

BIANCA CASTRO GOUVEIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DE PLANTA PELO
RECEPTOR NIK (NSP-INTERACTING KINASE) E IDENTIFICAÇÃO DE UM
NOVO PARCEIRO DE NSP (NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN) DE
GEMINIVÍRUS.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G719a
2014
Gouveia, Bianca Castro, 1989-
Avaliação da ativação do sistema imune de plantas pelo
receptor NIK (NSP-*Interacting kinase*) e identificação de um
novo parceiro de NSP (*Nuclear Shuttle Protein*) de geminivírus /
Bianca Castro Gouveia. – Viçosa, MG, 2014.
x, 50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Geminivírus. 2. Vírus de planta. 3. Cinase. 4. Proteína.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Genética
e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 632.8

BIANCA CASTRO GOUVEIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DE PLANTA PELO
RECEPTOR NIK (NSP-INTERACTING KINASE) E IDENTIFICAÇÃO DE UM
NOVO PARCEIRO DE NSP (NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN) DE
GEMINIVÍRUS.**

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

APROVADA: 25 de julho de 2014.

Michihito Deguchi
(Coorientador)

Anésia Aparecida dos Santos

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientador)

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Aos meus pais, Álvaro e Maria Célia,
à minha irmã, Isabella,
ao meu amor, Daniel,
ao meu anjo da guarda, Tia Tide,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, o responsável pela minha vida, a quem recorro em momentos alegres e difíceis e que, com suas bênçãos, me impulsiona sempre em busca dos meus sonhos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela minha formação desde o ensino médio, e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade na realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Elizabeth Fontes, pela oportunidade, confiança e aprendizado. A quem admiro pelo profissionalismo e pelo destaque na condução de uma pesquisa de alta qualidade, um grande mérito em meio a tantas dificuldades em se fazer ciência no Brasil.

Aos meus pais, Álvaro e Maria Célia, meus exemplos e meus maiores incentivadores. Por eles, procuro fazer o melhor que posso em tudo, para retribuir com orgulho e alegria, todo amor e dedicação de tantos anos. Por não medirem esforços para realização dos meus sonhos e por me fazer acreditar que todos são possíveis.

À minha irmã, melhor amiga e parceira, Isabella, a quem recorro em todos os momentos, pelas palavras de incentivo, pela incansável torcida, amizade e lealdade.

Ao meu noivo Daniel, presente de Deus, por tornar a minha vida mais alegre, pelo apoio incondicional e paciência nos momentos mais difíceis. O alto astral e a leveza com que conduz a vida me fazem acreditar em um futuro feliz e cada vez melhor ao seu lado.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas. Ao João Paulo e a Anésia, pela participação fundamental neste trabalho, por toda ajuda na condução dos experimentos, pelas inúmeras dúvidas sanadas, pela paciência inesgotável e principalmente pela amizade e carinho que sempre demonstraram por mim. À Priscila, minha doce amiga, pelas boas conversas, sábios conselhos, e exemplo de dedicação e altruísmo. À Janaína, que me contagia com sua alegria, seu senso de justiça e por ser sempre tão prestativa. Ao Pedro, pela boa vontade demonstrada e por todos os conselhos em horas tão oportunas. À Giselle, pelo excelente convívio, boas idéias e

descontração, que tornam nossos dias mais divertidos. À Iara, pela atenção, companheirismo e gentileza que tem comigo. À Maiana, tão simpática e prestativa, um exemplo de equilíbrio e tranquilidade. À Fábria, por escutar minhas reclamações, pela compreensão e interesse em ajudar. Ao Virgílio, pelo bom humor inabalável e contagioso, e por despertar boas risadas ao longo dos dias. Ao Michi, por toda ajuda e por ter aceitado prontamente o meu convite para ser coorientador deste trabalho. À Mônica, Lucas, Nívea, Welison, Otávio, Cleisinho e Rafinha, pela atenção e por estarem sempre dispostos a ajudar. À Marlene, Gláucia e Adriano, que pelo excelente trabalho, deixam nossa rotina mais fácil.

Aos meus amigos e familiares pela torcida e afeto.

RESUMO

GOUVEIA, Bianca Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Avaliação da ativação do sistema imune de planta pelo receptor NIK (NSP-interacting kinase) e identificação de um novo parceiro de NSP (Nuclear Shuttle Protein) de geminivírus.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientador: Michihito Deguchi.

NIK (NSP-Interacting Kinase) é um receptor cinase envolvido na resposta de defesa contra geminivírus, e foi primeiramente identificado como alvo de virulência da proteína de transporte NSP (Nuclear Shuttle Protein) de begomovírus. Previamente, foi identificado que a ativação de NIK medeia a fosforilação indireta da proteína ribossomal L10, promovendo a translocação da proteína citosólica para o núcleo, onde interage com a proteína LIMYB (L10-interacting Myb domain-containing protein), para regular genes envolvidos na maquinaria de tradução da célula, resultando em supressão da tradução global. Foi também demonstrado que a ativação constitutiva de NIK1, através da expressão ectópica do mutante T474D, induz o sistema imune de plantas em *Arabidopsis*. Nesta investigação, foi analisado em maiores detalhes se a ativação do módulo de sinalização NIK-RPL10-LIMYB também transmitiria um sinal típico de defesa, resultando na indução do sistema imune de plantas. Entretanto, os resultados encontrados sugerem que a via de sinalização antiviral mediada por NIK não transmite o sinal de defesa típico que culmina na ativação de genes relacionados ao sistema imune de plantas. Em primeiro lugar, por meio de estudos de variação global de expressão gênica, induzida por expressão ecotópica do mutante constitutivo T474D ou LIMYB, foi constatado que não houve enriquecimento gênico significativo na lista dos genes regulados positivamente nas categorias de defesa, como resposta de defesa a patógenos, resposta de defesa a vírus e silenciamento gênico induzido por vírus. Além disso, RT-PCR quantitativo de uma amostra representativa dos genes de defesa confirmou que estes genes de defesa não foram regulados positivamente pela expressão de T474D ou LIMYB. Ao contrário, a expressão de LIMYB nas linhagens transgênicas promoveu a regulação negativa dos referidos genes de defesa. Nesta investigação, também se avaliou novos alvos do hospederio que interagem com NSP. Inicialmente, foi isolada, por meio de microarranjos de expressão de 12.000 proteínas de *Arabidopsis*, uma proteína com características de uma t-SNARE, codificada pelo locus At4g30240 com a capacidade de interagir com NSP *in vitro*. Esta interação NSP- proteína At4g30240 foi confirmada em ensaios de duplo híbrido em leveduras e por ensaios de complementação de fluorescência bimolecular *in planta*. Os resultados indicam que At4g30240 interage

com NSP in vivo, e pode mediar ou mesmo facilitar o transporte dessa proteína viral entre compartimentos celulares.

ABSTRACT

GOUVEIA, Bianca Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Evaluation of the plant immune system activation by the receptor NIK (NSP-interacting kinase) and identification of a new host partner of the geminivirus NSP (Nuclear Shuttle Protein).** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-adviser: Michihito Deguchi.

NIK (NSP-Interacting Kinase) is a receptor-like kinase involved in defense against geminiviruses, which was first identified as a virulence target of the begomovirus transport protein NSP (Nuclear Shuttle Protein). We have previously identified that NIK activation mediates an indirect phosphorylation of the ribosomal protein L10 causing the translocation of the cytosolic protein to the nucleus, where it interacts with LIMYB (L10-interacting Myb domain-containing protein) to regulate genes involved in the translation machinery resulting in a global translation suppression. Constitutive activation of NIK, through ectopic expression of the mutant T474D in Arabidopsis, has been previously shown to induce the plant immune system. In this investigation, we examined further whether activation of the signaling module NIK-RPL10-LIMYB would transduce a typical defense signal that promotes the induction of the plant immune system. However, the current results suggest that the NIK-mediated antiviral signaling does not induce the basal immune system. Firstly, the global variation of gene expression by ectopic expression of the constitutively activated mutant receptor T474D or LIMYB does not cause a gene enrichment in the up-regulated list of typical defense categories, such as response to pathogens, response to virus and virus-induced gene silencing. Secondly and very importantly, quantitative RT-PCR of a representative sample of defense genes confirmed that they are not up-regulated by expression of T474D or LIMYB. In contrast, expression of LIMYB in the transgenic lines caused a down-regulation of the defense genes examined. We have also examined new host targets that interact with NSP. Initially, we used a 12000 Arabidopsis protein expression-based microarray to isolate a t-SNARE-like protein with the capacity to bind NSP in vitro. This interaction NSP-At4g30240 protein was further confirmed by two-hybrid assay in yeast and by bimolecular fluorescence complementation assay in planta. Our results indicate that At4g30240 interacts with NSP in vivo to mediate or facilitate the viral protein transport among cell compartments.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
Capítulo 1 – Ativação constitutiva de NIK não induz o sistema imune de plantas.	7
Resumo.....	7
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	14
Resultados e Discussão.....	19
Referências Bibliográficas.....	26
Anexos.....	30
Capítulo 2 - Interação in vivo da proteína NSP (Nuclear shuttle protein) de begomovírus com um membro da família t-SNARE.	31
Resumo.....	31
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	37
Resultados e Discussão.....	41
Referências Bibliográficas.....	47

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas reconhecem a maioria dos patógenos através de duas classes funcionalmente distintas de receptores imunes (Boller e He, 2009; Dodds e Raathejen, 2010). A primeira delas refere-se aos receptores transmembranas que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e são designados PRRs (Pattern Recognition Receptors). Este evento de reconhecimento ou interação planta-patógeno ocorre na superfície celular e aciona um mecanismo de defesa basal denominado PTI (Pamp-Triggered Immunity), suficiente para combater a maioria dos invasores. Entretanto, alguns patógenos desenvolveram mecanismos capazes de inativar PTI, através da injeção de efetores de virulência no interior das células (Chisholm et al., 2006; Jones e Dangl, 2006).

Da mesma forma que os patógenos, as plantas também evoluíram e desenvolveram mecanismos de resistência contra esses efetores, através do surgimento de proteínas de resistência que correspondem à segunda classe de receptores imunes. Essas proteínas são designadas NBS-LRR (nucleotide binding site-leucine rich repeats) e reconhecem os efetores de virulência, acionando um tipo de imunidade chamada ETI (Effector-Triggered Immunity), associada à resposta hipersensitiva e morte celular programada (Dodds e Rathejen, 2010).

Em interações planta/vírus, o silenciamento do RNA é um dos mecanismos pelo qual a planta reconhece e se defende da infecção viral (Voinnet, 2005). Em contrapartida, os vírus possuem fatores de virulência que suprimem componentes da maquinaria de silenciamento de RNA, o que inativa a resposta de defesa da planta e aumentam a patogenicidade do vírus (Raja et al., 2010). Para limitar essas infecções virais, tem sido relatado que as plantas também utilizam o mecanismo de imunidade basal PTI, comumente usado em resposta ao ataque de bactérias e fungos (Carvalho et al., 2008). A família Geminiviridae constitui um grande grupo de vírus de plantas, capazes de infectar uma ampla gama de espécies, incluindo diversas culturas agronomicamente relevantes (Fauquet et al., 2008). O sucesso de infecção dessa família se deve a proteínas virais supressoras de silenciamento (Bisaro, 2006; Diaz-Pendón e Dig, 2008) e inibidoras de receptores imunes transmembranas.

O receptor transmembrana NIK (NSP-Interacting Kinase) foi inicialmente identificado como um alvo de virulência da proteína NSP (Nuclear Shuttle Protein) de begomovírus, o maior gênero da família Geminiviridae (Mariano et al., 2004;

Fontes et al., 2004). Além disso, homólogos desse receptor em *Arabidopsis thaliana* também mostraram capacidade de interagir com NSPs, demonstrando que a interação com NIKs é conservada entre NSPs de begomovírus (Fontes et al., 2004). Por desempenhar uma função importante no transporte do DNA viral, é bastante provável que NSP interaja com outras proteínas do hospedeiro em diversas regiões celulares, e a identificação de interações chave nessa via de sinalização antiviral é de fundamental importância para a elucidação do mecanismo de infecção viral.

A proteína NIK apresenta um domínio cinase conservado, além de possuir repetições ricas em leucina (LRR-leucine-rich repeat). Foi demonstrado que a proteína NIK se autofosforila, e que esta fosforilação antecede sua oligomerização, sugerindo que ela possui propriedades bioquímicas consistentes com uma função sinalizadora (Fontes et al., 2004). Além disso, inativação da atividade de cinase de NIK1 compromete a atividade de sinalização antiviral do receptor imune (Santos et al., 2009). Recentemente, foi demonstrado que infecção por geminivírus promove a ativação do receptor NIK através de auto-fosforilação em resíduos de treonina na posição 474 localizado na alça de ativação do domínio de cinase (Santos et al., 2009). Em oposição a este mecanismo de pró-ativação, a proteína viral NSP liga-se ao domínio cinase e inibe autofosforilação e atividade de NIK, impedindo assim a criação de um ambiente menos favorável à infecção viral (Santos et al., 2010).

Visando elucidar componentes da via de sinalização antiviral mediada por NIK, foi identificada, por ensaios de duplo híbrido, a proteína ribossomal RPL10 (Ribosomal protein L10). Além de interagir com NIK, RPL10 está geneticamente associada à via de sinalização de resposta à infecção por geminivírus, mediada por NIK (Rocha et al., 2008). Baseado em propriedades bioquímicas de NIK e características pertencentes à família LRR-LRKII, foi proposto um modelo para a via de sinalização mediada por NIK (Santos et al., 2010; Lopes, 2012, Zorzatto et al., 2014), que se inicia a partir de um estímulo induzido pela infecção viral, provocando a ativação de NIK, que culmina com a translocação da proteína ribossomal L10A para o núcleo (Carvalho et al., 2008), onde interage com a proteína LIMYB (L10-interacting Myb domain-containing protein) para regular genes envolvidos na maquinaria de tradução da célula, resultando em supressão de tradução global (Zorzatto et al., 2014).

Mais recentemente, foi demonstrado que a ativação constitutiva da via de sinalização antiviral mediada por NIK também induz a expressão de proteínas do

sistema imune de plantas, em tomateiros (Brustolini et al., 2014). Entretanto, os componentes dessa via de transdução do sinal de defesa que ligam a ativação do receptor NIK à indução dos genes de resistência são totalmente desconhecidos.

Assim sendo, a elucidação da via de defesa mediada por NIK constitui uma etapa importante para se avaliar a intercomunicação entre as vias de sinalização de defesa o que permite à planta ajustar as respostas imunes, dependendo da natureza do tipo invasor. Ainda, o esclarecimento da regulação das respostas de defesa permitirá aos geneticistas e melhoristas usar abordagens cada vez mais sofisticadas para controle de pragas e patógenos ao aumentar as defesas naturais das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BISARO, D.M. Silencing suppression by geminivirus proteins. **Virology**, 344, 158. 2006.

BOLLER, T., HE, S.Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, 324, 742. 2009.

BRUSTOLINI, O.J.B., MACHADO, J.P.B., CONDORI-APFATA, J. et al. A sustained NIK-mediated antiviral signaling confers broad-spectrum tolerance to begomoviruses in cultivated plants. Submetido em: **Plant Biotechnology Journal**, em 03/07/14.

CARVALHO, C.M., SANTOS, A.A., PIRES, S.R., ROCHA, C.S., SARAIVA, D.I. ET AL. Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. **PLoS Pathogens**, v.4, p.e1000247. doi:10.1371/journal.ppat.1000247. 2008.

CHISHOLM, S.T., COAKER, G., DAY, B., STASKAWICZ, B.J. Host-microbe interactions shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, 124, 803. 2006.

DIAZ-PENDON, J.A., DING, S.W. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. **Annual Reviews Phytopathology**, 46, 303. 2008.

DODDS, P.N., RATHEJEN, J.P. Plant immunity: towards and integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, 11, 539. 2010.

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

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

JONES JD, DANGL JL. The plant immune system. **Nature**;444:323–329. 2006.

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

LOPES, K.V.G. Universidade Federal de Viçosa. Vias de sinalização de defesa contra vírus mediada pelo receptor imune NIK1 (NSP-interacting kinase). Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. 2012.

RAJA, P., WOLF, J.N., BISARO, D.M. RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1799, 337. 2010.

ROCHA, C.S., SANTOS, A.A., MACHADO, J.P.B, FONTES, E.P.B. The ribosomal protein L10-QM-like protein is a component of the NIK – mediated antiviral signalling. **Virology**, v.380, p.165-169, 2008.

SANTOS AA, CARVALHO CM, FLORENTINO LH, RAMOS JJO, FONTES EPB. Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. **PLoS ONE**. 4:e5781, 2009.

SANTOS AA, LOPES KVG, APFATA JAC, FONTES EPB. NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signaling. **Journal of Experimental Botany**, 61(14)3839–3845, 2010.

VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nature Review Genetics**, 6, 206. 2005.

ZORZATTO, C. Universidade Federal de Viçosa. Caracterização Funcional de um novo fator transcricional Myb componente downstream da via de sinalização de defesa antiviral mediada pelo receptor imune NIK1 (NSP-interacting kinase). Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. 2013.

Capítulo 1

Ativação constitutiva de NIK não induz o sistema imune de plantas.

Resumo - NIK (NSP-interacting kinase) é um receptor cinase com função de sinalização na defesa contra infecção por geminivírus. Previamente, foi identificado que a ativação de NIK medeia a fosforilação indireta da proteína ribossomal L10, promovendo a translocação da proteína citosólica para o núcleo, onde interage com a proteína LIMYB para regular genes envolvidos na maquinaria de tradução da célula, resultando em supressão de tradução global. Além de inibir a tradução global, foi também demonstrado previamente que a ativação constitutiva de NIK1, através da expressão ectópica do mutante T474D, induz o sistema imune de plantas em *Arabidopsis*. Entretanto, os componentes dessa via de transdução do sinal de defesa que ligam a ativação do receptor NIK à indução dos genes de resistência são totalmente desconhecidos. Nesta investigação, foi analisado se a ativação do módulo de sinalização NIK-RPL10-LIMYB também transmitiria um sinal típico de defesa, resultando na indução do sistema imune de plantas. Através de sequenciamento de RNA, foi avaliada a variação global na expressão de genes, induzida por T474D e LIMYB, em *Arabidopsis*, concentrando-se em três categorias de genes de defesa, (i) resposta a patógenos, (ii) silenciamento gênico induzido por vírus e (iii) resposta de defesa contra vírus. Nas categorias II e III, análises de enriquecimento gênico dos resultados de RNA-seq de T474D não detectaram enriquecimento significativo de genes diferencialmente expressos na lista dos genes regulados positivamente ou na lista daqueles regulados negativamente. Em contraste, para a categoria de resposta a patógenos, enriquecimento gênico significativo foi observado tanto na lista dos genes up-regulados como naquela de genes down-regulados. Entretanto, genes marcadores típicos da via de sinalização por ácido salicílico ou não foram diferencialmente expressos ou foram down-regulados. Estes resultados foram validados por RT-PCR quantitativo e indicam que provavelmente expressão de T474D não induz o sistema imune de plantas. Também foi avaliado o efeito da superexpressão de LIMYB sobre o sistema imune. Enriquecimento gênico significativo só foi observado para o grupo de genes down-regulados da categoria funcional de resposta a patógenos. Resultados de RT-PCR quantitativo confirmaram a tendência de repressão de genes de defesa pela overexpressão de LIMYB. Coletivamente, esses resultados sugerem que a via de

sinalização antiviral mediada por NIK não transmite o sinal de defesa típico que culmina na ativação de genes relacionados ao sistema imune de plantas.

1. INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente expostas à invasão, infecção ou toxidade por organismos patogênicos durante todas as fases do seu ciclo de vida. No entanto, as plantas, diferentemente dos animais, não dispõem da proteção oferecida por anticorpos e células específicas de defesa para combater invasores. Por isso, desenvolveram estratégias diferenciadas para detectarem e se adaptarem aos vários tipos de agressões ambientais (Gómez-Gomez & Boller, 2002).

As plantas apresentam algumas estruturas que funcionam como uma barreira para a entrada de invasores. A primeira linha de defesa das mesmas, de natureza mecânica, é representada pela presença de uma camada de cutícula recobrindo a superfície externa da planta, paredes celulares espessas e outras estruturas físicas para deter a invasão do patógeno. A segunda linha de defesa ocorre a nível celular, onde a regulação dinâmica e estritamente controlada de genes específicos produz proteínas cuja ação irá responder à infecção pelo organismo invasor (Thurston et al., 2005).

O evento que desencadeia uma resposta de defesa inicia-se pela percepção de um estímulo extracelular primário por um receptor de membrana, que interfere na interação desse receptor com uma molécula ligante específica. Ao evento de ligação, segue a transmissão de sinais secundários a partir da membrana plasmática. O acúmulo de moléculas sinalizadoras no interior da célula causa a indução de cascatas específicas de fosforilações e desfosforilações. As mudanças moleculares desencadeadas por esses eventos incluem a ativação de genes envolvidos em respostas de defesa particulares, ou alterações em processos de desenvolvimento (Gachomo et al., 2003).

A fosforilação de proteínas, que ocorre através da transferência de um grupo γ -fosfato do ATP para um grupo hidroxila da proteína alvo, é uma reação recorrente nas células, sendo realizada por uma família de enzimas denominada proteínas cinases (PK) (Lin et al., 1992). Muitas vezes esses processos são mediados por receptores cinases presentes nas membranas das células. O genoma de plantas codifica um grande número de proteínas com topologias preditas de receptores cinases, cujas funções ainda não foram totalmente elucidadas. Tais proteínas são chamadas de RLKs (Receptor-Like Kinases; Becraft, 1998).

Os RLKs são divididos em duas classes de acordo com as especificidades em seus domínios cinases: receptores tirosina-cinases (RTK) que fosforilam proteínas em resíduos específicos de tirosina, e receptores serina/treonina-cinases (STKR) que fosforilam serinas ou treoninas ou, em alguns casos, ambos os resíduos de aminoácidos (Lin et al., 1992).

O genoma de *Arabidopsis thaliana* contém 417 sequências de proteínas contendo a estrutura típica de um receptor cinase, que possui um domínio extracelular seguido de um domínio transmembrana e do domínio cinase (Shiu e Bleecker, 2001). Neste organismo, mais da metade das RLKs contém de 1 a 32 repetições ricas em leucina (Leucine-Rich Repeat – LRR) em seu domínio extracelular, tornando-se o motivo extracelular mais comumente encontrado e que está envolvido em interações proteína-proteína (Morris e Walker, 2003). Os membros desta sub-família divergem na organização e na identidade de sequência de seu domínio extracelular sendo assim categorizados em 13 subfamílias (LRR I-LRR XIII).

Várias proteínas receptoras do tipo LRR-RLK têm sido identificadas, estando relacionadas com desenvolvimento, resistência a doenças ou à interação com proteínas de patógenos. Uma das proteínas envolvidas na interação planta-patógeno foi identificada em tomate, através de um ensaio de duplo híbrido, utilizando a proteína de geminivírus NSP (Nuclear Shuttle Protein) como isca. Tal proteína, designada LeNIK (*Solanum lycopersicum* NSP Interacting Kinase) foi caracterizada como um provável receptor transmembrana serina/treonina quinase (Mariano et al., 2004), cujo domínio quinase, localizado no citosol, é capaz de interagir com a proteína viral NSP. Esta proteína facilita o transporte intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma (Lazarowitz et al., 1999) e, juntamente com a proteína MP (Movement Protein), está envolvida com o movimento do DNA viral de célula a célula (Noueiry et al., 1994 e Ward et al., 1991).

Um homólogo de NIK de soja, designando GmNIK (*Glycine max* NIK), e três genes homólogos de *Arabidopsis*, designados NIK1, NIK2 e NIK3, também foram isolados pela capacidade de interação com NSP. Os receptores NIK1, NIK2 e NIK3 foram caracterizados como membros da subfamília LRR-RLKII (Shiu e Bleecker, 2001; Dievart e Clark, 2004), constituída por 14 proteínas portadoras de quatro LRRs completas (com 24 resíduos) e uma quinta LRR incompleta (com 16 resíduos),

dispostas em um único bloco contínuo dentro do domínio extracelular (Zhang et al., 2006).

A proteína NIK exibe propriedades bioquímicas consistentes com receptores de membrana e diversas evidências na literatura sugerem uma função de sinalização na defesa contra infecção por geminivírus (Fontes et al., 2004). Inicialmente, foi identificado que a proteína viral NSP de CaLCuV (Cabbage Leaf Curl Vírus) atua como um fator de virulência para suprimir a atividade cinase de NIK (Fontes et al., 2004). Além disso, a perda de função de NIK1, NIK2 ou NIK3 em *Arabidopsis* está ligado a um aumento do fenótipo de suscetibilidade à infecção por CaLCuV (Fontes et al., 2004; Rocha et al., 2008; Santos et al., 2009). Finalmente, a superexpressão de NIK1 de *Arabidopsis* em tomates atenua o desenvolvimento de sintomas e atrasos na infecção por ToYSV (Tomato Yellow Spot Virus) (Carvalho et al., 2008).

Por meio do sistema de duplo híbrido de leveduras, utilizando o domínio cinase de NIK como isca e uma biblioteca de cDNAs de *Arabidopsis*, foi identificada a proteína ribossomal, L10 (RPL10). Além de interagir com NIK, RPL10 está geneticamente associada à via de sinalização de resposta à infecção por geminivírus, mediada por NIK (Rocha et al., 2008). Em *Arabidopsis*, ensaios de infectividade mostraram que plantas nocautes l10A bombardeadas com vírus CaLCuV foram mais suscetíveis ao vírus quando comparadas com plantas selvagens, mimetizando o fenótipo de suscetibilidade aumentada de *nik1*. Estas observações fornecem evidências genéticas que posicionam *rpL10A* na via de sinalização de defesa downstream ao receptor NIK. Tais resultados são reforçados pelo aumento significativo da translocação da proteína *rpL10A* para o núcleo celular, quando co-agroinfiltrada com NIK (Rocha et al., 2008).

A ativação de muitas cinases requer a fosforilação do segmento de ativação, que é definido pela região delimitada por dois motivos de tripeptídeos conservados, DFG e APE (Nolen et al., 2004). NIK1 é fosforilada *in vitro* nas posições conservadas Thr474 e Thr469 (Santos et al., 2009). Além de ser fosforilada *in vitro*, a substituição de Thr474 por alanina prejudica a capacidade de NIK1 para desencadear uma resposta de defesa e redirecionar *rpL10* ao núcleo *in vivo* (Carvalho et al., 2008; Santos et al., 2009). Em contraste, a substituição de Thr474 por um resíduo de aspartato aumenta a atividade de autofosforilação e a realocação da *rpL10* para o núcleo mediada por NIK1. Coletivamente, estes resultados indicam que

a fosforilação do resíduo Thr474, localizado na alça de ativação é essencial e constitui um mecanismo regulador chave para ativação de NIK.

Baseado em propriedades bioquímicas de NIK e características pertencentes à família LRR-LRKII, foi proposto um modelo para a via de sinalização mediada por NIK (Santos et al., 2010; Lopes, 2012, Zorzatto et al., 2014). Segundo este modelo, a partir de um estímulo induzido pela infecção viral, o domínio extracelular de NIK sofre oligomerização com o mesmo domínio de outro receptor, permitindo assim a aproximação dos respectivos domínios cinases e consequente transfosforilação desses, além da ativação de outros domínios. A transfosforilação da treonina 474 no A-loop ativa NIK. Assim inicia-se a cascata de sinalização, que culmina com a translocação de L10A para o núcleo (Carvalho et al., 2008), onde interage com a proteína LIMYB para regular genes envolvidos na maquinaria de tradução da célula, resultando em supressão de tradução global (Zorzatto et al., 2014). LIMYB e RPL10A atuam como fatores de transcrição e inibem a atividade de promotores de genes ribossomais de forma aditiva, resultando na inibição da síntese de proteínas, diminuição da associação do RNAm viral com frações de polissomos, conferindo assim tolerância a geminivírus (Zorzatto et al., 2014).

Além de inibir a tradução global, a ativação constitutiva de NIK1, através da expressão ectópica do mutante T474D, induz o sistema imune de plantas em *Arabidopsis* (Lopes, 2012). Esta hipótese foi levantada porque a expressão ectópica de T474D induziu a expressão de genes do sistema imune e resultou em um aumento de morte celular espontânea, mimetizando o fenótipo de resposta hipersensitiva. Mais recentemente, foi demonstrado que a ativação constitutiva da via de sinalização antiviral mediada por NIK também induz a expressão de proteínas do sistema imune de plantas, como genes de resistência do tipo LRR-NBS e componentes da via de sinalização do ácido salicílico, em tomateiros (Brustolini et al., 2014). Entretanto, os componentes dessa via de transdução do sinal de defesa que ligam a ativação do receptor NIK à indução dos genes de resistência são totalmente desconhecidos.

Assim sendo, a elucidação da via de defesa mediada por NIK constitui uma etapa importante para se avaliar a intercomunicação entre as vias de sinalização de defesa o que permite à planta ajustar as respostas imunes, dependendo da natureza do tipo invasor. O esclarecimento das bases moleculares da resistência de plantas e da regulação das respostas de defesa permitirá aos geneticistas e melhoristas usar abordagens cada vez mais sofisticadas para controle de pragas e patógenos ao

aumentar as defesas naturais das plantas. Dessa forma, o principal objetivo dessa investigação foi examinar se a via de sinalização antiviral mediada por NIK transduz um sinal típico de defesa que resulta na indução do sistema imune de plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal.

Plantas de *Arabidopsis* da linhagem Col-0 (Columbia), da linhagem transgênica originada por mutagênese insercional por T-DNA (knock down Salk_060808) transformada com a construção 35S:AtNIK1T474D, superexpressando a proteína NIK mutada, obtida e disponibilizada por Lopes (2012), e da linhagem transgênica de ecótipo Columbia superexpressando o gene AT5G05800 (LIMYB), obtida e disponibilizada por Zorzatto (2013), foram cultivadas em câmara de crescimento a 22° C, com fotoperíodo de 16 horas.

Sementes dos mutantes nap, SALK_104485 (sid2), CS3806 (pad4), CS66002 (sid2 pad4), CS3724 (npr1), CS6358 (ndr1), SALK_091541C (eds5) e SALK_034523 (bak1) foram obtidas do ABRC (“*Arabidopsis* Biological Resource Center”).

2.2. Extração de protoplasto de *Arabidopsis thaliana*.

Para o isolamento de protoplastos foram utilizadas as linhagens de *Arabidopsis* SALK_104485 (sid2), CS3806 (pad4), CS66002 (sid2 pad4), CS3724 (npr1), CS6358 (ndr1), SALK_091541C (eds5) e SALK_034523 (bak1). As sementes foram esterilizadas, plaqueadas em meio MS ½ força, incubadas a 4°C por 4 dias, seguido por 22°C por 15 dias, com fotoperíodo de 16 horas, como descrito por Niyogi (2005) com modificações.

As plantas foram cortadas com bisturi e incubadas em solução enzimática (Celulase 1%, Macerozyme 0.2%, Mannitol 0.8 mol/L, KCL 1 mol/L e MES 100 mmol/L ph 5.7) sob vácuo por 30 segundos e mantidas sob agitação, a 50 rpm, por seis horas. As folhas digeridas foram filtradas em filtro de nylon de 65µm de espessura e centrifugadas a 200 x g durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes em 10 ml de solução de lavagem (NaCl 5 mol/L, CaCl₂ 1 mol/L, KCl 1 mol/L e MES 100 mmol/L), centrifugado a 200 x g por 2 min e ressuspendidos em 1 ml de tampão de eletroporação (Mannitol 0.8 mol/L, MgCl₂ 1 mol/L e MES 100 mmol/L).

Para a análise de expressão de genes de proteína de resistência, 2 x 10⁵ a 5 x 10⁶ de protoplastos foram eletroporados a 250 V, 250 µF com 10 µg do DNA de interesse, 30 µg de DNA de esperma de salmão em um volume final de 0.8 ml. Após

36 h de incubação no escuro, os protoplastos foram centrifugados e congelados em nitrogênio líquido.

2.3. Extração de RNA total das plântulas de Arabidopsis e protoplastos.

Para isolamento de RNA total, plântulas de Arabidopsis foram maceradas em nitrogênio líquido e aproximadamente 200 mg do tecido vegetal ou 2×10^6 células de protoplastos foram homogeneizados com o reagente TRIZOL (SIGMA). Foram incubadas à temperatura ambiente, por 5 min, e adicionados 200 μ L de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada manualmente, por 15 s, incubada à temperatura ambiente, por 3 min, e submetida à centrifugação a 12.000 x g por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, livre de RNase, e foram adicionados 500 μ L de isopropanol. Em seguida, foram incubadas à temperatura ambiente, por 10 min, e centrifugadas a 12.000 x g, por 10 min. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% (V/V) e centrifugado a 7.500 x g, por 10 min. Em seguida, o material foi seco à temperatura ambiente, por aproximadamente 10 min, e os pellets ressuspensos em 20 μ L de água livre de RNase e estocados a -80°C. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em NBC (H_3BO_3 0.05 mol.L⁻¹, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 1mmol.L⁻¹ e NaOH 5mmol.L⁻¹ pH 7.5) corado com brometo de etídeo 0,1 μ g/mL.

2.4. Método de sequenciamento de RNA e análise dos dados.

As linhagens transgênicas e selvagem foram infectadas no estágio de sete folhas com CaLCuV. Dez dias após a inoculação (dpi), folhas infectadas sistemicamente foram diagnosticada por PCR. Folhas infectadas do tipo selvagem e das linhagens 35S::NIK1-5 e 35S::T474D-4 foram utilizadas para extração de RNA total pelo método do TRIZOL (Invitrogen). Para os experimentos de sequenciamento de RNA, foram utilizadas duas repetições biológicas de um conjunto de 10 plantas em 10 dias após a inoculação (dpi), quando foram detectados altos níveis de DNA viral em folhas sistêmicas, mas os sintomas ainda não haviam desenvolvido, ou aos 21 dpi, quando sintomas eram visíveis.

Os dados de sequenciamento de RNA foram obtidos usando o Illumina Hi-seq 2000. O protocolo desenvolvido utilizou a metodologia “pair-ended” com os seguintes parâmetros de filtro de qualidade: máximo de uma base abaixo da

qualidade de 5 nas primeiras 30 bases. A análise da expressão gênica diferencial (DGE) foi realizada utilizando o pacote edger R/Bioconductor (Robinson et al., 2010).

Os dados brutos foram normalizados utilizando o fator de normalização TMM. A dispersão foi estimada pelo parâmetro edger tagwise. A expressão diferencial foi determinada utilizando o p-valor de corte de 0,01, ajustado pelo método de “False discover rate” (FDR). O processo de mapeamento dos reads foi executado usando o programa Bowtie 2 (Langmead et al., 2009), e o conjunto de cDNAs foi obtido a partir do banco de dados Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org>), décima versão. A classificação de Gene ontology foi realizada utilizando os pacotes R/Bioconductor GOstats.

2.5. Análise da expressão de genes de proteínas de resistência.

Dezesseis genes de proteínas de resistência que são induzidos por T474D foram selecionados a partir dos dados do RNAseq e a análise da expressão foi avaliada por RT-PCR quantitativo nas linhagens transgênicas superexpressando o gene T474D e LIMYB, e nos protoplastos dos mutantes nap, SALK_104485 (sid2), CS3806 (pad4), CS66002 (sid2 pad4), CS3724 (npr1), CS6358 (ndr1), SALK_091541C (eds5) e SALK_034523 (bak1), superexpressando o gene T474D.

O RNA total foi tratado com DNase e quantificado em espectrofotômetro Thermo Scientific, a 260/280 nm, e sua concentração expressa em $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Para a obtenção do cDNA, 2 μg do RNA total foram utilizados como molde, juntamente com 5 μM do oligonucleotídeo oligo dT e 0,5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de dNTPs, em um volume final de 15 μL . A mistura foi aquecida a 70°C por 5 minutos e depois imediatamente incubada no gelo. Em seguida, foi adicionado o tampão da enzima transcriptase reversa (Invitrogen: Tris-HCl 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.3, KCl 3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgCl_2 75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ e DTT 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), para um volume final de 20 μL . A mistura foi mantida a 37°C, por dois minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 μL de M-MLV RT Transcriptase Reversa (Invitrogen Life Technologies, Inc.), incubando-se à 37°C por 1 hora. A enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos.

Para análise de expressão por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) foram desenhados primers específicos para os genes estudados (Tabela 1) utilizando o programa Primer Express 3.0. As reações de qRT-PCR foram realizadas em

ABI7500 (Applied Biosystems) usando 500 fentomols dos primers com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O RNA do gene para actina foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados. O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para a quantificação da expressão gênica.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados em reação de qRT-PCR.

Primer	Sequência 5'-3'	Gene
qRTAT1G33560 Fwd	GACATCACGACGCAACTCTTAAA	AT1G33560
qRTAT1G33560 Rvs	AGTCGTTTCGGCGATTCCTTT	AT1G33560
qRTAT1G63750 Fwd	TGGTATGCGTCGTGATTTCC	AT1G63750
qRTAT1G63750 Rvs	GCCGTTGATGCGACATAACA	AT1G63750
qRTAT1G75040 Fwd	GCGATGGAGGATTTGAATTGA	AT1G75040
qRTAT1G75040 Rvs	AGCCTGTACGAGCCCAGAAC	AT1G75040
qRTAT2G14610 Fwd	CGAGAGGGTTGCAGCCTATG	AT2G14610
qRTAT2G14610 Rvs	AAGGCCACCAGAGTGTATGA	AT2G14610
qRTAT3G44480 Fwd	GCTCGAACAATTCGGAAGAGA	AT3G44480
qRTAT3G44480 Rvs	ATACCCCTTGCACCAACCAA	AT3G44480
qRTAT3G55230 Fwd	AGCACAAACAGAGGTGAATGGA	AT3G55230
qRTAT3G55230 Rvs	CAAGCGGCACTGCGTTATCT	AT3G55230
qRTAT4G11650 Fwd	TCCGCACTTTTGCTCATCTC	AT4G11650
qRTAT4G11650 Rvs	CAGCCCACACGGTGTA ACTACA	AT4G11650
qRTAT4G16890 Fwd	CTTGTGAATTCGCCCAGAAC	AT4G16890
qRTAT4G16890 Rvs	CTGGATGCCTTCCCATAGCTT	AT4G16890
qRTAT4G16950 Fwd	TATCAACTTAGCCGGTGACCAA	AT4G16950
qRTAT4G16950 Rvs	CTCCCTCCCCTAACGAAAGC	AT4G16950

qRTAT4G33720 Fwd	AGCGGGTCCTATGGAGAGAAC	AT4G33720
qRTAT4G33720 Rvs	TCGTCCACCCACATGTCAAC	AT4G33720
qRTAT5G17970 Fwd	TGTCTCTAGGCGAAACTGCGATA	AT5G17970
qRTAT5G17970 Rvs	CGCCATCTCCAATGAGACAA	AT5G17970
qRTAT5G22690 Fwd	TGACTACCCGATGAGGCGTAT	AT5G22690
qRTAT5G22690 Rvs	CGAGCTTGCTGTGTTGCATT	AT5G22690
qRTAT5G40020 Fwd	CCTCCGGCAACACTTATTCAA	AT5G40020
qRTAT5G40020 Rvs	CCGTCCACGAGGCTTACATC	AT5G40020
qRTAT5G40100 Fwd	CCACATAGTGCTCGCTTCCA	AT5G40100
qRTAT5G40100 Rvs	TTGGGTAGGCGACTCTTTCTG	AT5G40100
qRTAT5G46490 Fwd	TATCAACTTAGCCGGTGACCAA	AT5G46490
qRTAT5G46490 Rvs	CTCCCTCCCCTAACGAAAGC	AT5G46490
qRTAT5G67330 Fwd	GGTAGACATCTGGCGGAGTTG	AT5G67330
qRTAT5G67330 Rvs	GCAATCTCCGCCATAATCCA	AT5G67330
qRTATNIK1B Fwd	AGGCACGGTGGGTCACATT	NIK1
qRTATNIK1B Rvs	TCCCGAAGCCAAAAACATCT	NIK1
qRTACTIN Fwd	ATGTCGTGAGCCATCCCTGTC	ACTINA
qRTACTIN Rvs	ACACCGGATTCGTGCGGCAT	ACTINA

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O receptor NIK atua como um autêntico transdutor de sinais relacionado a mecanismos de resposta imune nas células (Fontes et al., 2004; Carvalho et al., 2008), envolvido na ativação de defesa contra geminivírus. Sabe-se que a infecção viral induz, nas células do hospedeiro, a expressão de genes de defesa (genes PR) e a indução de morte celular programada, fenômenos relacionados à via do ácido salicílico (Chen et al., 2010). Baseado nisso, perguntamos se a ativação constitutiva de NIK iria provocar uma resposta de defesa similar àquela elicitada por infecção viral, através da via do ácido salicílico (SA).

Através de sequenciamento de RNA, foram utilizadas linhagens transgênicas de *Arabidopsis* para avaliar a variação global na expressão de genes, induzida por 35:SNIK1Ser/Tre474D, em comparação com plantas selvagens não inoculadas. Estas análises concentraram em analisar o efeito da expressão de T474D sobre genes relacionados ao sistema imune da planta, que foram divididos em três categoria funcionais, como resposta de defesa à patógenos, resposta de defesa à vírus e silenciamento gênico induzido por vírus (Tabela 1, Anexo).

Análises de enriquecimento gênico utilizando o método de análise de conjuntos de enriquecimento gênico (GSEA) mostraram que os genes diferencialmente expressos pela expressão de T474D não foram enriquecidos nas categorias de silenciamento gênico induzido por vírus e de resposta de defesa viral (Figura 1). Somente para a categoria de resposta de defesa à patógenos, o enriquecimento gênico foi encontrado em genes up e down-regulados.

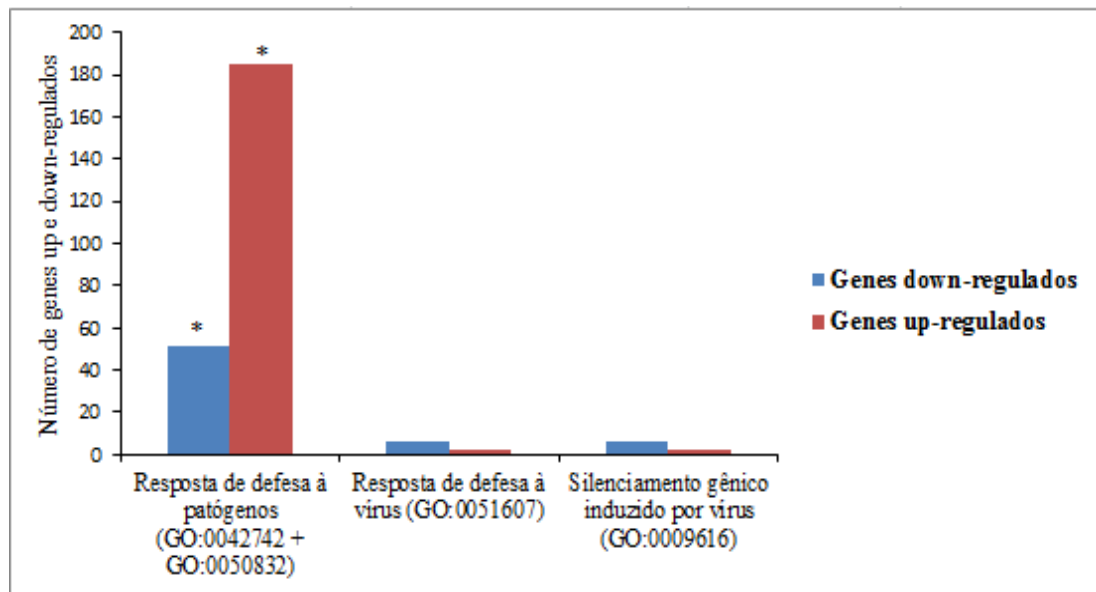
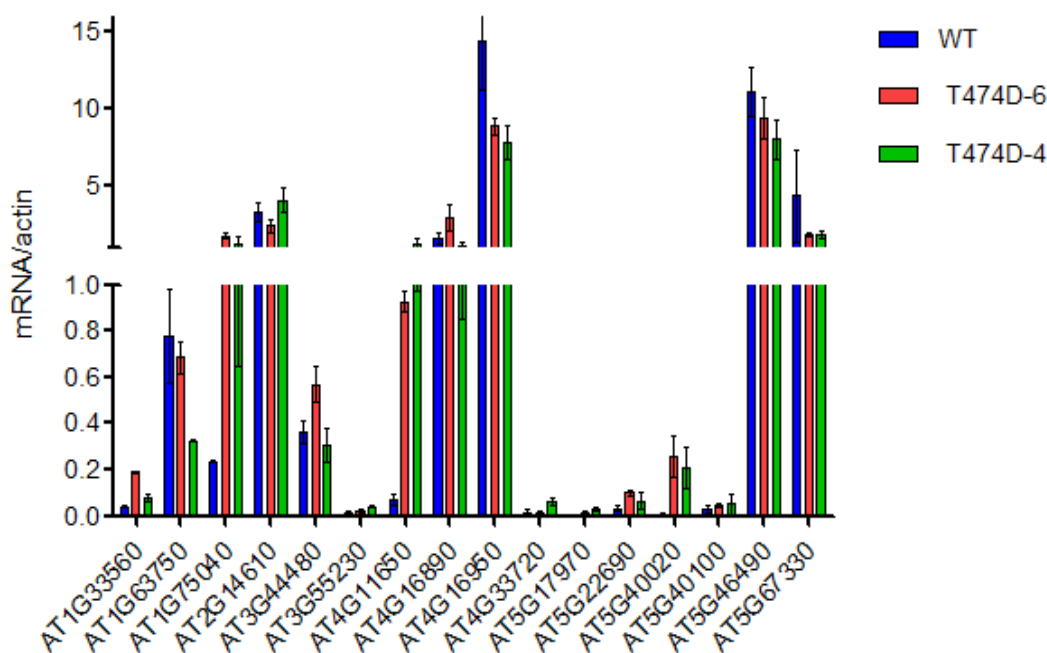


Figura 1. Enriquecimento gênico (edgeR TMM T474D mock 10 dias – WT mock 10 dias) de genes de resposta de defesa à patógenos up e down-regulados. * Teste estatístico baseado no Teste Exato de Fisher com p-valor < 0,01.

O perfil de expressão de uma amostra representativa de genes de defesa em plantas selvagens e T474D de *Arabidopsis* foi também avaliado por qRT-PCR (Figura 2a-b), cujos resultados confirmaram uma correspondência de 80% com os resultados de RNA-seq. No entanto, genes marcadores típicos de sinalização de resposta imune, tais como PR1 e SNC1, não foram diferencialmente expressos ou foram down-regulados. Em geral, genes de resistência codificam proteínas que direta ou indiretamente reconhecem efetores patógenos (Jones e Dangl, 2006), e a maior classe dessas proteínas são LRR-NBS (Meyers et al., 2003). SNC1 (Supressor of NPR1-1, constitutive1) codifica uma dessas proteínas (Zhang et al., 2003), levando à ativação de respostas de defesa rápidas e robustas, incluindo a acumulação de ácido salicílico (SA), a indução da expressão de genes de proteínas relacionadas à patogênese, como PR1, e morte celular programada localizada, conhecida como resposta hipersensitiva (Hammond-Kosack e Jones, 1997), culminando com uma maior resistência à agentes patogênicos (Li et al., 2001).

Similarmente os genes PR1 e SNC1 não foram diferencialmente expressos, assim como outros genes relacionados à resistência. Coletivamente, esses resultados indicam que a expressão ectópica de T474D não ativa respostas de defesa virais típicas, tais como sinalização mediada por SA ou o silenciamento gênico induzido por vírus.

A



B

TAIR 10	log2 (Fold Change)	q-valor (FDR)	Símbolo	Descrição
AT2G14610.1	-2.0266	0.001666228802457	PR1	Pathogenesis-related gene 1
AT4G11650.1	-1.4957	0.0033842099513922	OSM34	osmotin 34
AT3G44480.1	-0.1045	0.763775753084199	RPP1, cog1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT4G16890.1	-0.0927	0.81956561493713	SNC1, BAL	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
AT4G16950.1	-0.0397	0.923791385238997	RPP5	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT4G33720.1	0.0	0.0	PR1	pathogenesis-related gene 1
AT5G17970.1	0.0	0.0		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT5G40100.1	0.1313	1		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT5G46490.1	0.2537	0.557766109000824		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT5G67330.1	0.3322	0.497337654351076	NRAMP4	natural resistance associated macrophage protein 4
AT3G55230.1	0.8647	0.293804289942712		Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) protein
AT5G40020.1	1.1202	0.360825407950067		Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
AT1G63750.1	1.2229	0.209031413356128		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G33560.1	1.3284	0.0253419904795418	ADR1	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
AT5G22690.1	1.8197	0.0106685101569183		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G75040.1	2.8732	0.0007221062898074	PR5	pathogenesis-related gene 5

Figura 2. Análise do perfil de expressão de genes de defesa em plantas selvagens e T474D por qRT-PCR. (A) RNA foi extraído das folhas e o acúmulo dos transcritos dos genes de defesa quantificado por RT-PCR quantitativo. O gene actina foi usado como controle endógeno. A barra indica intervalo de confiança baseado no teste t com p-valor < 0,05. (B) Genes de defesa identificados no sequenciamento de RNA das linhagens 35S::NIK1-5 e 35S::T474D-4.

Também foi avaliado a variação global na expressão de genes pela overexpressão de LIMYB, com focus em genes relacionados ao sistema imune da planta, alocados nas três categorias funcionais, descritas nos experimentos para

T474D (Tabela 1, Anexo). Análises de enriquecimento gênico dos genes diferencialmente expressos detectou enriquecimento significativo apenas para genes down-regulados da categoria de resposta de defesa a patógenos (Figura 3). Estes resultados foram validados por RT-PCR quantitativo para uma amostra representativa de genes, confirmando a não indução de genes marcadores da via de ácido salicílico e de silenciamento gênico (Figure 4).

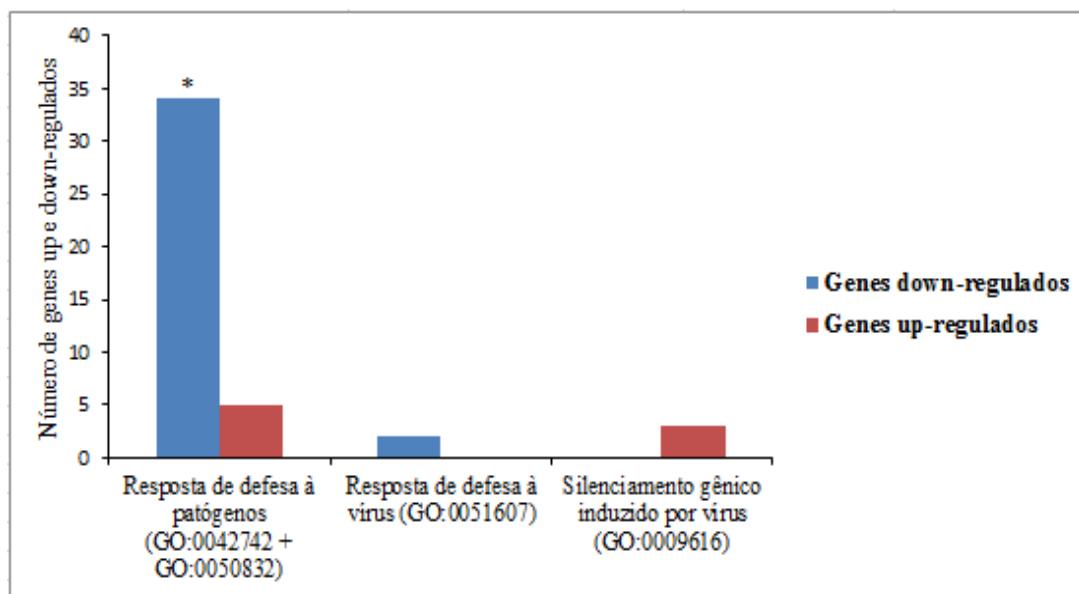


Figura 3. Enriquecimento gênico (edgeR LIMYB over – WT) de genes de resposta de defesa à patógenos down-regulados. * Teste estatístico baseado no Teste Exato de Fisher com p-valor < 0,01.

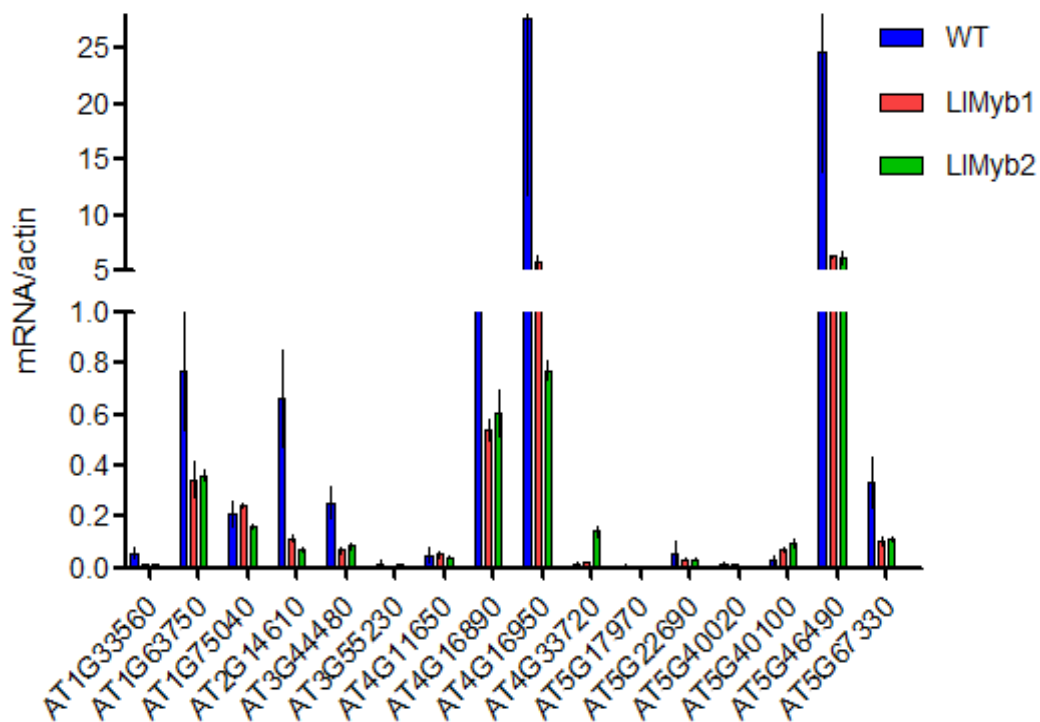


Figura 4. Análise do perfil de expressão de genes de defesa em plantas selvagens e superexpressando LIMyb. RNA foi extraído da folha e o acúmulo dos transcritos dos genes de defesa quantificado por RT-PCR quantitativo. O gene actina foi usado como controle endógeno. A barra indica intervalo de confiança baseado no teste t com p-valor < 0,05.

O ácido salicílico representa um papel central como um sinalizador envolvido na defesa das plantas contra o ataque de microorganismos, ativando um tipo de resistência conhecida como Resistência Sistêmica Adquirida (SAR). O mecanismo da SAR envolve uma cascata de eventos e sinais, os quais iniciam-se no momento da interação planta/patógeno ou do tratamento com fatores abióticos, levando a alterações no seu metabolismo celular, culminando com a emissão de sinais moleculares dirigidos para outras partes da planta, atuando de forma inespecífica, promovendo a redução da severidade da doença. Em resposta à distribuição dos sinais dentro da planta, esta seria induzida a sintetizar genes de defesa, incluindo as proteínas PR.

Baseado nessas observações, avaliamos se a superexpressão de NIK1 seria capaz de induzir a expressão de genes de resistência em plantas nocautes para as principais proteínas conhecidas por participarem da via de indução do sistema imune por SA. O possível efeito de interações negativas de T474D com proteínas chaves na

via do ácido salicílico foi avaliado em protoplastos nocauteadas para as proteínas SID2, PAD4, EDS5, NPR1 e NDR1. Expressão de T474D nos referidos mutantes não alterou o padrão de expressão de uma amostra representativa de genes de resistência, destacados pelo sequenciamento do RNA de linhagem T474D de *Arabidopsis* (Figura 5). Estes resultados indicam que NIK não está ligado geneticamente a via de sinalização de ácido salicílico.

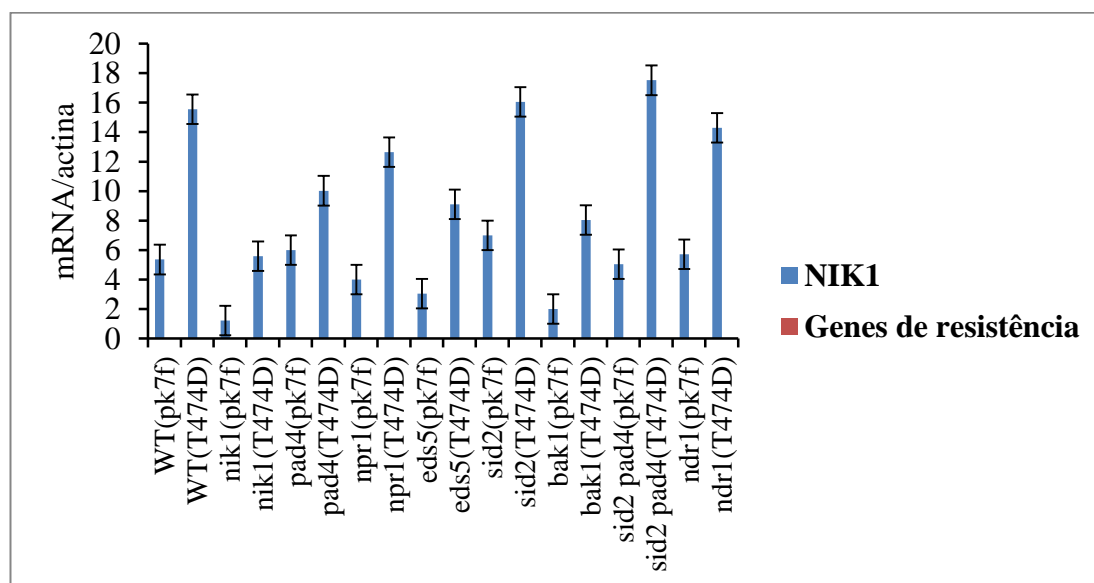


Figura 5. Análise do perfil de expressão de genes de defesa em protoplasto de plantas selvagens e nocauteadas para as principais proteínas conhecidas por participarem da via de indução do sistema imune por SA. RNA foi extraído dos protoplastos e o acúmulo dos transcritos dos genes de defesa quantificado por RT-PCR quantitativo. O gene actina foi usado como controle endógeno. A barra indica intervalo de confiança baseado no teste t com p -valor $< 0,05$.

Todas as proteínas citadas apresentam um papel de destaque, seja na indução da via do SA, ou como produto desta. Vários estudos evidenciam a importância de SID2 (Salicylic acid induction deficient 2), com função de promover a síntese e acúmulo do SA (Ward et al., 1991), o que induz uma complexa rede de regulação genética que afeta a sinalização de resistência ao ataque de patógenos, e estimulam as vias do metabolismo secundário, algumas das quais produzem pequenas moléculas com atividade antibiótica, como as fitoalexinas. PAD4 (*Arabidopsis* phytoalexin deficient 4) é uma das proteínas responsáveis por induzir a síntese de fitoalexinas,

além de interagir com a lipase EDS (Enhanced disease susceptibility), e atuar downstream à SA na resistência basal (Ođjakova e Hadjiivanova, 2001).

Evidências na literatura revelaram um papel fundamental para os membros da subfamília LRRII-RLK de *Arabidopsis* como co-receptores para transdução de sinais de defesa e desenvolvimento (Chinchilla et al., 2009). De fato, o co-receptor BAK1 tem sido implicado na imunidade viral (Kørner et al., 2013) e também em respostas típicas de defesa, como indução de genes marcadores de sinalização de PTI ou SA. A extraordinária similaridade de sequências entre BAK1 e NIK levantou a possibilidade de que NIK também fosse capaz de ativar essas respostas características, além da sinalização antiviral já conhecida. Entretanto, nenhum dos genes analisados foi diferencialmente expresso em todas as amostras utilizadas, corroborando dados de enriquecimento gênico já mostrados no presente trabalho, que mostram que a ativação constitutiva de NIK1 não induziu respostas típicas de defesa do SA. Esses resultados sugerem que, provavelmente, que a via de sinalização mediada por NIK não produz um sinal de defesa que culmina na ativação de genes relacionados ao sistema imune de plantas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECRAFT, P.W. Receptor kinases in plant development. **Trends Plant Science**, v.3, p.384-88, 1998.

BRUSTOLINI, O.J.B., MACHADO, J.P.B., CONDORI-APFATA, J. et al. A sustained NIK-mediated antiviral signaling confers broad-spectrum tolerance to begomoviruses in cultivated plants. Submetido em: **Plant Biotechnology Journal**, em 03/07/14.

CARVALHO, C.M., SANTOS, A.A., PIRES, S.R., ROCHA, C.S., SARAIVA, D.I. et al. Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. **PLoS Pathogens**, v.4, p.e1000247. doi:10.1371/journal.ppat.1000247. 2008.

CHINCHILLA D, SHAN L, HE P, DE VRIES S, KEMMERLING B. One for all: the receptor-associated kinase BAK1. **Trends Plant Sci.** 14:535-541, 2009.

DIEVART A, CLARK SE.. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. **Development** 131, 251–261. 2004.

FATICA, A., TOLLERVEY, D. Making ribosomes. **Curr. Opin. Cell. Biol**, 14, 313-318, 2002.

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

GACHOMO, E.W., SHONUKAN, O.O., OTCHONI, S.O. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. **African Journal Biotechnology**, v.2, p.26-32, 2003.

GOMEZ-GOMEZ, L., BOLLER, T. Flagellin perception: A paradigm for innate immunity. **Trends Plant Science**, v.7, p.251-256, 2002.

HAMMOND-KOSACK KE, JONES JD. Plant disease resistance genes. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 48: 575–607. 1997.

KØRNER CJ, et al. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. **Mol. Plant Microbe Interact.**26:1271-1280, 2013.

LAFONTAINE, D.L.J., TOLLERVEY, D. The function and synthesis of ribosomes. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol**, 2, 514-520, 2001.

LAZAROWITZ, S. G, BEACHY, R. N. Viral movement proteins as probes or intracellular and intercellular trafficking in plants. **The Plant Cell**, v. 11, p. 535-548, 1999.

LI X, CLARKE JD, ZHANG Y, DONG X. Activation of an EDS1-mediated R-gene pathway in the *snc1* mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. **Mol Plant Microbe Interact** 14:1131–1139. 2001.

LIN, H.Y., WANG, X.F., NG-EATON, E., WEINBER, R.A., LODISH, H.F. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. **Cell**, v.68, p.775-785, 1992.

LOPES, K.V.G. Universidade Federal de Viçosa. Vias de sinalização de defesa contra vírus mediada pelo receptor imune NIK1 (NSP-interacting kinase). Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. 2012.

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

MEYERS BC, KOZIK A, GRIEGO A, KUANG H, MICHELMORE RW. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. **Plant Cell** 15: 809–834. 2003.

NIYOGI, K.K. Arabidopsis protoplast isolation and transformation. 2005.

NOLEN, B., TAYLOR, S., GHOSH, G. Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation. **Molecular Cell**, 15, 661-666, 2004.

NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell** 76, 965-932, 1994.

ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. The complexity of pathogen defense in plants. **Bulg. J. Plant Physiol.**, 27(1–2):101–109, 2001.

OLSEN, M.O., DUNDR, M., SZEBENI, A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. **Trend Cell Biol.**, 10, 189-196, 2000.

ROCHA, C.S., SANTOS, A.A., MACHADO, J.P.B, FONTES, E.P.B. The ribosomal protein L10-QM-like protein is a component of the NIK – mediated antiviral signalling. **Virology**, v.380, p.165-169, 2008.

SANTOS AA, CARVALHO CM, FLORENTINO LH, RAMOS JJO, FONTES EPB. Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. **PLoS ONE**. 4:e5781, 2009.

SANTOS AA, LOPES KVG, APFATA JAC, FONTES EPB. NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signaling. **Journal of Experimental Botany**, 61(14)3839–3845, 2010.

SHIU, S.H., BLEECKER, A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v.98, p.10763-10768, 2001.

THURSTON, G., REGAN, S., RAMPITSCH, C., XING, T. Proteomic and phosphoproteomic approaches to understand plant–pathogen interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.66, p.3-11, 2005.

WARD, E.R., UKNES, S.J., WILLIAMS, S.C., DINCHER, S.S., WIEDERHOLD, D.L., ALEXANDER, D.C., AHL-GOY, P., MÉTRAUX, J.-P., AND RYALS, J.A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell** 3, 1085–1094. 1991.

ZHANG Y, GORITSCHNIG S, DONG X, LI X. A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. **Plant Cell** 15:2636–2646. 2003.

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

ZORZATTO, C. Universidade Federal de Viçosa. Caracterização Funcional de um novo fator transcricional Myb componente downstream da via de sinalização de defesa antiviral mediada pelo receptor imune NIK1 (NSP-interacting kinase). Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. 2013.

5. ANEXOS

Tabela 1. Análise do enriquecimento gênico (edgeR TMM T474D mock 10 dias – WT mock 10 dias and LIMyb over – WT).

(edgeR TMM T474D mock 10 dias – WT mock 10 dias)					
Processos Biológicos	Total	Genes down-regulado	P-valor	Genes up-regulados	P-valor
TAIR (GO database)	30321	3076		4082	
Resposta de defesa à patógenos (GO:0042742 + GO:0050832)	508	51	0.00586012*	185	1.2584e-59*
Resposta de defesa à vírus (GO:0051607)	54	6	0.47175	2	0.9962
Silenciamento gênico induzido por vírus (GO:0009616)	101	6	0.95083	2	0.9999
edgeR TMM - LIMyb superexpressão – WT					
TAIR (GO database)	30321	712		481	
Resposta de defesa à patógenos (GO:0042742 + GO:0050832)	501	34	5.86101e-08*	5	0.907354
Resposta de defesa à vírus (GO:0051607)	54	2	0.363018	0	NA
Silenciamento gênico induzido por vírus (GO:0009616)	101	0	NA	3	0.216204

*Teste estatístico baseado no Teste Exato de Fisher com p-valor < 0,01.

Capítulo 2

Interação in vivo da proteína NSP (Nuclear shuttle protein) de begomovírus com um membro da família t-SNARE.

Resumo - A família Geminiviridae compreende a segunda família mais numerosa entre os vírus de plantas. O genoma dos geminivírus consiste em uma ou duas moléculas circulares de DNA fita simples, e é replicado no núcleo das células vegetais através das maquinarias celulares e interação com uma grande variedade de proteínas da planta, reprogramando o ciclo celular das células infectadas para induzir a replicação tanto do DNA viral quanto DNA cromossômico da planta. O gênero Begomovírus constitui o maior grupo dentro da família, e todos os representantes deste gênero possuem genoma composto por um ou dois componentes, denominados DNA A e DNA B. No DNA A, encontram-se os genes codificadores da proteína do capsídeo (CP) e de proteínas envolvidas no processo de replicação, como a Rep. No DNA B, estão presentes os genes das proteínas relacionadas à movimento, MP e NSP. A proteína NSP possibilita a movimentação do DNA viral entre o núcleo e o citoplasma da célula vegetal, enquanto MP é responsável pelo transporte do complexo viral NSP-DNA célula a célula através dos plasmodesmos e também a longa distância via floema. Por desempenhar uma função importante no transporte do DNA viral, é bastante provável que NSP interaja com outras proteínas do hospedeiro em diversas regiões celulares. O principal objetivo dessa investigação foi identificar proteínas de plantas que interagem com proteínas virais, além da caracterização bioquímica e funcional dessas proteínas. Com a finalidade de identificar alvos celulares para a proteína NSP, foi realizada uma triagem de proteínas candidatas, utilizando um microarranjo de proteínas expressas a partir de 12000 cDNAs de Arabidopsis. Este escrutínio de espectro genômico permitiu a identificação de uma proteína com características de uma t-SNARE, codificada pelo locus At4g30240, cuja interação com NSP foi confirmada pelo ensaio de duplo híbrido em levedura. Foi também avaliada a interação in vivo entre NSP e At4g30240, pelo ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC), no qual a reconstituição da fluorescência da proteína quimérica ocorreu na membrana e no citoplasma. A fim de determinar a localização subcelular de At4g30240, foi realizado o ensaio de expressão transiente, que demonstrou a presença da proteína em vários compartimentos celulares, sugerindo que At4g30240 está amplamente distribuída na

célula. Tais resultados indicam que At4g30240 interage com NSP, e pode mediar ou mesmo facilitar o transporte dessa proteína entre compartimentos celulares.

1. INTRODUÇÃO

A família Geminiviridae, que recebe este nome por ser composta por vírus icosaédricos geminados, causa doenças em várias culturas agrícolas importantes, como tomate, milho, feijão e algodão, levando a prejuízos substanciais no mundo todo, em razão da perda das safras. A incidência e severidade das doenças causadas por geminivírus aumentou muito nos últimos 20 anos (Mansoor et al., 2006; Navas-Castillo et al., 2011), em decorrência dos elevados níveis de mutação, recombinação e rearranjos que ocorrem nos genomas virais, aumentando assim a diversidade dessa família (Harkins et al., 2009; Martin et al., 2011; Lima et al., 2012). O desenvolvimento de resistência a inseticidas e a evolução de novos biótipos de vetores, em particular moscas brancas, permitiram aos geminivírus invadir novas regiões, além de reunir novas combinações de vírus em doenças bastante complexas, representando grandes ameaças à segurança da agricultura mundial (Lefeuvre et al., 2010; Tahir et al., 2011; De Bruyn et al., 2012).

O genoma dos geminivírus consiste em uma ou duas moléculas circulares de DNA fita simples (ssDNA), e é replicado no núcleo das células vegetais. Para que ocorra o processo de replicação, eles dependem das maquinarias celulares e interagem com uma grande variedade de proteínas da planta durante o processo de infecção, reprogramando o ciclo celular das células infectadas para induzir a replicação tanto do DNA viral quanto DNA cromossômico da planta. Além disso, os geminivírus também são capazes de alterar padrões de expressão gênica, inibir vias de morte celular, alterar o tráfego de macromoléculas, e interferir na sinalização celular e turnover de proteínas para redirecionar ou bloquear as defesas do hospedeiro e sinalização hormonal (Hanley-Bowdoin et al., 2013).

Os geminivírus compreendem a segunda família mais numerosa entre os vírus de plantas, superada apenas pela família Potyviridae (Berger et al., 2005). São classificados pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus em sete gêneros (Begomovírus, Mastrevírus, Curtovírus, Becurtovírus, Eragrovírus, Topocuvírus e Turncurtovírus), distinguidos de acordo com a estrutura do genoma (monopartido ou bipartido), inseto vetor (mosca branca ou cigarrinha), planta hospedeira (monocotiledônia ou dicotiledônia) e origem filogenética (Brown et al., 2012).

O gênero Begomovírus constitui o maior grupo dentro da família Geminiviridae, e também o mais bem descrito pela literatura, devido a sua

importância econômica por causar doenças em culturas diversas como feijão, mandioca, milho e tomate (Moriones e Navas-Castillo, 2000). Todos os representantes deste gênero possuem genoma composto por um ou dois componentes, denominados DNA A e DNA B. DNA A contém seis ORFs, em sentido viral ou complementar, que codificam cinco genes envolvidos em mecanismos de replicação (Rep e Ren), ativação da transcrição (TrAP), encapsidação (CP), e supressão de funções de defesa por RNA de interferência (TrAP e AC4) (Timmermans et al., 1994; Vanitharani et al., 2005). No sentido viral, encontra-se o gene que codifica a proteína CP (coat protein, AV1), componente do capsídeo viral e, portanto, responsável pela transmissão viral e especificidade do inseto vetor. Os genes que codificam as quatro proteínas restantes, Rep, Ren, TrAP e AC4, localizam-se no sentido complementar de leitura e dentre as quais se destaca Rep (replication-associated protein, AC1), a única proteína essencial para o processo de replicação do DNA viral (Elmer et al., 1998; Fontes et al., 1994).

O DNA B contém duas ORFs, que codificam os genes NSP (nuclear shuttle protein, BV1) no sentido viral, e MP (movement protein, BC1) no sentido complementar (Hanley-Bowdoin et al., 1999). A proteína NSP possibilita a movimentação do DNA viral entre o núcleo e o citoplasma da célula vegetal, enquanto MP é responsável pelo transporte do complexo viral NSP-DNA célula a célula através dos plasmodesmos e também a longa distância via floema (Rojas et al., 2005; Zhou et al., 2011).

A infecção por begomovírus se inicia quando uma mosca branca que transporta o vírus se alimenta da seiva através do floema de uma folha saudável, e os transmite para as células por associação com o floema. Já na célula, o ssDNA viral é libertado do vírus e é replicado pela DNA polimerase, que sintetiza a fita complementar com oligonucleotídeos de RNA (Saunders e Stanley, 1992; Danson et al., 1984). O cDNA é transcrito pela RNA polimerase II do hospedeiro, permitindo a produção da proteína Rep, que então inicia a replicação viral círculo-rolante (Jeske et al., 2001). DNAs circulares recém-sintetizados podem ser convertidos em dsDNA para entrar novamente no ciclo de replicação ou podem ser encapsulados após a proteína CP ser sintetizada. A infecção é propagada no interior da planta pelo movimento do DNA viral para fora do núcleo para a próxima célula ou para o floema, através da ação das proteínas virais de movimento, NSP e MP (Noueiry et al., 2001; Sanderfoot e Lazarowitz et al., 2011).

O transporte do DNA viral tem início quando NSP interage com a histona H3, levantando a possibilidade de que o material genético se move como um minicromossomo (Zhou et al., 2011). Acredita-se que o dsDNA é empacotado em nucleossomos e esse grau de compactação aumenta quando se liga a NSP, através da cauda amino-terminal de H3 (Zhou et al., 2011). A compactação pode ser aumentada, ainda, por meio da supressão de acetilação das histonas por AtNSI, uma acetiltransferase de *Arabidopsis thaliana* inibida por NSP (Carvalho et al., 2006). H3 também interage com MP e foi detectada em plasmodesmos de células infectadas, sugerindo que o movimento de DNA viral entre as células ocorre em associação com nucleossomos (Zhou et al., 2011).

Uma GTPase, denominada NIG (NSP-interacting GTPase), associada ao exterior do envelope nuclear facilita o trânsito de NSP para o citosol (Carvalho et al., 2008). O complexo NSP-DNA interage com MP, e através de um mecanismo que envolve uma hidrólise catalisada por NIG, o complexo MP-DNA move-se para a periferia da célula (Carvalho et al., 2008). Finalmente o vírus move-se para as células vizinhas através dos plasmodesmos e para o floema, onde é transportado a longa distância, até a aquisição do vírus pelo vetor, o que corresponde à última etapa do ciclo (Martin et al., 2011).

A proteína NIK (NSP-interacting kinase) é um receptor transmembrana serina/treonina cinase, anteriormente isolado em plantas de tomate e soja, pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP de begomovírus. Além disso, homólogos desse receptor em *Arabidopsis thaliana* também mostraram capacidade de interagir com NSPs, demonstrando que a interação com NIKs é conservada entre NSPs de begomovírus (Fontes et al., 2004). Por desempenhar uma função importante no transporte do DNA viral, é bastante provável que NSP interaja com outras proteínas do hospedeiro em diversas regiões celulares.

A resistência de plantas à geminivírus vem sendo explorada através da utilização de biotecnologia, a fim de se obter culturas resistentes ou mais tolerantes à infecção por geminivírus (Shepherd et al., 2010). Porém, para se obter uma planta geneticamente modificada resistente a geminivírus, é necessário, primeiramente, conhecer as vias de sinalização pelas quais estes vírus interagem com o hospedeiro, identificando componentes moleculares e interações chave da via de defesa cuja manipulação possa comprometer o estabelecimento da infecção viral (Vandershuren et al., 2007).

O principal objetivo dessa investigação foi identificar proteínas de plantas que interagem com proteínas virais, além da caracterização bioquímica e funcional dessas proteínas. Estes conhecimentos constituem etapas de fundamental importância para a elucidação do mecanismo de infecção viral, bem como para a estruturação de um modelo de interação planta/patógeno, possibilitando o estabelecimento de estratégias de resistência, através da engenharia genética de plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das construções de DNA.

Os cDNAs de At4g30240 e NSP foram isolado mediante amplificação via PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para estes genes, At4g30240-Fwd e At4g30240St-Rvs ou At4g30240Ns-Rvs, e para NSP-Fwd e NSPSt-Rvs ou NSPNs-Rvs, respectivamente (Tabela 1). Os produtos obtidos foram submetidos a uma segunda reação de amplificação utilizando oligonucleotídeos contendo extensões de recombinação para clonagem através do sistema Gateway (Invitrogen) AttB1-Fwd e AttB1-Rvs, e clonados, por recombinação, nos vetores de entrada (pDONR201 e pDONR207) com (St) ou sem (Ns) códon de terminação de tradução. Os clones resultantes foram At4g30240St-pDONR201 (pUFV2134), At4g30240Ns-pDONR201 (pUFV2135), At4g30240St-pDONR207 (pUFV2236), At4g30240Ns-pDONR207 (pUFV2237), NSPSt-pDONR207 (pUFV924), NSPNs-pDONR207 (pUFV925). Em seguida, os insertos dos clones de entrada foram transferidos, por recombinação, para os vetores de expressão em levedura (pDEST22 e pDEST32) e em plantas (pK7FWG2, pSPYNEGW e pSPYCEGW). Nos clones resultantes At4g30240St-pDEST22 (pUFV2142), At4g30240St-pDEST32 (pUFV2141), NSPSt-pDEST22 e NSPSt-pDEST32 (Fontes et al., 2004) de expressão em leveduras, At4g30240 e NSP estão fusionados ao domínio de ligação (pDEST22) ou de ativação (pDEST32) de GAL4. O clone resultante At4g30240Ns-pK7FWG2 (pUFV2436) de expressão em plantas contém o cDNA de At4g30240 com GFP fusionado no seu carboxi terminal, sob o controle do promotor 35S. Nos clones resultantes At4g30240Ns-SPY-NE-GW (pUFV2238), At4g30240Ns-SPY-CE-GW, NSPNs-SPY-NE-GW (pUFV1654) e NSPNs-SPY-CE-GW (pUFV1655), os cDNAs de At4g30240 e NSP estão ligados, respectivamente, ao domínio N-terminal (NE) ou ao domínio C-terminal (CE) de YFP, sob controle do promotor 35S.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados em reação de qRT-PCR.

Primer	Sequência 5'-3'	Gene
At4g30240 Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGATGGTAGCGAATAG	At4g30240
At4g30240NS Rvs	AGAAAGCTGGGTCAGTTCTCAAGATGAATAATAG	At4g30240
At4g30240 Rvs	AGAAAGCTGGGTCCTTAAGTTCTCAAGATGAATAA	At4g30240
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	TATAACGCGTTTGAATCACT	pDEST22
DEST22 Rvs	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC	pDEST22
4799 Rvs	CGCCCTCGCCCTCGCCGGACAC	GFP
MC36 Fwd	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC	35S
NSP Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGTATCCTACAAAGTT	NSP
NSP-Ns Rvs	AGAAAGCTGGGTCACCTAAATAATCAAGATC	NSP

2.2. Localização subcelular e microscopia confocal.

A expressão transiente de genes de interesse foi mediada por *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 em folhas de *Nicotiana benthamiana* por agroinoculação. As culturas carreando a construção At4g30240-pK7FWG2 foram crescidas em meio Rhizo, contendo os antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2500 x g por 5 minutos e lavadas duas vezes com tampão de infiltração (MgCl₂ 10Mm, MES 10mM, ph 5,6 e acetoceringona 100µM) e diluídas em tampão de infiltração para uma O.D._{600nm}=0,2. Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de *N. benthamiana* foram infiltradas, por meio de uma leve pressão através dos estômatos da epiderme inferior.

A expressão das proteínas foi verificada por microscopia de varredura a laser confocal (LSM 510 META invertido – ZEISS), três dias após a agroinoculação, utilizando o laser de argônio. As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser 4” (ZEISS).

2.3. Ensaio de Duplo-Híbrido em leveduras.

Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , LYS2::GAL1/UAS-10 GAL1/TATAHIS3, MEL1 GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ), deficiente na produção de triptofano, leucina e uracila 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). As células foram então centrifugadas a 3000x g por 4 minutos e lavadas com 1 mL de água deionizada e, em seguida, ressuspensas em 1 mL de Acetato de lítio 100 mM. Após nova centrifugação, procedeu-se à cotransformação das células com os DNAs plasmidiais utilizando-se o método de transformação com acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG). Para cada transformação, foram adicionados às células 240 μ L de polietilenoglicol 50% (p/v; PEG, MW 3350), 36 μ L de acetato de lítio 1 M, 25 μ L de ssDNA 2 μ g/ μ L e 50 μ L de solução contendo entre 2-5 μ g de cada uma das construções de interesse.

As leveduras repórteres foram cotransformadas com as construções pAD-NSP + pBD- At4g30240 ou pBD-NSP + pAD-At4g30240, além de seus devidos controles. As células foram então homogeneizadas e incubadas, inicialmente a 30°C por 30 minutos, e, em seguida, a 42°C por 25 minutos. Após a centrifugação a 6000 x g por 15 segundos, as células foram lavadas com 1 mL de água deionizada, plaqueadas em meio seletivo e mantidas a 28°C por três dias. Para a seleção dos duplos 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 e 10 mM de 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole; Sigma).

2.4. Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC).

O ensaio de BiFC foi realizado utilizando folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com tampão de infiltração ($MgCl_2$ 10mM, MES 10mM, pH 5,6 e acetoceringona 100 μ M) para $O.D._{600nm}=1$, com as seguintes combinações de plasmídeos:

1. pSPYNE-At4g30240 + pSPYCE-NSP
2. pSPYCE-At4g30240 + pSPYNE-NSP
3. pSPYNE-At4g30240 + pSPYCE
4. pSPYNE-NSP + pSPYCE
5. pSPYCE-At4g30240 + pSPYNE
6. pSPYCE-NSP + pSPYNE

Fragmentos das folhas foram analisados em microscopia confocal (LSM 510 META invertido – ZEISS), três dias após a agroinoculação, utilizando o laser de argônio, com fluorescência do YFP avaliada com excitação à 514nm e emissão à 560nm. As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser 4” (ZEISS).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O interactoma de Arabidopsis tem identificado uma série de interações entre proteínas que participam do sistema de resposta de defesa das plantas. Com a finalidade de identificar alvos celulares para a proteína NSP, foi realizada uma triagem de proteínas candidatas, utilizando um microarranjo de proteínas expressas *in situ* a partir de cDNA de *A. thaliana* (M. L. Dal-Bianco, comunicação pessoal). Dentre as possíveis interações positivas, foi identificada a proteína codificada pelo locus At4g30240, cuja interação com NSP foi confirmada pelo ensaio de duplo híbrido em levedura (Figura 1). Co-expressão das proteínas recombinantes BD-NSP e AD-At4g30240 promoveu o crescimento das leveduras transformadas em meio seletivo, suplementado com 3AT 2.5 mM. Em contraste, adição de 3AT ao meio seletivo inibiu o crescimento das leveduras transformadas com os controles, confirmando a especificidade da interação entre NSP e At4g30240. A alternância das fusões de NSP e At4g30240 com o domínio de ligação (BD) e de ativação (AD) de Gal4 inibiu o crescimento de leveduras co-transformadas na presença de 3AT, o que provavelmente indica que as interações são sensíveis a orientação das fusões nas proteínas ligantes. O locus At4g30240 codifica uma proteína de função ainda desconhecida, de 300 resíduos de aminoácidos, com massa molecular predita de 34416.4 Da, com características de uma sintaxina, pertencente à família das t-SNARE.

Proteínas SNARE desempenham papel importante na formação, tráfego e fusão de vesículas, acoplando-as aos seus receptores específicos. SNAREs são classificadas de acordo com sua localização e função, em v-SNAREs e t-SNAREs, que estão localizadas na membrana da vesícula ou na membrana-alvo, respectivamente (Jahn e Sudhof, 1999). Acredita-se que v-SNAREs, com a ajuda de pequenas GTPases, interagem com diversas t-SNAREs localizadas exclusivamente no compartimento do receptor (Fukuda et al., 2000). A interação da v-SNARE com t-SNAREs específicas garante acurácia e especificidade à proteína alvo. Esta interação estabelece um complexo vesícula/receptor, que permite a fusão das duas membranas, entregando a proteína transportada pela vesícula para o compartimento alvo (Jahn e Sudhof, 1999). O complexo v-SNARE/t-SNARE é desmontado após a fusão das membranas e as SNAREs tornam-se, então, disponíveis para o próximo ciclo do tráfego.

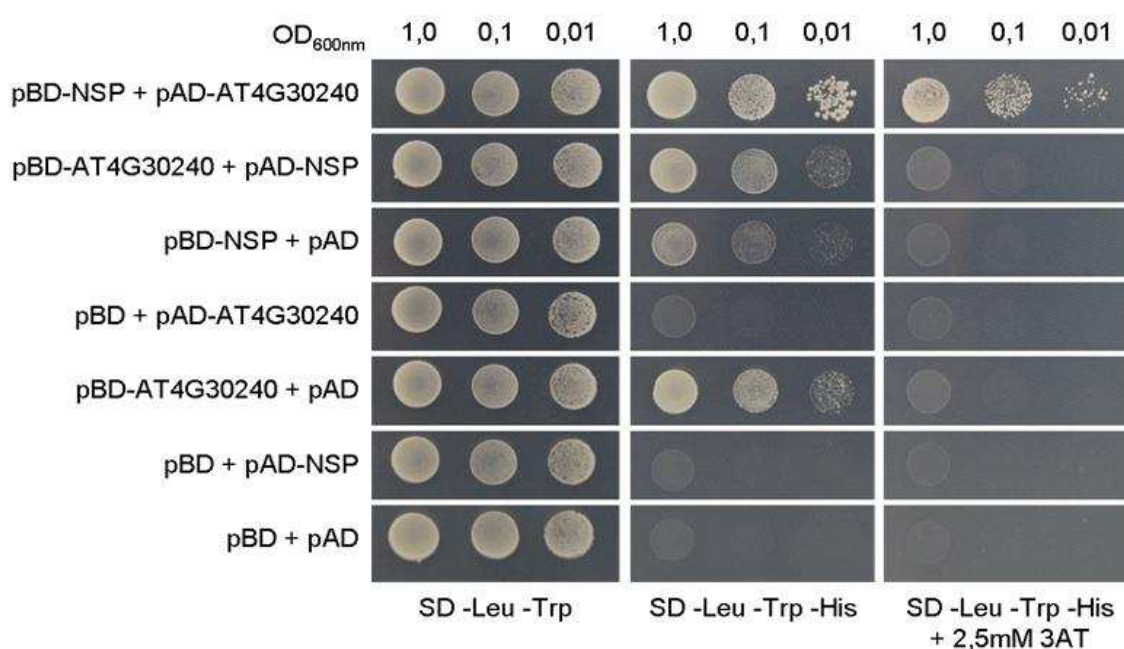


Figura 1. A proteína At4g30240 interage com NSP em levedura. Leveduras co-trasformadas com AD-At4g30240 e BD-NSP apresentam prototrofia à histidina. Células de levedura expressando as proteínas recombinantes indicadas foram avaliadas quanto à sua prototrofia à histidina, sendo plaqueadas em meio seletivo deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, suplementado com 2,5 mM de 3AT.

A interação *in vivo* entre NSP e At4g30240 também foi avaliada pelo ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) (Figura 2). Inicialmente, as proteínas NSP e At4g30240 foram fusionadas às porções N-terminal e C-terminal não fluorescente da proteína amarela fluorescente YFP. Culturas de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV3101, carregando as combinações das construções, foram agroinoculadas em folhas de *N. benthamiana*. Após 72 h, fragmentos das folhas infiltradas foram analisados em microscopia confocal. A fluorescência emitida por YFP foi reconstituída no citoplasma e membrana das células coexpressando NSP-SPYNE e At4g30240-SPYCE (Figura 2A), bem como em folhas coexpressando NSP-SPYCE e At4g30240-SPYNE (Figura 2B). Nenhuma fluorescência foi detectada quando NSP e At4g30240 foram coinfiltradas com o vetor complementar vazio (Figuras 2C e 2D), demonstrando a especificidade das interações detectadas *in vivo*.

Devido a sua função no transporte intracelular do DNA viral, prevê-se que NSP associe extensivamente com a maquinaria de transporte intracelular de células hospedeiras com sítios de reconhecimento em todos os compartimentos celulares. Já foi demonstrado que NSP interage com NIG (NSP-Interacting GTPase), no citoplasma, para facilitar a liberação do complexo DNA-proteína no citoplasma (Carvalho et al., 2008). A proteína NIG possui atividade GTPase intrínseca, uma característica comum de proteínas regulatórias envolvidas no tráfego de proteínas (Carvalho et al., 2008b). Também foi relatado que proteínas com atividade GTPase interagem com t-SNARES durante o transporte de proteínas até o compartimento alvo. Interligando essas informações e os resultados demonstrados, sugere-se que a t-SNARE At4g30240 interaja com NSP, mediando ou mesmo facilitando o transporte dessa proteína entre compartimentos celulares.

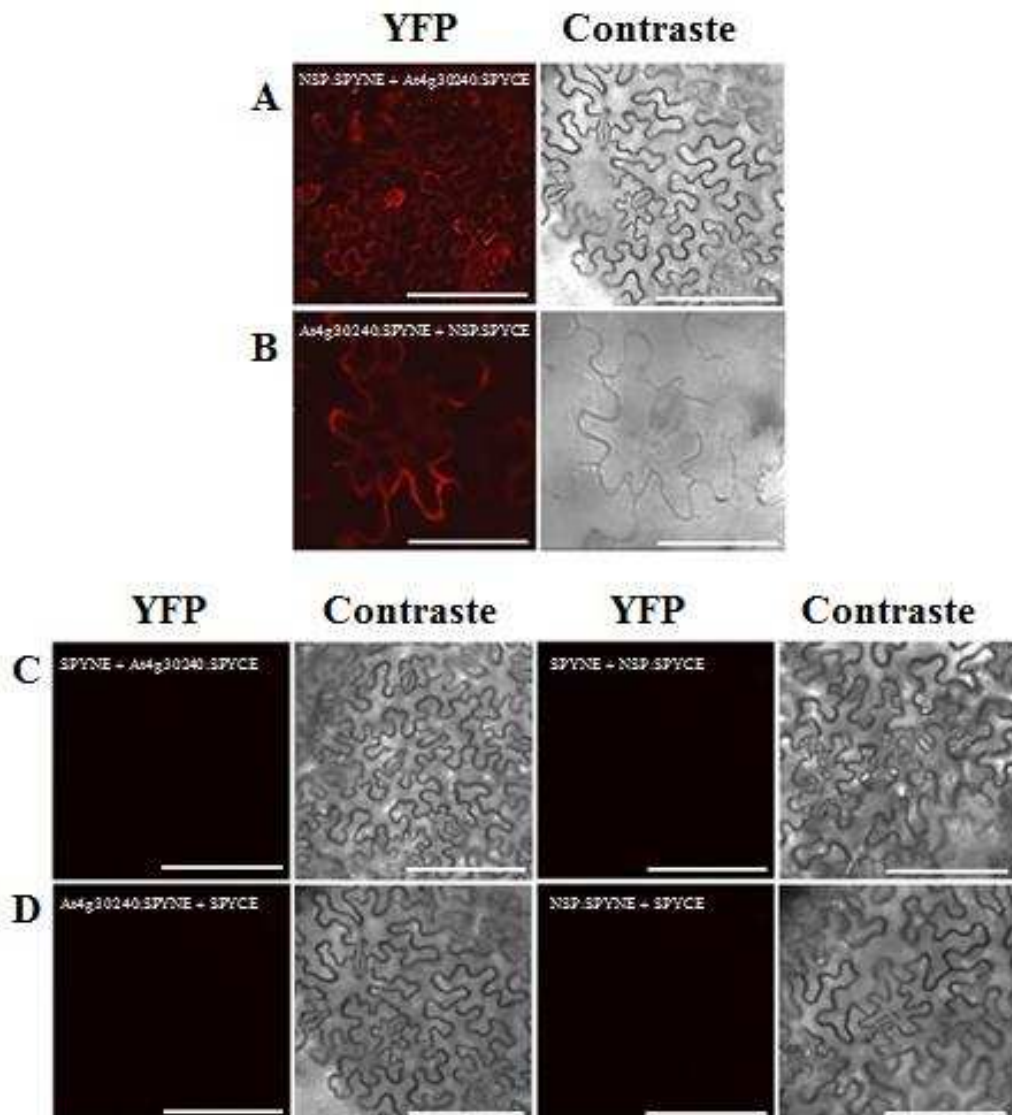


Figura 2. A interação entre NSP e At4g30240 ocorre na membrana plasmática e no citoplasma. Fragmentos não fluorescentes da proteína YFP, NE e CE, foram fusionados a NSP e At4g30240. Diferentes combinações de construções, conforme indicado, foram agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana* e analisadas por microscopia confocal, 72h após inoculação. As barras equivalem a 10 μ m.

A fim de determinar a localização subcelular de At4g30240, foi realizado o ensaio de expressão transiente, mediado por *A. tumefaciens*, em células epidérmicas de folha de *N. benthamiana*. A proteína At4g30240 foi fusionada à GFP e sua localização foi analisada por microscopia confocal. A fluorescência emitida pela proteína quimérica apresentou-se em vários compartimentos celulares (Figura 3A), inclusive no núcleo, e exceto no nucléolo (Figura 3B).

Se as SNAREs atuam em diversos processos de transporte e fusão celular, essas proteínas são amplamente distribuídas nas células, estando presentes em vários compartimentos intracelulares. Ainda, análises de sequências revelaram que todas as SNAREs partilham um domínio de 60 aminoácidos, que é referida como o motivo SNARE. O motivo SNARE é a característica definidora de todas as SNAREs e também é funcionalmente importante porque medeia a associação dessas proteínas em complexos no núcleo (Pizarro e Norambuena, 2014). Além disso, outras proteínas de *Arabidopsis*, também caracterizadas como t-SNAREs, como At1g27700 e At2g18860, também foram encontradas no núcleo (The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR). Em conjunto, todos os dados validam o resultado encontrado no ensaio de localização, sugerindo que At4g30240 está amplamente distribuída na célula.

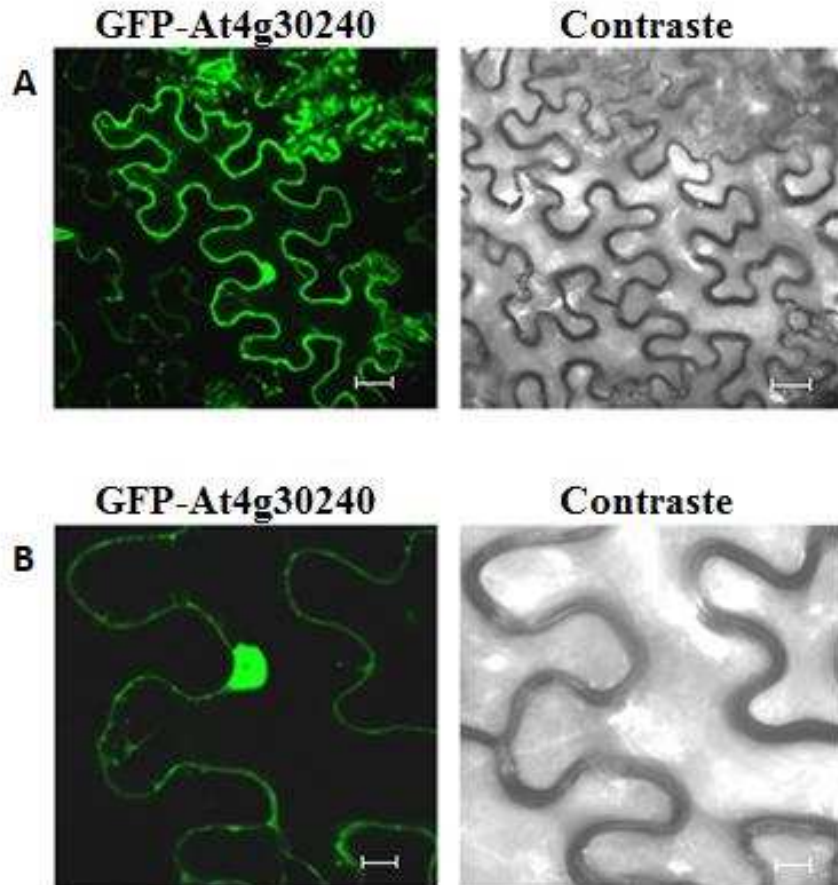


Figura 3. Localização subcelular de At4g30240 em folhas de *N. benthamiana*. (A) GFP-At4g30240 localiza em várias regiões das células de folhas de *N. benthamiana* transfectadas. Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *A. tumefaciens* carregando a construção At4g30240-GFP e a localização da proteína recombinante analisada por microscopia confocal. (B) Localização nuclear da At4g30240-GFP em células de folhas de *N. benthamiana*. As barras equivalem a 10 μ m.

A caracterização bioquímica e funcional de proteínas da planta hospedeira que interagem com proteínas virais é de fundamental importância para o entendimento do mecanismo de infecção viral, bem como para a estruturação de um modelo de interação planta/patógeno, possibilitando o estabelecimento de estratégias de resistência, através da engenharia genética de plantas. As informações obtidas neste trabalho sugerem que a função de At4g30240 na interação com NSP está relacionada ao movimento da proteína viral entre regiões celulares. Sabemos que a propagação da infecção na planta é devido ao movimento do DNA viral entre regiões celulares e entre células, e por isso, entender como esse movimento ocorre e quais

proteínas da planta estão envolvidas nesse processo é essencial para desvender os mecanismos de infecção. Entretanto, novos estudos são necessários para auxiliar na elucidação da função dessa proteína, e das bases moleculares na interação com NSP.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGER, P.H., ADAMS, M.J., BARNETT, O.W., BRUNT, A.A., VETTEN, H.J. Family Potiviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Ball, L.A. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: **Elsevier Academic Press**. 819-841. 2005.

BROWN, J.K., FAUQUET, C.M., BRIDDON, R.W., ZERBINI, M., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, J. Family Geminiviridae. In: Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses-Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (King, A.A.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., eds), pp. 351-373. London: Elsevier Academic Press. 2012.

CARVALHO, M. F., TURGEON, R. & LAZAROWITZ, S. G. The geminivirus nuclear shuttle protein NSP inhibits the activity of AtNSI, a vascular-expressed Arabidopsis acetyltransferase regulated with the sink-to-source transition. **Plant Physiol.** 140, 1317–1330. 2006.

CARVALHO, C.M., SANTOS, A.A., PIRES, S.R., ROCHA, C.S., SARAIVA, D.I. et al. Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. **PLoS Pathogens**, v.4, p.e1000247. doi:10.1371/journal.ppat.1000247. 2008.

DE BRUYN, A. et al. East African cassava mosaic-like viruses from Africa to Indian ocean islands: molecular diversity, evolutionary history and geographical dissemination of a bipartite begomovirus. **BMC Evol. Biol.** 12, 228. 2012.

DONSON, J., MORRIS-KRSINICH, B. A., MULLINEAUX, P. M., BOULTON, M. I. & DAVIES, J. W. A putative primer for second-strand DNA synthesis of Maize streak virus is virion-associated. **EMBO J.** 3, 3069–3073. 1984.

ELMER, J.S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W.E., BISARO, D.M., ROGERS, S.G. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. Requirement for the product of the highly conserved ALI coding sequence for replication. **Nucleic AcidsRe**, 16, 7043-7060. 1988.

FONTES, E.P.B., GLADFELTER, H.J., SCHAFFER, R.L., PETTY, I.T.D., HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **The Plant Cell**, 6, 405-416. 1994.

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

FUKUDA R, MCNEW JA, WEBER T, PARLATI F, ENGEL T, NICKEL W, ROTHMAN JE, SOLLNER TH. Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. **Nature**;407:198±202. 2000.

HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S., ROBERTSON, D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Crit. Rev. Plant Sci**, 18, 71-106. 1999.

HANLEY-BOWDOIN, L., BEJARANO, E.R., ROBERTSON, D., MANSOOR, S. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews**. 11. 777. 2013.

HARKINS, G. W. et al. Experimental evidence indicating that mastreviruses probably did not co-diverge with their hosts. **Viol. J.** 6, 104. 2009.

JESKE, H., LUTGEMEIER, M. & PREISS, W. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. **EMBO J.** 20, 6158–6167. 2001.

LEFEUVRE, P. et al. The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. **PLoS Pathog.** 6, e1001164. 2010.

LIMA, A. T. et al. Synonymous site variation due to recombination explains higher variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **J. Gen. Virol.** 94, 418–431. 2012.

MANSOOR, S., ZAFAR, Y. & BRIDDON, R. W. Geminivirus disease complexes: the threat is spreading. **Trends Plant Sci.** 11, 209–212. 2006.

MARTIN, D. P. et al. Complex recombination patterns arising during geminivirus coinfections preserve and demarcate biologically important intra-genome interaction networks. **PLoS Pathog.** 7, e1002203. 2011.

MARTIN, D.P., BIAGINI, P., LEVREUVE, P., GOLDEN, M., ROUMAGNAC, P., VARSANI, A. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. **Viruses** 3: 1699-1738. 2011.

MORIONES, E. and NAVAS-CASTILLO, J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. **Virus Research**, 71, 123-134. 2000.

NAVAS-CASTILLO, J., FIALLO-OLIVE, E. & SANCHEZ- CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annu. Rev. Phytopathol.** 49, 219–248. 2011.

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

PIZARRO, L., NORAMBUENA, L. Regulation of protein trafficking: Posttranslational mechanisms and the unexplored transcriptional control. **Plant Science**; 225. 24-33. 2014.

ROJAS, M.R., FRITSCH, E.E., MANIATIS, T. Molecular cloning – A Laboratory Manual. Ed 2, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.

SANDERFOOT, A. A. & LAZAROWITZ, S. G. 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. 1995.

SAUNDERS, K., LUCY, A. & STANLEY, J. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. **Nucleic Acids Res.** 20, 6311–6315. 1992.

SHEPHERD, D. N. et al. Maize streak virus: an old and complex ‘emerging’ pathogen. **Mol. Plant Pathol.** 11, 1–12. 2010.

TAHIR, M. N., AMIN, I., BRIDDON, R. W. & MANSOOR, S. The merging of two dynasties — identification of an African cotton leaf curl disease-associated begomovirus with cotton in Pakistan. **PLoS ONE** 6, e20366. 2011.

VANITHARANI, R., CHELLAPPAN, P., FAUQUET, C.M. Geminiviruses and RNA silencing. **Trend Plant Sci.** 10, 144-151. 2005.

ZHOU, Y. et al. Histone H3 interacts and colocalizes with the nuclear shuttle protein and the movement protein of a geminivirus. **J. Virol.** 85, 11821–11832. 2011.