C: Colônias transformantes contendo os dois plasmídeos em meio QDO + X-α-Gal + 3-AT. 1: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-NBS-LRR e pGPP623. 2: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-NBS e pGPP623. 3: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-CC (N-terminal) e pGPP623. 4: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-Sw-5 (CC-NBS-LRR) e pGPP623. 5: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-CC-NBS e pGPP623. 6: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-LRR e pGPP623. D: Colônias transformantes contendo os plasmídeos presa, controle positivo, controle negativo e a colônia positiva, respectivamente. 7: Colônia de levedura transformada com o plasmídeo pGPP623. 8: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-T. 9: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-Lam. 10: Colônia pGPP612.

3.4. Análise da especificidade das interações proteína-proteína detectadas

Com o objetivo de determinar se as interações obtidas ocorrem entre a proteína isca e a proteína presa e não entre os domínios AD e BD do ativador transcricional GAL4, os plasmídeos presa recuperados foram co-transformados com o vetor isca (pGBKT7) em leveduras da estirpe AH109. Os transformantes obtidos não foram capazes de ativar os genes repórteres do sistema. Concomitantemente, as iscas que interagiram com a proteína presa foram co-transformadas com o vetor pGADT7 em leveduras da estirpe AH109. Como esperado, nenhum transformante foi capaz de ativar os genes repórteres e crescer em meio QDO (Figura 8).

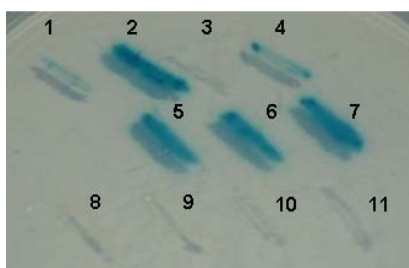


Figura 8. Verificação da especificidade das interações proteína-proteína. Colônias transformantes crescidas em meio QDO + X- α -Gal + 3-AT. Observa-se que as interações obtidas são específicas em todos os três casos. 1: Colônia de levedura transformada com o plasmídeo pGPP623. 2: Colônia pGPP612. 3: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-Lam. 4: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-T. 5: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-NBS-LRR e pGPP623. 6: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-NBS e pGPP623. 7: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-Sw-5 (CC-NBS-LRR) e pGPP623. 8: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7e pGPP623. 9: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-NBS-LRR e pGADT7. 10: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-NBS e pGADT7. 11: Colônia de levedura transformada com os plasmídeos pGBKT7-CC-NBS-LRR e pGADT7.

3.5. Caracterização molecular do cDNA identificado por meio de análises de similaridades em banco de dados

O cDNA presa identificado (clone pGPP623) é constituído por 412 nucleotídeos. A proteína de fusão obtida pela expressão do clone pGPP623 contém 151 aminoácidos, sendo os 35 primeiros referentes à tradução da sequência de nucleotídeos do vetor de expressão (Figura 9).

O cDNA apresentou 94% de identidade de nucleotídeos com o gene nuclear que codifica a ferredoxina I de cloroplasto (*fdn-1*) de *Nicotiana tabacum* (acesso AY864890.1, 615 nucleotídeos, $p=3e-165$).

A análise pelo Blastx mostrou que a sequência traduzida do clone pGPP623 possui identidade com ferredoxinas de cloroplastos de várias plantas da família *Solanaceae*. Dentre elas, uma identidade de 94% com uma ferredoxina I de cloroplasto de *N. tabacum* (acesso AAW64931, 144 aminoácidos, $p=7e-50$). A sequência da presa obtida possui similaridade a partir do 29º ao 144º aminoácido com a porção final da sequência das ferredoxinas analisadas.

Os resultados da análise da sequência de aminoácidos pelo banco de dados PROSITE (<http://au.expasy.org/prosite/>), que consiste em determinar o perfil, o padrão e sítios de significância biológica de proteínas com a finalidade de identificar a família protéica a qual pertence, indicam que a proteína presa contém um domínio e uma assinatura característicos de proteínas 2Fe-2S (ferredoxin-type iron-sulfur binding domain profile). A assinatura de uma proteína 2Fe-2S se caracteriza pela sequência consenso C - {C} - {C} - [GA] - {C} - C - [GAST] - {CPDEKRHFYW} - C, onde os três Cs interagem por pontes dissulfídicas necessárias para o enovelamento da proteína em sua estrutura terciária.

O alinhamento das sequências por meio da utilização do programa Clustal W mostrou que a sequência de aminoácidos obtida pela tradução das sequência do clone pGPP623 alinhou com as sequências da ferredoxina I de cloroplasto de *N. tabacum* (acesso AAS58496, 144 aminoácidos, $p=7e-50$), *L. esculentum* (acesso CAA99756, 144 aminoácidos, $p=4e-46$), *Solanum tuberosum* (acesso CAC38395, 144 aminoácidos, $p=2e-45$), e *Capsicum annuum* (acesso AAD02175, 144 aminoácidos, $p=4e-43$). O alinhamento com ferredoxinas I de cloroplasto já caracterizadas possibilitou a determinação de resíduos de aminoácidos e regiões importantes para a caracterização da proteína codificada pela sequência de cDNA

do clone pGPP623. A presença de parte do peptídeo sinal que carrega a proteína para o citoplasma, sítios de N-meristoilação, domínio 2Fe-2S e cisteínas localizadas em posições similares ao das ferredoxinas já caracterizadas foram observados na seqüência obtida (Figura 10).

```

1  atggagtacccatacgcgtaccagattacgctcatatggccatg
   M E Y P Y D V P D Y A H M A M
46  gaggccagtgaattccaccaagcagtggtatcaacgcagagtgg
   E A S E F H P S S G I N A E W
91  ccattatggcccgggttgggcaagctctctttggtcttaaatct
   P L W P G V G Q A L F G L K S
136 cagaggggtggtaggattacttgcattggccagttacaaagtgaag
   Q R G G R I T C M A S Y K V K
181 cttattacaccagagggagctgttgaatttgattgtccagatgat
   L I T P E G A V E F D C P D D
226 gtttacattcttgatcaagctgaggaaatgggacatgatcttcct
   V Y I L D Q A E E M G H D L P
271 tactcatgcagagctgggtcttgcctcttcttgctggaaaagtt
   Y S C R A G S C S S C A G K V
316 acagctggaaatggtgatcagtcctgatggaaactttcttgatgat
   T A G N V D Q S D G N F L D D
361 gaccaaattggctgatggatttgtgctaacctgtgttgcttaccca
   D Q M A D G F V L T C V A Y P
406 cagtcctgatgttactattgagactcacaaggaggaggagctcact
   Q S D V T I E T H K E E E L T
451 gcctaa 456
   A *

```

Figura 9. Sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos deduzida do clone pGPP623. A sequência de 151 aminoácidos indica uma ORF de 456 nucleotídeos. Azul: códons de iniciação (ATG) e de terminação (TAA). Sublinhado: Metionina referente ao códon de iniciação do vetor. Itálico: sequência de aminoácidos referente ao vetor de expressão pGADT7-Rec. Negrito: sequência de aminoácidos referente ao inserto presente no clone pGPP623

```

pGPP623
N.tabacum_AAS58496
L.esculentum_CAA99756
S.tuberosum_CAC38395
C.annuum_AAD02175
-----VGQALFGLKSQRGGRITCMASY
MASISGTMVSTSFLPRPVVTSLKAIPNVGQALFGLKSERGGRITCMASY
MASISGTMISTSFLPRPVVTSLKAISNVGEALFGLKSGRNGRITCMASY
MASISGTMISTSFLPRPVVTSLKAISNVGEALFGLKSGRNGRITCMASY
MASVSATMISTSFMPRPVVTSLKPIPNVGEALFGLKSANGGKVTICMASY
**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

pGPP623
N.tabacum_AAS58496
L.esculentum_CAA99756
S.tuberosum_CAC38395
C.annuum_AAD02175
KVKLITPEGAVEFDCPDDVYILDQAEEMGHDLPSCRAGSCSSCAGKVTA
KVKLITPEGTFEFDCPDDVYILDQAEEEGHDLPSCRAGSCSSCAGKVTG
KVKLITPEGPIEFECPDDVYILDQAEEEGHDLPSCRAGSCSSCAGKVTA
KVKLITPDGPIEFECPDDVYILDQAEEEGHDLPSCRAGSCSSCAGKVTA
KVKLITPDGPIEFDCPDNVYILDQAEEAGHDLPSCRAGSCSSCAGKTAG
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:.

pGPP623
N.tabacum_AAS58496
L.esculentum_CAA99756
S.tuberosum_CAC38395
C.annuum_AAD02175
GNVDQSDGNFLDDDQMADGFVLTCVAYPQSDVTIETHKEEELTA
GNVDQSDGNFLDDDQMADGFVLTCVAYPQSDVTIETHKEEELTG
GSVDQSDGNFLDEDQEAAGFVLTCVAYPKGDVTIETHKEEELTA
GTVDQSDGKFLDDDQEAAGFVLTCVAYPKCDVTIETHKEEELTA
GAVDQTDGNFLDDDQLEEGWVLTCVAYPQSDVTIETHKEAELVG
*  ***:*:*:*:*:*  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:.

```

Figura 10. Alinhamento pelo programa Clustal W (1.83) da sequência deduzida de aminoácidos do clone pGPP623 quando comparada com as sequências de aminoácidos das ferredoxinas que apresentaram maior similaridade pelo algoritmo Blastx. Negrito: sequência de um peptídeo sinal. Sublinhado: sítio de N-meristoilação. Região sombreada: sítio de fosforilação. Retângulo: Domínio 2Fe-2S. Azul: cisteínas responsáveis pelo enovelamento correto por meio de pontes dissulfídricas entre eles. Verde: resíduo modificado representado por uma fosfotreonina na posição 136.

3.6. Ensaio funcional do cDNA “presa” identificado por meio de VIGS

Um fragmento da porção final do cDNA presa e do gene Sw-5 foram clonados no vetor pTRV e transformados em *A. tumefaciens*. Análise por restrição dos plasmídeos recuperados de *A. tumefaciens* confirmaram a presença dos insertos. Os clones positivos foram crescidos em meio LB contendo canamicina e estreptomicina, armazenados em glicerol 25% e estocados até o uso.

A agroinoculação ocorreu quarenta dias após a montagem da sementeira e consistiu de oito furos em três pecíolos das folhas mais apicais das plantas. Uma semana após a agroinoculação as folhas que tiveram seus pecíolos furados apresentaram características de senescência e caíram. Duas semanas foi o tempo suficiente para que fosse observado o fenótipo de silenciamento nos tratamentos B5-5 PDS e *N. benthamiana* PDS (sintomas de branqueamento das folhas apicais)(Figura 11 A e B). Os demais tratamentos apresentaram sintomas de mosaico nas folhas típicos de infecção pelo TRV (Figura 11 C).



Figura 11. Sintomas visuais do silenciamento do gene PDS nos tratamentos B5-5 PDS e *N.benthamiana* PDS e de infecção viral nos demais tratamentos. A – Tratamento B5-5 PDS; B – Tratamento *N. benthamiana* PDS. Observa-se o branqueamento das folhas mais apicais dos tratamentos devido ao silenciamento do gene PDS. C – Mosaico nas folhas do tratamento B5-5 Ferredoxina pode ser observado duas semanas após a agroinoculação.

A partir do momento da observação dos sintomas descritos, as plantas silenciadas e os controles foram inoculadas com o tospovírus. Os tratamentos em *N. benthamiana* não apresentaram nenhuma alteração quando comparados aos controles. O tospovírus infectou de forma sistêmica as plantas (Figura 12 A - D).

Lesões típicas de HR foram evidenciadas aproximadamente 72 horas após a inoculação com tospovírus (Figura 12 I) nas plantas B5-5 não-agroinoculadas. Não foi observada HR no tratamento B5-5 Sw-5 (Figura 12 F e J), indicando efetivo silenciamento do gene Sw-5. No tratamento B5-5 TRV o sinergismo entre o TRV e o tospovírus acarretou um rápido colapso das plantas (Figura 12 G). Já no tratamento B5-5 Ferredoxina as lesões necróticas típicas de HR foram observadas a partir de aproximadamente 48 horas após a inoculação do vírus diferindo do tratamento controle B5-5 palito (Figura 12 E, H e J).

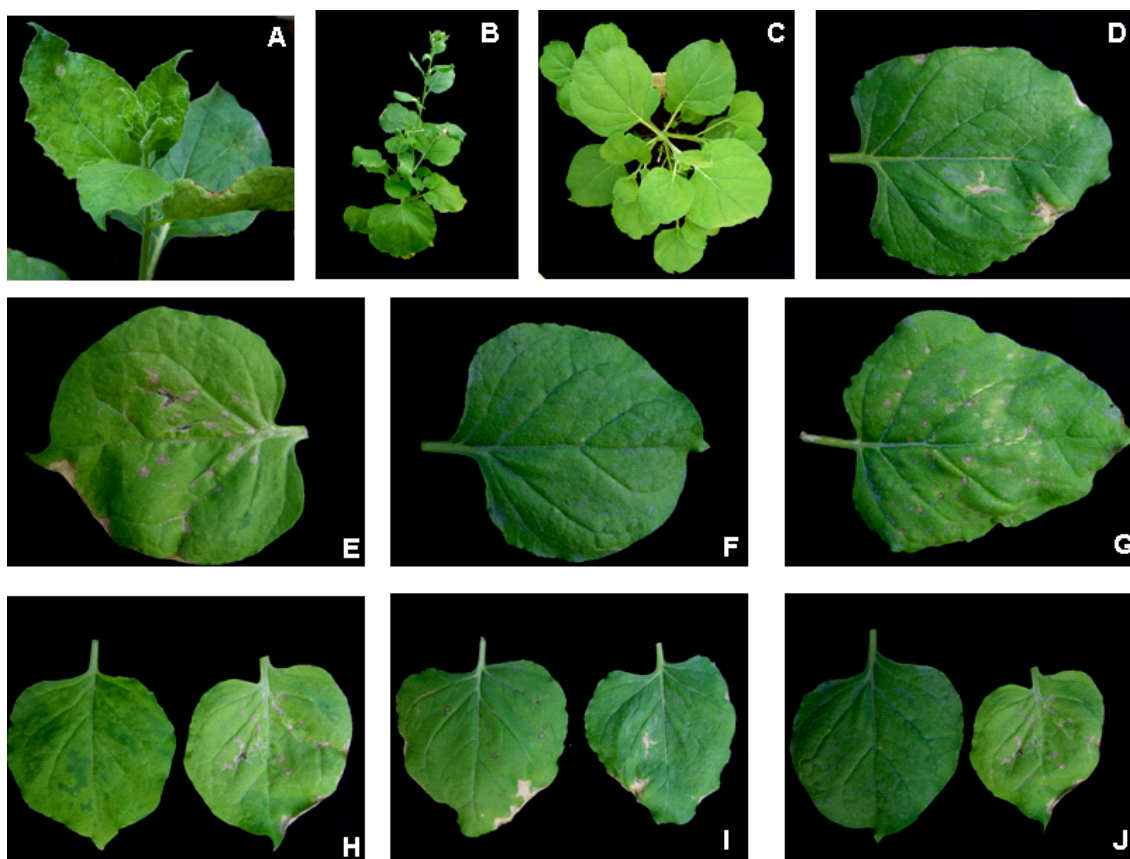


Figura 12. Sintomas visuais do processo de infecção por tospovírus nas plantas silenciadas. A – *N. benthamiana* TRV infectada com tospovírus. Observa-se o encarquilhamento da região apical, sintoma típico da infecção sistêmica. B e C – Vista lateral e apical, respectivamente, de plantas dos tratamentos *N. benthamiana* Palito não inoculadas com tospovírus. D – Folha de uma planta do tratamento *N. benthamiana* palito infectada com tospovírus. E – Folha de uma planta do tratamento B5-5 Ferredoxina infectada com tospovírus. Observam-se lesões locais típicas de HR convergindo para o pecíolo. F - Folha de uma planta do tratamento B5-5 Sw-5 infectada com tospovírus. Não é possível observar lesões locais típicas de HR. G - Folha de uma planta do tratamento B5-5 TRV infectada com tospovírus. O rápido colapso das plantas infectadas com os dois vírus não permitiu avaliações posteriores. H – Comparação dos sintomas em folhas das plantas dos tratamentos *N. benthamiana* Ferredoxina e B5-5 Ferredoxina. I – Comparação das plantas dos tratamentos B5-5 Palito e *N. benthamiana* Palito. J – Comparação das plantas dos tratamentos B5-5 Sw-5 e B5-5 Ferredoxina.

Nos tratamentos B5-5 palito e B5-5 PDS não ocorreu infecção sistêmica, sendo a resposta restrita ao local de infecção. No tratamento B5-5 Sw-5 o tospovírus foi capaz de infectar de forma sistêmica todas as plantas do tratamento. O tratamento B5-5 TRV não foi avaliado quanto a infecção sistêmica do tospovírus

devido ao rápido colapso das plantas do tratamento. Do tratamento B5-5 Ferredoxina, sete das oito plantas inoculadas apresentaram infecção sistêmica pelo tospovírus evidenciado pela presença de lesões necróticas nas folhas mais apicais do sítio de inoculação (Figura 13).

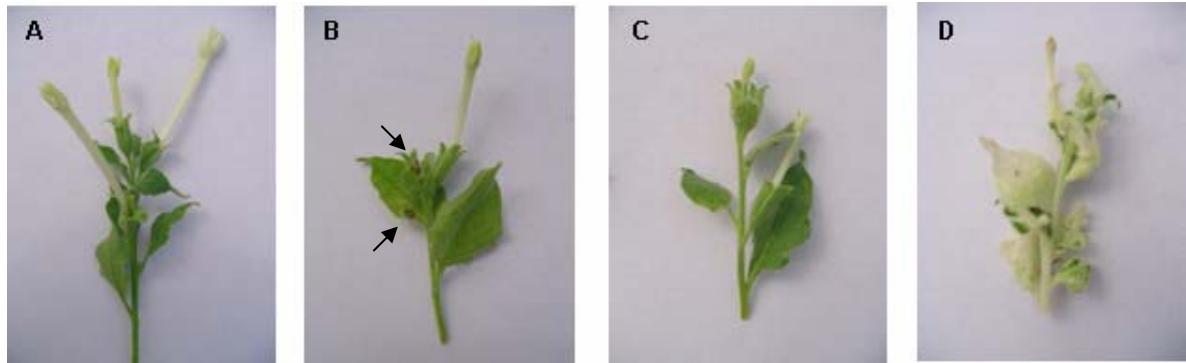


Figura 13. Avaliação de infecção sistêmica por tospovírus. A – Ápice de uma planta do tratamento B5-5 Palito. B - Ápice de uma planta do tratamento B5-5 Ferredoxina. As setas indicam lesões necróticas típicas de HR. C - Ápice de uma planta do tratamento B5-5 Sw-5. Nenhuma lesão típica de HR foi observada nas plantas deste tratamento. D - Ápice de uma planta do tratamento B5-5 PDS.

Com o objetivo de determinar o nível de expressão dos genes silenciados comparando com os tratamentos controles, análises por PCR em tempo real foram feitas. Plantas do tratamento B5-5 Ferredoxina apresentaram uma diminuição de 92% na expressão do gene que codifica para a putativa ferredoxina I de cloroplasto quando comparado ao tratamento B5-5 Palito (calibrador) (Figura 14 A). Uma pequena alteração na expressão de Sw-5 no tratamento B5-5 Sw-5, de aproximadamente 34%, mostrou-se ser menor quando comparada aos demais tratamentos (Figura 14 B).

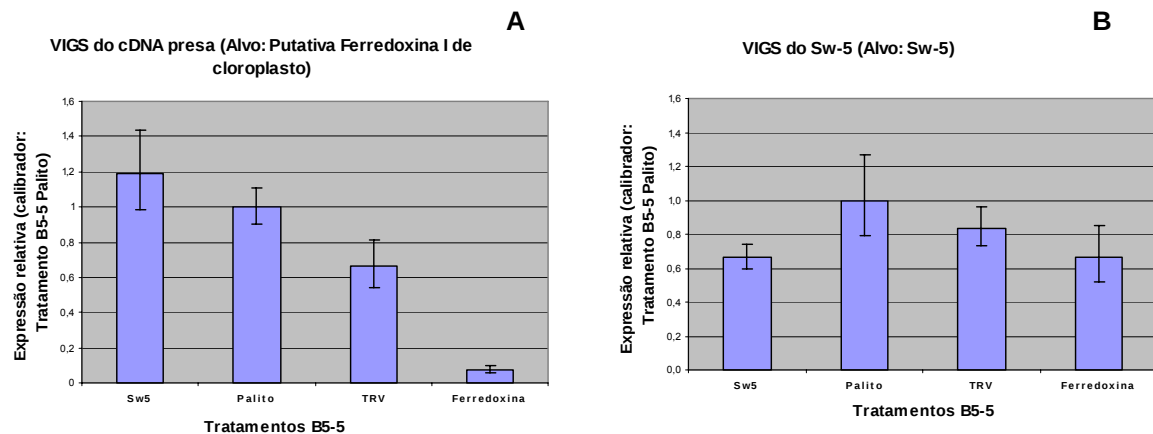


Figura 14. Análise de expressão de genes-alvo nas plantas agroinoculadas por PCR em tempo real. A – Análise da expressão relativa das plantas do tratamento B5-5 Ferredoxina comparado aos demais tratamentos Sw-5 – B5-5 Sw-5, Palito – B5-5 Palito, TRV – B5-5 TRV e Ferredoxina – B5-5 Ferredoxina (calibrador: B5-5 Palito; Alvo: putativa Ferredoxina I de cloroplasto). B - Análise da expressão relativa das plantas do tratamento B5-5 Sw-5 comparado aos demais tratamentos Sw-5 – B5-5 Sw-5, Palito – B5-5 Palito, TRV – B5-5 TRV e Ferredoxina – B5-5 Ferredoxina (calibrador: B5-5 Palito; Alvo: Sw-5). Controle endógeno: actina 2.

4. DISCUSSÃO

Através do presente trabalho foi possível identificar uma putativa ferredoxina I de cloroplasto de *Nicotiana benthamiana* (Nb-Fd1), que interage com a proteína Sw-5 no sistema duplo-híbrido de leveduras. Esta proteína possui um domínio 2Fe-2S característico de ferredoxinas de plantas e algas fotossintetizantes. A ferredoxina I de cloroplasto é específica do fotossistema I presente nos tilacóides. O fotossistema I possui um centro de reação (P700), onde ocorre a transferência de elétrons para uma proteína ferredoxina Fe-S que por sua vez transfere elétrons para NADP⁺ produzindo NADPH. Os centros de reação presentes nos tilacóides são responsáveis pela catálise do movimento eletrônico a partir da água para a síntese de NADPH.

Apesar da especificidade das reações que ocorrem no processo da fotossíntese oxigênica, o centro 2Fe-2S é um local onde ocorrem reações de óxido-redução. Reações de óxido-redução são comuns em eventos de sinalização celular como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Uma proteína de pimentão com as mesmas características da presa obtida, denominada PFLP, que interfere na HR mediada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* também já foi caracterizada.

O presente trabalho vem mostrar que o complexo protéico formado a partir da interação entre a região NBS, a menor porção da proteína R capaz de interagir com a putativa ferredoxina, e uma proteína com centro de reações de óxido-redução pode estar envolvido na sinalização da resposta de resistência disponibilizando elétrons livres para a formação de ROS. A produção de espécies reativas de oxigênio tem implicação em uma ampla gama de estresses bióticos e abióticos. O acúmulo de ROS tem sido relatado como requerimento para a defesa de uma planta contra patógenos (Tenhaken *et al.*, 1995).

Em muitas interações incompatíveis, a produção de ROS é geralmente a primeira resposta a ser detectada, ocorrendo em menos de cinco minutos após a percepção da presença do elicitor do patógeno pela planta. Durante a resposta de defesa, ROS são produzidos pela planta devido ao aumento das atividades enzimáticas de NADPH oxidases ligadas à membrana plasmática, peroxidases ligadas à parede celular, e amina oxidases presentes no apoplasto. Vários são os papéis de ROS na resposta de defesa. H_2O_2 pode ser diretamente tóxico aos patógenos ou pode contribuir para reforçar a parede celular vegetal. A sinalização de ROS envolve a indução da atividade da enzima ácido benzóico 2-hidrolase (BA 2-H), que é requerida para a biossíntese de ácido salicílico pelo H_2O_2 . H_2O_2 também é capaz de induzir a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos de proteção contra estresses oxidativos, como por exemplo a glutathione S-transferase. O balanço redox celular também pode ser substancialmente alterado pela atuação de ROS sobre fatores transcricionais redox regulados (Apel e Hirt, 2004; Laloi *et al.*, 2004).

A disponibilidade de elétrons para a formação de ROS a partir da interação com o domínio protéico NBS de Sw-5 poderia ser o meio pelo qual esta proteína R é capaz de desencadear a resposta de resistência. Apesar da localização celular proteínas Sw-5 e da ferredoxina I serem aparentemente diferentes, ambas são sintetizadas no citoplasma onde poderiam interagir evitando com que o destino final da ferredoxina fosse alcançado. A localização subcelular da proteína recombinante PFLP quando superexpressa em células de tabaco confirmou a presença dessa proteína no cloroplasto e no citoplasma. Como a redução de ferredoxina no cloroplasto é altamente regulada e em tal organela há uma rede constitutiva de reguladores antioxidantes capazes de contornar o estresse oxidativo, Dayakar *et al.* (2003) propõem que a ferredoxina localizada no

cloroplasto não influi no aumento da geração de ROS em plantas de tabaco inoculadas com a proteína elicitora de HR hairpina. Baseado nos resultados com PFLP e com os dados obtidos neste trabalho, é possível que ferredoxinas de cloroplasto quando mantidas no citoplasma não possuam qualquer tipo de controle endógeno acarretando numa alteração do estado redox celular. Esta alteração levaria à geração de ROS e morte celular sob infecção por um patógeno (Figura 15).

Por ocorrer interação específica entre a proteína presa obtida e a região NBS da proteína de resistência, algumas considerações a respeito do processo de desencadeamento da resistência podem ser feitas. O domínio NBS de proteínas da classe NBS-LRR é altamente conservado e mutações neste domínio inativam invariavelmente a sinalização mediada por essas proteínas (Tao *et al.*, 2000; Tornero *et al.*, 2000). Contudo pouco se sabe sobre o processo de desencadeamento da sinalização. Genes requeridos para atuar em uma resposta mediada por um gene de resistência específico, podem codificar proteínas que atuam em eventos iniciais do reconhecimento, ou na transdução de sinais *upstream* ou imediatamente *downstream* do reconhecimento da presença do patógeno. Como a biblioteca analisada foi constituída de uma mistura de transcritos de vários tempos após o processo de inoculação, possivelmente a proteína presa é um constituinte que atua imediatamente *downstream* do reconhecimento do patógeno pela planta amplificando a sinalização desencadeada pela proteína R.

Alterações na expressão do gene que codifica para a putativa ferredoxina I de cloroplasto determinados pelo PCR em tempo real mostra a eficiência da técnica de VIGS em *N. benthamiana*. A redução de 92% no nível de transcrito resultou na alteração do fenótipo de resistência. A infecção sistêmica nas plantas silenciadas, evidenciado pela convergência das lesões para as regiões dos pecíolos das plantas seguida da presença de lesões típicas da resposta de hipersensibilidade nos ápices, demonstra a incapacidade dessas conterem o vírus no sítio de infecção revelando um papel importante da putativa ferredoxina I de cloroplasto no desencadeamento da resposta de resistência. De acordo com trabalhos publicados recentemente, a superexpressão de genes que codificam para ferredoxinas de *Capsicum annuum* L. em plantas transgênicas de tabaco induziram uma rápida resposta de resistência quando desafiadas com proteínas

harpinas de bactérias virulentas (Dayakar *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004). Os resultados dos trabalhos indicam que esta resistência foi caracterizada pela rápida indução de HR localizada. Trabalhos anteriores da mesma equipe reportaram que plantas de arroz e orquídeas *Oncidium* superexpressando uma proteína ferredoxina-like de pimentão apresentaram aumento na resistência a doenças mesmo na presença de baixas concentrações de harpinas. É interessante notar que VIGS de CITRX, uma tiorredoxina que está envolvida em vários eventos celulares incluindo a expressão de genes, transdução de sinais, proliferação e apoptose, resultou em alteração na resposta de defesa Cf-9 dependente tanto em tomateiro quanto em tabaco. Baseado nos resultados obtidos no ensaio de silenciamento da putativa ferredoxina I de cloroplasto é possível sugerir que o atraso na resposta de resistência pelas plantas é resultado da diminuição relativa de ferredoxinas que ficariam disponibilizadas no citoplasma, alterando o estado redox celular e retardando as respostas de defesa. Este retardamento permitiria a infecção de um maior número de células do hospedeiro o que, nas plantas resistentes foi evidenciado pela maior quantidade de HRs locais e a presença de lesões apicais quando comparados às plantas que não tiveram o gene silenciado. Os trabalhos que envolveram a superexpressão de proteínas com seqüências homólogas à presa obtida mostraram uma resposta de resistência mais rápida pela presença de poucas lesões locais e de HRs microscópicas. Sendo assim, o presente trabalho vem corroborar a idéia de que ferredoxinas de cloroplastos estão envolvidas no desencadeamento do processo de resposta de resistência, onde a diminuição da sua expressão acarretaria na uma menor disponibilização de elétrons para que ROS sejam formadas e culminando em um maior número de células infectadas e maior número de sítios de infecção mostrando HR. Estudos adicionais, envolvendo imunoprecipitação, são necessários para demonstrar de fato, a interação da proteína Sw-5 interage com Nb-Fd1 *in vivo*

5. CONCLUSÕES

A proteína de resistência Sw-5 interage com uma ferredoxina I de cloroplasto (Nb-Fd1) no sistema duplo híbrdo em leveduras.

O silenciamento do gene *Nb-Fd1* resultou em alterações da resposta de defesa de *N. benthamiana* transformada com o gene *Sw-5*, evidenciada pela não contenção do vírus no sítio de infecção, demonstrando a importância desse gene nas respostas de resistência mediadas por *Sw-5*.

Considerando que ferredoxinas de cloroplasto estão relacionadas ao processo de alteração do estado redox celular, é possível que a interação da proteína Sw-5 com Nb-Fd1 resulte em alteração do estado redox envolvido no desencadeamento da resposta de hipersensibilidade.

Estudos adicionais são necessários para demonstrar que a interação detectada no sistema duplo híbrido também acontece ocorre na célula vegetal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apel, K.; Hirt, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.** 55:373-399, 2004.
- Baulcombe, D. C. Gene silencing: RNA makes RNA makes no protein. **Curr Biol.** 9(16): 599-601, 1999.
- Belkhadir, Y.; Subramaniam, R.; Dangl, J. L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Curr. Opin. Plant Biol.** 7:391-399, 2004.
- Bethke, P. C.; Jones, R. L. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. **Plant J.** 25(1):19-29, 2001.
- Boiteux, L. S.; Giordano, L.B. Genetic basis of resistance against two tospovirus species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica** 71:151-154, 1993.

- Brent, R., Finley Jr. R.L. Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. **Annu. Rev. Genet.** 31:663-704, 1997.
- Brommonschenkel, S.H.; Frary, A.; Tanksley, S. D. The Broad – spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. **Mol. Plant Microbe Interact.** 13: 1130-1138, 2000.
- Brommonschenkel, S.H.; Tanksley, S. D. Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. **Mol. Gen. Genet.** 256:121-126, 1997.
- Bucher E, Sijen T, De Haan P, Goldbach R, Prins M. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. **J. Virol.** 2:1329-36, 2003.
- Buell, C. R.; Joardar, V.; Lindeberg, M.; Selengut, J.; Paulsen, I. T.; Gwinn, M. L.; Dodson, R. J.; Deboy, R. T.; Durkin, A. S.; Kolonay, J. F.; et al. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 100:10181–10186, 2003.
- Burnette, W. N. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.** 112:195-203. 1981.
- Dai, S.; Schwendtmayer, C.; Schürmann, P.; Ramaswamy, S.; Eklund, H. Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. **Science** 287: 655-658, 2000.
- Dangl, J. L., Jones, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature** 411:826-833, 2001.

- Dayakar, B. V.; Lin, H. J.; Chen, C. H.; Ger, M. J.; Lee, B. H.; Pai, C. H.; Chow, D.; Huang, H. E.; Hwang, S. Y.; Chung, M. C.; Feng, T. Y. Ferredoxin from sweet pepper (*Capsicum annum* L.) intensifying harpin_{PSS}-mediated hypersensitive response shows an enhanced production of active oxygen species (AOS). **Plant Mol. Biol.** 51:913-924, 2003.
- De Haan, P.; Komerlink, R.; Resende, R.O.; Van Poelwijk, F.; Peters, D.; Golbach, R. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. **J. Gen. Virol.** 71:2207–2216, 1991.
- Desikan, R.; Reynolds, A.; Hancock, J. T.; Neill, S. J. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. **Biochem J.** 330:115-120, 1998.
- Durrant, W. E.; Dong, X. Systemic Acquired Resistance. **Ann. Rev. Phytopathol.** 42: 185-209, 2004.
- Ellis, J.; Dodds, P.; Pryor, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Curr. Opin. Plant Biol.** 3:278–284, 2000.
- Feys, B. J.; Parker, J. E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends Genet.** 16(10): 449-455, 2000.
- Fields, S.; Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interaction. **Nature** 340:245-246, 1989.
- Flor, H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annu. Rev. Phytopathol.** 9:275-296, 1971.
- Freialdenhoven, A.; Scherag, B.; Hollricher, K.; Collinge, D. B.; Thordal-Christensen, H.; Schulze-Lefert, P. *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla*₁₂-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. **Plant Cell** 6: 983-994, 1994.

- German, T.L.; Ullman, D.E.; Moyer, J.W. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. **Ann. Rev. Phytopathol.** 30: 315-348, 1992.
- Greenberg, J. T. Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interaction. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48: 525-545, 1997.
- Greenberg, J. T.; Yao, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cell Microbiol.** 6(3):201-211, 2004.
- Gurr, S. J.; Rushton, P. J. Engineering plants with increased disease resistance: What are we going to express? **Trends Biotechnol.** 23:275-282, 2005.
- Hammond-Kosack, K.; Jones, J. D. G. Response to plant pathogens. **In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, ed. B. Buchanan, D. Gruissem, R. Jones, Rockville, MD: Am. Soc. Plant Physiol. pp.1102-56, 2000.
- Heath, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Curr. Opin. Plant Biol.** 3:315-319, 2000.
- Huang, C. F.; Williamson, V. M. Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi. **Plant J.** 34:585-593, 2003.
- Huang, H. E.; Ger, M. J.; Yip, M. K.; Chen, C. Y.; Pandey, A. K.; Feng, T. Y. A hypersensitive response was induced by virulent bacteria in transgenic tobacco plants overexpressing a plant ferredoxin-like protein (PFLP). **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 64:103-110, 2004.
- Hwang, C. F.; Bhakta, A. V.; Truesdell, G. M.; Pudlo, W. M.; Williamson, V. M. Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the *Mi* gene product in regulation of localized cell death. **Plant Cell** 12:1319-1329, 2000.
- Innes, R. W. New effects of type III effectors. **Mol. Microbiol.** 50: 363–365, 2003.

- Keen, N.T. The molecular biology of disease resistance. **Plant Mol. Biol.** 19: 109–122, 1992.
- Komerlink, R.; De Haans, P.; Meurs, C.; Peters, D.; Golbach, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **J. Gen. Virol.** 73:2795-2804, 1992.
- Laloi, C.; Apel, K.; Danon, A. Reactive oxygen signalling: the latest news. **Curr. Opin. Plant Biol.** 7:323-328, 2004.
- Lamb, C.; Dixon, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48: 251-275, 1997
- Liu, Y.; Schiff, M.; Marathe, R.; Dinesh-Kumar, S.P. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **Plant J.** 30:415-429, 2002.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., Sessa, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annu. Rev. Plant Biol.** 54:23-61, 2003.
- Rivas, S.; Rougon-Cardoso, A.; Smoker, M.; Schauser, L.; Yoshioka, H.; Jones, J. D. G. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein negatively regulates defence. **EMBO J.** 23: 2156-2165, 2004.
- Samuilov, V. D.; Lagunova, E. M.; Kiselevsky, D. B. Dzyubinskaya, E. V.; Makarova, Y. V.; Gusev, M. V. Participation of chloroplasts in plant apoptosis. **Biosci. Rep.** 23 (2-3):103-117, 2003.
- Seo, F.; Okamoto, M.; Iwai, T.; Iwano, M; Fukui, K.; Isogai, A.; et al. Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction. **Plant Cell** 12: 917-932, 2000.
- Shirasu, K.; Schulze-Lefert, P. Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. **Trends Plant Sci.** 8(6):252-258, 2003.

- Smith, N. A.; Singh, S. P.; Wang, M. B.; Stoutjesdijk, P. A. Green, A. G.; Waterhouse, P. M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature** 407:319-320, 2000.
- Soellick T, Uhrig JF, Bucher GL, Kellmann JW, Schreier PH. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 5:2373-8, 2000.
- Stevens, M. R.; Scott, S. J.; Gergerich, R. C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica** 59:9:17, 1992.
- Takeda, A.; Sugiyama, K.; Negano, H.; Mori, M.; Kaido, M.; Mise, K.; Tsuda, S.; Okuno, T. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. **FEBS Lett.** 532:75-79, 2002.
- Tang, X.; Frederick, R. D.; Zhou, J.; Halterman, D. A; Jia, Y.; Martin, G. B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. **Science** 274:2060-2063, 1996.
- Tao, Y.; Yuan, F.; Leister, R. T.; Ausubel, F. M.; Katagiri, F. Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene *RPS2*. **Plant Cell** 12:2541-2554, 2000.
- Tenhaken, R.; Levine, A.; Brisson, L. F.; Dixon, R. A.; Lamb, C. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 92:4158-4163, 1995.
- Tornero, P.; Merritt, P.; Sadanandom, A.; Shirasu, K.; Innes, R. W.; Dangl J. L. RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in Arabidopsis, and their relative contributions are dependent on the *R* gene assayed. **Plant Cell** 14: 1005-1015, 2000.

- Vailleau, F.; Daniel, X.; Tronchet, M.; Montillet, J. L.; Triantaphylides, C.; Roby, D. A *R2R3-MYB* gene, *AtMYB30*, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 99:10179-10184, 2002.
- Van Bentem, S. F.; Vossen, J. H.; de Vries, K. J.; van Wees, S.; Tameling, W. I. L.; Dekker, H. L.; de Koster, C. G.; Harina, M. A.; Takken, F. L. W.; Cornelissen, B. J. C. Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. **Plant Journal** 43(2):284-298, 2005.
- Van der Biezen, E. A.; Jones, J. D. G. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Curr. Biol.** 8 (7): R226-227, 1998.
- Van der Hoorn, R.A.L., De Wit, P.J.G.M., Joosten, M.H.A.J. Balancing selection favors guarding resistance proteins. **Trends Plant Sci.** 7:67-71, 2002.
- Whitfield, A. E.; Ullman, D. E.; German, T. L. Tospovirus-Thrips interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.** 43:459-489, 2005.
- Yoshioka, H.; Numata, N.; Nakajima, K.; Katou, S.; Kawakita, K.; Rowland, O.; et al. *Nicotiana benthamiana* *gp91^{phox}* homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. **Plant Cell** 15: 706-718, 2003.
- Xia, Y. Proteases in pathogenesis and plant defense. **Cell. Microbiol.** 6: 905, 2004.
- Xie, Z; Chen, Z. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. **Mol Plant Microbe Interact.** 13(2):183-190, 2000.
- Zervos, A.S.; Gyuris J.; Brent, R. Mxil, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. **Cell** 72:223 – 232, 1993.

- Zhou, J.; Loh, Y. T.; Bressan, R. A.; Martin, G. B. The tomato gene *Pti* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. **Cell** 83: 925-935, 1995.
- Zhou, J.; Tang, X.; Frederick, R.; Martin, G. Pathogen recognition and signal transduction by the Pto kinase. **J. Plant Res.** 111:353-356, 1998.
- Zhu, M.; Shao, F.; Innes, R. W.; Dixon, J. E.; Xu, Z. The crystal structure of *Pseudomonas* avirulence protein AvrPphB: a papain-like fold with a distinct substrate-binding site. **Proc. N Sci. U.S.A.** 101: 302–307, 2004.