

NÍVEA COSTA EUCLYDES

**ENSAIOS DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA REVELAM FUNÇÃO
SIMILAR DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS E
PATÓGENOS**

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

Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Coorientadores: Christiane Eliza Mota Duarte
Pedro Augusto Braga Reis

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2023

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

T

E86e
2023

Euclides, Nívea Costa, 1986-

Ensaio de interação proteína-proteína revelam funções similares de proteínas em diferentes espécies de plantas e patógenos / Nívea Costa Euclides. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (58 f.): il.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Referências bibliográficas: f. 51-58.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.756>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Marcadores genéticos. 2. Morte celular. 3. Proteínas. 4. Ligações químicas. I. Fontes, Elizabeth Pacheco Batista, 1957-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 576.53


NÍVEA COSTA EUCLYDES

**ENSAIOS DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA REVELAM FUNÇÃO
SIMILAR DE PRÓTEÍNAS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS E
PATÓGENOS**


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: 20 de junho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **NÍVEA COSTA EUCLYDES**
Data: 08/01/2024 15:54:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Nívea Costa Euclýdes
Autora

Documento assinado digitalmente
 **ELIZABETH PACHECO BATISTA FONTES**
Data: 08/01/2024 12:18:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
Orientadora

Aos meus pais: Marco Antônio e Ivone;
E minhas avós: Dadá e Verônica

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de evolução espiritual.

Ofereço a minha dissertação de mestrado aos meus pais: Marco Antônio e Ivone e às minhas avós in memoriam: Dadá e Verônica.

Agradeço à professora Doutora Elizabeth Pacheco Batista Fontes por todo incentivo e a Doutora Valéria Pacheco Batista Euclides pela confiança.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) em especial a Sam e a Chris pela paciência.

Agradeço a minha irmã, Aline pelo apoio nos momentos difíceis.

À Ciça agradeço a amizade e lealdade.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus também os momentos difíceis pois se não fossem eles eu não sairia do lugar.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e FAZER UM NOVO FIM”. Chico Xavier

RESUMO

EUCLYDES, Nívea Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2023. **Ensaio de interação proteína-proteína revelam função similar de proteínas em diferentes espécies de plantas e patógenos.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Christiane Eliza Mota Duarte e Pedro Augusto Braga dos Reis.

Raramente, as proteínas funcionam como formas monoméricas e, frequentemente, exercem suas funções como dímeros ou por meio de interações com outras proteínas (heterodímeros ou oligômeros). Estas interações proteína-proteína são particularmente relevantes em vias de sinalização celulares em que os sinais percebidos por receptores são propagados intracelularmente por meio de interações proteína-proteína. A via de sinalização de morte celular mediada por proteínas DCD/NRPs (“Development and Cell Death Domain-containing N-Rich Proteins”) tem sido caracterizada em soja e representa um importante circuito de sinalização que liga senescência foliar natural com aquela induzida por estresses e pode conferir às plantas tolerância à seca. Exceto por GmNAC30 cujo ortólogo de *Arabidopsis* ainda não foi identificado, os demais componentes da via em soja, NRP-A, NRP-B, GmNAC81, VPE possuem ortólogo caracterizados em *Arabidopsis*, AtNRP1, AtNRP2, ANAC36 e gamaVPE, respectivamente. GmNAC30 pertence à família SNACA, compartilhando maior grau de conservação de sequência com ATAF2 de *Arabidopsis*. Sendo assim, o presente estudo propôs investigar, como primeiro objetivo, a possível participação de AtATAF2 na via de morte celular programada mediada por NRPs, como o ortólogo de GmNAC30. Por meio de ensaios de duplo híbrido em leveduras e BiFC em folhas de *Nicotiana benthamiana*, foi demonstrado que ATAF2 interage com ANAC36 de uma forma específica e, como GmNAC30, também interage com GmNAC81. Estes resultados sugerem que ATAF2 é provavelmente o parceiro natural de ANAC36 na indução da expressão de VPE. Além disso, ATAF2 é localizado no núcleo e exibe atividade transcricional em leveduras, propriedades bioquímicas próprias de GmNAC30. Dentre os patógenos de plantas economicamente importantes, os geminivírus destacam-se por sua ampla ocorrência no mundo e pela variedade de hospedeiros. *Begomovirus* constitui o maior gênero da família *Geminiviridae*, cujas espécies são transmitidas pela mosca branca e representam uma restrição severa à agricultura globalmente. Similarmente a outros vírus, os begomovírus formam rede de interações proteína-proteína entre proteínas virais e do hospedeiro. Recentemente, foi identificado o interactoma entre proteínas virais e do hospedeiro, o qual revelou um “hub” de interação proteína-proteína enriquecidos por proteínas que respondem à auxina. Embora estes resultados sugiram que a sinalização por auxina possa ser funcionalmente relevante durante a infecção por begomovírus, é necessário que estas interações

sejam comprovadas por métodos alternativos de interação proteína-proteína. Sendo assim foi selecionado um representante do hub AT4G14560 que interage com ambas as proteínas virais NSP e MP a fim de se confirmar estas interações por ensaio de duplo-híbrido em leveduras. Foi demonstrado que AT4G14560 fusionada ao domínio de ativação (AD) de GAL-4 interage com NSP fusionada ao domínio de ligação (BD) de GAL-4, promovendo autotrofia a His quando coexpressas em leveduras. Assim também BD-AT4G14560 interage com AD-MP em leveduras. As interações foram específicas já que as combinações das proteínas fusionadas com vetores vazios não promoveram autotrofia à histidina em leveduras cotransformadas. Estes resultados validam os resultados de arranjo de proteínas e confirmam o possível envolvimento de auxina na infecção viral, o que deverá ser investigado posteriormente. Um *hub* funcional bem definido do sistema imune de plantas corresponde a interconexões convergentes para a proteína CSN5A, para a qual convergem proteínas de patógenos divergentes, como C2 de geminivírus. Este hub também é enriquecido de proteínas de defesa de plantas. Considerando que a proteína AtWWP1 possui atividade antiviral contra geminivírus, foi de interesse verificar a proteína AtWWP1 também faz parte do hub imune derivado de CSN5A. Inicialmente, por meio do sistema duplo-híbrido de leveduras, foi examinada a possível interação das proteínas CSN5A e AtWWP1. A interação entre as respectivas proteínas em leveduras foi confirmada pela ativação do gene repórter *LacZ*, quantificado pela atividade da enzima β -galactosidase, e autotrofia à histidina em leveduras transformadas com as combinações CSN5A-BD e AtWWP1-AD, mas não em leveduras transformadas pelas combinações com vetores vazios. Além disso, a interação entre as proteínas CSN5A e AtWWP1 foi monitorada *in vivo* por meio dos ensaios de co-precipitação e BiFC. Nos experimentos de Co-IP, o anticorpo anti-GFP imunoprecipitou separadamente a proteína CSN5A-GFP e GFP, sendo que a proteína AtWWP1-HA foi detectada somente no imunocomplexo de CSN5A-GFP, confirmando associação estável e específica entre as proteínas AtWWP1 e CSN5A nos extratos protéicos de folhas de *N. benthamiana* transformadas com as respectivas construções. Nos ensaios de BiFC, coexpressão de AtWWP1 fusionada ao C-terminal de YFP e CSN5A fusionada ao N-terminal de YFP e vice-versa, promoveu a reconstituição de fluorescência no núcleo de células de folhas de *N. benthamiana*, mas não os controles negativos. Coletivamente, esses resultados demonstram que CSN5A e AtWWP1 interagem *in vivo* no núcleo de células vegetais. Estes resultados também reforçam o argumento de que o hub imune CSN5A é funcional durante a infecção por geminivírus.

Palavras-chave: interação proteína proteína; patógenos de plantas; hub imune CSN5A.

ABSTRACT

EUCLYDES, Nívea Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2023. **Protein-protein interaction assays reveal similar function among proteins of different plant species and pathogens** Advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisors: Christiane Eliza Mota Duarte and Pedro Augusto Braga dos Reis.

Proteins often function as dimers or interact with other proteins (heterodimers or oligomers) rather than existing as monomers. These protein-protein interactions are crucial in cellular signaling pathways, especially in propagating signals sensed by receptors within cells. One such signaling pathway, mediated by DCD/NRPs proteins, has been studied in soybean. It is an essential circuit connecting natural leaf senescence with stress-induced senescence, potentially contributing to plant drought tolerance. While the Arabidopsis ortholog of GmNAC30 remains unidentified, other components of the soybean pathway (NRP-A, NRP-B, GmNAC81, and VPE) have characterized counterparts in Arabidopsis (AtNRP1, AtNRP2, ANAC36, and gammaVPE, respectively). GmNAC30 belongs to the SNACA family and shares a significant sequence conservation with ATAF2 from Arabidopsis. Therefore, this study aimed to investigate the potential involvement of AtATAF2, as the Arabidopsis counterpart of GmNAC30, in the programmed cell death pathway mediated by NRPs. Through yeast two-hybrid assays and BiFC in *Nicotiana benthamiana* leaves it was demonstrated that ATAF2 specifically interacts with ANAC36 and also interacts with GmNAC81, similar to GmNAC30. These results suggest that ATAF2 is likely the natural partner of ANAC36 in inducing VPE expression. Furthermore, ATAF2 is located in the nucleus and exhibits unique transcriptional activity in yeast, a distinct biochemical property shared with GmNAC30. Geminiviruses, among economically important plant pathogens, are widespread and infect many hosts. *Begomovirus*, the largest genus within the *Geminiviridae* family, is transmitted by whiteflies and poses a significant agricultural constraint globally. Like other viruses, begomoviruses engage in protein-protein interactions with host proteins. Recently, the interactome between viral and host proteins has been identified, revealing a hub of protein-protein interactions enriched with auxin-responsive proteins. Although these findings suggest the functional relevance of auxin signaling during begomovirus infection, alternative protein-protein interaction methods need to be employed for confirmation. Therefore, a representative of the AT4G14560 hub, which interacts with both NSP and MP viral proteins, was selected to validate these interactions using a yeast two-hybrid assay. AT4G14560 fused to the activation domain (AD) of GAL-4 specifically interacted with NSP fused to the binding domain (BD) of GAL-4, leading to histidine autotrophy in co-expressed yeast. Similarly, BD-AT4G14560 interacted

with AD-MP in yeast. These interactions were specific as combinations of proteins fused with empty vectors did not promote histidine autotrophy in co-transformed yeasts. These results validate the findings from the protein array and confirm the potential involvement of auxin in viral infection, warranting further investigation. A well-defined functional hub within the plant immune system consists of convergent interconnections involving the CSN5A protein, to which proteins from diverse pathogens such as geminivirus C2 converge. This hub is also enriched with plant defense proteins. Given that the AtWWP1 protein exhibits antiviral activity against geminiviruses, it was of interest to determine if AtWWP1 is part of the CSN5A-derived immune hub. Initially, the yeast two-hybrid system was used to examine the possible interaction between CSN5A and AtWWP1 proteins. The interaction was confirmed by the activation of the LacZ reporter gene, quantified through the activity of the β -galactosidase enzyme, and histidine autotrophy in yeast transformed with the combinations CSN5A-BD and AtWWP1-AD, but not in yeast transformed with combinations involving empty vectors. Furthermore, the interaction between CSN5A and AtWWP1 proteins was validated in vivo using co-immunoprecipitation and BiFC assays. In the co-immunoprecipitation experiments, the anti-GFP antibody successfully immunoprecipitated CSN5A-GFP and GFP proteins separately, and the presence of AtWWP1-HA protein was detected only in the CSN5A-GFP immune complex, confirming a stable and specific association between AtWWP1 and CSN5A in leaf protein extracts of *N. benthamiana* transformed with the respective constructs. In BiFC assays, co-expression of AtWWP1 fused to the C-terminus of YFP and CSN5A fused to the N-terminus of YFP resulted in fluorescence reconstitution within the nucleus of *N. benthamiana* leaf cells, whereas negative controls did not produce such fluorescence.

Keywords: protein protein interaction; plant pathogens; CSN5A immune hub.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Ensaios de detecção interações proteína-proteína	15
2.1.2. Ensaios de coimunoprecipitação de proteínas.....	17
2.1.3 Ensaios de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC)	18
2.2 Vias de sinalização celular e interactomas de interesse	19
2.2.1 Vias de sinalização de morte celular mediada pelo módulo de sinalização DCD-NRPs/GmNAC30-GmNAC81/VPE.....	19
2.2.2. Interactoma NSP-MP-proteínas do hospedeiro detectado por microarranjo de proteínas ..	22
2.2.3- Hub imune CSN5A	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Plasmídeos recombinantes	30
3.1.1. Clonagem de At4g14560 em vetores de expressão em levedura.	31
3.2 Ensaio de duplo híbrido.....	33
3.3 Expressão transiente em folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> por agroinfiltração.....	34
3.4 Ensaio de complementação de fluorescência bimolecular BiFC.....	35
3.5 Ensaio de Co-imunoprecipitação	35
3.6 Localização subcelular de proteínas.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 ATAF2 de <i>Arabidopsis</i> é provavelmente ortólogo de GmNAC30 na via de sinalização de morte celular mediada por NRPs	36
4.1.1 ATAF2 é uma proteína nuclear	37
4.1.2 ATAF2 exibe atividade transcricional similar a GmNAC30	37
4.1.3 ATAF2 interage com ANAC36 e GmNAC81 em leveduras e <i>in vivo</i>	38
4.2 Ensaios de duplo híbrido confirmam interação de NSP e MP com AT4G14560.1 (IAA1), mas não confirmam a interação AC2 com NRP1	41
4.3 O Hub imune CSN5A interage com proteínas de defesa contra geminivírus	46
4.3.1 At WWP1 liga ao hub imune CSN5A por duplo híbrido	46
4.3.2 AtWWP1 liga a CSN5A <i>in vivo</i>	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

Muitos processos bioquímicos são mediados por meio de interações específicas entre proteínas. Desta forma, a exploração de redes de interações proteína-proteína é crucial para o entendimento de vários processos relacionados à biologia dos organismos como crescimento, diferenciação celular, respostas a estresse abióticos e na defesa contra-ataques de patógenos. No caso específico da resposta imune de plantas, complexas redes de interações entre proteínas estão envolvidas, que incluem receptores de membrana, proteínas transdutoras de sinal e fatores de transcrição. Similar configurações de interações proteína-proteína também são observadas em plantas nos mecanismos de sinalização celular em respostas a diversos estresses abióticos, como seca, temperatura, salinidade etc.

O Brasil se destaca como um país que tem a economia pautada predominantemente no agronegócio. Deste modo, o estudo da fisiologia dos vegetais frente às condições de cultivo e estresses ambientais tem se destacado consideravelmente, devido a sua importância para a melhoria da produtividade e manejo de culturas. A via de sinalização de morte celular mediada por proteínas DCD/NRPs (“Development and cell death domain-containing asparagine rich proteins”), por operar através de mecanismos regulatórios conservados entre diferentes espécies de planta, e dado o seu papel integrativo a múltiplos estresses, se apresenta como um potencial alvo de estudos para o desenvolvimento de culturas agrônômicas tolerantes a estresses. De acordo com o modelo mecanístico dessa via de sinalização celular, inicialmente descrita em soja, a expressão dos genes DCD/NRPs é induzida por múltiplos estresses o que resulta na indução dos genes GmNAC81 e GmNAC30. Os fatores de ativação de transcrição GmNAC81 e GmNAC30 formam então um complexo heterodimérico que liga ao promotor e induz a expressão do gene VPE (“Vacuolar Processing Enzyme”), o executor de um programa de morte celular mediado pelo colapso do vacúolo (Mendes et al., 2013). Sinais de desenvolvimento também ativam o módulo de sinalização NRPs-GmNAC81/GmNAC30-VPE promovendo senescência foliar natural (Pimenta et al., 2016). Tem sido demonstrado que o chaperone molecular BiP (“Binding Protein”) modula a expressão dos componentes da via de sinalização de morte celular por NRPs e confere tolerância à seca (Valente et al., 2009; Reis et al., 2011). Entretanto, os efeitos pleiotrópicos da superexpressão de BiP, comprometendo a imunidade antifúngica em soja, têm limitado a aplicação direta dessa estratégia de tolerância à seca e

impulsionado estudos para elucidação dos mecanismos regulatórios do módulo de sinalização NRPs-GmNACs-VPE (Quadros, 2020).

A dificuldade de se encontrarem ferramentas moleculares eficazes em soja tem comprometido o avanço na caracterização da via nesta espécie, levantando a necessidade de se trabalhar com organismos modelos. Foi demonstrado que o módulo de sinalização NRPs-GmNACs-VPE opera em *Arabidopsis* com mecanismos regulatórios similares (Reis et al., 2016). Exceto por GmNAC30, cujo ortólogo em *Arabidopsis* ainda não foi identificado, os ortólogos das proteínas NRPs foram caracterizados como sendo AtNRP1 e AtNRP2, sendo o ortólogo de GmNAC81, ANAC36 e de VPE, gamaVPE. GmNAC30 pertence à família SNACA, compartilhando maior grau de conservação de sequência com ATAF2 de *Arabidopsis*. Sendo assim, o presente estudo propôs investigar, como primeiro objetivo, a possível participação de ATAF2 na via de morte celular programada mediada por NRPs, como o ortólogo de GmNAC30.

Dentre os patógenos de plantas economicamente importantes, os geminivírus destacam-se por sua ampla ocorrência no mundo e pela variedade de hospedeiros (Rojas et al., 2018). *Begomovirus* constitui o maior gênero da família *Geminiviridae*, cujas espécies são transmitidas pela mosca branca e representam uma restrição severa à agricultura globalmente (Navas – Castillo et al., 2011). Sendo vírus de DNA fita simples (ssDNA) circular que se replica nos núcleos das células infectadas, o DNA viral precisa se mover para o citoplasma e, em seguida, para a célula adjacente para causar a doença (Hanley-Bowdoin et al., 2013). A proteína de transporte nuclear de begomovírus NSP (“Nuclear Shuttle Protein”) auxilia o transporte intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma e coopera com a proteína de movimento (MP) para a translocação do DNA viral para células adjacentes não infectadas via plasmodesmas (Lazarowitz & Beachy, 1999; Gafni & Epel, 2002; Sanderfoot et al., 1996). Além disso, NSP está envolvida em interações pró e antivirais, que determinam a suscetibilidade do hospedeiro a begomovírus. Várias proteínas codificadas por begomovírus interagem com várias proteínas derivadas do hospedeiro para assessorar a replicação do vírus, movimento celular e transmissão do inseto vetor (Mauck *et al.*, 2018; Mauck *et al.*, 2014).

A fim de se identificar a rede de interações proteína-proteína entre proteínas NSP e MP de begomovírus e do hospedeiro, o nosso grupo de pesquisadores utilizou uma abordagem de amplitude genômica, por meio de micro arranjos de proteínas. Os resultados desses ensaios revelaram um “hub” de interação proteína-proteína enriquecidos por proteínas que respondem à auxina, sendo um representado pela proteína de *Arabidopsis* AT4G14560 que interage com

ambas as proteínas virais NSP e MP. Interessantemente, este “hub” é interconectado por proteínas envolvidas na resposta à auxina, formando um “hub” convergente com alto grau de centralidade e provavelmente afetado por auxina. Uma vez que não tem sido documentado que a infecção por begomovírus afete a via de sinalização de auxina, o segundo objetivo desse trabalho consiste em confirmar a interação molecular entre as proteínas de begomovírus MP e NSP e a proteína AT4G14560 por ensaio de duplo-híbrido em leveduras. Estes ensaios são relevantes porque as interações entre proteínas virais e do hospedeiro também obstruem a biossíntese ou sinalização de hormônios vegetais.

Os hormônios vegetais são os principais reguladores do equilíbrio homeostático entre desenvolvimento e estresse, e são explorados por vírus para superarem as respostas de defesa das plantas (Biasi, 2002). Similarmente à sinalização desses hormônios vegetais associados à defesa, a auxina também pode afetar a resistência a diferentes grupos de patógenos, além das doenças se manifestarem indiretamente através dos efeitos no crescimento (Denancé, 2013). Auxina é um hormônio produzido pelas plantas nos tecidos vegetais, também podendo ser de origem sintética. A auxina pode estar em diferentes regiões nas plantas (folhas, caule, raiz, frutos, sementes), atuando como mediadora de processos fisiológicos, provocando alterações nos processos vitais e estruturais, com a finalidade de aumentar o crescimento e desenvolvimento dos órgãos, e com isso melhorarem a produção (Castro e Vieira, 2001). Esse hormônio, influencia praticamente todos os estádios do ciclo de vida de um vegetal, da germinação à senescência (Souza et al., 2018). Trata-se de uma substância essencial no cultivo de plantas. Promove modificações plásticas na parede celular vegetal durante o processo de divisão celular, permitindo a extensibilidade da célula. Pode também estimular várias respostas fisiológicas quando utilizadas na indução de raízes, folhas, gemas axilares ou apicais, embriões e calos (Rodrigues e Leite, 2013; Cid, 2010; Mercier, 2012). A via de sinalização de auxina representa uma parte essencial da complexa rede de respostas ao estresse abiótico e biótico, o que a torna um tema relevante a ser endereçado nas interações moleculares entre vírus e hospedeiro. Espera-se que a confirmação de interações das proteínas de begomovírus NSP e MP com um “hub” de sinalização de auxina seja relevante não somente para validar os resultados da rede de interações NSP-MP-proteínas do hospedeiro previamente identificada (Gouveia-Mageste et al., 2021), mas também como fundamento para direcionar ensaios funcionais que comprovem a interação de begomovírus com a via de sinalização de auxina.

Ainda com relação a redes de interações proteína-proteína relacionadas ao sistema imune de plantas, foi descrito uma rede de interconexões entre proteínas virais e proteínas do

hospedeiro em *Arabidopsis*, tendo sido caracterizado um hub funcional do sistema imune de plantas convergente para a proteína CSN5A (Mukhtar et al., 2011). Entre as proteínas que interagem com CSN5A, destacam-se efetores de virulência de dois patógenos divergentes na evolução e proteínas de defesa do hospedeiro, demonstrando que efetores de diferentes patógenos interagem com os mesmos hubs imunes do hospedeiro. Consistente com esta observação, foi demonstrado independentemente que a proteína C2 de begomovírus monossegmentados interage com CSN5A (Losano-Durán & Bejanaro, 2011). Além disso, foi também demonstrado que a proteína de defesa contra begomovírus NIK1 interage com CSN5A (Machado, 2011). Possivelmente, o hub imune CSN5A representa um alvo comum e possível elemento funcional na interação begomovírus-hospedeiro. Conseqüentemente, a caracterização dos componentes dessa rede de interações convergentes entre begomovírus e CSN5A do hospedeiro é importante para o entendimento da estratégia de virulência de begomovírus, assim como os mecanismos de defesa da planta para contrapor a infecção viral. Neste aspecto, seria interessante identificar se outras proteínas de defesa contra begomovírus interagem com CSN5A.

Mais recentemente, foi demonstrado que a proteína AtWWP1 ("*Arabidopsis thaliana* WW domain-containing protein1"), envolvida na formação de corpos nucleares, participa de um mecanismo de defesa do hospedeiro contra begomovírus (Calil et al., 2018). Como provável componente da rede de interações begomovírus-hospedeiro, AtWWP1 interage diretamente com o fator de suscetibilidade NIG ("NSP-interacting GTPase") para prevenir sua atividade proviral em uma resposta de defesa do hospedeiro. Entretanto, como proteína de defesa, não se sabe se AtWWP1 constitui um elemento adicional do sistema imune de plantas representado por CSN5A. Sendo assim, também constitui objetivo dessa investigação identificar se as proteínas CSN5A e AtWWP1 interagem entre si, *in vivo* e *in vitro*. Estes resultados fornecerão subsídios para análise funcional posterior do "hub" imune representado por CSN5A durante as infecções por begomovírus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi estruturada em duas partes, sendo que na primeira parte os ensaios de detecção interação proteína-proteína, utilizados nesta investigação são revisados para melhor compreensão dos resultados. Na segunda parte, as vias de sinalização e os interactomas desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisadores e outros são revisados destacando pontos importantes em que os ensaios de interações proteína-proteína podem ser utilizados para o avanço e validação do conhecimento na área.

2.1 Ensaios de detecção interações proteína-proteína

2.1.1 O sistema de duplo-híbrido em leveduras

O sistema de duplo-híbrido de levedura permite a detecção de interações entre proteínas *in vitro* e foi descrito primeiramente por Stanley et al. (1989), fornecendo a vantagem do estudo das interações de proteínas em sua conformação original. Este sistema se baseia no conceito de que os fatores de transcrição, GAL4 por exemplo, podem ser fisicamente separados em dois domínios: um domínio chamado de ligação ao DNA (BD- “binding domain”) e um domínio de ativação de transcrição (AD- “activation domain”). Estes domínios podem ser clonados separadamente fusionados com as proteínas de interesse, ou seja, aquelas cuja interação se deseja detectar (Figura 1). As construções de DNA resultam na expressão de duas proteínas recombinantes ou dois híbridos, sendo híbrido 1, BD fusionada a uma das proteínas de interesse, “X”, também chamado de “isca” (BD-X) e híbrido 2, AD fusionado a outra proteína de interesse, “Y”, também chamada de “presa” (AD-Y). A interação entre estas proteínas restaura o fator de transcrição, permitindo a transcrição de um gene repórter, que levará à visualização da interação (Figura 1).

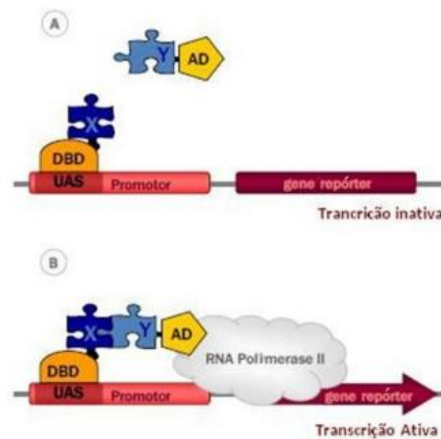


Figura 1: O Sistema De Duplo-Híbrido Clássico – (A) A proteína de interesse X é fusionada ao domínio de ligação (BD), uma construção chamada de isca. A possível proteína de interação Y é fusionada ao domínio de ativação (AD) e é chamada de presa. (B) a isca se liga à sequência de ativação (UAS) do promotor. A interação entre isca e presa recruta o AD e reconstitui o fator de transcrição funcional, levando ao recrutamento adicional da RNA Polimerase II e subsequente transcrição do gene repórter (Fonte: Adaptado de Brukner et al., 2009).

Apesar do sistema de duplo-híbrido ser amplamente utilizado, vários tipos de falso-positivos têm sido descritos. Duas categorias principais de falso positivo podem ser definidas, como sendo o chamado falso-positivo biológico, onde a interação entre as proteínas ocorre na levedura, mas não ocorre *in vivo* no organismo em estudo; e o falso-positivo técnico, onde ocorre a ativação do gene repórter sem que ocorra a interação dos híbridos (Vidalain et al., 2004).

O sistema duplo híbrido foi inicialmente descrito para o escrutínio de proteínas que interagem com uma definida proteína de interesse, utilizando bibliotecas de cDNA, por meio de isolamento do gene correspondente (Mariano et al., 2004; Florentino et al., 2006; Calil et al., 2018). Além disso, o sistema de duplo-híbrido tem sido extensivamente utilizado para confirmar interações de proteínas detectadas por outros ensaios de interações proteína-proteína (Gouveia-Mageste et al., 2021). O sistema duplo-híbrido de leveduras também tem sido utilizado em escala ampla para detectar redes complexas de interações proteína-proteína em eucariotos (Uetz et al., 2000; Ito et al., 2001, Fiebitz et al., 2008; Simonis et al., 2009. Em plantas, alguns exemplos do uso de duplo híbrido em larga escala incluem a identificação do interactoma de proteínas de sistema imune de plantas (Mukhtar et al, 2011), de receptores transmembrana do tipo cinases, ricos em repetições de leucina (Smakowska-Luzan et al., 2018), além de outros interactomas envolvidos em outros processos celulares básicos (Dietz et al., 2010).

2.1.2. Ensaio de coimunoprecipitação de proteínas

A coimunoprecipitação (Co-IP) é uma técnica extensivamente utilizada para identificar interações proteína-proteína fisiologicamente relevantes, usando anticorpos específicos contra uma proteína-alvo para capturar indiretamente proteínas que estejam estavelmente associadas à proteína-alvo específica (Figura 2). Esses complexos de proteínas podem então ser analisados para identificar novos parceiros de ligação, a afinidade de ligação, cinética de ligação e a função da proteína alvo. Sendo assim, trata-se de uma importante ferramenta para investigar as redes de interações proteicas *in vivo*, desde que se possa usar um método de detecção de proteínas ligantes em larga escala. Isto se aplica, por exemplo, para identificar, por espectrometria de massa, o conjunto de proteínas que formam multicomplexos que são indiretamente imunoprecipitados com anticorpos específicos contra a proteína-alvo (Wang et al., 2017). Além disso, a tecnologia tem sido amplamente usada para confirmar interações diretas entre duas proteínas *in vivo*, apresentando a vantagem da disponibilidade comercial de diversos kits direcionados para coimunoprecipitação de proteínas com diferentes epítomos de etiquetagem (Carvalho et al., 2008a, 2008b, Zorzatto et al., 2015; Calil et al., 2018; Li et al., 2019; Gouveia-Mageste et al, 2021). Como desvantagens principais, pode-se levar em consideração alto custo de reagentes e análises de alto desempenho como espectrometria de massa, necessidade de anticorpos específicos e possibilidades de reações cruzadas, minimizadas com o uso de anticorpos monoclonais contra epítomos (etiquetagem) comerciais.

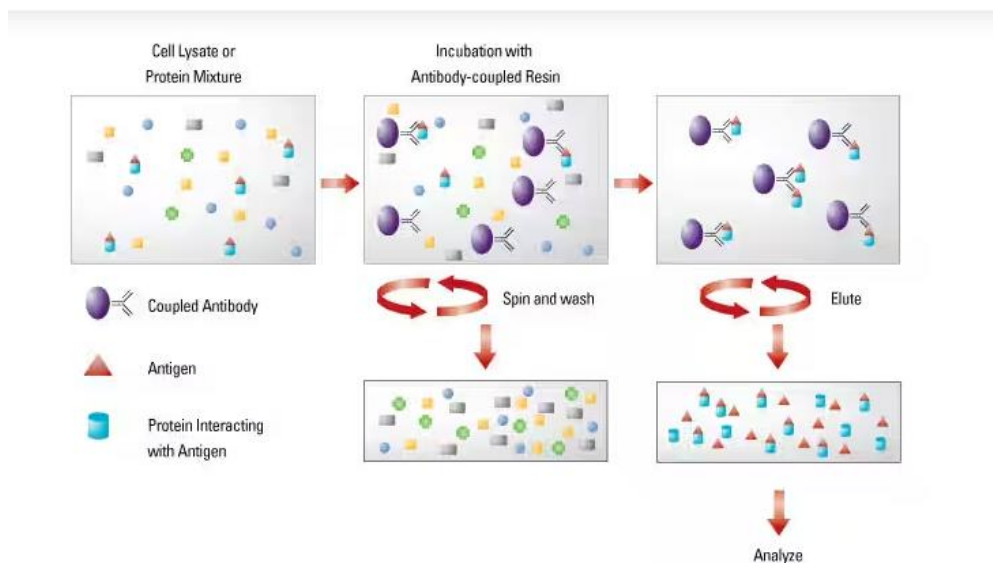


Figura 2: Ilustração esquemática de um ensaio de coimunoprecipitação padrão. Proteína total é extraída de uma definida célula, expressando a proteína-alvo fusionada a um epítipo (tag) comercial e incubada com anticorpos comerciais contra o epítipo comercial da proteína recombinante ligado a resinas de sepharose, por exemplo. Após centrifugação, o pellet é lavado duas vezes por centrifugação e os imunocomplexos associados à proteína alvo são eluídos. A identidade desses complexos pode ser analisada por espectrometria de massa ou, em interações diretas, por western blots, utilizando anticorpos específicos para a proteína parceira. Thermo Scientifica site. <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/co-immunoprecipitation-co-ip.html>

2.1.3 Ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC)

A complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) é uma técnica alternativa para detectar a associação proteína-proteína em células vivas (Citovsky et al., 2006; Schütze et al., 2009; Weinthal et al., 2009). Neste método de detecção de interações proteína-proteína, as proteínas investigadas são fusionadas a fragmentos amino (N) e carboxi (C) terminais da proteína amarela fluorescente (YFP) (Figura 3). Estes fragmentos (Yn, Yc) não são fluorescentes isoladamente, entretanto, a interação entre as proteínas estudadas une Yn e Yc e promove a reconstituição da estrutura do barril β de YFP (Figura 3A). O dobramento correto do fluoróforo regenera a fluorescência do YFP, emitindo um sinal em comprimento de onda único, indicando associação proteína-proteína. Entretanto, caso as proteínas investigadas não se associem, o fluoróforo não é reconstituído não sendo observado fluorescência resultante da reconstituição de YFP (Figura 3B).

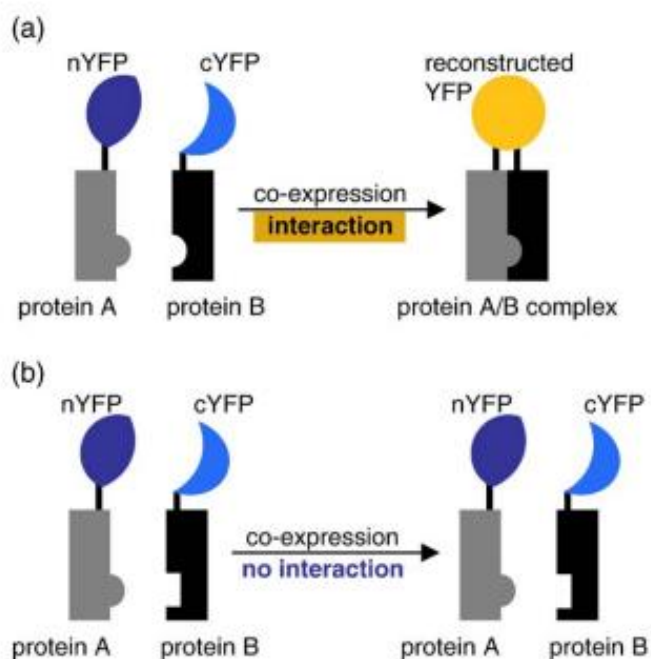


Figura 3. O ensaio BiFC detecta interações proteína-proteína em células vivas. Uma molécula de gene repórter de proteína autofluorescente, YFP, é dividido em duas partes, N-terminal (nYFP) e C-terminal (cYFP), nenhuma

das quais fluoresce por conta própria. A fusão de nYFP e cYFP para proteínas testadas resultam em um sinal YFP reconstruído (a) se as proteínas interagem entre si, enquanto nenhuma fluorescência de YFP é produzida na ausência de interação (b). Fonte: Citovsky *et al.*, 2006.

Embora o método BIFC não tenha sido escalonado para detecção de redes de interações proteína-proteína, o método possibilita a detecção de interações *in vivo* (Schütze *et al.*, 2009), e oferece a vantagem adicional por detectar o compartimento subcelular onde ocorre a interação (Citovsky *et al.*, 2008; Ohad & Yalovsky, 2010; Calil *et al.*, 2018; Gouveia-Mageste *et al.*, 2021).

2.2 Vias de sinalização celular e interactomas de interesse

2.2.1 Vias de sinalização de morte celular mediada pelo módulo de sinalização DCD-NRPs/GmNAC30-GmNAC81/VPE

A via de morte celular mediada pelas proteínas DCD/NRPs (“*Developmental and Cell Death domain-containing N-Rich Proteins*”) foi inicialmente descrita em soja (Isgler *et al.*, 2007, Costa *et al.*, 2008) e mais tarde identificada como módulo de sinalização DCD-NRPs/GmNAC30-GmNAC81/VPE (Mendes *et al.*, 2013). Esta via de sinalização mediada por DCD/NRPs transmite sinais de estresses, como estresses no RE, osmótico e seca, culminando em uma resposta integrada de morte celular programada (PCD) (Reis *et al.*, 2011). De acordo com o modelo molecular dessa via de sinalização, estas condições de estresses múltiplos induzem a expressão do fator de transcrição GmERD15 que, por sua vez, ativa o promotor e a expressão de DCD/NRPs (Alves *et al.*, 2011; Figura 4). A indução dos genes DCD/NRPs leva à ativação de uma cascata de sinais para indução dos genes *GmNAC30* e *GmNAC81*. Como resultado as proteínas GmNAC30 e GmNAC81 interagem entre si, ligam ao promotor e induzem a expressão do gene *VPE* (Vacuolar Processing Enzyme) que executa o evento de PCD (Faria *et al.*, 2011, Mendes *et al.*, 2013) (Figura 4).

Além de ser sinergisticamente ativada por estresses múltiplos, tem sido determinado que o módulo de sinalização de morte celular programada, NRPs/GmNAC30-GmNAC81/VPE, está também associado com senescência foliar programada pelo desenvolvimento. Foi demonstrado que os genes componentes da via de sinalização, *NRP-A*, *NRP-B*, *GmNAC081*, *GmNAC0030*, e *VPE*, são induzidos por senescência foliar (Pimenta *et al.*, 2016). Além disso, a atividade caspase-1 de VPE, a enzima que executa PCD, é altamente aumentada durante a senescência foliar (Pimenta *et al.*, 2016). A expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* dos componentes da via de PCD mediada por NRPs induz uma reposta de morte celular com

características de senescência foliar natural, incluindo indução da atividade de caspase-1 e fragmentação do DNA, perda de clorofila e amarelecimento das folhas, degradação de proteínas e aumento da peroxidação de lipídeos, além da indução de genes marcadores associados com senescência (Reis et al., 2016; Melo et al., 2018). Além disso, os fito-hormônios reguladores positivos de senescência, ácido jasmônico (JA), absícico ácido (ABA) e ácido salicílico (SA), também induzem a expressão dos genes componentes da via de sinalização de PCD mediada por DCD/NRP (Pimenta et al., 2016). Também foi demonstrado que a hiper expressão de *GmNAC81* acelera a senescência foliar, um fenótipo que foi associado com o aumento de degradação de clorofila, decaimento mais rápido de fotossíntese e maior expressão de genes alvos de *GmNAC81/GmNAC30* que codificam enzimas hidrolíticas, incluindo VPE, o efetor de PCD (Pimenta et al., 2016; Ferreira et al., 2020). Em contraste à senescência acelerada exibida pelas linhagens transgênicas superexpressando *GmNAC81*, o silenciamento do gene *GmNAC81* por VIGS (*virus-induced gene silencing*), utilizando a patente BR BR1020150070462, retardou o processo de senescência foliar e diminui a expressão dos genes alvos de *GmNAC81*, incluindo *VPE*. Conseqüentemente, *GmNAC81* emerge como um regulador positivo de senescência foliar natural, que por sua vez deve estar integrada ao circuito regulatório ou módulo de sinalização NRPs/NACs/VPE (Figura 4).

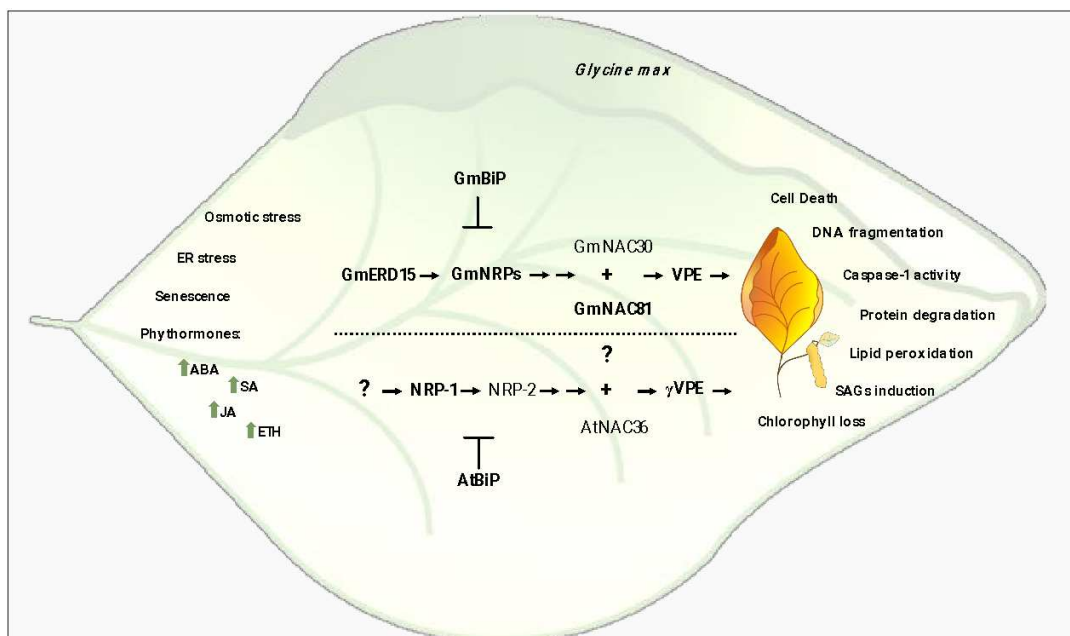


Figura 4- Integração de sinais de senescência e de estresses na resposta de morte celular mediada por DCD/NRP. Senescência foliar, estresse do ER e estresse osmótico induzem a expressão de *GmERD15*, o qual induz *GmNRPs* para iniciar a cascata de sinalização que culmina com a indução de *GmNAC30* e *GmNAC81*. Estes fatores de transcrição NACs forma um heterodímero que ativa o promotor a expressão de *VPE* e subseqüente execução de um programa de morte celular. Os fitos hormônios positivamente regulam a via de sinalização e o chaperone molecular residente no retículo endoplasmático, BiP, age como um regulador negativo da morte celular

por meio da modulação da expressão e atividade dos componentes da via de morte celular. A via de morte celular mediada por DCD/NRP é conservada em outras espécies de plantas, e os ortólogos em *Arabidopsis* são indicados na parte inferior da figura. Reproduzido de Fraga et al., 2022.

Consistente com a função de GmNAC81 em senescência, foi demonstrado que um subconjunto de genes diferencialmente expressos por senescência foliar natural em soja são positivamente regulados nos estágios iniciais de desenvolvimento em linhagens de soja hiper expressando *GmNAC81* (Ferreira et al., 2020). Conseqüentemente, GmNAC81 regula senescência foliar modulando a expressão de genes relacionados com senescência, morte celular e sinalização por hormônios (Pimenta et al., 2016, Ferreira et al., 2020). GmNAC81 funciona tanto como ativador como repressor de transcrição ligando-se a promotores que contêm o elemento cis regulatório TGTG (T/G/C). Como um regulador positivo de senescência, GmNAC81 ativa a expressão de genes que induzem senescência e negativamente modula a expressão de genes que suprimem senescência foliar (Ferreira et al., 2020). Foi também demonstrado que o chaperone molecular BiP (“Binding Protein”), residente no RE, regula negativamente esta via de morte celular mediada pelo módulo de sinalização NRPs/GmNACs/VPE, conferindo tolerância à seca em soja (Valente et al., 2008), tabaco (Alvim et al., 2001) e *Arabidopsis* (Reis et al., 2016).

Como regulador negativo do módulo de sinalização NRPs/GmNACs/VPE, o mecanismo pelo qual BiP confere tolerância à seca deve estar associado ao atraso provocado na senescência foliar induzida por seca, um fenótipo semelhante ao caráter “stay green” conferido por alguns genes de resistência à seca. Nestes casos, a tolerância à seca é molecularmente ligada à senescência foliar. Para confirmar esta hipótese, foi demonstrado, que ao contrário de BiP, a super expressão de *GmNAC81*, um regulador positivo da via de sinalização de morte celular, acelera a senescência foliar e promove maior suscetibilidade à seca (Ferreira et al., 2020). A super expressão de GmNAC81 induz a expressão de genes associados a senescência e indutores de morte celular e suprime a expressão de reguladores da sinalização de ABA (Ferreira et al., 2020). Este panorama transcricional derivado da super expressão de GmNAC81 suporta o argumento de que senescência foliar é molecularmente associada à tolerância a seca.

O módulo de sinalização de morte celular, representado pelo circuito NRP-NAC-VPE, é conservado em outras espécies de plantas exibindo similar mecanismos regulatórios (Alvim et al., 2011; Reis et al., 2016). Os ortólogos de GmNRPS (*AtNRP1*, *AtNRP2*), GmNAC81 (*ANAC036*) e VPE (γ VPE) em *Arabidopsis* induzem morte celular quando transientemente expressos em folha de *N. benthamiana*, e suas linhagens silenciadas exibem tolerância ao

estresse no RE e morte celular (Reis et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que a indução de ANAC036 e γ VPE mediada por estresses requer a função de NRP1, comprovando a ordem de atuação dos componentes, conforme Figura 4 (Reis et al., 2016). Embora representantes da via de morte celular tenham sido identificados no genoma de *Arabidopsis* e funcionalmente caracterizados, o ortólogo de GmNAC30 ainda não foi identificado.

GmNAC30 é representado, no genoma da soja, por uma família multigênica constituída por 11 membros que se agrupam com a família SNAC-A (ATAF) de *Arabidopsis* por análise filogenética (Melo et al., 2018). A família ATAF possui sete representantes no genoma de *Arabidopsis*, sendo que GmNAC30 se relaciona melhor estruturalmente com ATAF1 e ATAF2. Estudos prévios demonstraram que ATAF1 não corresponde ao ortólogo de GmNAC030; ATAF1 não interage com ANAC036, e tampouco com seu ortólogo na soja GmNAC081 (Caetano, 2018). Além disso, ATAF1 não compartilha o mesmo perfil transcricional de componentes do módulo de sinalização NRPs/NACs/VPE, por exemplo, não é induzido por estresses no RE. Considerando que GmNAC30 compartilha maior identidade de sequência com ATAF2, seria importante avaliar se ATAF2 teria características funcionais similares a GmNAC30. Uma vez que GmNAC30 interage especificamente e funcionalmente com a proteína GmNAC81, estudos de interação proteína-proteína poderiam ser conduzidos para identificar o homólogo de GmNAC30 em *Arabidopsis*.

2.2.2. Interactoma NSP-MP-proteínas do hospedeiro detectado por microarranjo de proteínas

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, que necessitam entrar nas células hospedeiras, cooptar a maquinaria celular para completar seu ciclo de vida. Os mecanismos moleculares para a entrada do vírus nas células diferem completamente entre os vírus de animais e vegetais. No entanto, uma vez no citoplasma, os genomas de vírus de plantas e animais se movem intracelularmente para subcompartimentos celulares específicos para replicação, transcrição ou encapsidação (Dodding e Way, 2011; Schoelz et al., 2011). Do local de replicação, os vírus de plantas devem se movimentar intracelularmente para os plasmodesmatas, que são pontes citoplasmáticas intercelulares entre as células vegetais (Harries et al., 2010; Schoelz et al., 2011). Para promover o movimento típico célula-a-célula do genoma viral, as proteínas de movimento (MPs) virais aumentam o limite de exclusão do plasmodesmata e promovem ativamente a translocação do ácido nucleico viral para as células não infectadas adjacentes (UN), (Wolf et al., 1989). No caso de geminivírus, que replicam no

núcleo de células infectadas, o DNA viral deve ser translocado do núcleo para o citoplasma e mover intracelularmente para o plasmodesmata de onde são direcionados para as células adjacentes, não infectadas.

Os geminivírus são vírus circulares de DNA de fita simples, que se replicam por meio de intermediários de DNA de fita dupla no núcleo das células infectadas. Geminivírus infectam um amplo espectro de culturas economicamente importantes, e causam perdas significativas em todo o mundo (Rojas et al., 2018). A família *Geminiviridae* inclui 14 gêneros, mas 75% das espécies identificadas pertencem ao gênero *Begomovirus*, que são transmitidos pela mosca branca, infectam espécies dicotiledôneas e apresentam uma configuração genômica que pode ser monopartida ou bipartida (Hanley-Bowdoin et al., 2013; Silva et al., 2017). Os componentes genômicos dos begomovírus bipartidos são designados DNA-A e DNA-B. O DNA-A codifica proteínas envolvidas na replicação viral (AC1 ou Rep, RE_n ou AC3), transativação de genes virais (AC2 ou TRaP), encapsidação do genoma viral (AV1 ou CP) e supressão de defesas do hospedeiro (AC4 e TrAP). O DNA-B codifica a proteína NSP (“Nuclear Shuttle Protein” ou BV1) que facilita o movimento do DNA viral (vDNA) do núcleo para o citoplasma e MP (“Movement Protein” ou BC1) envolvida no movimento intracelular célula-a-célula do vDNA. Embora o papel da formação do complexo MP-NSP na mediação do transporte intracelular e intercelular de begomovírus é amplamente aceito, os mecanismos moleculares subjacentes à ação dessas proteínas virais em estágios do movimento intracelular e intercelular ainda não são totalmente conhecidos.

A proteína NSP interage com MP no citoplasma (Carvalho et al., 2008a), promovendo a direcionalidade da translocação do vírus para a superfície celular (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; Carvalho et al., 2008a). O mecanismo para a saída do vDNA do núcleo ainda não é compreendido. Foi conceitualmente aceito que NSP facilita a saída nuclear do vDNA recém-replicado via poros nuclear (Noueiry et al., 1994; Rojas et al., 1998; Lazarowitz e Beachy, 1999; Ward e Lazarowitz, 1999; Gafni e Epel, 2002). No entanto, as interações com a maquinaria de transporte nuclear do hospedeiro não foram documentadas. Uma peça desse quebra-cabeça foi obtida com a identificação de uma proteína “NSP interacting GTPase” (NIG), que interage com NSP no lado citosólico do complexo do poro nuclear e facilita a liberação do complexo NSP-vDNA do envelope nuclear para o citosol (Carvalho et al., 2008a, 2008b). Mais recentemente foi identificada uma proteína do endossomo designada NISP (“NSP-Interacting Syntaxin 6 domain-containing Protein”) que interage com NIG e NSP no citosol e transloca o complexo

vDNA-NSP-NIG para os endossomos, fornecendo assim uma provável rota intracelular para transporte do vDNA do núcleo para os endossomos.

As proteínas MP de begomovírus e outros vírus de plantas interagem com a sinaptotagmina A (SYTA), que é localizada nos endossomos das células vegetais e é necessária para o tráfico célula-a-célula de diferentes MPs (Lewis e Lazarowitz, 2010). Assim sendo, no endossomo, a proteína NSP, presente no complexo NSP-NIG-NISP-vDNA, interage com MP-SYTA que usa a via endocítica de reciclagem para translocar o complexo vDNA-NSP para os plasmodesmata e de lá para as células adjacentes (Gouveia-Mageste et al., 2021).

Diversas outras rotas alternativas para translocação intracelular e disseminação célula-a-célula de vDNA via cloroplastos e estromas têm sido propostas (Krenz et al., 2010, 2012). Entretanto, no caso de begomovírus bissegmentados que codificam NSP e MP, a rota intracelular via endossomo tem sido reforçada com a demonstração de que NSP e vDNA, por meio da interação com NISP, e MP, por meio de interação com SYTA, são translocados para o endossomo. Neste modelo, as proteínas do hospedeiro NIG e NISP agem em concerto para movimentar intracelularmente o vDNA para os endossomos. Enquanto a proteína NIG foi identificada em um escrutínio de proteínas de hospedeiro utilizando o sistema duplo híbrido de leveduras e NSP como isca (Carvalho et al., 2008), a proteína NISP foi identificada por meio de um escrutínio, utilizando um microarranjo de 4600 proteínas de *Arabidopsis* e NSP como isca (Gouveia-Mageste et al., 2021).

Este microarranjo de proteínas, recentemente desenvolvido, consiste em quadros de leitura aberta (ORFs) de *Arabidopsis thaliana* organizadas em lâminas de slides e programáveis para síntese *in vitro* das proteínas codificadas (NAPPA, “nucleic acid programmable protein array”) que são avaliadas pela capacidade de interagir com proteínas iscas (Yazaki et al., 2016). Para identificar a rede de interações entre NSP, MP e proteínas de *Arabidopsis*, 4.600 ORFs sintetizados *in vitro* de *Arabidopsis* foram interrogadas pela sua capacidade de ser alvo de MP e/ou NSP da CabLCV. O microarranjo de proteínas NAPPA sintetizado *in situ* gerou anteriormente um conjunto de dados de fator de transcrição-NAPPA, que foi validado por ensaios pull-down e fluorescência biomolecular (Yazaki et al., 2016).

As proteínas NSP e MP, transcritas e traduzidas *in vitro*, foram utilizadas para sondar este microarranjo de proteínas (Gouveia-Mageste et al., 2021). Um total de 45 proteínas candidatas foram identificadas pela capacidade de interagir com MP e NSP. Deste total de proteínas do hospedeiro selecionadas no microarranjo de proteínas, 35 proteínas interagiram com ambas as proteínas (Figure 5, proteínas em verde), o que não é surpreendente porque o

próprio MP interage com NSP e pode fazer parte de complexos multiprotéicos comuns, pois ambos participam do movimento do vDNA. Foram encontradas cinco proteínas do hospedeiro que interagem especificamente com NSP (laranja-escuro) e cinco interações de proteínas específicas de MP (amarelo-claro).

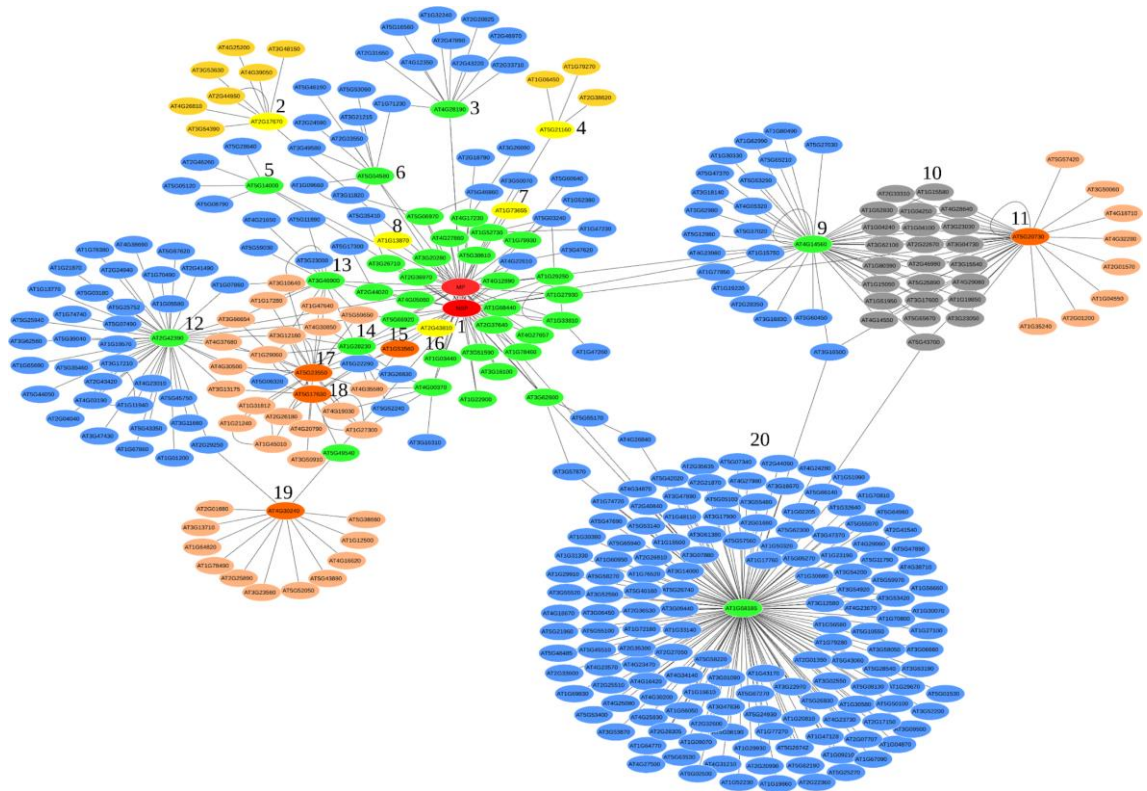


Figura 5. Rede de interações proteína-proteína (PPI) entre MP, NSP e proteínas de Arabidopsis integradas no interactoma de Arabidopsis. A rede exibe uma topologia em forma de fogos de artifício, que foi montada pelo software Cytoscape. As proteínas virais, MP e NSP, são representadas em vermelho. As proteínas que interagem especificamente com NSP. As proteínas que interagem especificamente com MP são indicadas em amarelo-claro para as quais proteínas em amarelo-escuro convergem. As proteínas de Arabidopsis que interagem com ambas MP e NSP são mostradas em verde, formando hubs com proteínas azuis convergentes. Proteínas cinza representam pontos de conexão entre dois hubs funcionalmente similares. Reproduzido de Gouveia-Mageste et al. (2021).

Esta rede de interações proteína-proteína (PPIs, “protein-protein interactios”) entre as proteínas virais e as proteínas de Arabidopsis foram integradas no interactoma proteína-proteína determinado experimentalmente para *A. thaliana* (BioGRID banco de dados e o banco de dados de Arabidopsis interactome), usando o Software Cytoscape. Este procedimento identificou a rede PPI contendo MP, NSP e as proteínas de Arabidopsis, que direta ou indiretamente, interagem com as proteínas virais, rede PPI aqui designada interactoma NSP-MP-proteínas do hospedeiro. Diversos “hubs” relevantes e de alta centralidade foram formados que conceitualmente participam de interações com patógenos contribuindo assim para validar o resultado do interactoma. Por exemplo, a proteína do hospedeiro AT1G68185, uma proteína

semelhante à ubiquitina (Ub), formou um hub significativo (hub 20, grau 148), podendo representar um nodo de direcionamento convergente entre as proteínas virais do begomovírus, por ser um alvo direto de NSP e MP independentemente. Além disso, a via Ub-proteassoma é alvo de diversos vírus para manter níveis adequados de proteínas e para induzir, inibir ou modificar proteínas de hospedeiros envolvidas na infecção (Alcaide-Loridan e Jupin, 2012). Algumas proteínas que interagem com MP, incluindo peptidil-prolil cis-proteína da família trans isomerase (Krenz et al., 2010) e sinaptotagmina A (Lewis e Lazarowitz, 2010), que auxiliam na função de movimento MP, estão conectadas ao “hub” AT1G68185 (hub 20), sugerindo uma possível biológica significância do referido “hub” durante a infecção por begomovírus (Gouveia-Mageste et al., 2021).

Duas proteínas que interagem com NSP, AT5G23550 e AT4G30240, formam hubs convergentes (17 e 19) enriquecidos por proteínas ligadas à membrana e função de atividade de transporte. A proteína que interage com NSP AT5G23550 (hub 17) é vista como uma vesícula semelhante a Got1/Sft2 proteína de transporte, que pode estar localizada em um compartimento do Golgi tardio e pode estar envolvida na fusão de vesículas de transporte derivadas de um compartimento endocítico com o complexo de Golgi (Conchon et al., 1999). Da mesma maneira, AT4G30240 (hub 19) é uma proteína N-etilmaleimida solúvel semelhante ao receptor da proteína de ligação do fator (SNARE) que abriga um domínio syntaxina-6 típico de proteínas encontradas nas vesículas de transporte endossomal (Jung et al., 2012). A interação dessa proteína com NSP foi confirmada por BiFC e Co-IP, tendo sido denominada NISP (“NSP-Interacting Syntaxin-6 domain-containing Protein”). Trata-se de uma proteína endossomal que facilita o movimento citoplasmático do vDNA para os endossomos (Gouveia-Mageste et al., 2021).

A rede PPI identificada pode fundamentar estudos futuros detalhando o complexo ciclo de vida do begomovírus (Gouveia-Mageste et al., 2021). Diversos outros “hubs” podem ser funcionalmente relevantes durante a infecção. Por exemplo, os “hubs” 9, 10 e 11 são constituídos de proteínas predominantemente envolvidas em sinalização por auxina (Tabelas 1, 2 e 3). Consistente com esta observação, a via de biossíntese e sinalização de auxina é reprogramada por geminivírus para aumentar a patogenicidade em tomateiros. Apesar da aparente relevância funcional desses hubs de proteínas envolvidas na sinalização por auxina na infecção por geminivírus, nenhuma interação entre as proteínas virais NSP e MP e proteínas do hub de auxina foi confirmada por qualquer método alternativo de interação proteína-proteína, o que constitui um dos objetivos dessa investigação.

Tabela 1: Corresponde ao Hub 9 (Figura 5), na qual proteínas responsivas ao ácido indol-3-acético interagem com proteínas virais NSP e MP. As proteínas de *Arabidopsis* que interagem com MP e NSP são mostradas em verde, formando hubs de proteínas azuis convergentes.

9) NSP- and MP-interacting indole-3-acetic acid inducible							
name	Average ShortestPath Length	Betweenness Centrality	Closeness Centrality	Clustering Coefficient	Degree	Eccentricity	Description
AT4G14560	2.59944751	0.17677492	0.38469713	0.0240518	49	3	indole-3-acetic acid inducible
AT1G15750	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein
AT1G62990	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	homeobox knotted-like protein
AT2G28350	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	auxin response factor 10
AT4G23980	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	auxin response factor 9
AT5G37020	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	auxin response factor 8
AT1G19220	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	auxin response factor 19
AT5G60450	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	auxin response factor 4
AT1G80490	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	TOPLESS-related 1
AT5G47370	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	Homeobox-leucine zipper protein 4 (HB-4) / HD-ZIP protein
AT5G65210	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	bZIP transcription factor family protein
AT5G27030	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	TOPLESS-related 3
AT1G77850	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	auxin response factor 17
AT4G05320	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	polyubiquitin 10
AT5G12980	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	Cell differentiation, Rcd1-like protein
AT1G30330	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	auxin response factor 6
AT3G62980	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	F-box/RNI-like superfamily protein
AT3G18140	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT3G16500	2.77071823	0.03220154	0.36091725	0.33333333	3	4	phytochrome-associated protein 1
AT5G53290	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	cytokinin response factor 3
AT3G16830	3.59668508	0.0	0.27803379	0.0	1	4	TOPLESS-related 2

Tabela 2: Corresponde ao Hub10 (Figura 5), na qual proteínas responsivas ao ácido indol-3-acético interagem com proteínas de *Arabidopsis* AT5G20730 e AT4G14560. O Hub 10 é representado pelas proteínas em cinza. As proteínas cinzentas representam pontos de conexão entre dois hubs funcionalmente semelhantes.

10) AT5G20730- and AT4G14560-interacting indole-3-acetic acid inducible 28							
name	Average ShortestPath Length	Betweenness Centrality	Closeness Centrality	Clustering Coefficient	Degree	Eccentricity	Description
AT5G25890	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 28
AT1G51950	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 18
AT1G80390	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 15
AT2G33310	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	auxin-induced protein 13
AT1G52830	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid 6
AT3G15540	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 19
AT4G29080	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	phytochrome-associated protein 2
AT3G23050	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid 7
AT2G22670	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indoleacetic acid-induced protein 8
AT1G04250	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	AUX/IAA transcriptional regulator family protein
AT5G65670	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 9
AT2G46990	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 20
AT3G04730	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indoleacetic acid-induced protein 16
AT1G15050	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 34
AT4G28640	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 11
AT3G23030	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 2
AT3G62100	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 30
AT4G14550	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 14
AT5G43700	2.77071823	0.03220154	0.36091725	0.33333333	3	4	AUX/IAA transcriptional regulator family protein
AT1G19850	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-like protein
AT1G04240	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	AUX/IAA transcriptional regulator family protein
AT3G17600	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 31
AT1G04100	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indoleacetic acid-induced protein 10
AT1G15580	3.5718232	0.0	0.27996906	1.0	2	4	indole-3-acetic acid inducible 5

Tabela 3: Corresponde ao Hub11 (Figura 5), na qual proteínas do tipo AUX/IAA responsivas ao ácido indol-3-acético interage com NSP. A proteína que interage especificamente com NSP está em laranja escuro sendo representada pela proteína AT5G20730 e as proteínas de conexão de *Arabidopsis* em laranja-claro.

11) NSP-interacting auxin-responsive factor AUX/IAA-like protein								
	name	Average ShortestPath Length	Betweenness Centrality	Closeness Centrality	Clustering Coefficient	Degree	Eccentricity	Description
55	AT5G20730	2.67403315	0.08806503	0.37396694	0.04369748	37	4	Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-like prot
56	AT2G01200	3.67127072	0.0	0.27238525	0.0	1	5	indole-3-acetic acid inducible 32
57	AT1G35240	3.67127072	0.0	0.27238525	0.0	1	5	auxin response factor 20
58	AT5G57420	3.67127072	0.0	0.27238525	0.0	1	5	indole-3-acetic acid inducible 33
59	AT3G50060	3.67127072	0.0	0.27238525	0.0	1	5	myb domain protein 77
60	AT1G04550	3.67127072	0.0	0.27238525	0.0	1	5	AUX/IAA transcriptional regulator family protein
61	AT4G18710	3.67127072	0.0	0.27238525	0.0	1	5	Protein kinase superfamily protein
62	AT2G01570	3.67127072	0.0	0.27238525	0.0	1	5	GRAS family transcription factor family protein
63	AT4G32280	3.67127072	0.0	0.27238525	0.0	1	5	indole-3-acetic acid inducible 29
64								
65								
66								

2.2.3- Hub imune CSN5A

A proteína CSN5A de *Arabidopsis* (COP9 Signalosome 5A) é composta por 357 resíduos de aminoácidos, com 39,74 kDa, sendo identificada inicialmente como um componente do COP9 signalossomo (CSN). O signalossomo é um complexo protéico conservado, identificado em *Arabidopsis* como um repressor do desenvolvimento regulado pela luz (Wei et al., 1994). Composto por oito subunidades (CSN1-CSN8; Deng et al., 2000), o signalossomo apresenta papel central na via ubiquitina-proteassomo, por sua atividade de isopeptidase, que remove a proteína Rub, uma ubiquitina-like, da subunidade culina de culina-RING E3 ubiquitina ligase (CRL) (Schwechheimer, 2004). A conjugação ou remoção de Rub, denominadas rubilação ou derrubilação, respectivamente, representa um mecanismo importante de regulação da atividade de CRL (Lyapina et al., 2001; Cope e Deshaies, 2003).

A família de proteínas CSN5 é representada em *Arabidopsis* por dois membros, CSN5A e CSN5B (Kwok et al., 1998). Cada membro apresenta uma função distinta no desenvolvimento da planta, sendo que somente um é incorporado de cada vez no complexo CSN, com CSN5A exercendo maior destaque (Gusmaroli et al., 2004). CSN5A apresenta atividade isopeptidase, necessária para derrubilação e é também detectável como um monômero ou em subcomplexos menores (Kwok et al., 1998; Gusmaroli et al., 2007). Sua localização subcelular varia de nuclear, quando associado ao complexo CSN, a nuclear ou citoplasmática quando em sua forma livre (Kwok et al. 1998; Tomoda et al. 2002). Em sua forma monomérica, supõe-se que CSN5A possa exercer função independente do complexo CSN (Stuttman et al., 2009).

Um *hub* funcional bem definido do sistema imune de plantas corresponde a interconexões convergentes para a proteína CSN5A que constitui a subunidade catalítica do complexo COP9 “signalossomo”, um regulador chave de diversos processos celulares básicos.

Consistente com a previsão de que efetores de diferentes patógenos devam interagir com conexões similares na rede de interação planta-patógeno, foi demonstrado independentemente que a proteína efetora C2 de begomovírus interage com a proteína CSN5A (Losano-Durán & Bejanaro, 2011). Além disso, foi também demonstrado que a proteína NIG e NIK1, ambos alvos da proteína NSP de begomovírus, interagem com CNS5A (Machado, 2011, Mukhtar et al., 2011). Esta rede de interações, baseada em interações altamente interconectadas entre proteínas virais e proteínas do hospedeiro e que convergem em um alvo comum, sugere que o “hub” representado por CNS5A pode ser um elemento funcional na interação geminivírus-hospedeiro. Adicionalmente, foi demonstrado que além de interagir com CSN5A, NIG interage com uma proteína de função desconhecida, mas envolvida na formação de corpos subnucleares, designada AtWWP1, codificada pelo locus AT2G4102 (Calil et al., 2018). AtSWWP1 acumula durante a infecção viral e sequestra NIG em corpos nucleares a fim de prevenir sua função proviral que está associada a sua localização citoplasmática. Como proteína de defesa do hospedeiro, seria interessante avaliar se AtWWP1 também interage com o hub imune CNS5A. A caracterização dos componentes dessa rede de interações convergentes que ocorrem entre geminivírus e hospedeiro deve facilitar o nosso entendimento com relação à estratégia de virulência de geminivírus bem como mecanismos de defesa da planta para contrapor a infecção viral. Baseado nestas informações, prevê-se que o “hub” representado por CSN5A seja um elemento funcional na interação geminivírus-hospedeiro.

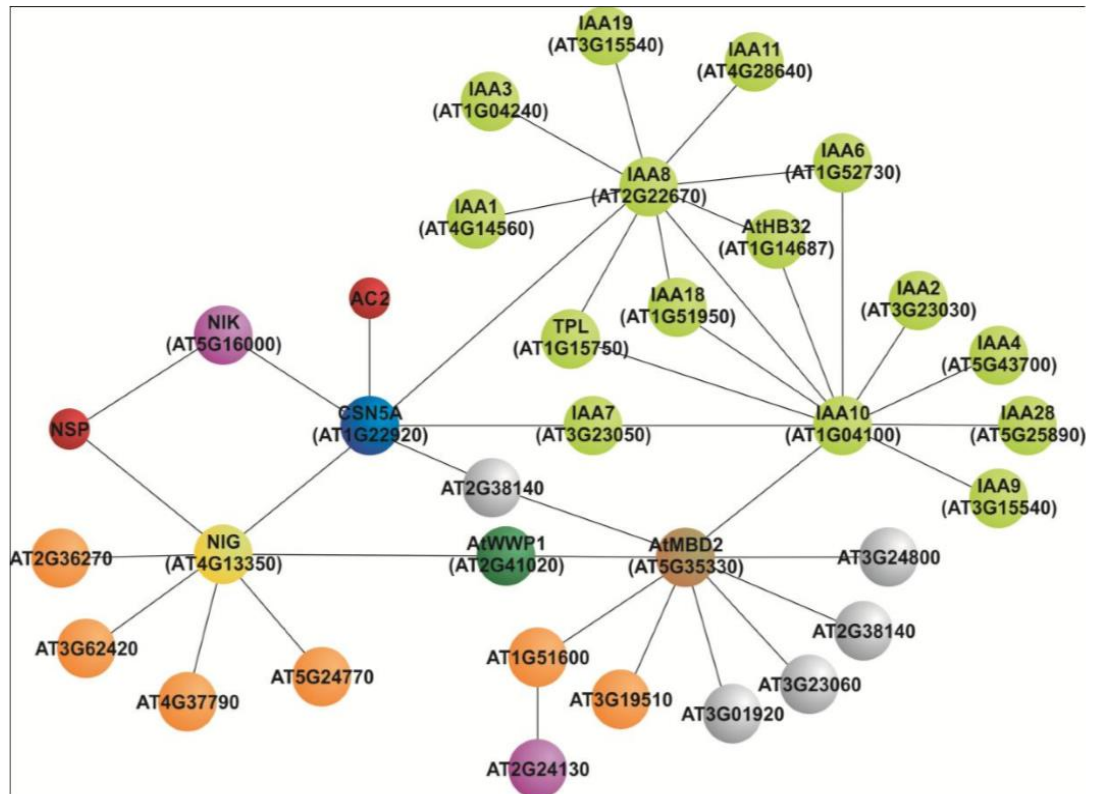


Figura 6: Hub Imune CSN5A; representação de um hub do sistema imune de plantas, sendo um alvo de proteínas virais onde, a proteína CSN5A representada em azul destaca-se por ser um ponto de conversão de várias interconexões.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Plasmídeos recombinantes

Os clones pUFV3177 (AD-ATAF2), pUFV3356 (AD-MP) e pUFV2213 (AD-AC2), contendo, respectivamente as regiões codificadoras de *ATAF2*, *MP* e *AC2* fusionadas ao domínio de ativação (AD) de *GAL-4*, e pUFV3329 (BD-ANAC36) e pUFV3178 (BD-ATAF2) com a região codificadora de ANAC36 e ATAF2 respectivamente fusionadas ao domínio de ligação (BD) de *GAL4* foram previamente obtidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas/Bioagro/UFV e disponibilizados para ensaios de mono e duplo híbrido em leveduras. Similarmente, o clone BD-CSN5A (pUFV1472), que expressa *CSN5A* fusionada ao domínio BD de *GAL4* (Machado 2011) e AD-AtWWP1 (pUFV1483) que expressa AtWWP1 fusionada ao AD de *GAL4* (Calil et al., 2018), além de BD-NSP (Fontes et al., 2004) BD-NRP1 (pUFV3172) que expressam os respectivos insertos fusionados ao domínio BD de *GAL-4* foram previamente obtidos. Para realização de ensaios de expressão transiente de *Nicotiana benthamiana*, o cDNA de ATAF2 foi fusionado ao C-terminal de GFP (green fluorescent

protein) no vetor pK7FWG2 gerando pK7F-ATAF2 previamente obtido e disponibilizado pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas/ Bioagro. O clone 35S:AtWWP1-mCherry (pUFV217) que expressa AtWWP1 fusionada a mCherry foi previamente descrito em Calil et al. (2018). Para experimentos de coimunoprecipitação o cDNA de AtWWP1 foram inseridos, pelo sistema triplo Gateway (Invitrogen), no vetor de destino pK7m34GW juntamente com o promotor 2X35S e, com a cauda 6XHA (Hemaglutinina), obtendo o clone 2X35S-AtWWP1-6HA-pK7m34GW (pUFV 1948), descrito em Calil et al. (2018). Para o ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BIFC), os cDNAs de CSN5A e AtWWP1 foram transferidos do vetor de entrada para os vetores contendo as porções N-terminal (SPY-NE) e C-terminal (SPY-CE) de YFP (yellow fluorescent protein), produzindo os clones pSPYNE-CSN5A (pUFV1648), pSPYNE-AtWWP1(pUFV1650), pSPYCE-CSN5A (pUFV1649) e pSPYCE-AtWWP1(PUFV1651), respectivamente, descritos em Calil et al., 2018.

Também para o ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BIFC), foram previamente obtidas as seguintes construções testadas nas combinações: ANAC36-SPYCE (pUFV3326.1) e ATAF2-SPYNE (pUFV3170); ANAC36-SPYNE (pUFV3326.2) e ATAF2-SPYCE (pUFV3171); GmNAC81-SPYCE (pUFV1731; Mendes et al., 2013) e ATAF2-SPYNE (pUFV3170); GmNAC81-SPYNE (pUFV1730; Mendes et al., 2013) e ATAF2-SPYCE (pUFV3171); GmNAC81-SPYCE (pUFV1731) e ATAF1-SPYNE (pUFV3118); GmNAC81-SPYNE (pUFV1730) e ATAF1-SPYCE (pUFV3117).

Os referidos clones foram propagados em *Escherichia coli*, estirpe DH5 α . *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV3101, foi transformada, por eletroporação, com as construções destinadas à expressão em plantas (Sambrook et al., 1989).

3.1.1. Clonagem de At4g14560 em vetores de expressão em levedura.

O gene At4g14560 foi amplificado a partir de cDNA de *Arabidopsis* utilizando os oligonucleotídeos At4g14560-Fwd/At4g14560-NS-Rvs, respectivamente, adaptados ao sistema Gateway® cloning technology (Invitrogen) (Tabela 4). Procederam-se a duas reações sequenciais de PCR (30 ciclos - volume final de 25 μ L e 50 μ L, respectivamente) contendo 1 μ L de cDNA (~200 ng), 1 μ L de oligonucleotídeo fwd (10 μ M), 1 μ L de oligonucleotídeo rvs (10 μ M), 4 μ L de dNTPs (2,5 mM), 5 μ L de tampão da enzima 10X, 4 μ L de MgSO₄ (50 mM) e 0,2 μ L de enzima Platinum Taq High Fidelity polymerase (Invitrogen) (2 U). As reações

consistiram em amplificação da ORF utilizando oligonucleotídeos específicos na primeira etapa e inserção das regiões de recombinação sítio dirigida attB1 e attB2 na segunda etapa. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação de cada ORF encontram-se descritos na Tabela 4. Após amplificação, os insertos foram purificados diretamente do gel de agarose utilizando o kit QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN) e inseridos em vetores de entrada pDONR 201®/pDONR 221® e pDONR 207® (Invitrogen), com (St) ou sem (Ns) códon de terminação de tradução por meio de recombinação sítio dirigida utilizando a enzima BP Clonase (Invitrogen). Os produtos da reação de recombinação foram transformados em células de *E. coli* linhagem DH5 α eletrocompetentes e os transformantes selecionados em meio LB-ágar suplementado com canamicina (para o vetor pDONR201) ou gentamicina (para o vetor pDONR207), nas concentrações de 100 μ M e 20 μ M, respectivamente. Os DNAs plasmidiais das colônias positivas foram extraídos utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) e enviados para sequenciamento automatizado de Sanger para a confirmação da identidade dos clones. Os clones resultantes foram; At4g14560-st-pDON201 (pUFV 3395.1), At4g14560-st-pDON207 (pUFV 3395.2), contendo o códon de terminação, e At4g14560-ns-pDON201 (pUFV 3396.1), At4g14560-ns-pDON207 (pUFV 3396.2), sem o códon de terminação. Posteriormente, a região codificadora de At4g14560 foi transferida para o vetor de expressão em levedura pDEST 32 (Invitrogen), que permite a expressão da proteína de interesse fusionada ao domínio de ligação ao DNA (BD) do transfator GAL4. Esta clonagem foi feita por meio da reação catalisada pela enzima LR clonase (Invitrogen), gerando At4g14560-pDEST32 (pUFV 3397). A região codificadora de At4g14560 também foi transferida do vetor de entrada para pAD, resultando em At4g14560-pDEST22 (pUFV 3398). O vetor pDEST22 permite a expressão de proteínas fusionadas ao domínio de ativação (AD) de GAL4. Os DNAs dos clones obtidos foram utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli*, estirpe DH5 α , pelo método do choque térmico ou de eletroporação (Sambrook et al., 1989).

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados em reação de qRT-PCR

Primer	Sequência 5' – 3'	Gene
AT4G14560 Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAAGTCCAATGGGC	AT4G14560
AT4G14560NS Rvs	AGAAAGCTGGGTCTAAGGCAGTAGGAGCTTCG	AT4G14560
AT4G14560Rvs	AGAAAGCTGGGTCTCATAAGGCAGTAGGAGCTTCG	AT4G14560
AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Clonagem Gateway
AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Clonagem Gateway
3397 Fwd	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC	pDONR201 e 207
3398 Rvs	TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	pDONR201 e 207
DEST32 Fwd	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG	pDEST32
DEST22 Fwd	TATAACGCGTTTGGAACTACT	pDEST22
DEST22 Rvs	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC	pDEST22
4799 Rvs	CGCCCTCGCCCTCGCCGGACAC	GFP
MC36 Fwd	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC	35S

3.2 Ensaio de duplo híbrido.

Os ensaios de duplo-híbrido foram realizados conforme descrito anteriormente (Florentino *et al.*, 2006). Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* da estirpe repórter AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal 80 Δ , LYS2::GAL1UAS10 GAL1TATA-HIS3, MEL1 GAL2UAS-GAL2TATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ) que é deficiente na produção de leucina, triptofano e histidina (Trp-, Leu-,

His-) e que contém os genes repórteres *LacZ* e *HIS3*, foram crescidas em 5 mL de meio YPD-A por 16 horas (O.D._{600nm}= 0,5-1,0) a 28°C. As células então foram centrifugadas a 3000 x g por 4 minutos, lavadas com 1 mL de água ultrapura, novamente centrifugadas a 3000 x g por 4 minutos e ressuspensas em 1 mL de acetato de lítio 100 mM. As células foram transformadas com os DNAs plasmidiais utilizando-se o método de transformação com acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG). Para cada transformação, foram adicionados às células, 240 µL de polietilenoglicol 50% (p/v; PEG, MW 3350), 36 µL de acetato de lítio 1 M, 25 µL de ssDNA (DNA transportador de de esperma de salmão) 2 µg/µL e 50 µL de solução contendo entre 2-5 µg de cada uma das construções de interesse. As células foram então homogeneizadas e incubadas inicialmente a 30°C por 30 minutos, e, em seguida, a 42°C por 20 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 8000 x g por 15 segundos, e lavadas com 1 mL de água ultrapura. As células foram plaqueadas em meio seletivo e mantidas a 28°C por três dias. Para a seleção dos duplo-transformantes, as células foram plaqueadas em meio deficiente em leucina e triptofano (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp). Para a detecção da interação entre proteínas, as células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo com deficiência em leucina, triptofano e histidina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp, -His) e em meio com deficiência dos mesmos aminoácidos, porém suplementado com 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mM de 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole; Sigma).

3.3 Expressão transiente em folhas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltração

Culturas de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 carreando as construções de DNA de interesse: pK7F-ATAF2 e 35S:AtWWP1-mCherry foram crescidas em meio Rhizo, contendo os antibióticos adequados, a 37°C por 16 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2500 x g por 5 minutos e lavadas duas vezes com tampão de agroinfiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, pH 5,6 e acetoseringona 100 µM). Em seguida, as células foram diluídas em tampão de infiltração para uma O.D._{600nm}= 0,3 e infiltradas em folhas jovens de *N. benthamiana*, utilizando seringas estéreis, gentilmente pressionadas sobre a face abaxial da epiderme foliar. A localização subcelular das proteínas recombinantes foi analisada por microscopia confocal.

3.4 Ensaio de complementação de fluorescência bimolecular BiFC

Com a finalidade de verificar a interação *in vivo* entre ATAF2 e ANAC36; ATAF2 e GmNAC81 e ATAF1 e GmNAC81 folhas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas com as seguintes combinações de plasmídeos recombinantes: ANAC36-SPYCE + ATAF2-SPYNE; ANAC36-SPYNE + ATAF2-SPYCE; GmNAC81-SPYCE + ATAF2-SPYNE; GmNAC81-SPYNE + ATAF2-SPYCE; GmNAC81-SPYCE + ATAF1-SPYNE; GmNAC81-SPYNE + ATAF1-SPYCE e seus devidos controles. Após 72 horas de incubação, fragmentos das folhas foram analisados em microscopia confocal, sendo a fluorescência do YFP avaliada com excitação a 514nm, utilizando laser de argônio com emissão a 560-615nm

Com a finalidade de verificar a interação *in vivo* entre AtWWP1 e CSN5A, folhas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas com as combinações dos plasmídeos: pSPYNE-AtWWP1 + pSPYCE-CSN5A; pSPYCE-AtWWP1 + pSPYNE-CSN5A; e seus devidos controles. Após 72 horas, fragmentos das folhas foram analisados em microscopia confocal, sendo a fluorescência do YFP avaliada com excitação a 514nm, utilizando laser de argônio com emissão a 560-615nm.

3.5 Ensaio de Co-immunoprecipitação

A fim de verificar a interação *in vivo* entre AtWWP1 e CSN5A foi realizado o ensaio de coimunoprecipitação utilizando se o kit μ MACSTM Epitope tag Protein Isolation (MACS/Miltenyi Biotec). Folhas de plantas jovens foram agroinfiltradas com as construções CSN5A-GFP + AtWWP1-6HA, além dos controles. Após 72 horas, as folhas foram maceradas em 1mL do tampão de lise [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, Nonidet P-40 1% (v/v)] para obtenção do extrato protéico, o qual foi normalizado para 1.5 mg/mL (Bradford_BIO-RAD) e incubado por 2 horas com beads anti-GFP (MACS/Miltenyi Biotec) a 4°C, sob agitação. As beads foram recolhidas em coluna magnética, conforme instruções do fabricante. Após a lavagem da coluna, as proteínas foram eluídas com 50 μ L do tampão de eluição previamente aquecido a 95°C, resolvidos por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nylon e detectadas utilizando anticorpos anti-HA e anti-GFP.

3.6 Localização subcelular de proteínas

As construções de DNA pUFV3151 ou pUFV2179, contendo a respectivamente a ORF clonada do gene *ATAF2* ou *AtWWP1* no vetor binário de expressão pk7FWG2/pEarleygate103 e m-Cherry foram utilizadas para a transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV3101 eletrocompetentes, conforme descrito no item 3.3. Em seguida, folhas de *Nicotiana benthamiana* com 3 a 4 semanas foram co-infiltradas com GV3101 transformada com pGFP-AtATAF2 e AtWWP1-m-Cherry juntamente com GV3101 transformada com 2x35S::WWP1-mCherry (pUFV2179 – CALIL, 2017), um marcador de núcleo. O procedimento de infiltração foi realizado conforme descrito por Carvalho *et al.* 2008. Após 3 dias da inoculação, segmentos foliares de aproximadamente 0,5 cm² foram excisados das folhas infiltradas, depositados em lâminas de vidro para microscopia, cobertos com água deionizada e observados ao microscópio confocal de varredura laser Zeiss LSM510 META. A excitação do GFP foi a 488 nm e a emissão foi detectada usando um filtro de 500-530 nm. Para o mCherry a excitação foi em 540 nm e a emissão de 608-680nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATAF2 de Arabidopsis é provavelmente ortólogo de GmNAC30 na via de sinalização de morte celular mediada por NRPs

GmNAC30 é um fator de transcrição do tipo NAC pertencente a subfamília SNAC-A, que inclui membros responsivos a múltiplos estresses. Foi demonstrado por análises *in silico*, que existem homólogos de GmNAC30 em várias espécies vegetais, demonstrando a importância desse fator de transcrição e da via na qual ele está envolvido (Melo et al. 2018). O gene *GmNAC30* tem sido caracterizado como um componente da via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRPs em soja, mas cujo ortólogo em Arabidopsis ainda não foi determinado. Na superfamília de proteínas NACs, GmNAC30 pertence à subfamília SNAC-A, sendo mais relacionado a ATAF1 e ATAF2. Estudos prévios demonstraram que ATAF1 não possui propriedades bioquímicas e genéticas consistentes com sua função como ortólogo de GmNAC30 (Caetano, 2018).

Com a finalidade de identificar o ortólogo de GmNAC30 em Arabidopsis, foram conduzidos ensaios funcionais com o gene ATAF2, baseando-se nas propriedades funcionais de GmNAC30, como (i) localização nuclear, (ii) capacidade de ativar transcrição em leveduras,

(iii) capacidade de interagir com GmNAC81 e, como consequência, (iv) capacidade de interagir com ANAC36, o ortólogo de GmNAC81 em *Arabidopsis*.

4.1.1 ATAF2 é uma proteína nuclear

A localização subcelular de foi determinada por microscopia confocal. ATAF2-GFP, quando expresso transientemente em folhas de *Nicotiana benthamiana* e avaliado por microscopia confocal, localiza-se no núcleo (Figura 7). De fato, a fluorescência pela expressão da proteína recombinante se concentra no núcleo, já que colocaliza com o marcador nuclear AtWWP1-mCherry pela sobreposição de imagens (veja painel “merged”). Esse fator de transcrição, diferentemente dos outros componentes do grupo SNAC-A (ATAF), tem sido associado principalmente a respostas a estresses bióticos. Estudos prévios fornecem evidências de que esse fator de transcrição possa estar atuando também nos mecanismos de defesa de plantas em resposta a estresses abióticos, como destaque da importância e abrangência da ação dos fatores de transcrição que compõem o subgrupo SNAC-A.

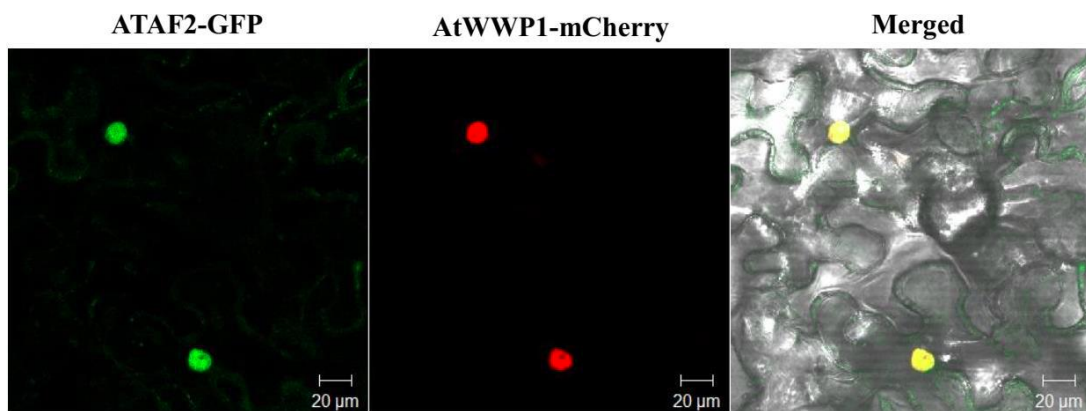


Figura 7. A proteína ATAF2 é localizada no núcleo. Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* contendo as construções de DNA expressando a proteína ATF2 fusionada a GFP e o marcador nuclear AtWWP1 fusionado a mCherry, sob o controle do promotor 35S. Após 72 h da agroinfiltração, as proteínas foram visualizadas por microscopia confocal. Merged é a sobreposição das duas imagens sob luz branca. Escala de barras, 20 µM

4.1.2 ATAF2 exibe atividade transcricional similar a GmNAC30

A superfamília das proteínas NACs em plantas possuem componentes que exibem atividade transcricional e aqueles que não são capazes de ativar a transcrição de um gene alvo e, portanto, dependem de heterodimerização com outros fatores de ativação de transcrição para exercer o controle da expressão gênica (Pinheiro et al., 2009). Exemplos típicos seriam os

fatores de transcrição GmNAC81, que não possui atividade transcricional em leveduras, e GmNAC30 capaz de ativar a transcrição de um gene repórter quando fusionado ao domínio de ligação de GAL4 (Faria et al., 2011; Mendes et al., 2013; Figura 7B). Assim como GmNAC81, foi demonstrado que seu ortólogo em Arabidopsis, ANAC36, não exibe atividade transcricional em leveduras, pois não foi capaz de ativar o gene repórter do Sistema mono- híbrido quando fusionado ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 (Figura 8A). Consequentemente, expressão de BD-ANAC36 nao promoveu a capacidade de leveduras de crescer em meio seletivo sem histidina e suplementado com 3AT. Em contraste, ATAF2 exibiu atividade transcricional em leveduras pois a expressão de BD-ATAF2 promoveu prototrofia à histidina. Estes resultados confirmam que ANAC36 é ortólogo de GmNAC81 e demonstram que ATAF2, como GmNAC30, exibe atividade transcricional em leveduras.

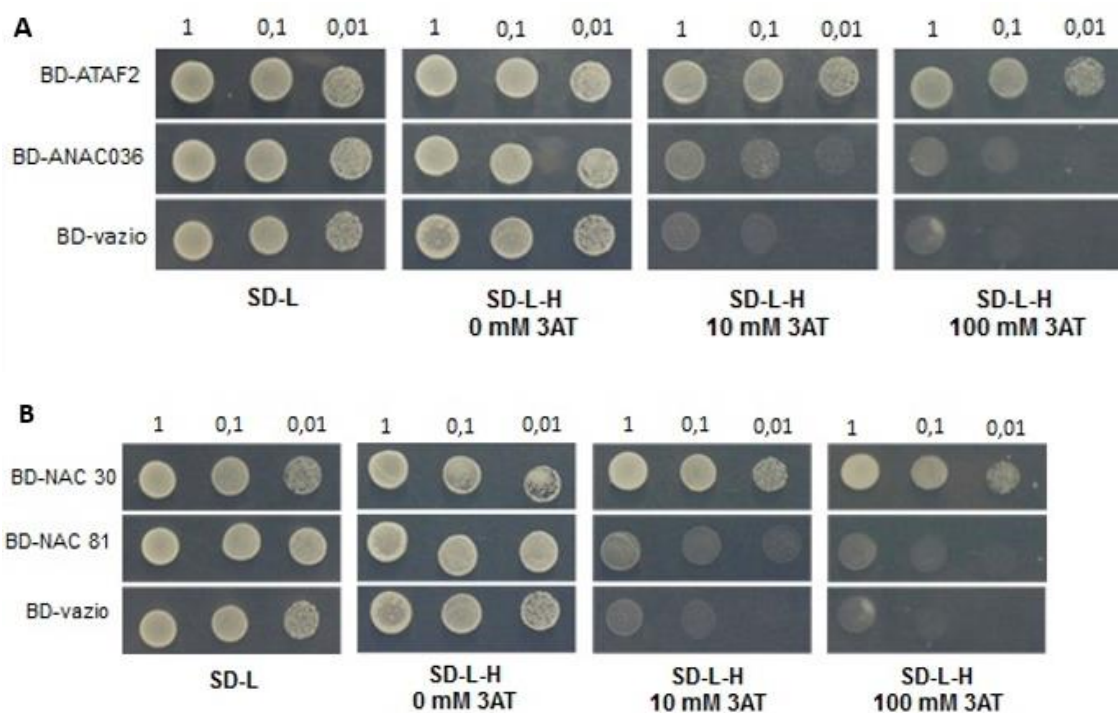


Figura 8. ATAF2 exibe atividade transcricional similar a GmNAC30. A ATAF2, mas não o ortólogo de GmNAC81, ANAC36, exibe atividade transcricional em leveduras. As regiões codificadoras dos genes de Arabidopsis, ATAF2 e ANAC36, foram fusionadas no domínio de ligação de GAL4 (BD) e a atividade transcricional das proteínas recombinantes analisadas pelo sistema mono-híbrido de leveduras. B. GmNAC30, mas não GmNAC81, exibe atividade transcricional em leveduras. Os referidos genes foram fusionados a BD e o ensaio de atividade transcricional conduzido pelo sistema mono-híbrido em leveduras.

4.1.3 ATAF2 interage com ANAC36 e GmNAC81 em leveduras e *in vivo*.

Considerando que GmNAC30 interage com GmNAC81 para ativar a expressão do gene *VPE* e que ANAC36 é o ortólogo de GmNAC81 em Arabidopsis, foi importante avaliar se ATAF2 interagia com ANAC36. Já foi demonstrado anteriormente por duplo-híbrido que

ATAF1 não interage com ANAC36 (Caetano, 2018). Nesta investigação, foi analisado por duplo-híbrido (Figura 9) e por BiFC (Figura 10) a possível interação entre ATAF2 e ANAC36.

A expressão da proteína ATAF2 fusionada a AD em leveduras co-transformadas com a construção BD-ANAC36 promoveu o seu crescimento em meio deficiente de histidina e suplementado com concentração 25 mM de 3AT (Figura 9). Embora tenha sido observado crescimento dos controles negativos, AD-ATAF2 e BD-NC36 com os vetores vazios, em meio deficiente de Leu-Trip e His, o crescimento foi interrompido pela suplementação do meio com 3AT, indicando especificidade da interação entre AD-ATAF2 e BD-ANAC6. Uma vez que ATAF2 possui atividade de regulação transcricional em leveduras, os reversos das construções não puderam ser avaliados.

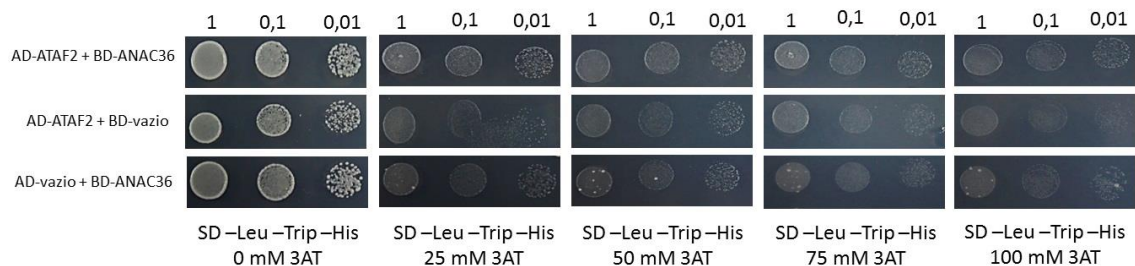


Figura 9. Interações entre as proteínas ATAF2 e ANAC36 em leveduras. Leveduras foram transformadas com os vetores duplo-híbrido expressando ATAF2 fusionada a AD e ANAC36 fusionadas a BD. A interação entre as proteínas recombinantes foi avaliada pelo fenótipo prototrofia à histidina. Adicionou-se 3AT nas concentrações indicadas. Os controles negativos consistiram na expressão de vetores vazios em diferentes combinações, conforme indicado na figura.

A interação entre ATAF2 e ANAC36 também foi avaliada *in vivo* por BiFC (Figura 10). *Agrobacterium tumefaciens* carregando as combinações das construções de ATAF2 e ANAC36 fusionadas às porções N-terminal e C-terminal não-fluorescentes, da proteína fluorescente (YFP) foram agroinoculadas em folhas de *N. benthamina*, analisados em microscopia confocal. A fluorescência emitida por YFP foi reconstituída no núcleo de células coexpressando ATAF2-SPYNE e ANAC36-SPYCE e em folhas coexpressando ATAF2-SPYCE e ANAC36-SPYNE (Figura 10). Não se detectou fluorescência quando ATAF2 e ANAC36 foram coinfiltradas com o vetor complementar vazio. Estes resultados confirmam que a interação entre ATAF2 e ANAC36 detectada em leveduras por duplo-híbrido (Figura 9) ocorre *in vivo* no núcleo das células transfectadas (Figura 10). Como ortólogo de GmNAC81 na via de morte celular mediada por DCD/NRPS, a expectativa é que ANAC36 forme um complexo com o ortólogo de GmNAC30 de Arabidopsis, no caso ATAF2.

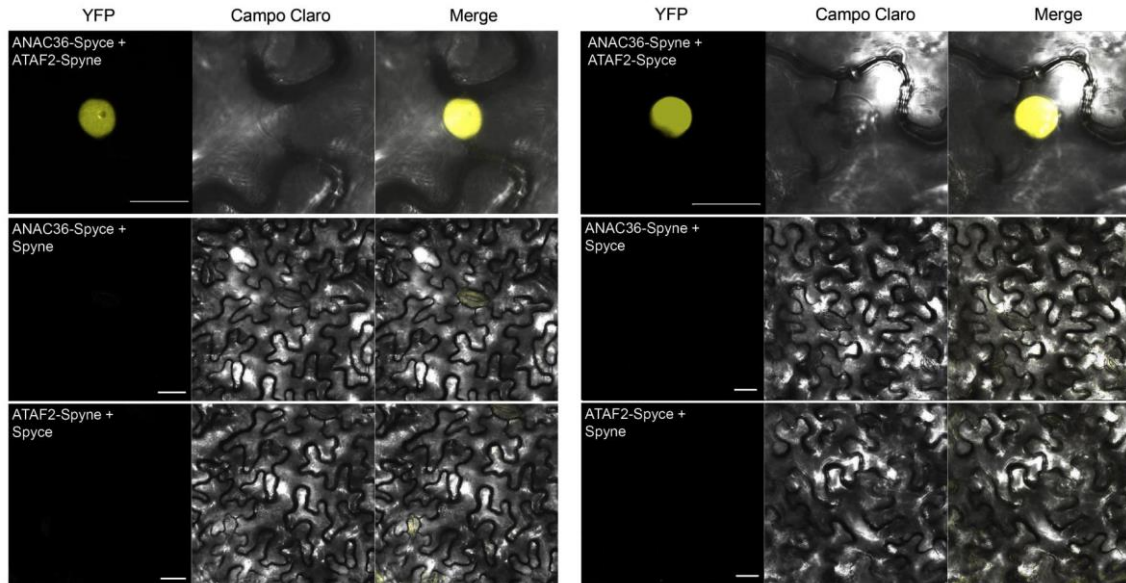


Figura 10. ATAF2 interage com ANAC36 *in vivo*. Células de folhas de *N. benthamiana* expressando ATAF2 e ANAC32 fusionadas ao carboxi-terminal (c-YFP) ou ao amino terminal (n-YFP) de YFP (painéis superiores) ou em combinação com os vetores vazios (painéis inferiores) foram visualizadas por microscopia confocal, 72-h após a agroinfiltração.

Para confirmar ATAF2 como ortólogo de GmNAC30, foi avaliado se ATAF2 pode substituir GmNAC30 na interação com GmNAC81. A possível interação entre ATAF2 e GmNAC81 foi avaliada por BiFC (Figura 11). A fluorescência de YFP foi reconstituído no núcleo de células expressando as construções de ATAF2 e GmNAC81 fusionadas ao C-terminal e N-terminal de YFP, mas não em combinações dessas construções com o vetor vazio. Também foi confirmado por BiFC que ATAF1 não interage com GmNAC81 *in vivo* (Figura 12) e, portanto, não funciona com ortólogo de GmNAC30 na via de sinalização de morte celular por DCD/NRPs. Coletivamente, estes resultados sugerem que, embora os membros da subfamília SNAC-A, que engloba GmNAC30 em soja, ATAF2 e ATAF1 em Arabidopsis, sejam altamente conservados, eles exibem especificidade funcional, sendo ATAF2 o provável ortólogo de GmNAC30 na via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRPs.

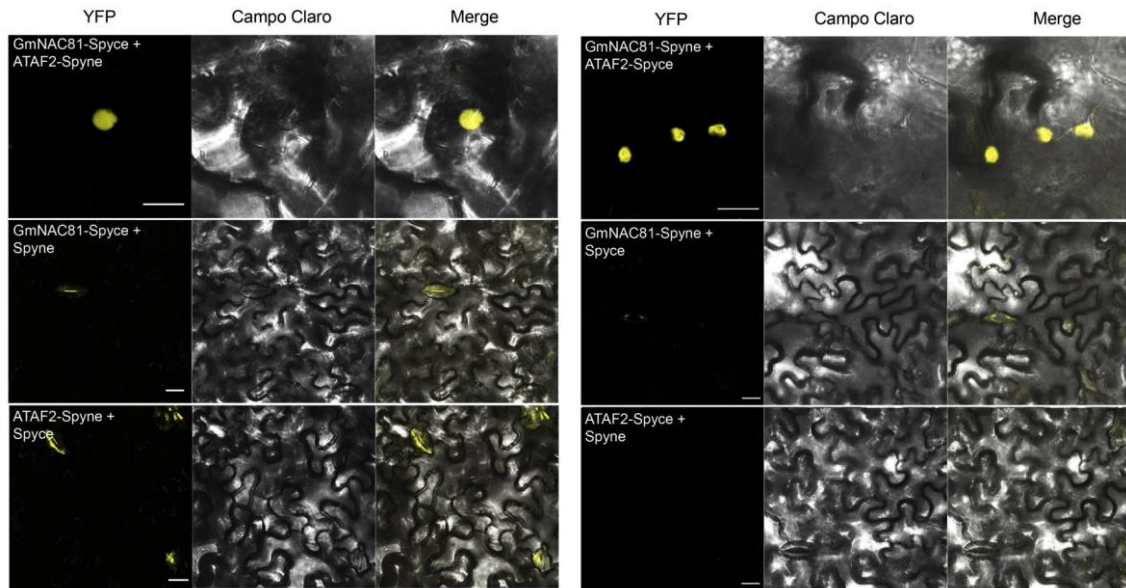


Figura 11. ATAF2 interage com GmNAC81 in vivo. Células de folhas de *N. benthamiana* expressando ATAF2 e GmNAC81 fusionadas ao carboxi-terminal (c-YFP) ou ao amino terminal (n-YFP) de YFP (painéis superiores) ou em combinação com os vetores vazios (painéis inferiores) foram visualizadas por microscopia confocal, 72-h após a agroinfiltração.

4.2 Ensaios de duplo híbrido confirmam interação de NSP e MP com AT4G14560.1 (IAA1), mas não confirmam a interação AC2 com NRP1

O escrutínio de um arranjo de proteínas contendo 4000 ORFs de Arabidopsis sintetizadas in vitro, utilizando as proteínas virais NSP e MP como isca, identificou 35 proteínas que interagem com ambas as proteínas virais, cinco proteínas do hospedeiro que interagem especificamente com MP e outras cinco proteínas que interagem especificamente com NSP (Gouveia-Mageste et al., 2011). Entre elas, apenas a interação de NSP com a proteína NISP foi confirmada por outros ensaios de interação proteína-proteína. Consequentemente, é absolutamente importante que outras interações detectadas sejam confirmadas a fim de validar esta tecnologia de amplo espectro genômico. Assim sendo, a proteína codificada pelo locus AT4G14560 que interage com MP e NSP foi selecionada para validação dessas interações por duplo híbrido baseado em dois critérios. O primeiro se refere à detecção de interação da proteína com as duas proteínas virais MP e NSP independentemente, o que pode significar que AT4G14560 representa um convergente “hub” para interações de diferentes proteínas virais. O segundo critério foi baseado na observação de que AT4G14560 forma um hub enriquecido de proteínas envolvidas na sinalização de auxina, que já foi demonstrado ser um alvo durante infecções por vírus (Padmanabhan et al., 2008). A análise filogenética da família das proteínas IAA indica que alta porcentagem de membros dessa família (em vermelho) foram identificados

nos hubs de interação com as proteínas virais NSP e MP (Figura 13), o que implica a sinalização por auxina como um ponto de interação funcional durante a infecção por begomovírus.

O Locus AT4G14560 codifica uma proteína envolvida na sinalização de auxina, sendo também designada RESISTENTE A AUXINA 5, AXR5, IAA1, ÁCIDO INDOLE-3-ACÉTICO INDUTIVO 1. O gene *IAA1* é induzido por auxina (ácido indol-3-acético) e codifica uma proteína nuclear reguladora de transcrição que exibe baixa estabilidade. O mRNA é móvel de célula a célula. Como fator de transcrição possui atividades de regulação de transcrição e de ligação de DNA, além de um domínio de ligação às proteínas idênticas. É expressa no carpelo, folha, cotilédono, flor, pedicelo da flor, célula guarda, hipocótilo, meristema de inflorescência, pólen, raiz, sépala, haste e nervura foliar.

Para confirmar a interação de AT4G14560 com MP e NSP, foi utilizado o sistema duplo-híbrido em leveduras (Figuras 13 e 14).

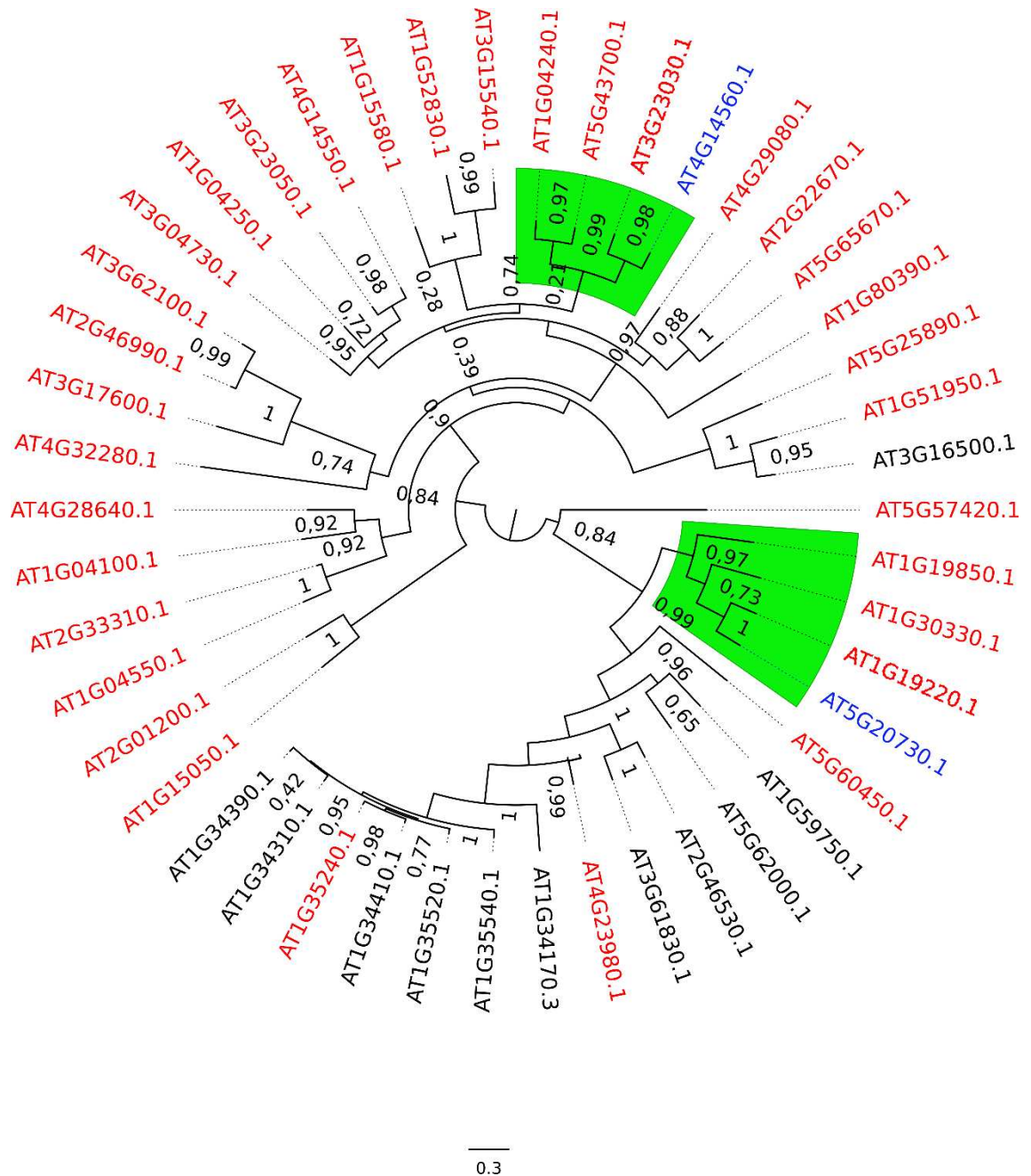


Figura 12. Árvore Filogenética dos genes da família de resposta a auxina (Ácido indol-3-acético). Um dos genes representados em azul refere-se a AT4G14560. Em verde, estão sendo representado dois clados de quatro genes parálogos de AT4G14560 (dessa investigação) e AT5G20730 (como referência). Em vermelho, estão representados os genes que estão presentes nos *hubs* 9, 10 e 11 representados na Figura 4 e Tabelas 1, 2 e 3 de genes responsivos ao Ácido indol-3-Acético.

As proteínas Aux / IAA atuam como repressores transcricionais (Ulmasov et al., 1999). Elas contêm um domínio conservado através do qual podem recrutar co-repressores de da família TOPLESS (TPL) aos promotores (Tiwari et al., 2003; Szemenyei et al., 2008). Por sua vez, os TPLs podem recrutar proteínas de remodelação da cromatina que estabilizam a repressão transcricional (Szemenyei et al., 2008). O Aux / IAAs eles mesmos não ligam o DNA, mas podem dimerizar com fatores de transcrição da resposta AUXIN Família FATOR (ARF).

A dimerização ocorre por meio de Domínios PB1 C-terminais compartilhados por ambas as famílias de proteínas (Guilfoyle, 2015). O domínio PB1 possui um ácido e um superfície de interação básica através da qual a dimerização pode ocorrer. Aux/IAA, parecem ser alvos comuns da estratégia de patógenos. Nas plantas de Arabidopsis, diversos genes são transcricionalmente reprogramados sob a influência da infecção pelo vírus do mosaico do tabaco. Isso é realizado através da interação entre a proteína replicase do vírus do mosaico do tabaco e a proteína Aux / IAA de Arabidopsis, que impedem a localização de Aux / IAA ao núcleo prevenindo sua função de regulação transcricional (Padmanabhan et al., 2008). Pesquisas em Arabidopsis também demonstraram que a presença de patógeno inibe a expressão de genes responsivos a auxinas, bloqueando a degradação da proteína Aux / IAA (Hayashi et al., 2003).

Sob baixas concentrações de auxina, as proteínas Auxin / INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux / IAA) reprimem a atividade dos fatores de transcrição do AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) (Chapman e Estelle, 2009). Existem 29 Aux / IAAs em Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*; Paponov et al., 2008). Sua meia-vida e a medida em que suas meias-vidas se reduzem em resposta a auxina aplicada varia muito (Dreher et al., 2006).

Nas plantas de Arabidopsis, vários genes envolvidos na sinalização e biossíntese de auxinas são reprogramados transcricionalmente sob a influência da infecção por vírus. A família de genes ARF que é uma família de fatores de transcrição modular consiste em vários domínios que permaneceram conservados, apesar de centenas de milhões de anos de evolução (Finet et al., 2012). Quando os níveis de auxina aumentam, uma proteína TIR1 / AFB F-box e uma proteína Aux / IAA se unem para formar o co-receptor da auxina e se ligar diretamente à auxina (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski e Leyser, 2005 ; Chapman e Estelle, 2009). É possível que a interação das proteínas MP e NSP de begomovírus com estes complexos induzidas por auxina seja funcional durante a infecção por geminivirus. Os resultados dessa investigação confirmam pelo menos duas interações proteína-proteína descobertas pelo microarranjo de proteínas, MP-AT4G14560 e NSP-AT4G14560. Estes resultados foram compartilhados no Capítulo “Duarte, C.E.M. and Euclides N. C. Protein-protein interaction via two-hybrid assay in yeast. In: E.P.B. Fontes and K.M. Makinen (Eds.) (Org.). Plant-Virus Interactions Methods in Molecular Biology series, 2023, v. 1, in press. ”

Embora não publicado, foi também demonstrado nos arranjos de proteína que a proteína AC2 interagia com a proteína AtNRP1, ortólogo da proteína de soja DCD/NRPB que, sob estresses abióticos, inicia a cascata de sinalização que resulta em morte celular mediada por

VPE em folhas de soja (Mendes et al., 2013). Consequentemente também foi de interesse confirmar a interação AC2-NRP1 por duplo-híbrido em leveduras.

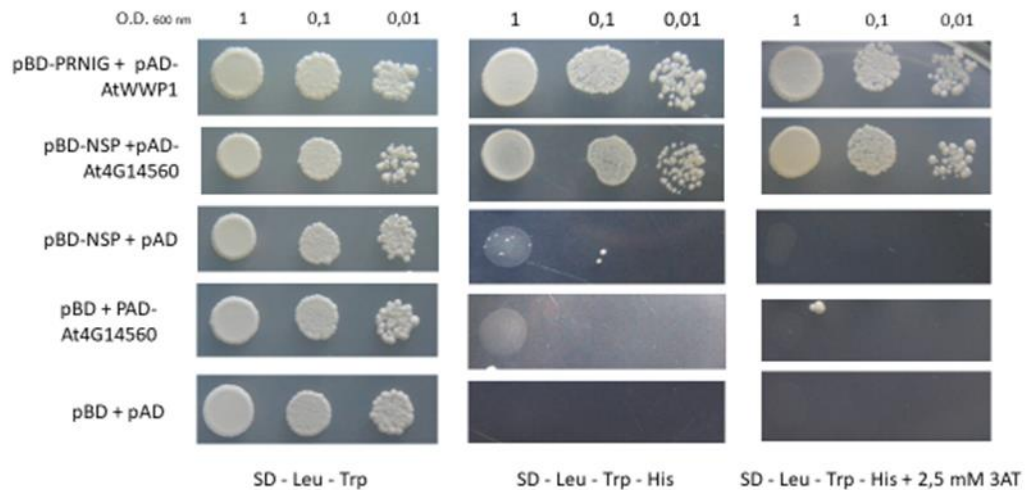


Figura 13. NSP interage especificamente com AT4G14560 pelo duplo híbrido em leveduras. Leveduras foram transformadas com os vetores duplo-híbrido expressando AT4G14560 fusionada a AD e NSP fusionadas a BD. A interação entre as proteínas recombinantes foi avaliada pelo fenótipo prototrofia à histidina. Os controles negativos consistiram na expressão de vetores vazios em diferentes combinações, conforme indicado na figura.

Sendo um fator de transcrição que ativa transcrição de genes repórteres em leveduras quando fusionado ao domínio BD de GAL4, AC2 foi fusionado ao domínio AT de GAL4 e sua interação com NRP1 avaliada por cotransformação de leveduras com BD-NRP1. Entretanto, coexpressão de BD-NRP1 e AD-AC2 não promoveu o crescimento de leveduras em meio deficiente de histidina ou suplementado com 2.5 mM de 3AT, indicando que a interação entre NRP1 e AC2 observado no microarranjo de proteínas pode ser um artefato da técnica. Não se pode atribuir a restrições na conformação das proteínas impostas pela etiqueta como causa da falha de interação entre AD-AC2 e BD-NRP1 em leveduras porque já foi demonstrado que ambas as proteínas recombinantes são capazes de interagir com outras proteínas parceiras em leveduras.

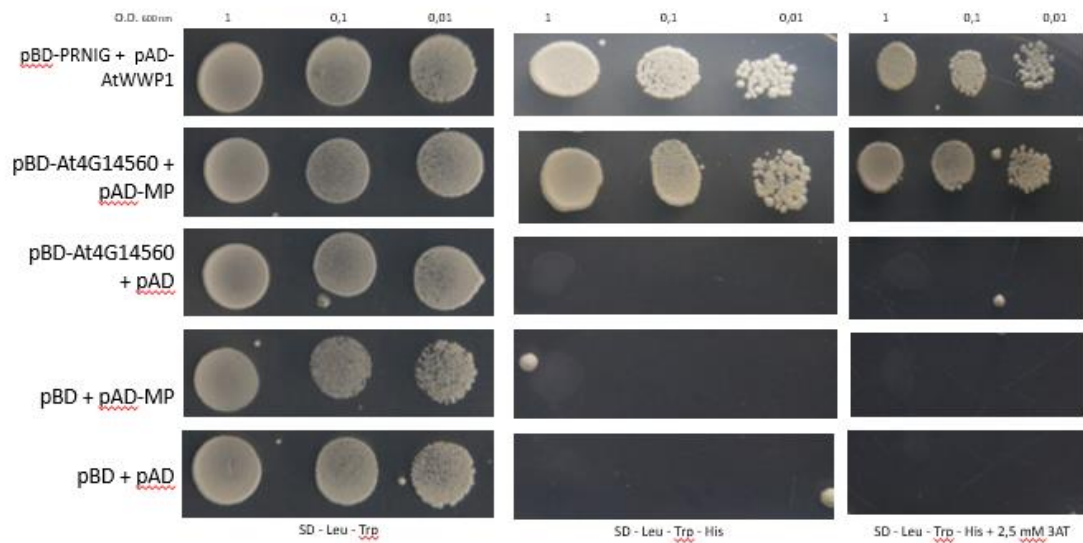


Figura 14. MP interage especificamente com AT4G14560 pelo duplo híbrido em leveduras. Leveduras foram transformadas com os vetores duplo-híbrido expressando AT4G14560 fusionada a BD e MP fusionadas a AD. A interação entre as proteínas recombinantes foi avaliada pelo fenótipo prototrofia à histidina, na presença de 2,5 mM de 3AT. Os controles negativos consistiram na expressão de vetores vazios em diferentes combinações, conforme indicado na figura.

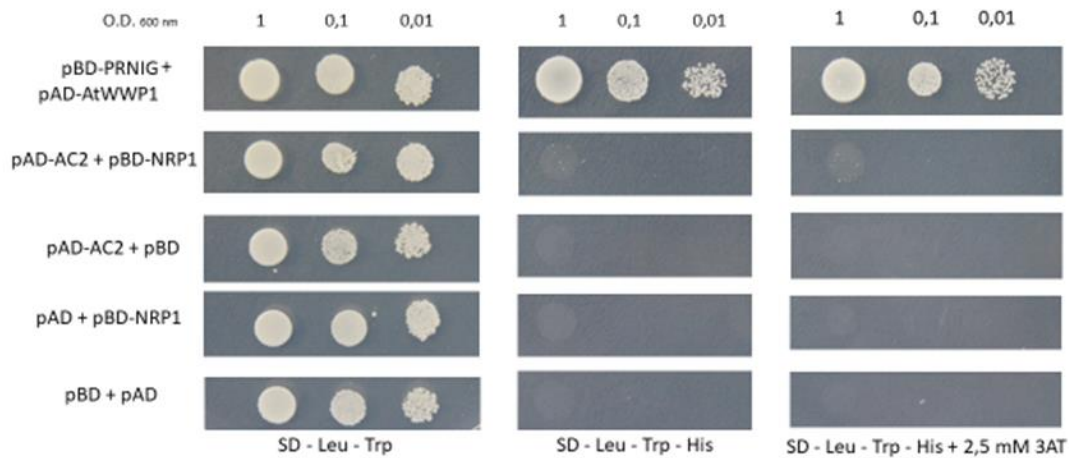


Figura 15. Ensaios de duplo híbrido não confirmam a interação entre NRP1 e a proteína viral AC2. Leveduras foram transformadas com os vetores duplo-híbrido expressando NRP1 fusionada a BD e AC2 fusionadas a AD. A interação entre as proteínas recombinantes foi avaliada pelo fenótipo prototrofia à histidina, na presença de 2,5 mM de 3AT. Os controles negativos consistiram na expressão de vetores vazios em diferentes combinações, conforme indicado na figura.

4.3 O Hub imune CSN5A interage com proteínas de defesa contra geminivírus

4.3.1 At WWP1 liga ao hub imune CSN5A por duplo híbrido

O “hub” imune de interações proteína-proteína convergentes para CSN5A é enriquecido de proteínas de defesa contra patógenos. Consistente com esta observação, a proteína NIK1 que transduz um sinal antiviral contra begomovírus interage diretamente com CSN5A (EPBF, comunicação pessoal; Figura 6). Uma vez que a proteína AtWWP1 também exibe atividade de defesa contra begomovírus e que interage indiretamente com o “hub”CSN5A por meio de interação com NSP (Calil et al., 2018), foi de interesse investigar se AtWWP1 interagia diretamente com CSN5A. Inicialmente, por meio do sistema duplo-híbrido de leveduras, foi examinada a possível interação das proteínas CSN5A e AtWWP1 (Figura 16A). Leveduras co-transformadas com as proteínas CSN5A e AtWWP1, fusionadas aos domínios de ligação ao DNA e ativação da transcrição de GAL4, respectivamente, foram capazes de crescerem em meio seletivo deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, suplementado com 10 mM de 3AT (Figura 16A). Esta interação CSN5A-AtWWP1 foi considerada forte pela estabilidade no meio suplementado por 10mM de 3AT, seguindo o padrão do controle positivo CSN5A-NIG. Além disso, trata-se de uma interação específica porque AtWWP1 e CSN5A não interagiram com os controles negativos, ou seja, os vetores vazios (pAD e pBD).

A interação entre as respectivas proteínas em leveduras foi confirmada pela ativação do gene repórter *LacZ*, diante da co-expressão das duas proteínas fusionadas aos domínios de GAL-4. Para quantificação da atividade de β -galactosidase, codificada pelo gene repórter *LacZ*, foi feito o ensaio de detecção da atividade da enzima e os valores foram comparados pelo teste t ($p < 0,05$) (Figura 16B). A atividade da β -galactosidase foi muito superior em extratos de células de leveduras co-expressando pBD-CSN5A e pAD-AtWWP1 do que em células co-transformadas com a combinação dos controles negativos pBD-CSN5A + pAD; pAD-AtWWP1 + pBD e pAD + pBD (Figura 16B).

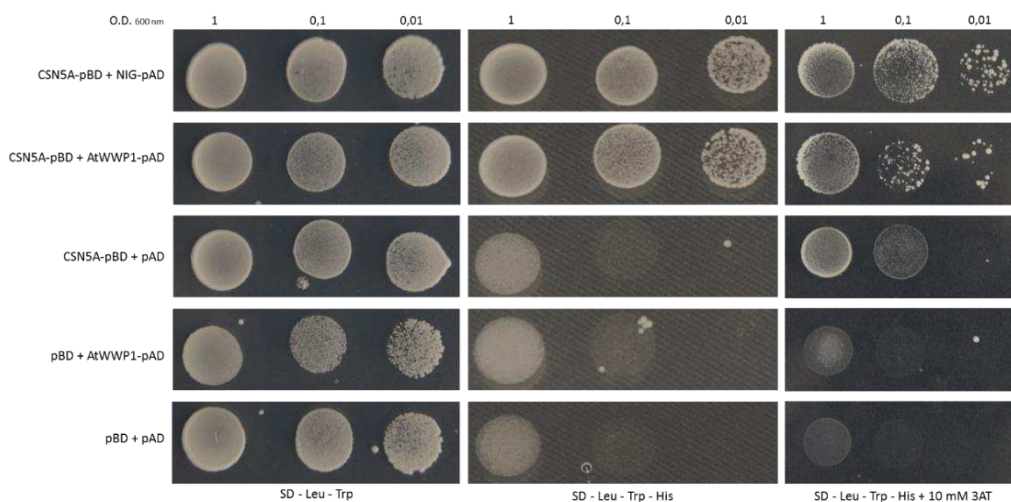


Figura 16-A. AtWWP1 interage com CSN5A por duplo híbrido em leveduras. Leveduras co-transformadas com as construções indicadas foram avaliadas quanto à sua prototrofia à histidina, sendo plaqueadas em meio seletivo deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, suplementado com 10mM de 3AT.

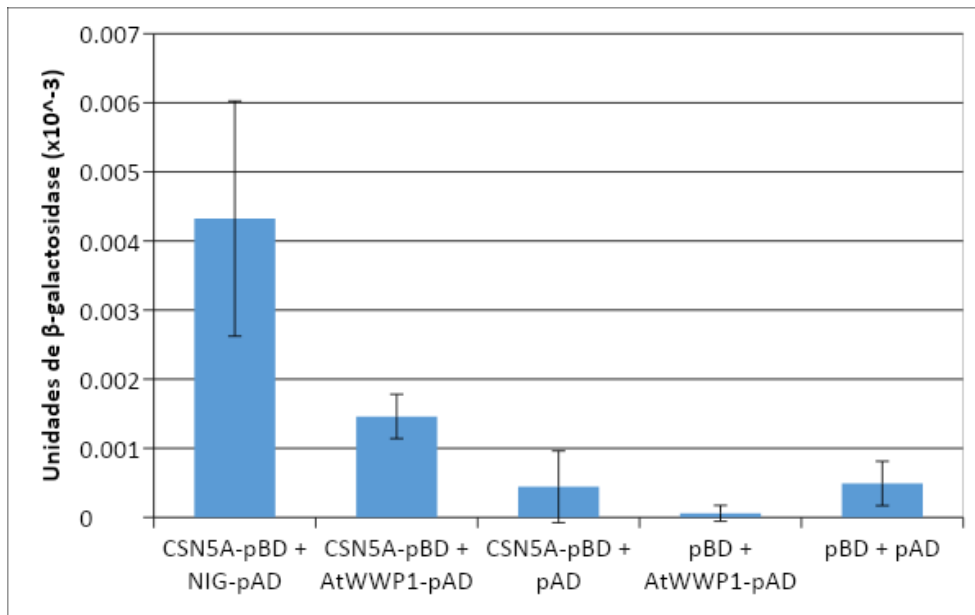


Figura 16-B AtWWP1 interage com CSN5A em leveduras. A quantificação da atividade da enzima β-galactosidase (representada em mL./min) foi utilizada para confirmar as interações entre AtWWP1 e CSN5A em leveduras. As atividades de β-galactosidase resultantes da expressão das combinações indicadas no gráfico foram comparadas pelo teste t, $p < 0,05$, $n=3$.

4.3.2 AtWWP1 liga a CSN5A in vivo

A interação entre as proteínas CSN5A e AtWWP1 foi monitorada *in vivo* por meio dos ensaios de co-immunoprecipitação (Figura 17) e o BiFC (Figura 18). A proteína CSN5A-GFP foi precipitada com anticorpo específico. Anti-GFP. AtWWP1-6HA também foi detectada no imunocomplexo, confirmando que as proteínas interagem *in vivo* (Figura 17). A interação *in vivo* entre CSN5A e AtWWP1 foi também avaliada pelo ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC). Foi observada a reconstituição da fluorescência no núcleo das células co-transformadas com as construções AtWWP1 fusionada ao C-terminal de YFP e CSN5A fusionada ao N-terminal de YFP e vice-versa (Figura 18). Em contrapartida, a fluorescência não foi detectada quando uma das proteínas foi cotransformada com o vetor vazio. Coletivamente, estes resultados indicam que AtWWP1 e CSN5A interagem *in vitro* e *in vivo* e reforça o argumento de que o “hub” representado por CSN5A seja um elemento funcional durante a infecção por begomovírus.

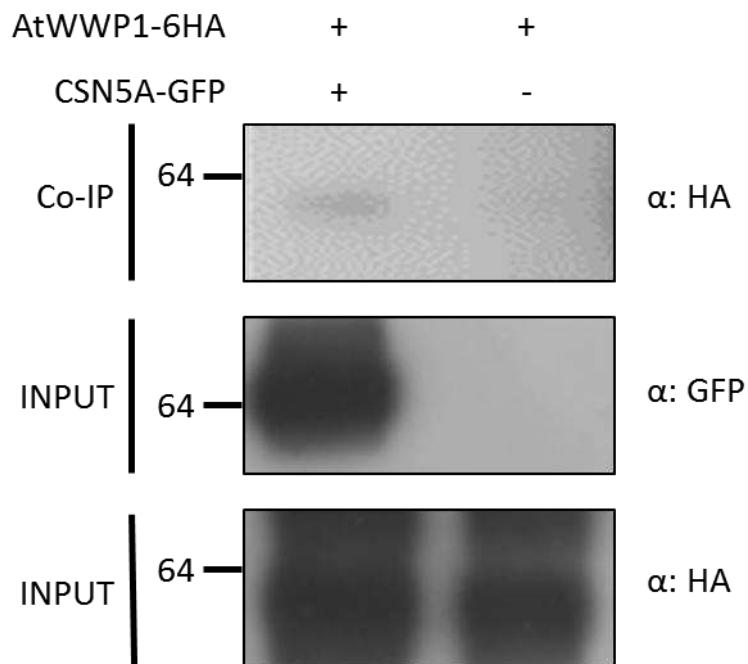


Figura 17. AtWWP1 e CSN5A interagem *in vivo*. Extrato proteico de folhas de *Nicotiana benthamiana* agroinoculadas expressando AtWWP1-6HA e CSN5A-GFP foram preparados e a proteína CSN5A imunoprecipitadas com anti-GFP. Em Co-IP, foi demonstrado que AtWWP1 estava presente no imunocomplexo.

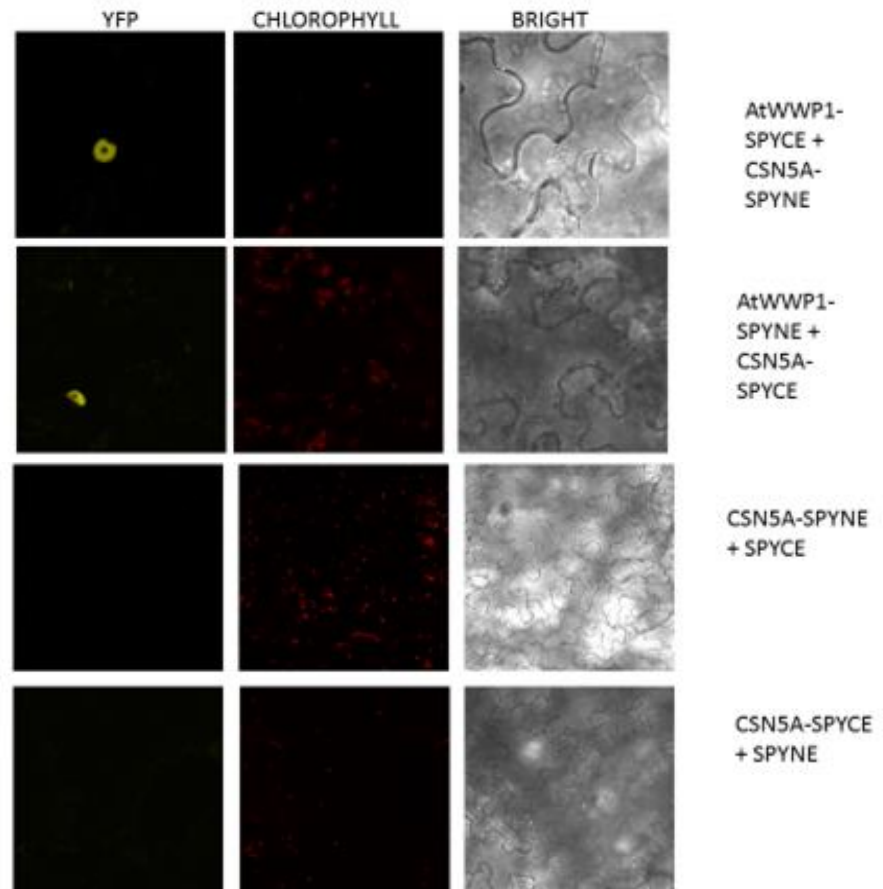


Figura 18. AtWWP1 e CSN5A interagem *in vivo* por BiFC. Células de folhas de *N. benthamiana* expressando AtWWP1 e CSN5A fusionadas ao carboxi-terminal (c-YFP) ou ao amino terminal (n-YFP) de YFP (painéis superiores) ou em combinação com os vetores vazios (painéis inferiores) foram visualizadas por microscopia confocal, 72-h após a agroinfiltração.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberle H.J., Ru'tz M.L., Karayavuz M., Frischmuth S., Wege C., Hu'lsler D., Jeske H. (2002). Localizing BC1 movement proteins of Abutilon mosaic geminivirus in yeasts by subcellular fractionation and freeze-fracture immunolabelling. *Arch Virol* 147: 103–107.
- Alves M.S., Reis P.A.B., Dadalto S.P., Faria J.A.Q.A., Fontes E.P.B.; Fietto L.G. (2011). A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *J. Biol. Chem.*, 286, 20020–20030.
- Biasi L.A. (2002). Reguladores de crescimento vegetal. In: Wachowicz, C.M.; Carvalho, R.I.N. (eds.). *Fisiologia Vegetal: Produção e Pós-colheita*. Curitiba: Editora Champagnat, p.63-94.
- Calil P.I, M.Sc. (2013). Caracterização funcional da proteína AtWWP1, componente de uma interconexão de fatores da interação geminivírus-hospedeiro envolvida na formação de corpos nucleares. 73f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Federal de Viçosa.
- Calil I.P., Quadros I.P.S., Araújo T.C., Duarte C.E.M., Gouveia-Mageste B.C., Silva J.C.F., Brustolini O.J.B., Teixeira R.M., Oliveira C.M., Milagres R.W.M.M., Martins G.S., Chory J., Reis P.A.B., Machado, J.P.B., Fontes E.P.B. (2018). A WW Domain-Containing Protein Forms Immune Nuclear Bodies against Begomoviruses. *Molecular Plant*, 11: 1449-1465.
- Carvalho M.F., Lazarowitz S.G. (2004). Interaction of the movement protein NSP and the Arabidopsis acetyltransferase AtNSI is necessary infection and pathogenicity. *J Virol* 78: 11161–11171.
- Carvalho C.M., Fontenelle M.R., Florentino, L.H., Santos A.A., Zerbini F.M., Fontes E.P.B. (2008a). A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant J* 5: 869–880.
- Carvalho C.M., Machado J.P., Zerbini F.M., Fontes E.P.B. (2008b). NSP-interacting GTPase: a cytosolic protein as cofactor for nuclear shuttle proteins. *Plant Signal Behav* 3: 752–754.
- Carvalho C.M., Santos A.A., Pires S.R., Rocha C.S., Saraiva D.I., Machado J.P.B., Mattos E.C., Fietto L.G., Fontes E.P.B. (2008c). Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathog* 4: e1000247.
- Chapman E.J., Estelle M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics*. 43:265–285.
- Cid, L. P. B.; Teixeira, J. B. (2010). Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). *Cultivo in vitro de Plantas*. Brasília: Embrapa, p. 15-49.
- Citovsky V., Lee L.Y., Vyas S., Glick E., Chen M.H., Vainstein A., Gafni Y., Gelvin S.B., Tzfira T. (2006). Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *J Mol Biol*. 362:1120-31.

- Citovsky V., Gafni Y., Tzfira T. (2008). Localizing protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in planta. *Methods*. 45:196-206.
- Cope, G.A., Deshaies, R.J. (2003). COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell*. 114, 663–671.
- Costa, M.D.L.; Reis, P.A.B.; Valente, M.A.S.; Irsigler, A.S.T.; Carvalho, C.M.; Loureiro, M.E.; Aragão, F.J.L.; Boston, R.S.; Fietto, L.G.; Fontes, E.P.B. (2008). A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *J. Biol. Chem.* 283, 20209–20219.
- Denancé N., Sánchez-Vallet A., Goffner D. & Molina A. (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front. Plant Sci.* 4: 155.
- Deng X.W., Dubiel W., Wei N., Hofmann K., Mundt K., Colicelli J., Kato J., Naumann M., Segal D., Seeger M., Carr A., Glickman M., Chamovitz D.A. (2000). Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet.* 16, 202–203.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 435:441–445.
- Dietz K.J., Jacquot J-P, Harris G. (2010). Hubs and bottlenecks in plant molecular signalling networks. *New Phytologist* 188: 919–938.
- Dodding M.P., Way M. (2011) Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *EMBO J* 30: 3527–3539
- Dreher K.A., Brown J., Saw R.E., Callis J. (2006). The Arabidopsis Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell*. 18:699–714.
- Faria, J.A.Q.A., Reis, P.A.B., Reis, M.T.B., Rosado, G.L., Pinheiro, G.L., Mendes, G.C., Fontes, E.P.B. (2011). The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of the ER stress- and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. *BMC Plant Biol.*, 11, 129.
- Ferreira D.O., Fraga O.T., Pimenta M.R., Caetano H.D.N., Machado J.P.B., Carpinetti P.A., Brustolini O.J.B., Quadros I.P.S., Reis P.A.B., Fontes, E.P.B. (2020). GmNAC81 inversely modulates leaf senescence and drought tolerance. *Front. Genet.* 11, 601876.
- Fiebitz A., Nyarsik L., Haendler B., Hu Y.H., Wagner F., Thamm S., Lehrach H., Janitz M., Vanhecke D. (2008). High-throughput mammalian twohybrid screening for protein–protein interactions using transfected cell arrays. *BMC Genomics* 9: 68.
- Finet C., Berne-Dedieu A., Scutt C. P., Marlétaz F. (2012). Evolution of the ARF gene family in land plants: old domains, new tricks. *Mol. Biol. Evol.* 30, 45–56.
- Florentino L.H., Santos A.A., Fontenelle M.R., Pinheiro G.L., Zerbini F.M., Baracat-Pereira M.C., Fontes E.P.B. (2006). A PERK-Like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *J Virol* 80: 6648–6656.

- Fontes E.P.B., Santos A.A., Luz D.F., Waclawovsky A.J., Chory J. (2004). The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes Dev* 18: 2545–2556.
- Fontes E.P.B. (2008). Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathog* 4: e1000247.
- Frischmuth S., Wege C., Hußler D., Jeske H. (2007). The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of Abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. *Protoplasma* 230: 117–123.
- Gafni Y., & Epel B. L. (2002). The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiol Mol. Plant Pathol* 60, 231–241.
- Gouveia-Mageste B.C., Martins L.G.C., Dal-Bianco M., Machado J.P.B., Silva J.C.F., Kim, A.Y., Yazaki J., Santos A.A., Ecker J.R., Fontes E.P.B. (2021). A new plant-specific syntaxin-6 protein may define an intracytoplasmic route for begomoviruses. *Plant Physiol*, 187, 158-175.
- Guilfoyle T. J. (2015). The PB1 domain in auxin response factor and Aux/IAA proteins: a versatile protein interaction module in the auxin response. *Plant Cell* 27, 33–43.
- Gusamaroli G., Feng S., Deng X.W. (2004). Arabidopsis CSN5A and CSN5B subunits are present in distinct COP9 signalosome complexes, and mutations in their JAMM domains exhibit differential dominant negative effects on development. *Plant Cell*. 16, 2984–3001.
- Gusmaroli, G., Figueroa, P., Serino G., Deng, X.W. Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with Arabidopsis Cullin3-based E3 ligases. *Plant Cell*. 19, 564-81(2007).
- Hanley-Bowdoin L., Bejarano E.R., Robertson D., Mansoor S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Ver Microbiol* 11: 777–788.
- Harries P.A., Schoelz J.E, Nelson R.S. (2010). Intracellular transport of viruses and their components: utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Mol Plant-Microbe Interac* 23: 1381–1393.
- Hehne S., Wege C., Jeske H. (2004) Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *J Virol* 78: 7698–7706.
- Hayashi K., Jones A.M., Ogino K., Yamazoe A., Oono Y., Inoguchi M., Kondo H. & Nozaki H. (2003). Yokonolide B, a novel inhibitor of auxin action, blocks degradation of AUX/IAA factors. *J Biol Chem* 278: 23797–23806.
- Irsigler A.S.T., Costa M.D.L., Zhang, P., Reis P.A.B., Dewey R.E., Boston R.S., Fontes E.P.B. (2007). Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genom* 8, 431.
- Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M., Sakaki Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 4569–4574.

\

Jung J.J., Inamdar S.M., Tiwari A., Choudhury A. (2012) Regulation of intracellular membrane trafficking and cell dynamics by syntaxin-6. *Biosci Rep* 32: 383–391.

Kepinski S. & Leyser O. (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 435:446–451.

Krapp S., Schuy C., Greiner E., Stephan I., Alberter B., Funk C., Marschall M., Wege C., Bailer S.M., Kleinow T. (2017). Begomoviral movement protein effects in human and plant cells: towards new potential interaction partners. *Viruses* 9: 334.

Krenz B., Windeisen V., Wege C., Jeske H., Kleinow T. (2010). A plastid-targeted heat shock cognate 70 kDa protein interacts with the Abutilon mosaic virus movement protein. *Virology* 401: 6–17.

Krenz B., Jeske H., Kleinow T. (2012). The induction of stomata formation by a plant DNA-virus in epidermal leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route. *Front Plant Sci* 3: 291.

Kwok S.F., Solano R., Tsuge T., Chamovitz D.A., Ecker J.R., Matsui M., Deng X.W. (1998). Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex and their abundance is differentially affected by the pleiotropic *cop/det/fus* mutations. *Plant Cell*. 10, 1779–1790.

Lazarowitz S. G., & Beachy R. N. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*. 11, 535–548.

Lewis J.D., Lazarowitz S.G. (2010). Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2491–2496.

Li B. (2019). The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity. *Nat Commun* 10: 1–14.

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

Lyapina S., Cope G., Shevchenko A., Serino G., Tsuge T., Zhou C., Wolf D.A., Wei N., Shevchenko A., Deshaies, R.J. (2001). Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*, 292, 1382–1385.

Machado J.P. (2011). M.Sc., Universidade Federal de Viçosa Identificação e caracterização de alvos celulares da proteína NIG (NSP-Interacting GTPase). Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Mukhtar M. S., Carvunis A. R., Dreze M., Epple P., Steinbrenner J., Moore J., Dangl J. L. (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *science*, 333(6042), 596-601.

Malinovsky F.G., Fangel J.U., Willats W.G.T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Front Plant Sci*, 5,178.

- Mauck K. E., Chesnais Q., Shapiro L. R. (2018). Evolutionary Determinants of Host and Vector Manipulation by Plant Viruses. *Advances in Virus Research*. 101: 189-250.
- Mauck K. E., De Moraes C. M., Mescher, M. C. (2014). Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of Cucumber mosaic virus on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell and Environment*, 37 (6):1427–1439.
- McGarry R.C., Barron Y.D., Carvalho M.F., Hill J.E., Gold D., Cheung E., Kraus W.L., Lazarowitz S.G. (2003). A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell* 15: 1605–1618.
- Melo B.P., Fraga O.T., Silva J.C.F., Ferreira D.O., Brustolini O.J.B., Carpinetti P.A.; Machado J.P.B., Reis P.A.B., Fontes E.P.B. (2018). Revisiting the soybean GmNAC superfamily. *Front. Plant Sci.* 9, 1864.
- Mendes G.C., Reis P.A.B., Calil I.P., Carvalho H.H., Aragao F.J.L., Fontes E.P.B. (2013). GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress- and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:19627-19632.
- Mercier H. Auxinas. (2012). In: KERBAUY, G. B. (Ed.). *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p.
- Mukhtar S.M., Carvunis A.R., Dreze M., Epple P., Steinbrenner J. (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* 33: 596-601.
- Navas-Castillo J., Fiallo-Olivé E., Sánchez-Campos S. (2011). Doenças virais emergentes transmitidas por moscas-brancas. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49 219–248. 10.1146/annurev-phyto-072910-095235.
- Noueiry A.O., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. *Cell* 76: 925–932.
- Ohad N., & Yalovsky S. (2010). Utilizing bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to assay protein-protein interaction in plants. *Methods Mol Biol.* 655:347-58.
- Padmanabhan M.S., Kramer S.R., Wang X. & Culver J.N. (2008). Tobacco mosaic virus replicase-auxin/indole acetic acid protein interactions: reprogramming the auxin response pathway to enhance virus infection. *J. Virol.* 82: 2477–2485.
- Pimenta M.R., Silva P.A., Mendes G.C., Alves J.R., Caetano H.D.N., Machado J.P.B., Brustolini, O.J.B., Carpinetti P.A., Melo B.P., Silva. J.C.F. (2016). The Stress-Induced Soybean NAC Transcription Factor GmNAC81 Plays a Positive Role in Developmentally Programmed Leaf Senescence. *Plant Cell Physiol.* 57, 1098–1114.
- Pinheiro G.L., Marques C.S., Costa M.D.B.L., Reis P.A.B., Alves M.S., Carvalho C.M., Fietto L.G., Fontes, E.P.B. (2009). Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene* 444, 10-23.

Quadros I.P.S. (2021) Participação da via de sinalização mediada pela proteína DCD/NRP na morte celular em soja induzida por cádmio e infecção pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. 2021. 108 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Reis P.A.A., Rosado G.L., Silva L.A.C., Oliveira L.C., Oliveira L.B., Costa M.D.L., Alvim F.C., Fontes E.P.B. (2011). The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. *Plant Physiol.* 157, 1853–1865.

Reis P.A.B., Carpinetti P.A., Freitas P.P.J., Santos E.G.D., Camargos L.F., Oliveira I.H.T., Silva, J.C.F., Carvalho H.H., Dal-Bianco M., Soares-Ramos J.R.L. (2016). Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. *BMC Plant Biol.* 16, 156.

Rocha C.S., Santos A.A., Machado J.P.B., Fontes, E.P.B. (2008). The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology.* 380: 165–169.

Rojas M.R., Noueirry A.O., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (1998). Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form and size-specific manner. *Cell* 95: 105–113.

Rojas M.R., Macedo M.A., Maliano M.R., Soto-Aguilar M., Souza J.O., Briddon R.W., Kenyon L., Rivera-Bustamente R.F., Zerbini F.M., Adkins S., (2018). World Management of Geminiviruses. *Ann Rev Phytopathol* 56: 637–677. [10.1146/annurev-phyto-080615-100327](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100327)

Sanchez-Velar N., Udofia E.B., Yu Z., Zapp M.L. (2004). hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes Dev* 18: 23–34.

Sanderfoot A.A., Lazarowitz S.G. (1995). Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell* 7: 1185–1194.

Sanderfoot A.A., Ingham D.J., Lazarowitz S.G. (1996.) A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiol* 110: 23–33.

Schoelz J.E., Harries P.A., Nelson R.S. (2011). Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol Plant* 4: 813–831.

Schütze K., Harter K., Chaban C. (2009). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to study protein-protein interactions in living plant cells. *Methods Mol Biol.* 479:189-202.

Schwechheimer C. (2004). The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 45–54.

Silva J.C.F., Carvalho T.F.M., Basso M.F., Deguchi M., Pereira W.A., Sobrinho R.R. (2017). Geminivirus data warehouse: a database enriched with machine learning approaches. *BMC Bioinformatics* 18: 240.

Simonis N., Rual J.F., Carvunis A.R., Tasan M., Lemmens I., Hirozane-Kishikawa T., Hao T., Sahalie J.M., Venkatesan K., Gebreab F. (2009). Empirically controlled mapping of the *Caenorhabditis elegans* protein–protein interactome network. *Nature Methods* 6: 47–54.

Smakowska-Luzan E., Mott G.A., Parys K., Stegmann M., Howton T.C., Layeghifard M., Neuhold J., Lehner A., Kong J., Grünwal K. (2018). An extracellular network of *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinases. *Nature* 553: 342–346.

Souza, M.U., Pereira S.C.J, Althman F.M.P. 2018. Auxina:hormônio de desenvolvimento fisiológico vegetal. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia da FAEF* v.33.

Stuttman J., Parker J.E., Noel L.D. (2009). Novel aspects of COP9 signalosome functions revealed through analysis of hypomorphic *csn* mutants. *Plant Signaling & Behavior*. 4, 896–898.

Tiwari, S. B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15, 533–543.

Tomoda K., Kubota Y., Arata Y., Mori S., Maeda M., Tanaka T., Yoshida M., Yoneda-Kato N., Kato J. (2002). The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CAN5 and the COP9 signalosome complex. *J. Biol. Chem.* 277, 2302–10 .

Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M Pochart., (2000). A comprehensive analysis of protein–protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623–627.

Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle, T. J. (1999). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.* 19, 309–319.

Valente M.A.S., Faria J.A.Q.A., Soares-Ramos J.R.L., Reis P.A.B., Pinheiro G.L., Piovesan N.D., Morais A.T., Menezes C.C., Cano M.A.O., Fietto, L.G. (2009). The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J. Exp. Bot.* 60, 533–546.

Wang L., Ding X., Xiao J., Jiménez-Góngora T., Liu R., Lozano-Durán R. (2017). Inference of a Geminivirus-Host Protein-Protein Interaction Network through Affinity Purification and Mass Spectrometry Analysis. *Viruses* 9:275.

Ward B.M., Medville E., Lazarowitz S.G., Turgeon R. (1997). The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-derived tubules in developing phloem cells. *J Virol* 71: 3726–3733.

Ward B.M., Lazarowitz S.G. (1999). Nuclear export in plants: use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *Plant Cell* 11: 1267–1276.

Wei N., Chamotivitz D.A., Deng X.W. (1994). *Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell.* 78, 117– 124.

Weinthal D., & Tzfira T. (2009). Imaging protein-protein interactions in plant cells by bimolecular fluorescence complementation assay. *Trends Plant Sci.* 14:59-63.

Wolf S., Deom C.M., Beachy R.N., Lucas W.J. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246: 377–379.

Zhang S.C., Wege C., Jeske H. (2001). Movement proteins (BC1 and BV1) of Abutilon mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. *Virology* 290: 249–260.

Zhou Y., Rojas M.R., Park M-R., Seo Y.S., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (2011). Histone H3 interacts and colocalizes with the nuclear shuttle protein and the movement protein of a geminivirus. *J Virol* 85: 11821–11832.

Zorzatto C., Machado J.P.B., Lopes K.V.G, Nascimento K.J.T, Pereira W.A, Brustolini O.J.B., Reis P.A.B., Calil I.P., Deguchi M., Sachetto-Martins G., Gouveia B.C., Loriato V.A.P., Silva M.AC., Silva F.F., Santos A.A., Chory j., Fontes E.P.B. (2015). NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature* 520: 679–682.