

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ADRIANA SANTOS SOPRANO

**“CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA
PROTEÍNA CSMAF1 DE *CITRUS SINENSIS*, PARCEIRA DE
INTERAÇÃO DO PRINCIPAL EFETOR TIPO TAL DE
XANTHOMONAS CITRI”**

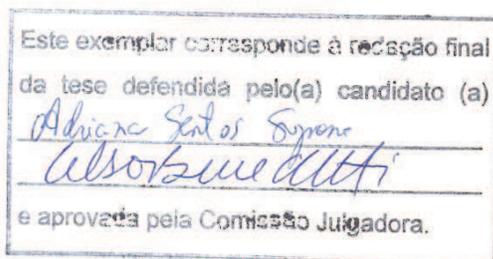
Campinas, 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



ADRIANA SANTOS SOPRANO

**“CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA
PROTEÍNA CSMAF1 DE *CITRUS SINENSIS*, PARCEIRA DE
INTERAÇÃO DO PRINCIPAL EFETOR TIPO TAL DE
XANTHOMONAS CITRI”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

CAMPINAS, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

So67c	<p>Soprano, Adriana Santos, 1982- Caracterização estrutural e funcional da proteína CsMAF1 de <i>Citrus sinensis</i>, parceira de interação do principal efetor tipo TAL de <i>Xanthomonas citri</i> / Adriana Santos Soprano. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Celso Eduardo Benedetti. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p style="text-align: center;">1. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>. 2. Proteína PthA. 3. Proteína MAF1. 4. RNA polimerase III. 5. Cancro cítrico. Proteínas efetoras TAL I. Benedetti, Celso Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Structural and functional characterization of the *Citrus sinensis* protein CsMAF1, an interacting partner of the main TAL effector of *Xanthomonas citri*

Palavras-chave em Inglês:

Xanthomonas axonopodis pv. *citri*

PthA protein

MAF1 protein

RNA polymerase III

Citrus canker

TAL effectors proteins

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Celso Eduardo Benedetti [Orientador]

Ivan de Godoy Maia

Maria Helena de Souza Goldman

Paulo Sérgio Lopes de Oliveira

Camila Caldana

Data da defesa: 24-08-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 24 de agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia



Assinatura

Profª. Dra. Maria Helena de Souza Goldman



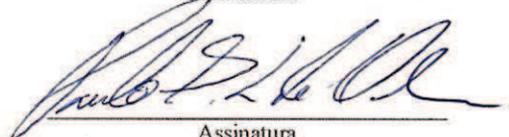
Assinatura

Profª. Dra. Camila Caldana



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Sérgio Lopes de Oliveira



Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

Prof. Dr. Márcio José da Silva

Assinatura

Prof. Dr. Júlio César Borges

Assinatura

Dedico essa tese aos meus queridos pais,
Wilson e Míriam e ao meu amado marido Júnior.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por permitir que mais esta etapa da minha vida fosse cumprida, mesmo com todas as dificuldades, tenho certeza que sempre estive ao meu lado me ajudando em todos os momentos.

Ao meu marido Júnior, por toda a paciência, pelo apoio, pelo incentivo, pela compreensão da ausência e principalmente pelo amor e carinho.

Aos meus queridos pais Wilson e Miriam, pelo amor, carinho, cuidado e instrução. Obrigada pelo apoio constante e pelo esforço para me dar a melhor educação possível.

Às minhas irmãs Cristiane e Camila, pela amizade e companhia.

Meu agradecimento especial ao meu orientador Dr. Celso Benedetti, que sempre me ajudou com valiosas sugestões e dicas sobre o andamento do trabalho, além de sempre estar disponível para discussões e incansáveis correções. Obrigada por tudo, principalmente pela confiança e constante incentivo.

Aos meus amigos do laboratório, Mariane, Bruna, Jaqueline, Nayara, Caio e Valéria pelo companheirismo e amizade e aos meus queridos amigos que já passaram pelo grupo e que deixaram muitas saudades, Malu, Tiago, Yuri, André e Uli.

À minha aluna bolsista de verão 2010, Luãna, pela amizade, carinho e valiosa contribuição para esta tese. E aos outros bolsistas de verão que tive o privilégio de conhecer, Nayara e Júlio.

À pesquisadora Dra. Juliana Smetana e sua aluna de iniciação Débora Camilotti, pela colaboração nos experimentos de fosforilação e ensaios biofísicos da CsMAF1.

Aos pesquisadores Dra. Camila Caldana e Dr. Paulo Sérgio de Oliveira pelas importantes considerações e sugestões durante a apresentação dos resultados na Pré-banca.

Principalmente ao Dr. Paulo Sérgio pela colaboração na modelagem molecular da proteína CsMAF1.

Aos membros titulares da Banca de Defesa: Dr. Ivan Maia, Dra. Maria Helena Goldman, Dra. Camila Caldana e Dr. Paulo Sérgio de Oliveira pelas valiosas sugestões e críticas, e aos demais membros, Dr. Jörg Kobarg, Dr. Júlio César Borges e Dr. Márcio José da Silva, pela disponibilidade.

À pesquisadora Dra. Adriana Paes Leme e sua equipe pela colaboração e suporte nos experimentos de espectrometria de massas.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro (processo nº 07/58558-6), que permitiu o desenvolvimento deste estudo, bem como meu aprimoramento profissional.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Centro Nacional de Pesquisas em Ciências e Materiais (CNPem), pela infra-estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira (Dr. Marcos Machado) pelas sementes de citros cedidas para os experimentos de transformação genética.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT.....	xvi
APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	1
CAPÍTULO I.....	3
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
A Citricultura brasileira e o cancro cítrico.....	3
Interação planta patógeno e mecanismos de defesa em plantas.....	6
Efeitos tipo TAL.....	7
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	13
CAPÍTULO II: Identificação e caracterização de proteínas de laranja doce que interagem com PthA4.	15
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 SCREENING DE DUPLO-HÍBRIDO COM A ISCA pOBDPthA4	17
3.2 ENSAIO DE DUPLO-HÍBRIDO.....	19
3.3 SUBCLONAGENS, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>E. coli</i>	21
3.4 ENSAIOS DE GST-PULL DOWN.....	22
3.5 WESTERN BLOT	23
3.6 ENSAIOS DE EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	23
3.7 ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
CAPÍTULO III: O silenciamento de CsMAF1, um regulador negativo da RNA Polimerase III e alvo de PthA4, aumenta o cancro cítrico.	45
1. INTRODUÇÃO	45

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 SUBCLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE CsMAF1 RECOMBINANTE EM <i>E. coli</i>	49
3.2 ENSAIO DE GST PULL-DOWN	49
3.3 WESTERN BLOT	50
3.4 ENSAIO DE DUPLO- HÍBRIDO.....	51
3.5 ENSAIO DE COMPLEMENTAÇÃO DE MUTANTE EM LEVEDURA.....	51
3.6 SUPEREXPRESSÃO E SILENCIAMENTO DE PROTEÍNAS DE CITROS	54
3.7 PCR EM TEMPO REAL	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
CAPÍTULO IV: Caracterização estrutural e funcional da proteína CsMAF1 de <i>Citrus sinensis</i>	73
1. INTRODUÇÃO	73
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	76
3. MATERIAIS E MÉTODOS	77
3.1 ENSAIOS DE FOSFORILAÇÃO <i>IN VITRO</i> COM PKA E PKC.....	77
3.2 ENSAIO DE FOSFORILAÇÃO mTOR.....	77
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO DE PKA	78
3.4 SUBLOCALIZAÇÃO CELULAR DE CsMAF1	78
3.5 MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA ESTRUTURAL.....	79
3.6 MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA	81
3.7 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DA PROTEÍNA CsMAF1.....	82
3.8 TENTATIVA DE CRISTALIZAÇÃO DE CsMAF1	82
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
7. ANEXOS	119

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Ciclo da doença Cancro Cítrico.....	5
Figura 2: Sintomas do cancro cítrico em folhas, caule e frutos.....	6
Figura 3: Modelo para a evolução da Resistência Bacteriana em Plantas.....	7
Figura 4: Efetor TAL de <i>X. citri</i> , PthA.....	8
Figura 5: Estrutura primária de PthA2	8
Figura 6: Mecanismo de ação da proteína efetora AvrBs3.....	9
Figura 7: Interações proteína-proteína entre PthAs e proteínas nucleares de citros.....	33
Figura 8: Expressão de CsSMC em fusão GST.....	34
Figura 9: Expressão de CsTRAX em fusão GST.....	34
Figura 10: Expressão de CsVIP2 em fusão GST.....	34
Figura 11: Expressão de CsPABP1 em fusão GST.....	34
Figura 12: Teste de purificação de CsRRMP1-GST.....	35
Figura 13: Expressão de CsHAP3 em fusão GST.....	35
Figura 14: Purificação da proteína PthA4_6xHIS.....	35
Figura 15: Purificação da proteína PthA3_6xHIS.....	35
Figura 16: Western blot do ensaio de GST <i>pull down</i> usando as proteínas PthA3 e PthA4 como presas e as proteínas de citros (fusionadas a GST) como iscas.....	36
Figura 17: PthA4 e seu domínio de repetições ligam RNA “poly(U)”.....	37
Figura 18: Interações por duplo híbrido entre as proteínas de laranja doce.....	38
Figura 19: Gel de acrilamida SDS PAGE corado com prata com as proteínas do extrato de citros resultantes do ensaio de <i>pull down</i> com as iscas 6xHis-tag CsSMC e CsTRAX.....	39
Figura 20: Modelo esquemático do complex multiproteico de citros.....	42
Figura 21: Representação esquemática dos domínios dos ortólogos de MAF1.....	46
Figura 22: Vetor de clonagem pHANNIBAL (CSIRO).....	54
Figura 23: Vetor pHANNIBAL com a construção para o silenciamento de CsMAF1.....	55
Figura 24: Vetor pHANNIBAL com a construção para a superexpressão de CsMAF1.....	56
Figura 25: Interação proteína-proteína entre CsMAF1 de citros e diferentes construções de PthA.....	61
Figura 26: Western blot do ensaio de GST-Pull down, confirmando a interação <i>in vitro</i> da proteína CsMAF1 com PthA4.....	62

Figura 27: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína MAF1 de citros e MAF1 humana.....	63
Figura 28: Western blot ensaio de GST-Pull down, confirmando a interação da proteína CsMAF1 com RNA Pol III de células HEK 293.....	64
Figura 29: Western blot anti-GST e anti-MAF1 mostrando a expressão de CsMAF1 em levedura.....	65
Figura 30: Northern blot mostrando a transcrição de tRNA ^{His} nas cepas de levedura.....	66
Figura 31: Northern blot mostrando a transcrição de tRNA ^{His} nas cepas de levedura e a cepa complementada com CsMAF1 e transformada com PthA4.....	67
Figura 32: Epicótilos transformados e regenerados em meio ágar, microenxertia e crescimento das plantas microenxertadas.....	68
Figura 33: Western blot anti-MAF1 dos níveis de expressão da proteína CsMAF1 endógena em plantas RNAi e gráfico da área relativa de cada banda de CsMAF1 das plantas silenciadas e controle.....	69
Figura 34: Gel de agarose não desnaturante usado para confirmar a qualidade do RNA total extraído das folhas das plantas silenciadas.....	70
Figura 35: Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância relativa de transcritos de genes de tRNAs em plantas de citros silenciadas para o gene <i>maf1</i>	70
Figura 36: Folhas de plantas de citros silenciadas para o gene <i>maf1</i> , infiltradas com <i>X. citri</i>	71
Figura 37: MAF1 é regulada em múltiplos níveis de fosforilação.....	75
Figura 38: Sítios consensos de PKA e PKC preditos para CsMAF1.....	84
Figura 39: Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> de CsMAF1 com as quinases PKC e PKA.....	84
Figura 40: Espectro de MS/MS do fosfopeptídeo de CsMAF1.....	85
Figura 41: Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> de CsMAF1 selvagem (WT), CsMAF1 mutante Ser45Ala e CsMAF1 mutante Ser45Asp, com a quinase PKA.....	87
Figura 42: Alinhamento das sequências de aminoácidos de MAF1 de citros e humana.....	87
Figura 43: Fosforilação <i>in vitro</i> de CsMAF1 com a quinase mTOR.....	88
Figura 44: Localização nuclear de pEGFP-CsMAF1 através de microscopia de fluorescência em células HEK 293 vivas (não fixadas).....	89
Figura 45: Localização nuclear de pEGFP-CsMAF1 através de microscopia de fluorescência em células HeLa fixadas.....	90
Figura 46: Purificação por afinidade com resina de cobalto de CsMAF1 (His-tag).....	91
Figura 47: Migração de CsMAF1 em gel Nativo 8% de acrilamida, comparada com BSA.....	91
Figura 48: Purificação da proteína CsMAF1 por gel filtração na coluna Superdex 75 10/300 GL.....	92
Figura 49: Gráfico de DLS da proteína CsMAF1.....	93

Figura 50: Western blot anti-MAF1 para testar qualidade do anticorpo anti-MAF1 e do extrato solúvel e extrato insolúvel de folha de citros, detectando CsMAF1 endógena.....	94
Figura 51: Gel de acrilamida 10% da proteína CsMAF1 recombinante com ou sem DTT, enviado para espectrometria de massas.....	94
Figura 52: Interações entre a isca pOBD-CsMAF1 e outras proteínas de citros.....	95
Figura 53: Estrutura e distribuição de cargas da proteína MAF1 humana (PDB: 3NR5) e do modelo predito para o monômero da proteína CsMAF1.....	96
Figura 54: Estrutura e distribuição de cargas do modelo predito para a o dímero da proteína CsMAF1.....	97
Figura 55: Perspectiva do dímero de CsMAF1 mostrando a face inferior onde se localiza o sítio de dimerização e a ampliação do sítio de dimerização de CsMAF1.....	98
Figura 56: Purificação por afinidade em resina de cobalto de CsMAF1 selvagem (WT) e CsMAF1 mutante (Thr62Asp).....	99
Figura 57: Espectros de CD da proteína CsMAF1 (WT).....	100
Figura 58: Gradiente crescente de temperatura, com análise da estrutura secundária da proteína CsMAF1.....	100
Figura 59: Análise do comportamento de CsMAF1 em diferentes temperaturas.....	101
Tabela 1: Relação da sequência 5' 3' dos oligonucleotídeos usados na clonagem para correção da fase de leitura dos genes isolados em citros.....	17
Tabela 2: Sondas utilizadas nos ensaios de EMSA de RNA com PthA4.....	24
Tabela 3: Proteínas de citros identificadas como alvos de PthA4 e componentes do complexo multiproteico envolvido com o processamento e tradução de mRNA.....	26
Tabela 4: Proteínas de <i>Citrus sinensis</i> identificadas como parceiras de interação de CsSMC e CsTRAX através de espectrometria de massas.....	40
Tabela 5: Primers usados nas clonagens de silenciamento e superexpressão dos genes de <i>Citrus sinensis</i>	57
Tabela 6: Óligos dos genes de tRNAs usados como sondas para o PCR em tempo real.....	59
Tabela 7: Óligos utilizados para a mutagênese sítio dirigida no resíduo Thr62 de CsMAF1.....	81
Tabela 8: Identificação por Massas dos sítios de fosforilação de MAF1 de <i>S. cerevisiae</i>	83
Tabela 9: Identificação por Massas dos sítios de fosforilação de MAF1 humana.....	83
Tabela 10: A tabela indica a % de polidispersividade da amostra, o tamanho estimado das partículas presentes e % de intensidade e massa das partículas em solução.....	93
Tabela 11: Porcentagens das estruturas secundárias de CsMAF1 em diferentes temperaturas.....	102

LISTA DE ABREVIACES

α -imp – α -importina
AGO1 - Argonauta
AAD – Acidic activation domain
Ade – adenina
avr – genes de avirulncia do patgeno
BSA – albumina de soro bovino
bHLH – basic helix-loop-helix
CsCyp – Ciclofilina de *Citrus sinensis*
CsHMG – High-Mobility Group Protein de *Citrus sinensis*
CsPABP1 – Poly(A) binding protein 1 de *Citrus sinensis*
CsPABP2 – Poly(A) binding protein 2 de *Citrus sinensis*
CsPCBP – Poly(C) binding protein de *Citrus sinensis*
CsRRMP1 – RNA recognition motif protein 1 de *Citrus sinensis*
CsSMC – Structural maintenance of chromosomes de *Citrus sinensis*
CsTdx – Tioredoxina de *Citrus sinensis*
CsTRAX – Translin-associated factor X de *Citrus sinensis*
CsUbc13 – enzima de conjugaco a ubiquitina de *Citrus sinensis*
CsVIP2 – VIRE2 Interacting Protein 2 de *Citrus sinensis*
DLS – Espalhamento dinmico de luz
DTT – ditionetrito
EDTA – cido etilendiaminotetractico
EMSA – Electrophoretic mobility shift assays
EST – Expressed Sequence Tags
FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography
GFP – Green Fluorescent Protein
GST – glutationa-S-transferase
HR – hypersensitive reaction
IPTG - Isopropyl β -D-1 thyogalactopiranoside
Kb – Kilobases
KDa – Kilo-Dalton
LRR – Leucine Rich Repeats
MAMP – Microbe- Associated Molecular Patterns
MAP quinases – Mitogen Activated Protein kinases
NB-LRR – Nucleotide-Binding Leucine Rich Repeats

NLS – Nuclear localization signal
PAMP – Pathogen-Associated Molecular Patterns
pb – Par de base
PCR – Polimerase Chain Reaction
PKA – Protein kinase A
PKC – Protein kinase C
PIP box – plant-inducible promotor box
PVDF – difluoreto de polivinila
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RNA Pol II – RNA Polimerase II
RNA Pol III – RNA Polimerase III
RPM – Rotações por minuto
SAXS – Small angle x-ray scattering
SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAL – Transcription activator-like
TOR – Target of rapamycin
TPR – Tetratricopeptide repeat
T3S – Type III Secretion System
Trp – triptofano
TBS-T – tampão salino Tris contendo Tween 20
Uev – enzima de conjugação a ubiquitina variante
UPA – Up-Regulated by AvrBs3
Ura – uracila
3-AT – 3-aminotriazole

RESUMO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* (*X. citri*), afeta a maioria das espécies de *Citrus*, ocorre praticamente em todos continentes e se destaca como uma séria ameaça à citricultura brasileira. O mecanismo molecular pelo qual *X. citri* causa cancro não é inteiramente conhecido, entretanto, sabe-se que a bactéria utiliza o sistema secretório tipo III para injetar proteínas de patogenicidade, entre elas, PthAs da família AvrBs3/PthA, também conhecidas como efetores TAL (*transcriptional activator-like*). Os efetores TAL atuam como fatores de transcrição transativando genes específicos da planta que vão beneficiar a bactéria ou desencadear respostas de defesa.

Com o objetivo de entender os mecanismos moleculares pelos quais os efetores TAL atuam, a técnica de duplo híbrido foi usada para identificar proteínas de laranja doce (*Citrus sinensis*) que interagem com PthA4, um dos efetores TAL de *X. citri* necessário para o desenvolvimento do cancro cítrico. A maioria das proteínas de laranja identificadas como alvos de PthA4 apresenta domínios de ligação à DNA ou RNA e está envolvida no controle da transcrição, estabilização de mRNAs e tradução. Várias dessas proteínas interagem entre si, sugerindo a presença de um complexo multiproteico como alvo de efetores TAL. Entre as proteínas envolvidas no controle da transcrição, destacamos a CsMAF1, uma proteína homóloga à MAF1 humana que atua como regulador negativo da RNA Polimerase III.

Os resultados obtidos nesse trabalho revelam que CsMAF1 complementa o fenótipo do mutante *maf1* de levedura, reprimindo a expressão de tRNA^{His} e que a expressão de PthA4 na cepa complementada restaura a síntese desse tRNA. Portanto, os dados mostram que CsMAF1 atua como um repressor da RNA Pol III em levedura e que PthA4 altera o estado repressor de CsMAF1 sobre a RNA Pol III.

De forma surpreendente, verificamos que plantas de citros com níveis reduzidos de CsMAF1 apresentaram aumento significativo no número e intensidade de lesões hiperplásticas ou eruptivas quando infiltradas com *X. citri*, indicando que CsMAF1 desempenha um papel crítico no desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico. O aumento das lesões do cancro nas plantas silenciadas para CsMAF1 se correlaciona com um aumento expressivo de tRNAs, incluindo o tRNA^{His}, confirmando assim o papel repressor de CsMAF1 sobre a RNA Pol III em citros. Além disso, mostramos nesse trabalho que CsMAF1 é uma fosfoproteína que se encontra na forma dimérica em solução, uma característica singular ainda não descrita para membros dessa família de proteínas. Verificamos que CsMAF1 é fosforilada *in vitro* pelas quinases PKA e PKC e que apresenta sítios adicionais de fosforilação conservados para a quinase TOR, incluindo o resíduo Thr62. Curiosamente, tais sítios se

localizam na interface de dimerização de CsMAF1, sugerindo que a fosforilação desses sítios deve regular a função da proteína e/ou seu estado multimérico. De fato, verificamos que a substituição do resíduo de treonina Thr 62 para ácido aspártico (Asp 62) diminui a proporção dímero:monômero de CsMAF1, indicando que a fosforilação de resíduos na interface do dímero desestabiliza o dímero, e que esse pode ser um mecanismo regulatório novo para essa classe de proteína. Desse modo, esses achados abrem novas perspectivas para o entendimento não só dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da RNA Pol III pela CsMAF1, como também do papel de PthA4 na interação com CsMAF1 e sua modulação da transcrição

ABSTRACT

Citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* (*X. citri*), is a disease that affects most of the *Citrus* species, occurs in almost all continents and stands as a threat to the Brazilian citrus industry. The molecular mechanism by which *X. citri* causes canker is poorly understood, however the bacterium injects pathogenicity proteins via the type III secretion system (T3S) including proteins of AvrBs3/PthA family, also known as transcriptional activator-like (TAL) effectors. TAL effectors have been extensively studied and are known to act as transcription factors that transactivate specific plant genes which either benefit the bacteria or trigger defense responses. To gain insights into the molecular mode of action of TAL effectors, a two-hybrid screening was performed to identify sweet orange (*Citrus sinensis*) proteins that interact with PthA4, one of the *X. citri* TAL effectors required for citrus canker development. Among the proteins identified as PthA4 interactors, most are DNA and/or RNA-binding factors involved in chromatin remodeling and repair, transcriptional control and mRNA stabilization/modification. Several of these proteins interact with each other, suggesting the presence of a multiprotein complex as a target of TAL effectors. Among the proteins involved in transcription control, we selected for further studies the CsMAF1, a homolog of the human MAF1 that acts as a negative regulator of RNA polymerase III.

The results presented here reveal that CsMAF1 complements the yeast *maf1* mutant phenotype by repressing the tRNA^{His} transcription, and that PthA4 expression in the complemented strain restores the tRNA^{His} synthesis. Thus, the data show that CsMAF1 acts as a RNA Pol III repressor in yeast and that PthA4 somehow suppresses the repressor activity of CsMAF1 upon on the RNA Pol III. Surprisingly, we found that citrus plants with reduced levels of CsMAF1 showed a significant increase in the number, morphology and size of eruptive or hyperplastic lesions when infiltrated with *X. citri*, indicating the CsMAF1 plays a critical role in canker development. Increased canker lesions in CsMAF1 silenced plants correlated with a significant increase of tRNAs expression, including tRNA^{His}, thus confirming the repressor role of CsMAF1 upon the citrus RNA Pol III. Furthermore, we showed in this work that CsMAF1 is a phosphorylated and a dimer in solution, a feature that so far has not been reported for any member of this protein family. We found that CsMAF1 is phosphorylated *in vitro* by PKA and PKC, and has additional phosphorylation sites for the TOR kinase, including the Thr 62 residue. Interestingly, these phosphorylation sites are located at the dimerization interface of CsMAF1, suggesting that phosphorylation of such sites might regulate the function of the protein and / or its multimeric state. Indeed, mutation of threonine residue Thr62 to aspartic

acid (Asp62) decreases the dimer:monomer CsMAF1 ratio, indicating that phosphorylation of the residues at the interface of the dimer destabilizes the dimer, and this may be a novel regulatory mechanism for this class of protein. Thus, these findings open new perspectives for the understanding of the molecular mechanisms involved in RNA Pol III regulation by CsMAF1, as well as for the role of PthA4 in the modulation of RNA Pol III transcription mediated by CsMAF1.

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho está dividido em quatro partes: o primeiro capítulo apresenta uma introdução geral sobre a situação atual da citricultura brasileira, bem como informações e dados atuais sobre o cancro cítrico.

O segundo capítulo apresenta a caracterização de proteínas de citros isoladas no *screening* inicial de duplo híbrido com a isca PthA4 e que estão associadas a um complexo multiproteico envolvido em estabilização de mRNA e controle da tradução. Esse capítulo apresenta dados que geraram um artigo publicado na revista PLoS One, onde participo como co-primeira autora juntamente com o aluno Tiago Antonio de Souza. Esse trabalho sugere um novo papel para efetores TAL na estabilização e processamento do mRNA e controle da tradução.

O terceiro capítulo aborda a caracterização funcional da proteína CsMAF1. Isolada no *screening* de duplo híbrido, como parceira de interação de PthA4. O homólogo de CsMAF1 em mamíferos e leveduras está envolvido na repressão da RNA Polimerase III (RNA Pol III). Esse capítulo apresenta dados de interação de CsMAF1 com RNA Pol III, bem como o mapeamento de sua interação com PthA4, confirmação do seu papel de repressor da RNA Pol III através de experimentos de complementação de fenótipo de levedura mutante *maf1*, e análise da expressão gênica de plantas de citros silenciadas para o gene *maf1*.

O quarto capítulo apresenta dados bioquímicos e biofísicos da proteína CsMAF1, incluindo a caracterização de sítios de fosforilação, mutação e modelagem molecular da proteína. O conjunto de dados desse capítulo sugere que a função repressora de CsMAF1 esteja relacionada à sua estrutura dimérica.

O anexo I refere-se ao artigo publicado pela revista PLoS One em fevereiro de 2012, no qual participo como co-primeira autora e minha contribuição corresponde a todo o conteúdo do capítulo II dessa tese.

O anexo II refere-se ao artigo publicado pela revista JBC (Journal of Biological Chemistry) em março de 2011, no qual participo como terceira autora. A minha contribuição nesse trabalho foi a realização de ensaios de crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*, cuja metodologia está descrita na seção: “*Experimental Procedures*” em “*Growth of Agrobacterium cells*” e que geraram as figuras 4 e 5 do artigo.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Citricultura brasileira e o cancro cítrico

O Brasil detém uma posição de destaque no cenário internacional como um dos maiores produtores mundiais de frutas cítricas e respondendo por mais de 50% da produção mundial de suco de laranja concentrado. De cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos no Brasil (Neves, 2010). Segundo dados da CitrusBR, a Associação Nacional dos Exportadores de Suco Cítrico, somente em 2011, o Brasil exportou cerca de 1,2 bilhões de dólares em receitas com essa atividade e estima-se que outros 15 bilhões sejam movimentados anualmente pela cadeia citrícola no país com a geração de milhares de empregos e produção de insumos para o setor (www.citrusbr.com).

Entretanto, apesar da reconhecida competitividade da cadeia citrícola nacional, o Brasil tem enfrentado muitos desafios que comprometem a produção e a exportação do suco cítrico. Entre eles estão as barreiras tarifárias que induzem as flutuações de preços e a competição que o suco de laranja vem enfrentando com outros tipos de bebidas no mercado internacional. Além disso, os altos custos de produção associados ao uso de fertilizantes, irrigação, mão de obra e, sobretudo, à fitossanidade dos pomares que requer medidas rápidas de controle de doenças como aquisição de mudas sadias, instalação de quebra-ventos, descontaminação de material de colheita, pulverização com agro-químicos, entre outros, fazem da citricultura hoje uma das atividades do agronegócio nacional de maior risco. Pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores nestes últimos dez anos (Neves, 2010). Nesse aspecto, medidas e estudos que venham a contribuir para a sanidade dos pomares tornam-se bastante relevantes.

Entre as doenças que afetam os citros, o cancro cítrico se destaca como uma ameaça à citricultura brasileira, por se tratar de uma doença de fácil disseminação, sem métodos curativos e por não existir variedades comerciais de citros resistentes à bactéria causadora da doença.

A doença é classificada como praga quarentenária e a única forma de eliminar o cancro cítrico é por erradicação e queima das árvores contaminadas. Além do prejuízo de eliminar as árvores, as propriedades contaminadas ficam proibidas de comercializar sua produção até que os trabalhos de erradicação sejam concluídos, pois o comércio de frutas cítricas, suco concentrado e seus derivados é regulamentado por legislação internacional, e a não adoção de medidas de exclusão/erradicação impede o comércio desses produtos para países livres do patógeno (fonte: FUNDECITRUS – www.fundecitrus.com.br).

Embora regulamentada por leis que exigem rigor no controle da doença, em junho de 2009, uma nova resolução Estadual causou um afrouxamento na legislação, isentando o citricultor da necessidade de erradicar o talhão caso a contaminação ultrapasse o limiar de 0,5% de plantas infectadas. Antes, a determinação era de que fossem erradicadas todas as plantas de um talhão quando o índice de contaminação superasse 0,5%. Atualmente, a ordem é erradicar apenas as plantas doentes e as que estiverem em um raio de 30 metros do foco de contaminação. Após a mudança da lei, a incidência de cancro cítrico aumentou entre os 96 mil talhões cultivados no Estado de São Paulo. Segundo levantamentos feitos pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) e dados apresentados na 34ª Semana da Citricultura, realizada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, em maio de 2012, a incidência de cancro cítrico saltou de 0,44% para 0,99% em 2011 nos talhões do parque cítrico, evidenciando que o relaxamento nas inspeções e no programa de erradicação vem apresentando um efeito extremamente negativo no controle da doença.

O cancro cítrico é causado por dois grupos de linhagens da bactéria *Xanthomonas*: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (grupo Asiático), recentemente renomeado para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) (Schaad et al., 2006), e *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (*X. aurantifolii*) (grupo da América do Sul). A cancrose A, causada pela bactéria *X. citri* é a mais relevante do ponto de vista sócio-econômico, pois é a forma mais agressiva, de ampla ocorrência e que afeta praticamente todas as variedades de citros comerciais. Encontrada apenas na América do Sul, a bactéria *X. aurantifolii* é o agente causal das cancrose B e C, que infecta preferencialmente o limão verdadeiro (*Citrus limon*) na cancrose B e somente o limão Galego (*Citrus aurantifolia*) na cancrose C (Brunings e Gabriel, 2003; Graham et al., 2004). A Mancha Bacteriana dos Citros, ou cancrose E, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* (*X. citrumelo*), endêmica em viveiros de citros da Flórida, Estados Unidos, ataca principalmente, o citrumelo “Swingle” (*C.paradisi* x *Poncirus trifoliata*). Recentemente, dois novos isolados da espécie *citri* foram identificados. Denominados A* (Vernière et al., 1998) e Aw (Sun et al., 2004), ambos possuem patogenicidade restrita a *Citrus aurantifolia* e estão limitados, respectivamente, ao sudeste asiático e à Flórida.

A bactéria *X. citri* penetra nos tecidos vegetais através dos estômatos (figura 1) e outras aberturas naturais ou por ferimentos, muitas vezes causados por ferramentas de poda contaminadas ou por insetos herbívoros, como é o caso da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), que gera galerias nas folhas (Belasque Jr. et al., 2001). Dentro do tecido, a bactéria cresce abundantemente no espaço intercelular. O principal sintoma da doença é a formação de lesões circulares (water soaked), as quais se tornam elevadas e

eruptivas, resultado da hipertrofia (aumento no tamanho celular) e hiperplasia (divisão celular) induzidas pelo patógeno (Swarup et. al., 1991; Duan et. al., 1999) (figura 1).

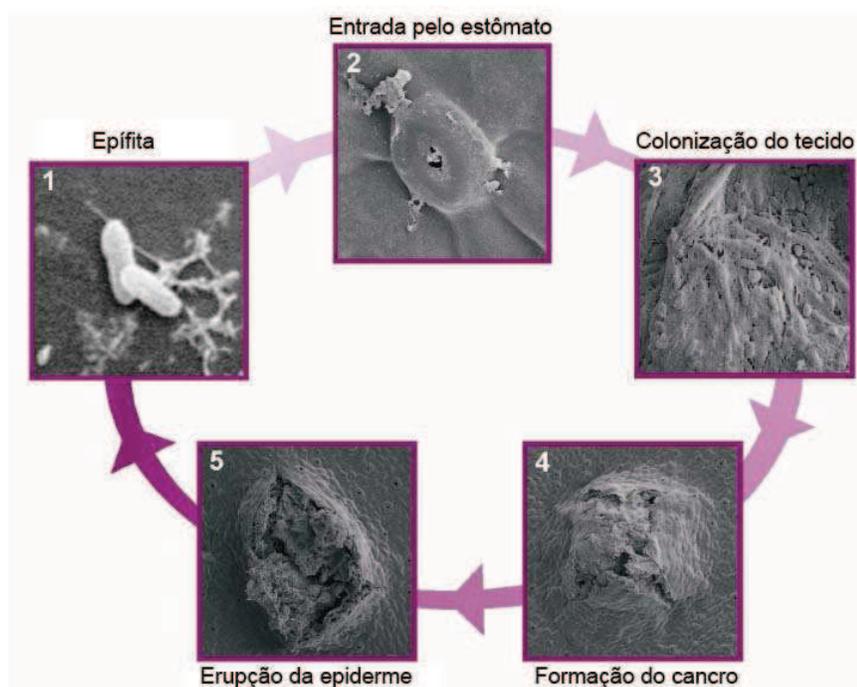


Figura 1: Ciclo da doença Cancro Cítrico. 1) A bactéria permanece como uma epífita na superfície da planta. 2) Penetração no tecido vegetal via estômatos. 3) Colonização do apoplasto. 4) Formação de lesões que caracterizam o cancro. 5) Ruptura da epiderme e liberação das bactérias para a superfície. Extraído de Gottig et al., 2010.

Após a proliferação no espaço intercelular, a epiderme é rompida e a bactéria é liberada para a superfície da planta, estando disponível para iniciar um novo ciclo de infecção. As lesões do cancro manifestam-se em toda a parte aérea da planta, incluindo folhas, ramos e frutos (figura 2). No Brasil, frutos infectados não podem ser comercializados, embora o cancro em si não altera as propriedades nutricionais do fruto.



Figura 2: Sintomas do cancro cítrico em folhas, caule e frutos. Fonte: Gottwald, 2002.

Interação planta patógeno e mecanismos de defesa em plantas

Em geral, durante a interação planta-patógeno as plantas respondem à infecção primeiramente através de uma resposta imune basal, baseada no reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos/patógenos (MAMPs/PAMPs). Os MAMPs/PAMPs mais bem caracterizados em bactérias incluem: flagelina, produtos de degradação de parede celular e lipopolissacarídeos. O reconhecimento dessas moléculas por receptores de superfície celular das plantas leva à ativação da cascata de sinalização por MAP quinases, indução da transcrição de genes de defesa, produção de espécies reativas de oxigênio e deposição de calose para o reforço da parede celular nos locais da infecção (figura 3 A). Todos esses eventos ocorrem para prevenir o crescimento e expansão do patógeno (Nurnberger et al., 2004). Porém, alguns patógenos desenvolveram a capacidade de burlar esse tipo de resistência, através da habilidade de translocar proteínas efetoras, através do sistema de secreção tipo III (TS3), para o interior da célula hospedeira, suprimindo a resposta de defesa basal e permitindo o desenvolvimento da doença (figura 3 B).

O TS3, presente em patógenos animais e de plantas, é constituído por aproximadamente 20-25 proteínas que formam uma estrutura em formato de agulha, a maioria localizada na membrana interna da bactéria, sendo, muitas delas homólogas a componentes do sistema flagelar de bactérias (Blocker et al., 2003; Tampakaki et al., 2004). No entanto, a co-evolução planta-patógeno levou à expressão de genes de resistência (R) na planta hospedeira. O isolamento de inúmeros genes R demonstrou que estes codificam proteínas NB-LRR, assim denominadas em função da presença de domínios de ligação a nucleotídeo (*nucleotide*

binding ou NB) e domínios ricos em leucina (*leucine rich repeat* ou LRR). Os domínios LRR participam ativamente nas interações proteína-proteína e são responsáveis pelo reconhecimento de proteínas efetoras implicando na indução de resposta de defesa (Gómez-Gómez e Boller, 2000; Chinchilla et al., 2006; Chisholm et al., 2006; Altenbach e Robatzek, 2007; Chinchilla et al., 2007)

Na presença de uma associação do efetor com seu cognato R, uma resposta de defesa é ativada (figura 3 C). Nesse caso, a resistência é manifestada através da morte celular programada no local da infecção culminando na inibição do crescimento do patógeno. Por outro lado, a ausência da interação efetor e proteína R resulta na proliferação do patógeno no interior da planta hospedeira e no desenvolvimento da doença.

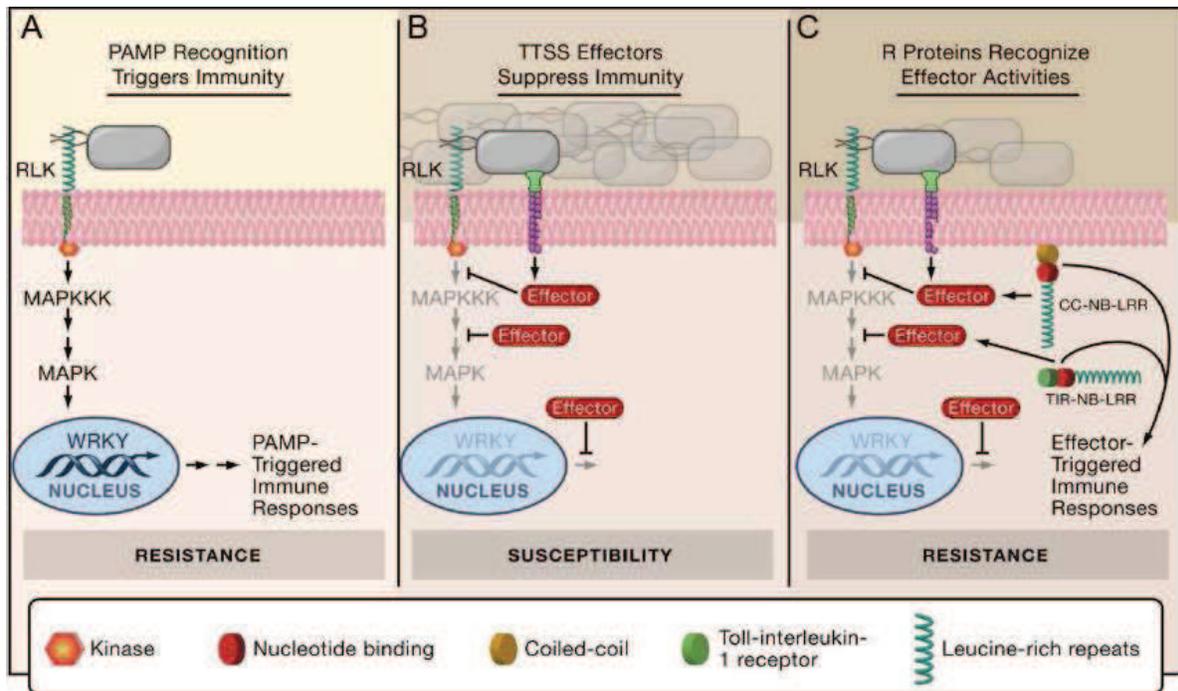


Figura 3: Modelo para a evolução da Resistência Bacteriana em Plantas. A) Reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos. B) A bactéria patogênica usa o sistema de secreção tipo III para translocar proteínas efetoras que atingem múltiplas proteínas do hospedeiro e suprimem a resposta imune basal. C) As proteínas de plantas resistentes (CC-NB-LRR e TIR-NB-LRR) reconhecem os efetores da bactéria e restauram a resistência através da resposta imune associada ao efetor. Extraído de Chisholm, 2006.

Efetores tipo TAL

Entre as proteínas efetoras translocadas pelo TS3 (figura 3 C), existe uma classe conhecida como efetores tipo TAL (**T**ranscription **A**ctivator-like) que são capazes de modular

B

NI HD NI HD NI HD HD NG HD NG NG NG NG NI NI NG
A C A C A C C T C T T T T A A T

A proteína AvrBs3 de *X. vesicatoria*, bactéria que causa a mancha bacteriana em tomate e pimentão, é o efetor TAL mais bem caracterizado (Bonas et al., 1989). Depois de translocado para a célula hospedeira via TS3, AvrBs3 dimeriza-se no citoplasma (Gurlebeck et al, 2005), através do domínio das repetições e interage, por meio do NLS com a proteína α -importina da planta, sendo transportado para o núcleo. Uma vez no núcleo, utiliza o domínio central para se ligar diretamente aos promotores de genes-alvo, ativando genes envolvidos com o desenvolvimento de hiperplasia celular no caso de plantas susceptíveis (Kay et al, 2007) ou genes de resistência em plantas resistentes (Römer et al, 2007) (figura 6).

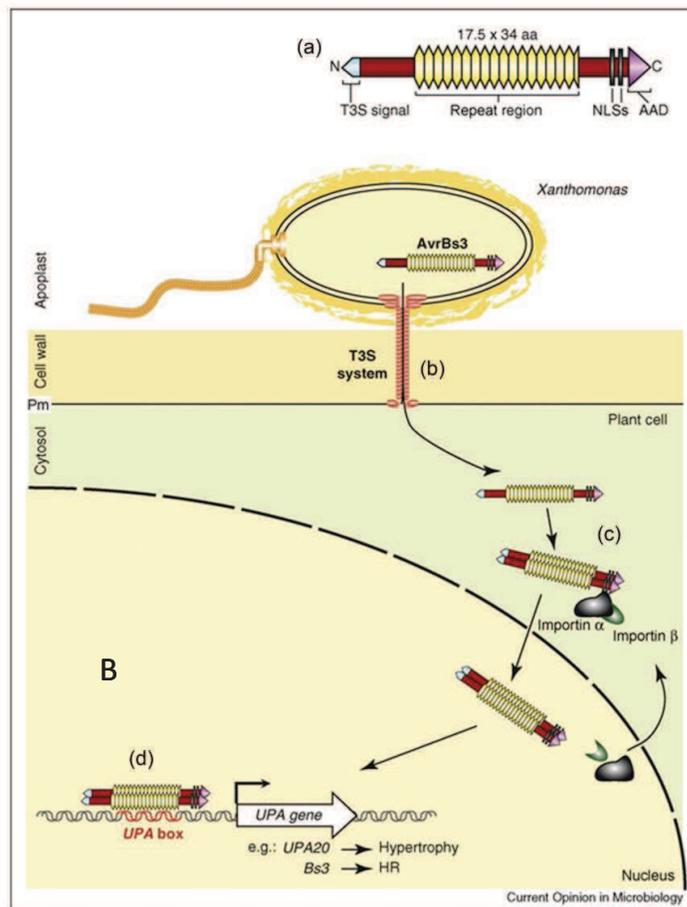


Figura 6: Mecanismo de ação da proteína efectora AvrBs3. (a) Estrutura de AvrBs3. (b) Translocação da proteína efectora para o citoplasma da célula da planta através do sistema de secreção tipo III. (c) Dimerização da AvrBs3 e interação com a α -importina através do seu sinal de localização nuclear. (d) Através do seu domínio de repetições, AvrBs3 se liga diretamente a uma sequência específica do DNA, denominada UPA box, e ativa a transcrição de vários genes, entre eles o UPA 20. Extraído de Kay e Bonas, 2009).

Verificou-se que AvrBs3 se liga a uma sequência específica de DNA denominada de UpaBox, a qual está presente nos promotores de vários genes com expressão dependente de AvrBs3, chamados de genes UPA (*upregulated by AvrBs3*). Um desses genes, o UPA20, codifica um fator de transcrição do tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH), que está diretamente envolvido na indução de hipertrofia celular em plantas suscetíveis à *X. vesicatoria* (Kay et al., 2007). Em contrapartida, em plantas resistentes à *X. vesicatoria*, AvrBs3 transativa o gene *bs3* que codifica uma flavina monooxigenase que confere resistência à essa bactéria (Römer et al., 2007).

O mecanismo de ligação de AvrBs3 ao DNA revelou um código de reconhecimento específico denominado de código TAL (Boch et al., 2009; Moscou e Bogdanove, 2009). Verificou-se assim que os efetores TAL possuem resíduos de aminoácidos variáveis nas posições 12 e 13 dentro de cada repetição do domínio central (figura 5). Cada resíduo de aminoácido variável se liga a um único nucleotídeo do DNA, conferindo desse modo a especificidade de ligação para as sequências de DNA dos promotores alvos (Boch et al., 2009; Moscou e Bogdanove, 2009; Boch e Bonas, 2010).

Na interação entre *X. citri* e *C. sinensis*, sabe-se que a bactéria também utiliza o TS3 para translocar várias proteínas efetoras de patogenicidade, além dos efetores TAL. Entre os efetores estudados estão aqueles que possuem o domínio PIP box (plant-inducible promotor), como o Apl1 (Fujikawa et al., 2006), HssB3.0 (Shiotani et al., 2007) e AvrTaw (Rybak et al., 2009) e outros candidatos como o AvrXacE1, AvrXacE2 e Xac3090, que foram recentemente caracterizados por um grupo de pesquisadores da Argentina e demonstraram ter um papel relevante na patogenicidade de *X. citri* (Dunger et al., 2012).

Por outro lado, dentre os efetores tipo TAL, destaca-se a proteína PthA. O gene *pthA* foi um dos primeiros genes *avr* para o qual se demonstrou uma função no desenvolvimento dos sintomas no hospedeiro. Quando expresso transitoriamente em folhas de citros é suficiente para causar lesões do tipo cancro, incluindo ruptura da epiderme, indicando que a proteína PthA é o fator principal de indução de hipertrofia celular e hiperplasia em citros (Swarup et al., 1991; Duan et al., 1999).

A expressão transitória de *pthA* em plantas não hospedeiras como tabaco, feijão e algodão levam à formação de uma reação tipo HR (Duan et al., 1999). De maneira semelhante, quando *pthA* foi inserido nas cepas *X. phaseoli* e *X. campestris* pv *malvacearum*, os transformantes permaneceram não patogênicos aos citros, entretanto, HR foi observado em feijão e algodão (Swarup et al., 1992). Evidências adicionais confirmam o papel de PthA na patogenicidade de *X. citri*: mutações nos genes *hpr* (Yang e Gabriel, 1995 b) ou *pthA* causaram perda da habilidade de induzir câncer hiperplásico, lesões circulares tipo “*water soaking*” e perda da habilidade do patógeno crescer *in planta* (Swarup et al., 1991). Além

disso, *E. coli* carregando ambos os grupos hpr e um homólogo ao *pthA* causou sintomas como o cancro em citros (Kanamori e Tsuyumu, 1998). Portanto, por essas características, PthA tem sido considerado o principal fator de patogenicidade de *X. citri* descrito até o momento.

A linhagem de *X. citri* 306 (da Silva et al., 2002), apresenta quatro variantes de PthAs, todas com alto grau de identidade entre si e à proteína AvrBs3 de *X. vesicatoria*. As variantes de PthAs diferem entre si basicamente pelo número de repetições do domínio central e pelos resíduos polimórficos encontrados dentro das unidades repetitivas. PthA4 apresenta 17,5 repetições de 34 aminoácidos, PthA1 possui 16,5 repetições, enquanto PthAs 2 e 3 contêm 15,5 repetições de 34 resíduos (da Silva et al., 2002; Brunings & Gabriel, 2003). A proteína PthA4 é considerada a variante essencial para induzir hipertrofia e hiperplasia e portanto, o homólogo funcional de AvrBs3 (Al-Saadi et al., 2007).

Análises do transcriptoma de folhas de *C. sinensis* infiltradas com *X. citri* revelaram mudanças na expressão de muitos genes associados ao remodelamento e crescimento celular, incluindo genes envolvidos na biogênese de ribossomos, tráfego de vesículas, síntese e mobilização de auxinas e giberelinas, dois hormônios necessários para o desenvolvimento do cancro cítrico (Cernadas et al., 2008; Cernadas e Benedetti, 2009), indicando portanto, atividade dos efetores TAL no desenvolvimento dos sintomas do cancro. De fato, a expressão transiente de PthA2 em epicótilos de laranja doce resultou em um aumento na expressão de genes envolvidos na sinalização de auxina, giberelina, divisão celular e remodelamento de parede, os quais estão sendo considerados como alvos diretos de PthA2, dado que em suas sequências promotoras encontramos sequências de ligação semelhantes àquelas representada na figura 5B (Pereira e Benedetti, dados ainda não publicados).

O domínio central de efetores TAL tem sido considerado importante não apenas para o reconhecimento e ligação ao DNA alvo, mas também para mediar interações proteína-proteína (Gürlebeck et al., 2005; Murakami et al., 2010). O nosso grupo foi pioneiro em determinar por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a estrutura de um domínio repetitivo de PthA2, que consiste em um peptídeo correspondente a 1,5 repetições do domínio central. Além disso, verificamos por difração de raios-X de baixo ângulo (SAXS) que o envelope do domínio central de PthA2 (RD2) corrobora o modelo teórico que prediz uma estrutura de superhélice tipo TPR (*tetratricopeptide repeat*) para esse domínio e que RD2 passa por rearranjos conformacionais na presença de DNA (Murakami et al., 2010). Recentemente, a estrutura tridimensional do domínio central do efector TAL PthXo1 (de *Xanthomonas oryzae*), em complexo com o DNA alvo, foi elucidada e confirma que as repetições de 34 resíduos se associam para formar uma superhélice em torno do sulco maior do DNA, como o nosso grupo havia predito, e que cada repetição forma uma estrutura tipo *helix-loop-helix* onde os resíduos variáveis 12 e 13 se encontram no *loop* ligados ao DNA (Mak et al., 2012; Deng et al., 2012).

Nosso grupo verificou ainda que PthAs formam homo e heterodímeros entre si através do domínio das repetições e que também interagem com a proteína α -importina de citros (Domingues et al., 2010). Portanto, os efetores TAL, além de ligarem DNA de forma específica, interagem com proteínas do hospedeiro. Entretanto, embora muito se tenha revelado recentemente sobre os genes alvos e especificidade ao DNA de efetores TAL, não sabemos ainda como esses efetores ativam a transcrição na planta. Assim, com o objetivo de entender os mecanismos moleculares pelos quais os efetores TAL ativam a transcrição na célula hospedeira, e considerando que os efetores TAL necessitam de fatores da célula hospedeira para transativar genes alvos, nosso grupo realizou inúmeras varreduras de duplo-híbrido e identificou várias proteínas de citros que interagem com as diferentes variantes de PthAs.

Num primeiro trabalho, o grupo identificou que PthA2 interage preferencialmente com um conjunto de proteínas de laranja doce envolvidas em reparo de DNA e controle da transcrição. Verificou-se, por exemplo, que as proteínas CsCyp, uma ciclofilina, CsTdx, uma tioredoxina, e o heterodímero CsUev/CsUbc13, proteínas conjugadoras de ubiquitina, interagem entre si formando um complexo (Domingues et al., 2010). Ainda, dados publicados recentemente pelo grupo mostram que a proteína CsCyp funciona como um regulador negativo da RNA Pol II de citros e que PthA2 inibe sua atividade de prolil-isomerase. CsCyp está diretamente associada ao desenvolvimento do cancro cítrico, uma vez que plantas de laranja com níveis reduzidos dessa proteína apresentaram aumento nas lesões do cancro (Domingues et al. 2012).

Por outro lado, numa varredura de duplo-híbrido com a variante 4 de PthA, essencial para o desenvolvimento do cancro, identificamos várias proteínas de citros com funções no controle da transcrição, estabilização de mRNA e controle da tradução (de Souza et al., 2012). Esses achados são na verdade o objeto de estudo dessa tese e estão descritos em detalhe no capítulo II. Em particular, uma das proteínas identificadas como alvo de interação de PthA4 foi a CsMAF1, um regulador negativo da RNA Pol III, proteína essa que se tornou tema principal desta tese e cujas características funcionais e bioquímicas estão descritas em detalhes nos capítulos III e IV.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando a importância da citricultura para a economia do Brasil e a sua grande vulnerabilidade às pragas e doenças, especialmente ao cancro cítrico, esse trabalho visa contribuir na compreensão da função de PthA, principal efector de patogenicidade de *X. citri*, identificando e caracterizando proteínas de laranja doce que interagem com esse efector.

CAPÍTULO II: Identificação e caracterização de proteínas de laranja doce que interagem com PthA4.

1. INTRODUÇÃO

Embora os genes alvos e a especificidade ao DNA de efetores TAL já tenham sido identificados (Boch et al., 2010; Bogdanove et al., 2010), não se sabe ao certo como essas proteínas controlam a transcrição dos genes no hospedeiro. Para abordar essa questão, e considerando que a atividade de efetores TAL como ativadores transcricionais provavelmente dependem da ação de fatores nucleares do hospedeiro, realizamos um *screening* de duplo híbrido utilizando como isca a variante PthA4 de *X. citri* contra uma biblioteca de cDNA de laranja doce (*Citrus sinensis*). A escolha por PthA4 se deve ao fato de que essa variante, que possui 17,5 repetições no domínio central, é considerada essencial para induzir hipertrofia e hiperplasia e portanto, o homólogo equivalente ao AvrBs3 (Al-Saadi et al., 2007). Além disso, *screenings* anteriores realizados com PthA2 e PthA3 revelaram um número de interações com proteínas de citros envolvidas em importação nuclear, regulação transcricional e mecanismos de reparo de DNA (Domingues et al., 2010). Entre as proteínas isoladas, foi caracterizado um complexo proteico de citros composto por uma ciclofilina (CsCYP), uma tioredoxina (CsTDX) e um heterodímero CsUEV/CsUBC13, envolvido em ubiquitinação “K63-linked” e reparo de DNA. Análises de interação das quatro variantes de PthA com esse complexo proteico revelou que apesar da alta similaridade entre as variantes, existe uma preferência de interação com proteínas alvos nas células de citros (Domingues et al., 2010).

Curiosamente, a grande maioria das proteínas de citros que interagem com PthA4 são homólogas a fatores nucleares envolvidos em remodelamento e reparo da cromatina, regulação transcricional e modificação/estabilização de mRNA. Além disso, essas proteínas também interagem com as outras variantes de PthA e surpreendentemente, interagem entre elas, indicando a existência de um complexo multiproteico de citros ainda não caracterizado.

Esse trabalho contou ainda com a colaboração de Tiago Antonio de Souza, aluno de mestrado do nosso grupo, que caracterizou funcional e estruturalmente uma das proteínas de citros que compõe esse complexo proteico, a CsHMG, conhecida por sua função como fator de transcrição promovendo *DNA-bending* e, dessa maneira, facilitando o recrutamento de fatores nucleares envolvidos com o remodelamento da cromatina, regulação transcricional e reparo de DNA (Krohn et al., 2002; Grasser et al., 2007; Prasad et al., 2007; Ueda e Yoshida, 2010). O aluno Tiago realizou ensaios de EMSA (*Electrophoretic mobility shift assays*) com CsHMG usando como sondas DNA e RNA e, curiosamente, constatou que essa proteína se liga especificamente em RNAs ricos em uridina, característica, até o momento, inédita para

proteínas dessa família. Esse fato nos estimulou a investigar se PthA4 também teria essa capacidade de ligar RNA. Surpreendentemente, descobrimos que PthA4, assim como CsHMG, liga-se especificamente à RNA poly (U). Além disso, observamos que tanto CsHMG quanto PthA, interagem com duas proteínas *poly(A)-binding* que estão ligadas ao complexo multiproteico de citros via interação com uma proteína *structural maintenance of chromosomes* (CsSMC) e uma *translin-associated factor X* (CsTRAX). No total, foram caracterizadas nove proteínas de citros, componentes desse complexo (de Souza et al., 2012).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um *screening* de duplo híbrido usando como isca a variante PthA4 de *X. citri* e como presa, uma biblioteca de cDNAs de laranja doce;
- Confirmar por duplo híbrido e *pull down* as interações entre as quatro variantes de PthA e as proteínas isoladas no *screening* de duplo híbrido inicial: CsPABP1, CsPABP2, CsPCBP, CsTRAX, CsSMC, CsVIP2, CsRRMP1, CsHAP3 e CsMAF1;
- Confirmar por duplo híbrido e *pull down* as interações entre as proteínas isoladas de laranja doce: CsPABP1, CsPABP2, CsPCBP, CsTRAX, CsSMC, CsVIP2, CsRRMP1, CsHAP3 e CsMAF1;
- Realizar ensaios de interação entre PthA4 e sondas de RNAs (poly A, U, G e C) através da técnica de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A subclonagem da isca PthA4 no vetor pOBD (em fusão com o domínio de ligação GAL4) foi realizada nos sítios de restrição NotI/NotI, partindo da construção em vetor pET28a, disponível em nosso laboratório. Uma biblioteca de cDNAs de folha de *Citrus sinensis*, clonada no vetor pOAD e já disponível em nosso laboratório (Domingues et al., 2010), foi utilizada como presa.

Para os clones positivos que estavam fora de fase de leitura em relação à fusão com o domínio GAL4, foram desenhados *primers* específicos para que esses genes pudessem ser clonados em fase de leitura correta (ver Tabela 1).

Tabela 1: Relação da sequência 5' 3' dos *oligonucleotídeos* usados na clonagem para correção da fase de leitura dos genes isolados em citros.

Nome	Sequência 5' 3'	Presa
Maf1-F	GTCGACCCATGAAGTTCTTAGAATACACTCC	CsMAF1
Pabp-F	GAATTCATGGAGCAACACGATGAGCAAGAGC	CsPABP1

Algumas das construções utilizadas nesse trabalho já estavam disponíveis em nosso laboratório, entre elas: pOBD-pthA1- Δ N, pOBD-pthA2- Δ N e pOBDpthA3- Δ N.

3.1 SCREENING DE DUPLO-HÍBRIDO COM A ISCA pOBDPthA4

3.1.1 Preparação da biblioteca pOAD de citros para transformação em levedura

Utilizou-se 50 μ L de cada alíquota da biblioteca de cDNAs de *Citrus sinensis* (cerca de 37 alíquotas) como inóculo para se extrair o DNA plasmidial. Esse inóculo foi crescido a 37°C sob agitação (200 rpm) por 16 horas. O DNA plasmidial foi purificado utilizando o kit *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O rastreamento das interações entre as iscas e presas requer um grande número de transformantes para testar uma grande fração de presas presentes na biblioteca. Segundo o protocolo de Gietz (1998), antes de partir para uma transformação em larga-escala, é preciso testar concentrações crescentes de DNA plasmidial que permitirão uma boa cobertura da biblioteca de cDNAs. Desse modo, foi feita uma quantificação do DNA plasmidial total purificado usando o método descrito por Sambrook (2001) em espectrofotômetro numa absorvância de 260nm. A quantidade de DNA utilizada para a transformação foi de 30 μ g.

3.1.2 Transformação em Larga-escala

A linhagem de levedura PJ69-4a de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1-HIS3*, *GAL2-ADE2*, *met2::GAL7-lacZ*

[James e Craig *et al.*, 1996]) contendo a isca de interesse (pOBDPthA4), foi inoculada em 50 mL de meio SC +Ade +His +Leu -Trp (0,66% base nitrogenada sem aminoácidos; 2% glicose; 0,008% adenina; 0,008% histidina; 0,008% leucina; 2% Bacto-ágar) e incubada sob agitação a 30°C por 16 horas. Após este período, mediu-se a OD (optical density) a 600nm e calculou-se o volume de pré-inóculo necessário pra a obtenção de um total de $7,5 \times 10^8$ células, as quais foram centrifugadas e inoculadas em 150 mL de meio YAPD. Após incubação a 30°C por 6 horas, sob agitação; novamente foi verificada a quantidade de células, que deveria atingir uma fase logarítmica - OD600nm de 2,0 unidades de absorbância, correspondente à aproximadamente $2,0 \times 10^7$ UFC/mL.

A cultura foi então dividida em três tubos de 50 mL e centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 25 mL de água estéril, quando foram novamente sedimentadas e ressuspensas em um único tubo com 3 mL de acetato de lítio (100 mM). A solução foi incubada em banho-maria a 30°C por 15 minutos, sendo então centrifugada e o sobrenadante descartado. Ao *pellet*, na ordem indicada, foram adicionados: 7,2 mL PEG (50%); 1,08 mL acetato de lítio (1,0 M); 1,5 mL ss-DNA esperma de salmão (2 mg/mL); 50 µL de DNA da biblioteca (30 µg total) e 950 µL de água estéril. A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada a 30°C por 30 minutos, agitando-se bem o tubo a cada 10 minutos. Após este procedimento, a mistura foi submetida ao choque-térmico a 45°C por 45 minutos, no decorrer dos quais, o tubo era invertido a cada 5 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante removido. As células foram ressuspensas em 20 mL de água ultrapura estéril e plaqueou-se 500 µL da solução em 36 placas (150 x 15 mm) contendo meio SC +Ade -His -Leu -Trp + 3 mM 3-AT (para os clones negativos em auto-ativação GAL1-HIS). Em outra placa contendo SC +Ade +His +Trp -Leu, plaqueou-se 500 µL de uma diluição 1:100 da mistura (controle do número de transformantes totais). As placas foram incubadas a 30°C durante 4 dias, no decorrer dos quais, efetuou-se a contagem de colônias.

Aproximadamente 9 milhões de clones foram plaqueados, sendo que a representabilidade da biblioteca é de aproximadamente 800 mil clones. Desse *screening* primário, foram isoladas 175 colônias que tiveram crescimento mais acentuado. Essas colônias foram repicadas para dois conjuntos de placas contendo os meios: SC +Ade -His -Leu -Trp e SC -Ade -His -Leu -Trp, respectivamente. Cerca de 90 colônias cresceram nas placas SC -Ade -His -Leu -Trp e foram consideradas positivas como resultado do *screening*.

3.1.3 Isolamento do DNA plasmidial de levedura

As colônias das placas SC –Ade –His –Leu –Trp, foram inoculadas independentemente, em meio seletivo SC –Ade –His –Leu –Tr a 30°C, sob agitação (250 rpm) por 18 horas. Centrifugou-se a 2.800 rpm a 4°C, por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas no volume residual do meio e adicionou-se 1 mL de “*Rescue Buffer*” (50 mM Tris-Cl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,3% β-mercaptoetanol). Após este procedimento, as células foram centrifugadas e novamente ressuspensas no volume residual do meio e adicionou-se 25 µL de solução de lise (2 mg/mL de zimoliase; 0,2 mg/mL de RNase). As células foram incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação (200 rpm). Foi adicionado 25 µL de SDS (10%), agitou-se bem e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 80 µL de acetato de potássio 3 M, misturou-se bem e as células foram levadas ao freezer -80°C por 15 minutos. Após o descongelamento, as células foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 15 minutos, à 4°C e 120 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo (1,5mL). O mesmo volume de isopropanol foi adicionado ao sobrenadante e o tubo foi agitado e incubado por 15 minutos no gelo. Centrifugou-se então a 4.000 rpm, por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol (70%). Após a drenagem, secou-se o *pellet* invertendo-se o tubo sobre um papel toalha e centrifugando-o mais uma vez por 15 minutos a 4000 rpm. O *pellet* foi então ressuspensado em 15 µL de TE e usado na transformação de células de *E. coli*, DH5α, para a obtenção dos vetores para sequenciamento. A reação de sequenciamento do DNA baseou-se no método Dideoxi de Sanger (Sanger et al., 1977) com a utilização de um kit de Sequenciamento da *Applied Biosystems* (BigDye Terminator vs. 3.0). A identificação dos clones foi feita por homologia de sequência usando o programa BLAST.

3.2 ENSAIO DE DUPLO-HÍBRIDO

As iscas clonadas em pOBD e as presas em pOAD foram separadamente transformadas em cepas de *E.coli* DH5α por choque térmico, plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani (LB – 1% de peptona, 05% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio) seletivo com 100 µg/mL de Ampicilina (ambos os vetores, pOBD e pOAD possuem resistência a esse antibiótico) e crescidas em estufa a 37 °C por 16 horas. Os clones foram repicados em meio líquido seletivo LB+Amp a 37 °C por 14-16 horas. As células foram em seguida, coletadas e o DNA plasmidial purificado utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O mesmo procedimento foi realizado para os vetores pOBD e pOAD vazios, ou seja, sem insertos, os quais foram utilizados como controle para confirmação das

interações. Estas construções pOBD-isca e pOAD-presa foram então utilizadas para transformação de leveduras competentes nos ensaios de duplo híbrido.

3.2.1 Transformação de leveduras competentes de *S. cerevisiae*

Para confirmação das interações por ensaios de duplo híbrido foi utilizada a linhagem PJ69-4a (ou α) de *Saccharomyces cerevisiae* (*MATa*, *trp1*-901, *leu2*-3,112, *ura3*-52, *his3*-200, *gal4*, *gal80*, *LYS2* : : *GAL1-HIS3*, *GAL2-ADE2*, *met2* : : *GAL7-lacZ*) (James e Craig et al., 1996). Para transformação desta linhagem de leveduras foi utilizado o protocolo de Transformação de Leveduras pelo método polietileno glicol/ DNA carreador fita simples/ acetato de lítio (PEG/ ssDNA/ LiAc) descrito por Gietz & Woods (2002). A cepa de levedura PJ69-4a foi previamente plaqueada em meio YPD sólido (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 2% de D-glicose; 2% de Bacto-ágar) e crescida por 2 dias em estufa 30°C. Foram preparados inóculos contendo a levedura selvagem em meio YPD líquido incubados por 16 horas a 30°C e 200 rpm. As células foram centrifugadas por 30 segundos a 14.000 rpm. Aos *pellets* foi adicionado um mix de transformação contendo 240 μ L PEG 3350 50% w/v; 36 μ L LiAc 1 M; 50 μ L ssDNA de esperma de salmão (2 mg/mL) fervido por 5 minutos e resfriado em banho de gelo; 5 μ L de plasmídeo pOBD-isca (obtido através de *miniprep* como descrito acima) e água para completar um volume final de 360 μ L. As células foram ressuspensas, submetidas a choque térmico no banho a 42°C por 2 horas e novamente centrifugadas. Os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de água e então amostras de 100 μ L foram plaqueadas em meio SC +Ade +His +Leu –Trp (0,66% base nitrogenada sem aminoácidos; 2% glicose; 0,008% adenina; 0,008% histidina; 0,008% leucina; 2% Bacto-ágar) e incubadas em estufa 30°C por 4 dias. Foram crescidos inóculos a partir desta placa contendo pOBD-isca e então transformados novamente como descrito acima, mas agora adicionando os plasmídeos pOAD-presa (mesma quantidade e também obtidos por *miniprep*). Estes duplo-transformantes foram então crescidos em meio SC +Ade +His – Leu –Trp e incubados em estufa a 30°C por 4 dias.

3.2.2 Teste de ativação dos genes repórteres *in vivo*

A cepa de levedura utilizada contém três promotores (*GAL1*, *GAL2* e *GAL7*) para seleção dos repórteres *HIS3*, *ADE2* e *lacZ*, artifício que tem se mostrado eficiente na redução de falsos-positivos. A partir das placas de transformação contendo ambos os plasmídeos (pOBD-isca + pOAD-presa) 9 clones de cada condição foram repicados para um meio mais seletivo agora sem histidina (marcador auxotrófico *HIS3*) e crescidos em estufa a 30°C por 3 a 4 dias. Em seguida, os clones obtidos foram repicados para um outro meio ainda mais restritivo que o anterior, sem os aminoácidos histidina e adenina (marcadores auxotróficos *HIS3* e *ADE2*), e com ou sem 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) nas concentrações de 0, 3 e 5 mM. Este composto é

utilizado para reduzir a ativação basal de *HIS3* quando são observadas interações fracas entre as proteínas de fusão, por ser capaz de inibir competitivamente o produto do gene *HIS3*. As placas foram incubadas em estufa 30°C por 3 a 4 dias. Estes procedimentos foram repetidos para cada clone isolado sob três condições: pOBD-isca +pOAD-presas, pOBD-vazio + pOAD-presas, pOBD-isca + pOAD-vazio. Sendo que as duas últimas condições citadas funcionaram como controles.

3.3 SUBCLONAGENS, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *E. coli*

3.3.1 Subclonagens nos vetores pGEX-4T-1 e pET28a

Os cDNAs correspondentes às proteínas CsPABP2, CsPCBP, CsSMC e CsVIP2 foram subclonados do vetor pOAD para os vetores de expressão pGEX-4T-1 (GE Healthcare) e pET28a (Novagen), usando-se os sítios de restrição Sall/NotI. Os cDNAs correspondentes às proteínas CsPABP1, CsHAP3 e CsRRM1 foram subclonados apenas no vetor pGEX-4T-1, usando-se os mesmos sítios Sall/NotI.

Após digestão com essas enzimas, vetor e inserto foram extraídos do gel de agarose (1%), purificados com Kit de Extração de DNA (Qiagen) e ligados com T4 DNA ligase sob incubação no banho a 16°C por 16 horas. Esta ligação foi então transformada em células competentes de *E.coli* DH5 α por choque térmico, plaqueada em meio LB seletivo com 100 μ g/mL de Amp, para a construção em pGEX-4T-1 e com 50 μ g/mL de Kana para a construção em pET28a (pET28a - resistência a kanamicina) e incubada em estufa 37°C por 16 horas. Para selecionar clones transformantes, foi realizado PCR de colônia com 10 clones isolados com os primers pyEX/pGEX *forward* e *reverse* para a construção em pGEX-4T-1 e os *primers* T7 e pet-Rev para a construção em pET28a. Estes clones foram então confirmados por sequenciamento de DNA. Em seguida, as culturas foram crescidas em meio líquido LB Amp e LB Kana (resistência de acordo com as construções) e os plasmídeos purificados por *miniprep* (Qiagen). Após a confirmação da clonagem os plasmídeos foram usados para transformar células competentes de *E.coli* para expressão, BL21(DE3), por choque térmico.

Essas construções foram então expressas em 100 mL de meio LB Amp (100 μ g/mL) e LB Kana (50 μ g/mL) nas temperaturas: 25°C, 30°C e 37°C (com o objetivo de testar se a temperatura influenciaria na solubilidade da proteína) sob agitação constante de 200 rpm. As culturas foram crescidas até atingir a fase logarítmica - OD (*optical density*) a 600nm entre 0,6 e 0,8 unidades de absorvância e a síntese das proteínas recombinantes foi induzida por 3 horas com adição de 0,4 M de IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo, análogo da lactose).

Foram realizados testes para verificar a solubilidade e se estas proteínas fusionadas à cauda de Histidina ou GST apresentavam afinidade por resina de níquel (Ni-NTA Agarose – Qiagen) e resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow*, respectivamente. Para lisar as células, equilibrar e lavar a resina foi utilizado o tampão BPS 1X (Phosphate-buffered saline – 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) + Nonidet P40 1% + lisozima (1 mg/mL) e sonicação (5 a 10 pulsos de 20s), a fim de aumentar a eficiência da lise, e resina GST imobilizada em PBS. Para o teste com a resina de níquel, foi utilizado o tampão Tris (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 15 mM Imidazol, 20% Glicerol, 1 mM PMSF) + lisozima (1 mg/mL) + Nonidet p40 (0,5%) + Rnase (20 mg/mL) e sonicação (15 pulsos de 20s), a fim de aumentar a eficiência da lise. O extrato foi então centrifugado à 4°C por 1 hora a 14000 rpm e incubado com a resina. A indução, solubilidade e purificação foram avaliadas por gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE e coloração com o corante *Coomassie Blue*.

3.3.2 Expressão de PthAs 3 e 4 em *E. coli*

PthAs 3 e 4 clonados em pET28a foram expressos em BL21(DE3) e purificados por afinidade em resina de níquel (NiNTA). Foram utilizados os seguintes tampões: **A** (de lise) – 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF; 20% glicerol e 0,5 mM DTT; **B** (de lavagem) – 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 15 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF; 20% glicerol e 0,5 mM DTT e **C** (de eluição) - 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM imidazol; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF, 20% glicerol e 0,5 mM DTT. A lise das células foi feita com 15 mL de tampão **A** e 1 mg/mL de lisozima a 4°C por 30 minutos. As suspensões foram sonicadas (20 pulsos de 10 segundos, ou até clarificação do extrato, amplitude 40%) e centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 1 hora. O extrato solúvel lisado e filtrado (0,45 µm) foi aplicado em coluna de gravidade contendo 600 µL de resina pré-equilibrada com tampão **A** e fluxo de 0,3 mL/min. Foram feitas 3 lavagens com 2 volumes de coluna cada (tampão **B**) e 6 eluições com 1 volume de coluna cada (tampão **C**). A indução, a solubilidade e as frações eluídas foram analisadas por gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE.

3.4 ENSAIOS DE GST-PULL DOWN

As proteínas recombinantes (CsTRAX, CsCSMC, CsRRMP1, CsHAP3, CsPABP1 e CsVIP2) expressas em fusão com GST, foram ressuspendidas em 1 mL de tampão de lise (PBS 1X pH 7,4; 1 mM de DTT e lisozima [1 mg/ml]), lisadas e as frações solúveis obtidas foram incubadas separadamente com 50 µL de resina “*Glutathione Sepharose 4 Fast Flow*” (Amersham Biosciences), previamente equilibrada com tampão de ligação (mesmo de lise), por 1 hora e 30 minutos sob leve agitação a 4°C. Após o período de incubação, a resina foi

lavada com tampão de ligação (30 volumes de coluna), para remoção de amostra não ligada. Em seguida, a resina foi incubada com 1 mL das proteínas inteiras: pET28a-PthA3 ou pET28a-PthA4, previamente expressas e purificadas por afinidade em resina de níquel (NiNTA) como já descrito anteriormente. A incubação foi realizada por 2 horas sob leve agitação a 4°C. As amostras foram centrifugadas e a resina lavada com tampão de ligação (40 volumes de coluna). As proteínas ligadas à resina foram eluídas com tampão de amostra SDS-PAGE sendo fervidas por 15 minutos a 95°C e fracionadas em gel de poliácridamida 10% para coloração com corante *Coomassie blue* e visualização por Western blot com os anticorpos Anti-PthA e Anti-GST, como será descrito no item 3.5. Como controle foi realizado o mesmo procedimento para a proteína GST sozinha presa à resina e incubada separadamente com as mesmas proteínas purificadas mencionadas acima.

As amostras foram aplicadas em géis de poliácridamida 10% para coloração com corante *Coomassie blue* e visualização por Western blot, com os anticorpos Anti-6xHis (Sigma) e Anti-GST (Sigma).

3.5 WESTERN BLOT

As proteínas separadas pelo gel foram transferidas para membrana de PVDF (difluoreto de polivinila) em tampão de transferência (48 mM de Tris-base; 39 mM de glicina; 0,037% de SDS e 20% de metanol). A transferência foi realizada a 350 mA por 1 hora. Após a transferência a membrana foi incubada em solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado em 1X TBS-T) por 1 hora. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo primário em solução bloqueadora. Depois desta incubação, a membrana foi lavada três vezes (de 10 minutos cada sob leve agitação) em solução TBS-T (20 mM de Tris-base; 150 mM de NaCl, pH 7,5; 0,05% de Tween 20) e incubada com o anticorpo secundário (ECL Kit – Amersham Biosciences) por 1 hora. A membrana foi novamente lavada três vezes de 10 minutos em solução TBS-T. A detecção foi feita utilizando-se o método de quimioluminescência do Kit ECL (GE Healthcare).

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: Anti-GST (Sigma - diluição de 1:3000) e Anti-PthA (policlonal - 1:5000). E como anticorpos secundários correspondentes Anti-mouse ou Anti-rabbit (ambos na diluição de 1:3000), dependendo do animal no qual foram produzidos.

3.6 ENSAIOS DE EMSA (*Eletrophoretic Mobility Shift Assay*)

As sondas utilizadas nesse ensaio consistiam de quatro segmentos de 25 bases compostos por polímeros de adenosina (poly-A)₂₅, uridina (poly-U)₂₅, citidina (poly-C)₂₅ e guanosina (poly-G)₂₅ (Tabela 2).

Tabela 2: Sondas utilizadas nos ensaios de EMSA de RNA com PthA4.

Nome	Oligonucleotídeos de RNA – Sequência 5' 3'
PolyA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
PolyC	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
PolyG	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
PolyU	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU

As sondas foram marcadas radioativamente usando-se [γ 32P]-ATP e a enzima T4 polinucleotídeo quinase (PNK - Fermentas). As sondas marcadas foram purificadas com o kit Illustra de acordo com as recomendações do fabricante.

As reações de ligação contendo a proteína PthA4 purificada (100 a 500 ng) foram incubadas com 12,5 nM de cada sonda marcada, em tampão de ligação (12 mM Tris-HCl, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 2,5% glicerol, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA e 0,05% NP-40, pH 7,5) por 30 minutos no gelo. Foi acrescentado o tampão de amostra de RNA e as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 6%. A corrida durou 2 horas a 70 volts. Após corrida os géis foram secos e expostos por 16h à -80°C para posterior autoradiografia.

3.7 ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Folhas jovens de laranja doce foram maceradas em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH7.4, 15 mM imidazol, 25 mM NaCl, 10% glicerol, 0,05% Triton X-100, 0.1 mM PMSF) e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. As proteínas recombinantes CsSMC e CsTRAX com his-tag foram purificadas (como descrito anteriormente), imobilizadas em resina de cobalto e incubadas com o lisado de células de citros, durante 16 horas a 4°C, sob agitação orbital. As resinas foram lavadas com 20 volumes de coluna do tampão de lise (quatro vezes) a 4°C. As proteínas ligadas às colunas foram fracionadas em gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE. As bandas correspondentes às proteínas eluídas foram coradas com prata, cortadas do gel, reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina. A mistura de peptídeos resultante foi reconstituída em 0.1% de ácido fórmico e analisada em um Espectrômetro de Massas ETD enabled Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) acoplado à cromatografia líquida (LC-MS/MS) por um sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystem) através de uma fonte de ionização nanoeletrospray Proxeon.

Os peptídeos foram separados em um gradiente de acetonitrila (2-90%) em 0.1% de ácido fórmico usando uma pré-coluna EASY-Column (2cm Xid 100 μ M, 5 μ M particle size) e uma coluna analítica EASY-Column (10cm Xid 75 μ M, 3 μ M particle size) a um fluxo de volume de 300 nl/min durante 20 minutos. A voltagem do nanoeletrospray foi ajustada para 1.7 kV e a

temperatura da fonte para 275°C. Todos os métodos de instrumentos para a Orbitrap Velos foram ajustados no modo de aquisição de dados dependentes. A verificação completa dos espectros de MS (m/z 300 – 2000) foi adquirida no analisador do Orbitrap após a acumulação de um valor alvo de $1e^6$. A resolução foi ajustada para $r= 60,000$ e os 20 íons de peptídeos mais intensos com o estado de carga ≥ 2 foram sequencialmente isolados para um valor alvo de 5,000 e fragmentados em um “trap” de íons linear por CID de baixa energia (energia de colisão normalizada de 35%). O limiar de sinal para desencadear um evento MS/MS foi ajustado para 1000 contagens. Exclusão dinâmica foi ativada com uma lista de exclusão de tamanho de 500, a duração da exclusão de 60 segundos e a repetição da contagem de 1. Foram usados uma ativação de $q=0.25$ e um tempo de ativação de 10 ms. As listas de pico (mgf) foram geradas a partir dos arquivos de dados *raw* pelo software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.) e a busca contra os bancos de dados de ESTs de citros (> 200.000 sequências) e do genoma de citros (13.000 unigenes) utilizando o Mascot v.2.3.01 (Matrix Science Ltd.), com carbamidometilação como modificações fixadas, oxidação da metionina, como modificação variável, uma clivagem perdida de tripsina e uma tolerância de 10 ppm para íons precursores e 1 Da para íons fragmentados. Apenas peptídeos com um mínimo de 5 resíduos de aminoácidos que apresentavam limiar significativo ($p<0.05$) na pontuação Mascot-based foram considerados na análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PthA4 interage com proteínas de citros com domínios de ligação a DNA e RNA.

Em relação às proteínas de citros isoladas no *screening* de duplo híbrido inicial realizado com a isca PthA4, podemos classificá-las em três grandes categorias funcionais: reparo e remodelamento da cromatina, regulação da transcrição e modificação/estabilização de mRNA.

As proteínas selecionadas estão listadas na tabela 3 e incluem uma proteína do tipo *high-mobility group* (CsHMG), caracterizada pelo aluno Tiago, duas proteínas do tipo *poly(A)-binding*, designadas CsPABP1 e CsPABP2, uma proteína do tipo *poly(C)-binding*, com um domínio KH (CsPCBP), uma *translin-associated factor X* (CsTRAX), uma proteína que contém o domínio *structure maintenance of chromosomes* (CsSMC), uma *VirE2-interacting protein* (CsVIP2), uma proteína com o motivo *RNA-recognition motif* (CsRRMP1) e uma homóloga ao fator de transcrição OshAP2A (CsHAP3).

Curiosamente, a proteína CsRRMP1, CsTRAX e importina- α (Domingues et al., 2010) foram isoladas em *screening* anteriores realizados com outras variantes de PthA.

Tabela 3: Proteínas de citros identificadas como alvos de PthA4 e componentes do complexo multiproteico envolvido com o processamento e tradução de mRNA.

Proteína	Acesso GenBank	Características	Função biológica predita
CsHMG	JN600529	Ligação à DNA; domínio HMG-box	Remodelamento da cromatina; reparo de DNA; controle da transcrição
CsPABP1	JN556038	Ligação à RNA; domínio RRM	Modificação / estabilização mRNA
CsPABP2	JN600528	Ligação à RNA; domínios RRM	Modificação / estabilização mRNA
CsPCBP	JN600525	Ligação à RNA; domínio PCBP_KH	Processamento de mRNA/splicing; ativação da tradução
CsTRAX	JN600526	Domínio Translin	Silenciamento gênico induzido por RNA; reparo de DNA / recombinação
CsSMC	JN600522	Domínio SMC / Mnd1	Segregação cromatina; reparo de DNA / recombinação
CsVIP2	JN600527	Domínio CCR4-NOT	Remodelamento da cromatina; integralização DNA
CsRRMP1	JN600523	Ligação à RNA; domínios RRM	Modificação / estabilização mRNA
CsHAP3	JN600524	Ligação à DNA	Regulação da transcrição

É interessante observar que todas as proteínas de citros isoladas nesse *screening* possuem um ou múltiplos domínios de ligação a RNA e/ou DNA e com exceção de CsRRMP1, todas as presas identificadas possuem homólogos em leveduras, humanos ou plantas, com estrutura tridimensional e/ou função biológica conhecida (Tabela 3). Além dessas proteínas listadas na tabela 3, outras proteínas envolvidas no controle da transcrição foram identificadas, incluindo uma *auxin-response factor* (CsARF) e uma homóloga à proteína MAF1 humana (CsMAF1), conhecida como reguladora negativa da RNA polimerase III, que será descrita nos próximos capítulos.

Características estruturais e funcionais de ortólogos das presas isoladas.

CsPABP1 e CsPABP2

Foram isoladas duas proteínas do tipo *poly(A) binding protein* (PABP) no *screening* de duplo híbrido com a isca PthA4: a CsPABP1 e a CsPABP2 que são homólogas às proteínas humanas PABPN e PABPC, respectivamente, cujas funções estão relacionadas com estabilização do mRNA e início da tradução (Kahvejian et al., 2001; Mandel et al., 2008). CsPABP1 possui um único domínio RRM e um domínio C-terminal rico em glicina/arginina e CsPABP2, possui quatro cópias do domínio RRM na porção N-terminal (Kühn e Wahle, 2004). O domínio RRM é o mais importante domínio usado no reconhecimento de RNA, presente em centenas de diferentes proteínas (Burd e Dreyfuss, 1994). Esse domínio possui dois motivos conservados RNPs, responsáveis pela especificidade do reconhecimento de cauda poli(A) (Deo et al., 1999).

Em eucariotos, a cauda poli(A) na porção 3' do mRNA, influencia quase todos os aspectos do metabolismo do RNA: transporte do núcleo para o citoplasma, estabilização e tradução. No entanto, estudos recentes realizados em humanos, plantas e leveduras, revelam que a cauda poli(A) pode também marcar os RNAs para a degradação via complexo exossomo (Chekanova et al., 2007; LaCava et al., 2005; Vanacova et al., 2005; Wang et al., 2008). Para realizar essas funções biológicas, a cauda poli(A) possui sítios específicos para vários fatores regulatórios, entre eles estão duas proteínas do tipo PABP: PABPC no citoplasma, e PABPN1 no núcleo (Ge et al., 2008).

Na maioria dos casos, a síntese de proteínas é estimulada por interações proteína-proteína (fatores de tradução do complexo eIF4F e PABPs) que servem para conectar a extremidade 5', 7-metil-G cap e a cauda poli(A) na extremidade 3' do mRNA, formando um loop-fechado, através da circularização do mRNA, e o recrutamento da maquinaria ribossomal. Interações entre as extremidades 3' e 5' do mRNA também influenciam a sua estabilidade. A cauda poli(A) estabiliza a maioria dos mRNAs via associação com proteínas PABP. Em leveduras,

PABP contribui para a estabilidade do mRNA por inibir a remoção do “cap”, que é um pré-requisito para a degradação de um número de mRNAs (Deo et al., 2001).

PABPC, também conhecida como Pab1 em *S. cerevisiae*, está presente em todos os eucariotos e desempenha um papel importante no início da tradução e na degradação do mRNA. PABPC contém quatro domínios RRM na porção N-terminal. RRM1 e RRM2 são mais similares à RRM3 e RRM4, respectivamente. Os dois primeiros domínios RRM são principalmente responsáveis pela ligação específica à cauda poli(A) (Ge et al., 2008). A região C-terminal possui um domínio da família PABP que tem sido atribuído inúmeras funções bioquímicas, incluindo homo-oligomerização (Kuhn e Pieler, 1996) e interações proteína-proteína. A protease 2A de poliovírus é capaz de clivar proteínas PABP entre o quarto domínio (RRM4) e o motivo PABP no C-terminal para diminuir o início da tradução *in vitro*, destacando a grande importância desse motivo (Joachims et al., 1999; Kerekatte et al., 1999).

No núcleo, PABPN1 promove a síntese da cauda poli(A) através da estimulação da proteína PAP [poly(A) polymerase] e controla o comprimento da cauda poli(A) (Nemeth et al., 1995). Microscopia eletrônica do complexo PABPN-poli(A), sugere que a oligomerização da proteína tem uma significância funcional. Essa estrutura dinâmica pode funcionar como uma “régua” molecular para determinar o comprimento da cauda poli(A) (Keller et al., 2000). Embora PABPN ligue à cauda poli(A) com a mesma afinidade e especificidade que PABPC, ela possui apenas um único domínio RRM, que separa a região C-terminal, rica em arginina, do domínio N-terminal, essencial para a estimulação de PAP (Ge et al., 2008). Recentemente, estudos realizados em levedura, sugerem que o papel de PABPN seja mais do que a poliadenilação na síntese do mRNA, mas sim um papel no controle da tradução via degradação do mRNA pelo exossomo (Perreault et al., 2007; Lemay et al., 2010).

CsPCBP

A regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional é alcançada principalmente por proteínas que contêm domínios bem definidos envolvidos em ligação a RNA. Os motivos mais amplamente conhecidos são os de reconhecimento de RNA (RRM) e o domínio KH (K homology) (Burd e Dreyfuss, 1994; Swanson, 1995; Siomi et al., 1993). O domínio KH possui cerca de 60 resíduos de aminoácidos, normalmente hidrofóbicos, e com uma sequência consenso (VIGXXGXXI) bem conservada no meio do domínio. Uma única proteína pode possuir até 15 cópias do domínio KH (Burd e Dreyfuss, 1994), como é o caso da proteína *vigilin* (Musco et al., 1996).

Proteínas do tipo poly(C)-binding (PCBPs) possuem como principal característica a presença de 3 domínios KH. Membros desse grupo realizam múltiplas funções, incluindo estabilização de mRNA (Weiss e Liebhaber, 1995; Blyn et al., 1997; Gamarnik e Andino,

1997), silenciamento traducional (Collier et al., 1998; Ostareck et al., 2001) e aumento da tradução (Blyin et al., 1997; Andino et al., 1999). Este grupo também é encontrado em proteínas de plantas, que parecem ter dois domínios PCBP-like arranjados em tandem, como HEN4, uma proteína que desempenha um papel importante no processamento do pré-mRNA de AGAMOUS (AG) e no desenvolvimento da planta. Em um primeiro cenário, HEN4, juntamente com outras proteínas associadas, inibem o reconhecimento ou o uso de sinais de poliadenilação presentes no segundo íntron de AG, isso acarreta um término prematuro da transcrição e poliadenilação nesses sítios. Em um segundo cenário, essas proteínas promovem um *splicing* no pré-mRNA de AG (Cheng et al. 2003).

A proteína CsPCBP isolada de citros, possui três domínios KH arranjados em tandem e cada domínio apresenta o motivo GXXG bem definido. Estudos demonstraram que esse domínio é essencial para a função dessa proteína em levedura (Brykailo et al., 2007).

CsTRAX

A proteína TRAX (Translin-associated factor X) de mamíferos foi primeiramente identificada em um ensaio de duplo-híbrido com o objetivo de identificar proteínas que interagem com Translina (Aoki et al., 1997). Translina é uma proteína octamérica envolvida em uma variedade de eventos celulares, incluindo translocações cromossômicas (Aoki et al., 1995), transporte de mRNA e regulação da tradução (Han et al., 1995a; Kwon e Hecht, 1993).

Apesar de muitos estudos destacarem o papel importante de Translina e TRAX na divisão e proliferação celular (Ishida et al., 2002; Yang e Hecht, 2004), um trabalho mostrou que TRAX também pode estar envolvida no mecanismo de reparo de DNA, através de sua interação com uma proteína da matrix nuclear, chamada C1D, uma proteína do tipo SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) (Chen et al., 2004).

Um outro estudo recente mostrou que o complexo Translin-TRAX é componente do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), atuando como ativador de AGO2, em células HeLa (Liu et al., 2009; Ye et al., 2011).

CsSMC

Proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) desempenham um papel importante na estrutura e dinâmica de cromossomos procariotos e eucariotos, assegurando o processo fiel de segregação durante a divisão celular (Koshland e Strunnikov, 1996; Cobbe e Heck, 2000; Hirano, 2002). Essas proteínas estão envolvidas em condensação do cromossomo, coesão de cromátides-irmãs, compensação da dosagem do cromossomo sexual, recombinação genética e reparo de DNA (Strunnikov, 1998).

Os eventos de condensação do cromossomo que ocorre entre a prófase e metáfase, onde uma massa amorfa de cromatina é organizada em cromossomos estruturados, e a coesão de cromátides irmãs, são processos realizados por complexos proteicos distintos, porém similares estruturalmente. Esses complexos são chamados de condensina e coesina, respectivamente. No núcleo desses dois complexos encontram-se membros de uma família de ATPases cromossômicas, a família SMC, *Structural Maintenance of Chromosome* (Hirano, 2002).

Em eucariotos, ao menos seis membros da família de proteínas SMC foram encontrados. Cada um deles possui parceiros específicos com os quais formam um heterodímero SMC. Podem ser classificados em três grupos distintos: SMC1-SMC3, SMC2-SMC4 e SMC5-SMC6. Esses heterodímeros também se associam com diferentes subunidades proteicas não pertencentes a essa família para montar um holocomplexo SMC inteiramente funcional (Hirano, 2002). Essas proteínas possuem a região N-terminal e C-terminal altamente conservadas. O domínio N-terminal possui um motivo de ligação NTP (Walker A box) que liga ATP. Já o domínio C-terminal contém um motivo DA box, que lembra um motivo Walker B e liga DNA, mas com preferência a DNA dupla fita que é capaz de adotar estruturas secundárias (Strunnikov e Jessberger, 1999). O complexo SMC5-SMC6 provavelmente desempenha um papel importante na organização cromossômica, no que diz respeito à integridade e resposta a DNA danificado (Hirano, 2002).

CsVIP2

A proteína CsVIP2 de citros possui mais de 70% de identidade com a proteína VIP2 de *Arabidopsis thaliana* e apresenta um domínio da família das proteínas NOT2/NOT3/NOT5.

VIP2 é uma VIRE2 Interacting Protein 2, ou seja, uma proteína de planta que interage com a proteína VIRE2 de *Agrobacterium tumefaciens*. VIRE2 é translocada para dentro da célula da planta e, aparentemente protege o T-DNA da bactéria da degradação. Em ensaios de duplo-híbrido realizados para melhor caracterizar as funções de VIRE2 no transporte e integração do T-DNA, duas proteínas de planta que se associam com VIRE2 foram identificadas em *Arabidopsis thaliana*, VIP1 e VIP2. VIP1 está envolvida na importação nuclear do complexo T-DNA, já VIP2, que possui um domínio NOT está envolvido na integralização do T-DNA no genoma do hospedeiro (Anand et al., 2007). Análises comparativas de transcriptoma, entre o tipo selvagem e o mutante *vip2* de *Arabidopsis thaliana*, sugeriram que VIP2 atua, de maneira direta ou indireta, na regulação da transcrição de muitos genes que codificam histonas ou proteínas relacionadas à histona. Dessa maneira, VIP2 atua na transformação mediada por *Agrobacterium* em plantas, modulando a expressão de vários genes que codificam histonas de plantas (Anand et al., 2007).

Proteínas com o domínio NOT são componentes integrais do complexo transcricional Ccr4-Not, conservado em eucariotos e cuja função está associada à degradação de RNA e regulação transcricional (Collart, 2003; Collart e Timmers, 2004). De fato, uma das subunidades desse complexo, o Ccr4, é a principal deadenilase de leveduras (Tucker et al., 2001), que catalisa o primeiro passo que conduz à subsequente degradação de mRNAs citoplasmáticos. Essa atividade é auxiliada por outra subunidade do complexo Ccr4-Not, a Caf1. Além de Ccr4 e Caf1, o complexo Ccr4-Not é composto por outras 7 subunidades, Caf40, Caf130 e outras 5 subunidades Not (Not1-Not5). A única subunidade que é essencial para a viabilidade da levedura é Not1, a plataforma do complexo Ccr4-Not (Azzouz et al., 2009).

CsRRMP1

A proteína CsRRMP1 isolada de citros no duplo-híbrido é semelhante a várias proteínas de plantas que contêm domínios RRM de reconhecimento de RNA.

A regulação da expressão gênica pós-transcricional é modulada principalmente por proteínas contendo motivos RRM. A regulação pode ser realizada por proteínas que se ligam diretamente ao RNA ou por proteínas que modulam a função de outros fatores regulatórios (Lorkovic e Barta, 2002). Proteínas que se ligam a RNA estão envolvidas na síntese, processamento, transporte, tradução e degradação do RNA, se destacando como importantes proteínas regulatórias multifuncionais (Fedoroff, 2002).

Os motivos conservados dessas proteínas identificam dois domínios: 1) não-catalíticos, que são os domínios de ligação a RNA primariamente (RBDs – RNA-binding domain), e 2) domínios catalíticos, que estão envolvidos com modificações do RNA (isomerização, tiolização e desaminação), hidrólise por ATP ou GTP (fatores de tradução, helicases de RNA e sintetases t-RNA aminoacil), ou degradação do RNA (ribonucleases).

As maiores categorias de RBDs em eucariotos, compreendem: RNA-recognition motif (RRM), double-stranded (ds)RBD e domínio K-homology (Fedoroff, 2002).

As proteínas com motivo RRM são as mais abundantes nos vertebrados superiores (de 0.5 a 1% dos genes humanos) e são as mais estudadas bioquimicamente e estruturalmente. Estudos mostraram que este domínio não está apenas envolvido no reconhecimento DNA/RNA, mas também na interação proteína-proteína (Cléry et al., 2008). Em plantas, a função da maioria das proteínas RRM não é muito conhecida, entretanto, verificou-se recentemente que a superexpressão de domínios RRM em arroz, aumentou o volume das células e afetou significativamente a morfologia das plantas (Hong et al., 2007). Esse dado é bastante interessante, pois nos remete novamente ao fato de que PthA induz crescimento celular. Além disso, é interessante notar que PthA4 aparentemente interage com a porção da

proteína CsRRMP1 que não contém os domínios RRM, ou seja, tais domínios estariam livres para interagir com RNA e executar sua função talvez relacionada à proliferação celular.

CsHAP3

O Complexo HAP, que também é conhecido como NF-Y ou CBF em animais, se liga à CCAAT-box, um dos elementos mais comuns em promotores de genes de eucariotos, e regula a expressão de genes. Este complexo consiste de três subunidades distintas: HAP2/NF-YA/CBF-B, HAP3/NF-YB/CBF-A e HAP5/NF-YC/CBF-C, todos necessários para a ligação no DNA. Cada subunidade contém um domínio conservado que é responsável pela afinidade ao DNA e interação proteína-proteína (Miyoshi et al., 2003).

Arabidopsis tem 9 genes para HAP2, 10 para HAP3 e 10 para HAP5 (Edwards et al., 1998; Gusmaroli et al., 2001, 2002). Entre eles, apenas LEC1 (LEAFY COTYLEDON1), membro da família HAP3, foi caracterizado detalhadamente. A perda de função de mutantes LEC1 causaram várias anormalidades no embrião (Meinke, 1992; West et al., 1994; Lottan et al., 1998).

Um estudo com a família HAP3 de arroz sugere que essa proteína faça parte do complexo HAP, juntamente com HAP2 e HAP5 e regule a expressão de genes através da ligação ao CCAAT-box presente na região promotora (Miyoshi et al., 2003).

Portanto, os resultados que serão apresentados a seguir, sugerem que PthA4 possa afetar a maquinaria de controle transcricional de citros interferindo com o processamento e tradução de mRNA, através de sua interação com as proteínas isoladas na tabela 3.

Ligação preferencial de PthAs pelas proteínas de citros identificadas como alvos de PthA4.

Embora o *screening* de duplo híbrido tenha sido realizado com a variante PthA4, resolvemos confirmar a interação das proteínas isoladas de citros com todas as quatro variantes de PthA.

O fato de *X. citri* possuir 4 variantes da proteína efetora PthA sugere uma vantagem evolutiva para essa bactéria, pois é possível que o número de variantes de PthA contribua para a formação de diferentes heterodímeros e que esses heterodímeros alcancem alvos diferentes dentro da célula. Ensaios de duplo-híbrido realizados por uma aluna do grupo, Mariane Domingues, revelaram que todas as variantes de PthA formam homodímeros e todas formam heterodímeros, com exceção da variante 1 e 4 que não formam heterodímeros entre si. Adicionalmente, algumas proteínas de citros que foram identificadas como alvos de PthAs 2 e 3 também interagiram com outras variantes de PthA (Domingues et al., 2010). Assim, as

proteínas isoladas com PthA4 foram testadas para interações com as quatro variantes de PthA.

A figura 7 mostra que a maioria das proteínas interagiram com outras variantes, preferencialmente com PthAs 2 e 3, além de PthA4. CsVIP2 interagiu especificamente com PthA4, enquanto CsPCBP, CsRRMP1 e CsHAP3 interagiram com PthAs 2 e 3 sob a condição mais estrigente (sem adenina).

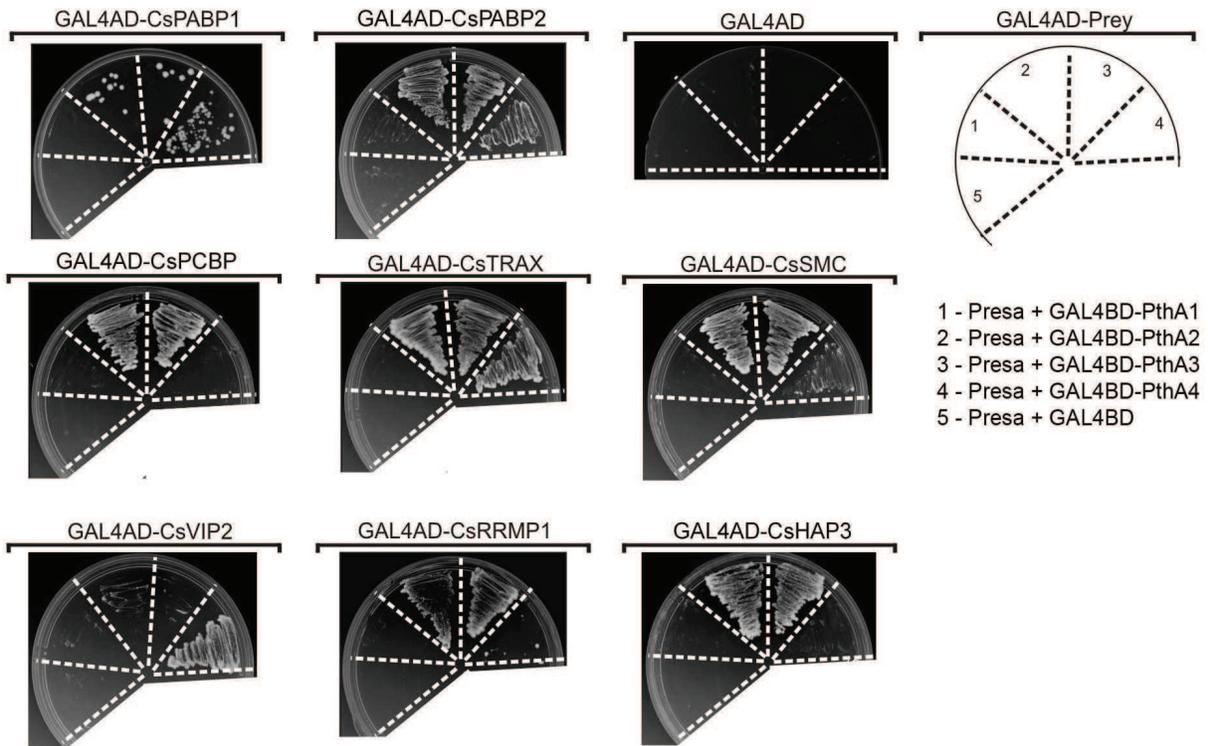


Figura 7: Interações proteína-proteína entre PthAs e proteínas nucleares de citros. As proteínas de citros (presas) fusionadas ao domínio GAL4-AD (GAL4AD-presas) ou o controle (GAL4AD) foram transformadas em leveduras contendo uma das quatro variantes de PthA fusionada ao domínio GAL4-BD, como mostra o diagrama acima (1 a 4 respectivamente). Os duplos transformantes foram crescidos em meio SC –Trp – Leu –His –Ade na presença de 5 mM de 3AT. As presas não transativaram os genes repórteres quando co-transformadas com o vetor da isca vazio. Do mesmo modo, as iscas (PthAs) não transativaram os genes repórteres quando co-transformadas com o vetor da presa vazio nas mesmas condições de crescimento.

Para confirmar as interações observadas em levedura, foram realizados ensaios de GST pull down. Para isso, as proteínas de citros isoladas foram clonadas em vetor de expressão pGEX-4T-1, expressas em *E. coli* e purificadas em resina GST. As figuras (8 a 15) mostram os

testes de purificação realizados para as proteínas recombinantes de citros e PthAs 3 e 4. De um modo geral, as proteínas recombinantes foram expressas em frações solúveis em *E. coli*, exceto CsPBPC e CsPABP2. Por essa razão, não foi possível realizar o ensaio de *pull down* com essas duas proteínas.

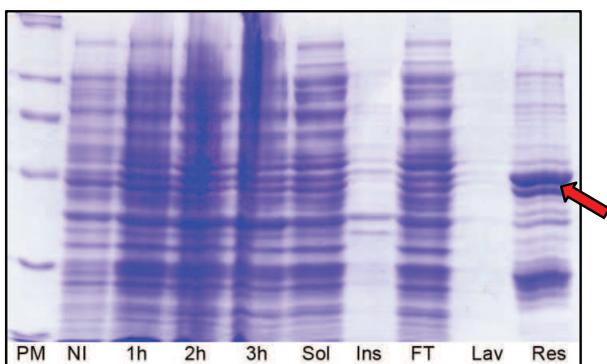


Figura 8: Expressão de CsSMC em fusão GST a 30°C e Teste de Purificação em resina GST. A seta indica a proteína CsSMC-GST com peso molecular total de 45,6 kDa.

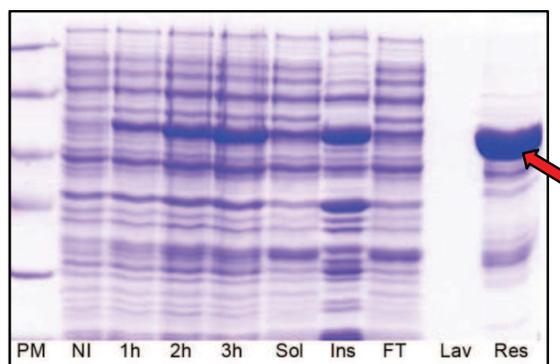


Figura 9: Expressão de CsTRAX em fusão GST a 25°C e Teste de Purificação em resina GST. A seta indica a proteína CsTRAX-GST com peso molecular total de 55 kDa.

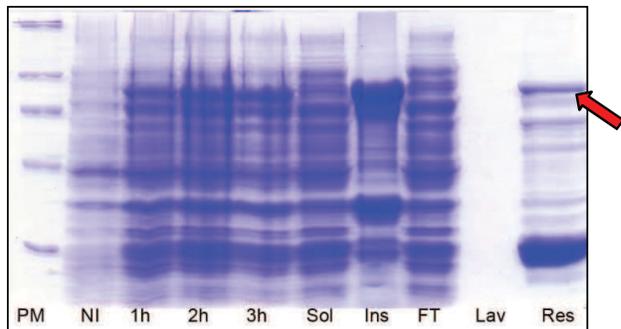


Figura 10: Expressão de CsVIP2 em fusão GST a 37°C e Teste de Purificação em resina GST. A seta indica a proteína CsVIP2-GST com peso molecular total de 85 kDa.

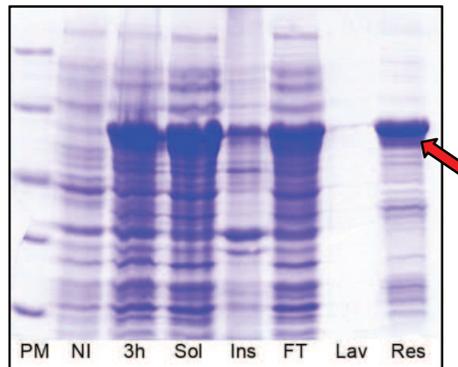


Figura 11: Expressão de CsPABP1 em fusão GST a 37°C e Teste de Purificação em resina GST. A seta indica a proteína CsPABP1-GST com peso molecular total de 53 kDa.

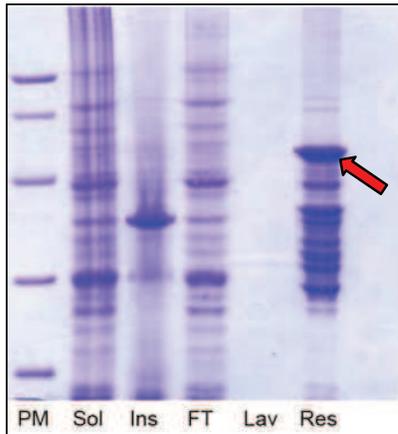


Figura 12: Teste de purificação de CsRRMP1-GST a 25°C, com peso molecular de 50 kDa.

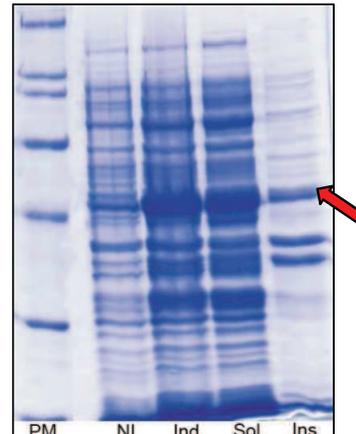


Figura 13: Expressão de CsHAP3 em fusão GST a 25 °C, com peso molecular de 46 kDa.

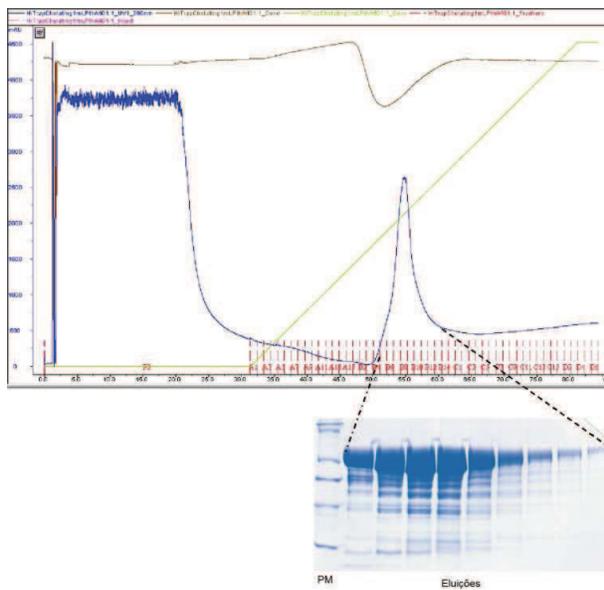


Figura 14: Purificação da proteína PthA4_6xHIS, com peso molecular de 116kDa. PM= marcador de peso molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker – Fermentas); B5 a B13= eluições da amostra.

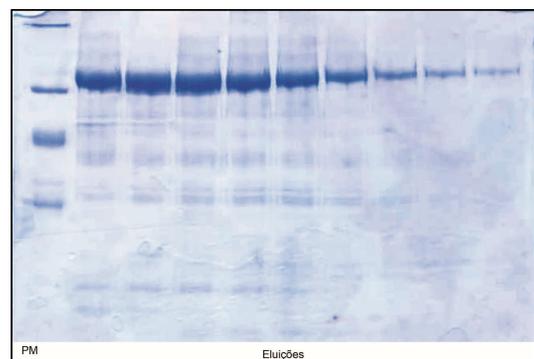


Figura 15: Purificação da proteína PthA3_6xHIS. PM = marcador de peso molecular(Unstained Protein Molecular Weight Marker – Fermentas); A10 a A18= eluições da amostra.

Legenda para as figuras de 8 a 15:

PM = Peso Molecular;
 NI = Não Induzido;
 1h, 2h, 3h = horas de indução;
 Sol = Solúvel;
 Ins =Insolúvel;
 FT = Flow through;
 Lav = Lavagem;
 Res = Resina .

O ensaio de GST *pull down* foi utilizado para confirmar as interações observadas no duplo híbrido. A figura 16 mostra que PthA3 interagiu com CSTRAX, CsSMC, CsRRMP1 e CsHAP3, enquanto PthA4 interagiu com CsPABP1 e CsVIP2, confirmando os resultados obtidos no duplo híbrido, que indicam que essas proteínas interagiram mais fortemente com essas presas.

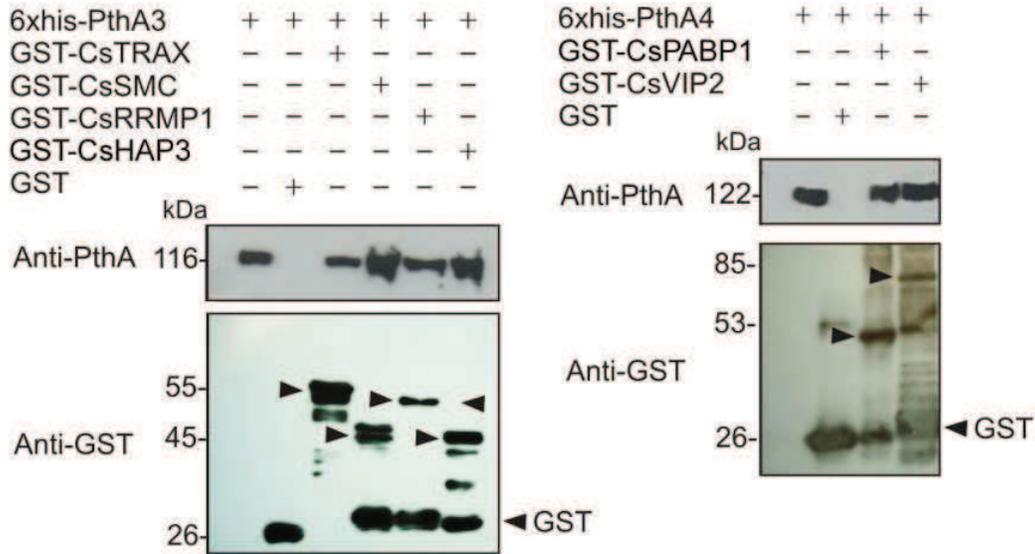


Figura 16: Detecção por Western Blot das frações eluídas do ensaio de GST pull down usando as proteínas PthA3 e PthA4 como presas e as proteínas de citros (fusionadas a GST) como iscas imobilizadas em resina GST. As setas indicam as bandas correspondentes ao tamanho esperado das proteínas fusionadas a GST: CsTRAX (~55 kDa), CsSMC (~45 kDa), CsRRMP1 (~50 kDa), CsHAP3 (~46 kDa), CsPABP1 (~53 kDa) e CsVIP2 (~85 kDa) detectadas pelo anticorpo anti-GST.

PthA4 liga-se especificamente em RNA “poly(U)” e forma complexos de alto peso molecular na presença de CsHMG.

Como citado anteriormente, o aluno Tiago Antonio de Souza contribuiu com esse trabalho caracterizando funcionalmente uma das proteínas de citros identificadas como parceiras de interação de PthA4, a CsHMG. Tiago verificou que CsHMG interage com as 4 variantes de PthA e que em ensaios de gel shift CsHMG liga-se com afinidade e especificidade à RNA “poly(U)” (de Souza et al., 2010). Além disso, Tiago observou que PthAs recombinantes expressos em *E. coli* co-purificavam com RNA (de Souza, T. A., 2010).

Desse modo, considerando que (i) CsHMG liga-se seletivamente à RNA “poly(U)”; (ii) CsHMG e PthA4 interagem com duas proteínas *poly(A)-binding* (figura 18 D); (iii) a maioria das proteínas-alvos de PthA4 possuem motivos de reconhecimento de RNA implicados em processamento e estabilização de mRNA (Tabela 3); (iv) PthAs recombinantes co-purificam

com RNA; e (v) o domínio de ligação a DNA dos PthAs é semelhante ao domínio PPR (*pentatricopeptide repeat*), presente em proteínas que reconhecem sequências ricas em U e desempenham um papel no processamento e estabilização de mRNA (Williams-Carrier et al., 2008; Pfalz et al., 2009; Prikryl et al., 2011), nós testamos se PthA4 poderia interagir com moléculas de RNA. De forma surpreendente, PthA4 inteira e seu domínio de ligação a DNA (domínio de repetições) foram capazes de se ligar de forma específica a RNA “poly(U)” em ensaios de *gel shift* (figura 17 A). Além disso, na presença de CsHMG, PthA4 forma complexos de maior peso molecular com RNA “poly(U)” (figura 17 B), sugerindo a formação de um complexo ternário.

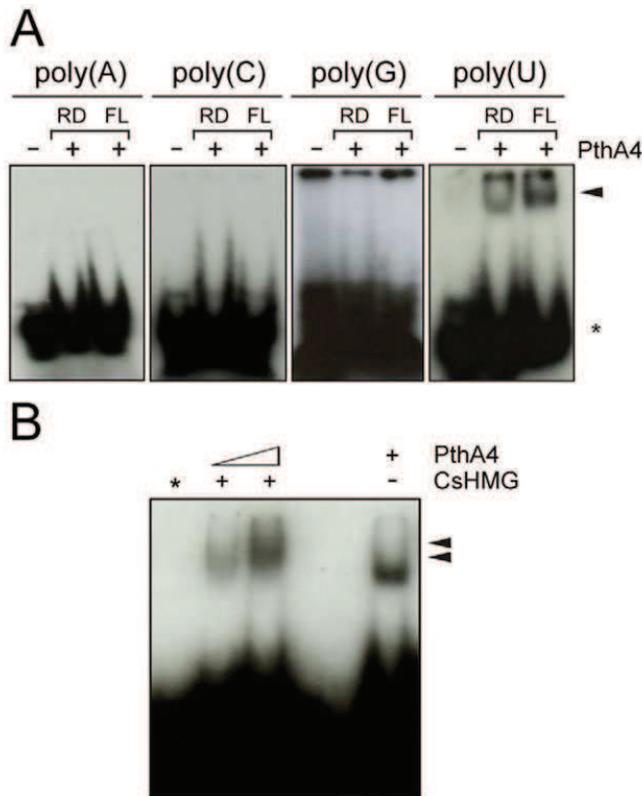


Figura 17: PthA4 e seu domínio de repetições ligam RNA “poly(U)”. A) Ensaio de EMSA usando sondas de RNA fita única marcadas com ³²P na concentração final de 12,5 nM e 100 ng de PthA4 “full length” (FL) e seu domínio interno repetitivo (RD). As bandas de shift correspondem à complexos RNA:proteína e estão indicadas pela seta, já as sondas livres estão indicadas pelo asterisco. B) Ensaio de EMSA usando sonda fita única de RNA “poly(U)” e as proteínas recombinantes PthA4 e CsHMG “full length”. PthA4 forma bandas de alto peso molecular na presença de CsHMG (setas).

As proteínas de citros interagem entre si, indicando a formação de um complexo multiproteico.

Considerando que as proteínas identificadas em citros são funcionalmente relacionadas (Tabela 3), resolvemos testar se elas poderiam interagir entre si, utilizando a técnica de duplo híbrido. De acordo com a figura 18, um número significativo de interações proteína-proteína foi

identificado, como por exemplo, CsTRAX com CsSMC, CsPABP1, CsRRMP1 e CsVIP2 (figura 18 A). Além disso, CsTRAX foi capaz de interagir com ela mesma, confirmando dados da literatura que apontam que o complexo Translina-TRAX em humanos pode ser formado a partir de um octâmero de Translina e um hexâmero de TRAX (Gupta et al., 2005).

A isca CsSMC interagiu com CsTRAX, CsPABP1, CsPABP2, CsVIP2 e com ela mesma (figura 18 B), corroborando dados da literatura que indicam que proteínas SMC formam homodímeros e heterodímeros (Hirano, 2002). CsVIP2 e CsPABP2 interagiram entre si, de maneira recíproca, e também formaram homodímeros (figura 18 C). CsVIP2 se associou com CsPCBP, enquanto CsHMG mostrou uma fraca interação com CsPABP1 e CsPABP2 (figura 18 D). Esses resultados apontam para uma rede de interações entre os alvos de PthA4 e sugerem a existência de um complexo multiproteico em citros, onde CsSMC poderia funcionar como uma proteína “hub” (figura 18 E).

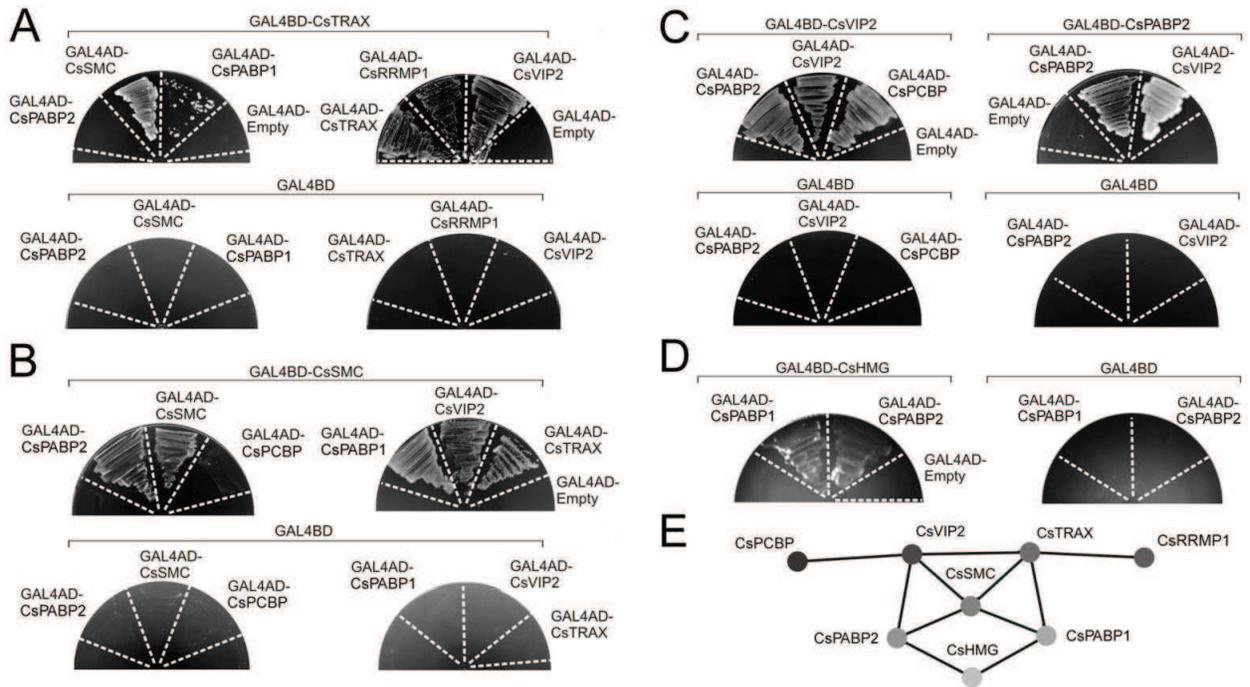


Figura 18: Células de levedura duplo transformadas com as construções presa (topo) e isca (ao redor da placa) indicadas. Crescidas em meio SC -Trp -Leu -His -Ade na presença de 5 mM de 3AT. A) Interações positivas observadas entre CsTRAX e CsSMC, CsPABP1, CsTRAX, CsRRMP1 e CsVIP2. (B) Interações positivas observadas entre CsSMC e CsPABP2, CsSMC, CsPABP1, CsVIP2 e CsTRAX, mas não entre CSMC e CsPCPB. (C) Interações de CsVIP2 com CsPCBP, interações recíprocas entre CsPABP2 e CsVIP2, e auto-interações de CsVIP2 e CsPABP2. (D) Interações fracas entre CsHMG e CsPABP2 e CsPABP1. (E) Diagrama ilustrando a rede de interações entre as proteínas de citros.

Para confirmar essas interações, e considerando que CsSMC e CsTRAX apresentaram maior número de interações proteína-proteína, extrato de células de folha de citros foi incubado com 6xHis-tag CsSMC ou CsTRAX imobilizadas em resina de cobalto. As proteínas eluídas que estavam ligadas à resina foram separadas em gel SDS PAGE e identificadas por espectrometria de massas (figura 19).

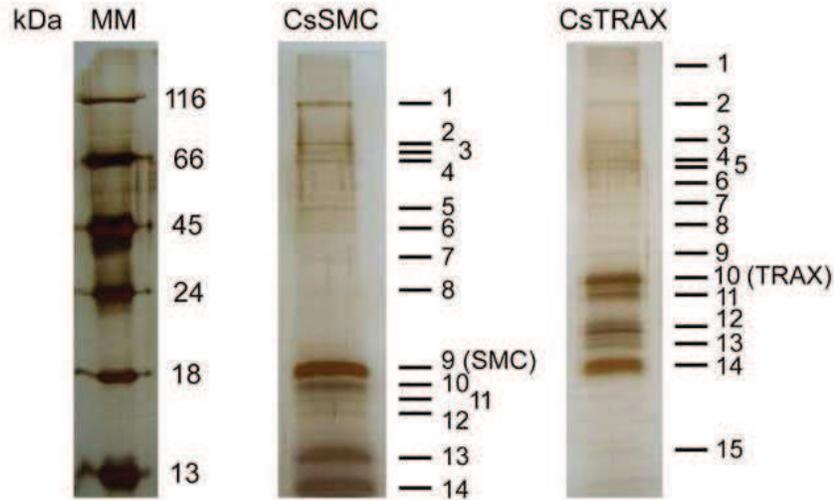


Figura 19: Gel de acrilamida SDS PAGE corado com prata com as proteínas do extrato de citros presas em resina de cobalto que carregam as proteínas recombinantes 6xHis-tag CsSMC e CsTRAX, usadas como iscas (bandas 9 e 10, respectivamente).

Consistente com os resultados do duplo híbrido, foram detectados peptídeos correspondentes à CsTRAX e à uma PABP 91% idêntica à CsPABP2 na amostra de CsSMC. De forma semelhante, foi identificado CsSMC na amostra com CsTRAX, porém o mais interessante foi encontrarmos CsMAF1 (objeto de estudo dos capítulos III e IV) e proteínas adicionais relacionadas com o controle da transcrição e da tradução, como o fator BTF3, uma proteína Argonauta (AGO1), fator de início da tradução 5a e fator de alongamento da tradução 1-alfa, como parceiras de interação de CsSMC e CsTRAX (Tabela 4).

Tabela 4: Proteínas de *Citrus sinensis* identificadas como parceiras de interação de CsSMC e CsTRAX através de espectrometria de massas.

Bandas de Proteínas	Parceiros de interação de CsSMC / CsTRAX	Número de Acesso	Sequências de peptídeos identificadas por espectrometria de massas	m/z	Carga
CsSMC					
1,4,6-10,12	CsSMC	110848831	LRAEIANSEK	565.8135	+2
			KGYAENYEHGQVMEK	594.9451	+3
			QELTGQAQMMSQDLVR	925.9453	+2
1	Argonaute 1 (AGO1)	188428433	SLYTAGPLPFLSK	697.3930	+2
			GGVGMGSGRGGHSGGPTR	828.8859	+2
2,3	HSP70	110877680	VEIANDQGNR	614.8190	+2
			NQVAMNPSNTIFDAK	825.4041	+2
			IINEPTAAAIAYGLDKK	894.5037	+2
	PABP2 homolog	94441024	VAEAMEVLR	509.2771	+2
			GMPDVSMGPVGGMLPIPYGDMAAMPLR	936.7758	+3
		55396367	NMQDFPFDMGAGGMLPVPVDMGAGIPR	962.0988	+3
5	Translation elongation factor 1 ^a	56584680	GFVASNSKDDPAR	682.3378	+2
			YYCTVIDAPGHR	726.3433	+2
			VETGVLKPGMVVTFGPGSLTTEVK	816.1167	+3
	CsMAF1	110836827	EWSETYGGSSLLETLYK	981.9786	+2
	CsTRAX	188246976	MDTMLQSVLK	583.3041	+2
			LHQLSGTALQSIK	489.6172	+3
	PABP2 homolog	63075332	NLSESTTEEDLQK	747.3532	+2
			GSGFVAFSTPEEASRALLEMNGK	1207.5867	+2
11	Translation initiation factor 5 ^a	21651392	DGFAEGK	362.1706	+2
			VVEVSTK	424.7421	+2
			DDLRLPTDENLLSQIK	624.0058	+3
13	Histone H4	188254614	TLYGFGG	714.3515	+1
			TVTAMDVVYALK	663.8570	+2
	CsCYP homolog	46214048	VVVADSGELP	493.2626	+2
	RNA-binding protein	188444131	SNGGSGGERGGR	545.7521	+2
CsTRAX					
1,9-11	CsTRAX	188291689	LHQLSGTALQSIK	733.9211	+2
			AEADLVAVKDQYISR	839.4460	+2
			DAFANYAGYLNELNEK	916.4340	+2
2	Argonaute 1 (AGO1)	55289153	QADAPQEALQVLDIVLR	940.0219	+2
			SGNILPGTVVDSK	643.8547	+2
		55288894	GQESSENSQEAFR	691.3056	+2
3	HSP70	38053102	NALENYAYNMR	679.8090	+2
			ATAGDTHLGGEDFDNR	838.3737	+2
			NAVVTVPAYFNDSQR	840.9252	+2
4	TPR-containing protein	218827114	RIPLDFLQGEK	658.3755	+2
			MLQADQVSLAEK	666.8473	+2
			SLAQYTWSSAVK	734.8757	+2
5	Ribosomal protein	188380114	YPLTDDSPMKNIIDDK	877.4249	+2
6	Nucleosome protein	188306400	LQNLAGQHSVLEK	776.4106	+2
7	Translation elongation factor 1 ^a	56584680	MDATTPK	382.1881	+2
			GFVASNSKDDPAR	682.3345	+2
			YYCTVIDAPGHR	726.3430	+2
8	Protein kinase	56534189	GALSPSTAVNFALDIAR	851.9663	+2
			GMAYLHNPNVVIHR	588.6417	+3
12	CsMAF1	110836827	INDFLDHLNLGER	778.4004	+2
			EWSETYGGSSLLETLYK	981.9799	+2
			LPECEIYSYNPDSDDPFLEK	1259.5583	+2
13	BTF3 factor	188439148	MNVEKLMNMAGALR	805.3939	+2
14	CsSMC	110848831	LTADLQVPAK	648.8824	+2
			QELTGQAQMMSQDLVR	917.9503	+2

Apesar dos dados genéticos abundantes que mostram que efetores TAL de bactérias atuam como ativadores transcricionais em células hospedeiras, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular pelo qual eles agem. O nosso grupo identificou anteriormente, proteínas de citros alvos de PthAs que compreendem CsCYP, CsTDX e o heterodímero CsUEV/CsUBC13, associadas com a maquinaria de transcrição basal afetando o reparo de DNA (Domingues et al., 2010). Portanto, os resultados desse trabalho sugerem que PthA4 pode interagir com um novo complexo nuclear multiproteico, cujos componentes estão relacionados com o remodelamento e reparo da cromatina, regulação da transcrição, estabilização/modificação de mRNA e controle da tradução (Tabelas 3 e 4).

TRAX de humanos, que possui 37% de identidade com CsTRAX, é componente do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que exibe atividade endoribonuclease (Liu et al., 2009; Ye X et al., 2011). Em levedura, TRAX se liga à proteína C1D, uma proteína do tipo SMC que é essencial para o reparo de quebras em DNA dupla fita (Chen et al., 2004; Erdemir et al., 2002a; Erdemir et al., 2002b). Além disso, a proteína humana homóloga à CsPCBP é capaz de se ligar a motivos ricos em UC dentro da região 3' não traduzida de um mRNA (Yeap et al., 2002). Assim, o suposto complexo multiproteico identificado em citros pode desempenhar um papel no reparo de DNA e em mecanismos de processamento e/ou estabilização de RNA.

Várias evidências apoiam essa idéia. Em primeiro lugar, algumas das interações proteína-proteína identificadas por duplo-híbrido, como por exemplo, CsTRAX e CsPABP2, foram confirmadas por análise de espectrometria de massas (figura 19 e Tabela 4). CsPABP1 e CsPABP2 são, respectivamente, homólogas à PABPN humana e PABPC, que participam na estabilização de mRNA e fatores do início da tradução (Lemay et al., 2010; Kahvejian et al., 2001). Notavelmente, fatores de início e alongamento da tradução, assim como o homólogo de tabaco AGO1, foram identificados como parceiros de ligação de CsSMC e CsTRAX (Tabela 4). Além disso, a proteína humana PABPN se liga à PABPC na presença de RNA e à proteínas RRM, similares a CsRRMP1 em um complexo proteico envolvido em degradação de mRNA. O mais interessante, no entanto, é que em um estudo recente, PABPC de mamíferos foi recrutado pelo complexo RISC e associado com as deadenilases CAF1/CCR4-NOT em um complexo multiproteico que regula o silenciamento gênico através da deadenilação de mRNA mediado por micro RNA (miRNA) (Fabian et al., 2009 e Huntzinger et al., 2010). Assim, considerando que TRAX é um componente do complexo RISC (Liu et al., 2009; Ye X et al., 2011), AGO1 foi encontrada associada à CsSMC e CsTRAX, e CsVIP2 é

de PthA (Domingues et al., 2010), possui um papel adicional além de promover o transporte citoplasma-núcleo. A α -importina, junto com a β -importina, interagem com o complexo “*cap-binding*” (CBC), afeta o *splicing*, a formação da região 3’ e inibe a deadenilação de mRNA (Balatsos et al., 2006; Dias et al., 2009; Dias et al., 2010; Sato e Maquat, 2009).

Finalmente, a identificação de CsSMC como um “*hub*” no interactoma com PthA4 está de acordo com dados recentes, que mostram que efetores que evoluíram independentemente convergem em “*hubs*” como alvos comuns (Mukhtar et al., 2011). Surpreendentemente, a maioria desses “*hubs*” se associam com proteínas que controlam a ligação/tradução de RNA, a transcrição/remodelamento de DNA e ubiquitinação (Mukhtar et al., 2011). Embora o homólogo de *Arabidopsis* de CsSMC não foi identificado sendo alvo de efetores de bactérias fitopatogênicas, CsSMC é relatada como uma proteína do tipo “*SKIP-interacting*”, um “*hub*” em arroz (Hou X et al., 2009). Portanto, os nossos dados sugerem que PthA interage com um complexo multiproteico envolvido em estabilização e processamento de mRNA associado com o controle da transcrição.

CAPÍTULO III: O silenciamento de CsMAF1, um regulador negativo da RNA Polimerase III e alvo de PthA4, aumenta o cancro cítrico.

1. INTRODUÇÃO

A proteína MAF1 de citros (CsMAF1) foi identificada como parceira de interação de PthA4 e como proteína associada à CsSMC e CsTRAX em extrato de células de citros, como descrito no capítulo II.

MAF1 foi originalmente descoberta em *Saccharomyces cerevisiae* como sendo o único repressor direto e global da RNA Polimerase III conhecido nesse organismo (Murawski et al., 1994). A proteína MAF1 é conservada desde leveduras a humanos (Pluta et al., 2001) e possui três domínios conservados A, B e C. Os domínios B e C contêm os motivos PDYDFS e LWSFnYFFYNKkIKR que definem os membros da família MAF1. MAF1 de levedura possui vários ortólogos em eucariotos (figura 21) e na maioria deles o segundo motivo (LWSFnYFFYNKkIKR) possui um sinal de localização nuclear funcional, assim como em *S. cerevisiae* (Moir et al., 2006).

Em leveduras, a repressão da atividade da RNA Pol III em resposta a limitação de nutrientes, estresse na parede celular, dano no DNA, estresse oxidativo e a uma variedade de tratamentos com drogas (Rapamicina e MMS) é mediada por MAF1 (Pluta, K. et al., 2001 e Upadhyya et al., 2002). Portanto, condições que causam inibição da proliferação celular ativam diferentes vias de sinalização que convergem em MAF1 e regulam sua atividade repressora. (Rollins et al., 2007). A rápida repressão da transcrição da RNA Pol III assegura a sobrevivência da célula durante o estresse (Warner, 1999).

Tanto a MAF1 humana quanto a de levedura são fosfoproteínas (Oficjalska-Pham et al., 2006 e Kantidakis et al., 2010). Em condições favoráveis ao crescimento, MAF1 é fosforilada pelas quinases PKA, CK2, Sch9 e TORC1 (Huber et al., 2009; Graczyk et al., 2011; Wei et al., 2009). Em condições de estresse, MAF1 é defosforilada pela fosfatase PP2A. A forma defosforilada de MAF1 interage com o complexo da RNA Pol III e funciona como um repressor (Moir et al., 2006). Tanto a fosforilação quanto a defosforilação de MAF1 pode ocorrer dentro do núcleo da célula. A forma fosforilada de MAF1 é exportada para o citoplasma pela exportina Msn5, porém não é simplesmente a saída de MAF1 do núcleo que determina a regulação apropriada da RNA Pol III (Towpik et al., 2008).

Vários estudos confirmaram que MAF1 é um regulador negativo da RNA Pol III, pois sua inativação em leveduras e em mamíferos resulta em níveis elevados de tRNA (Pluta et al., 2001; Upadhyya et al., 2002; Johnson et al., 2007).

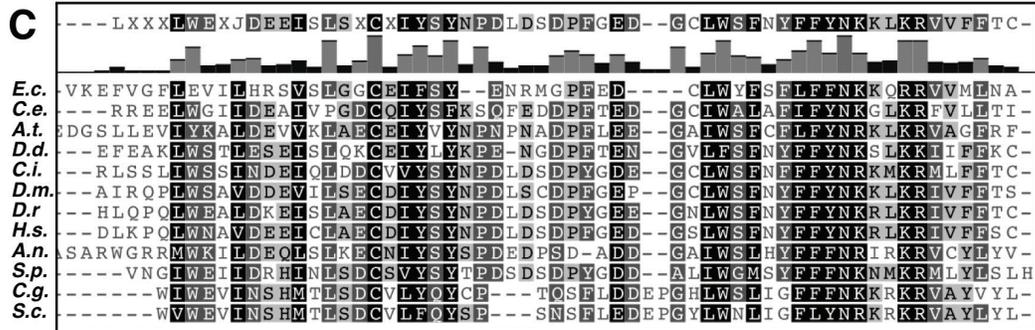
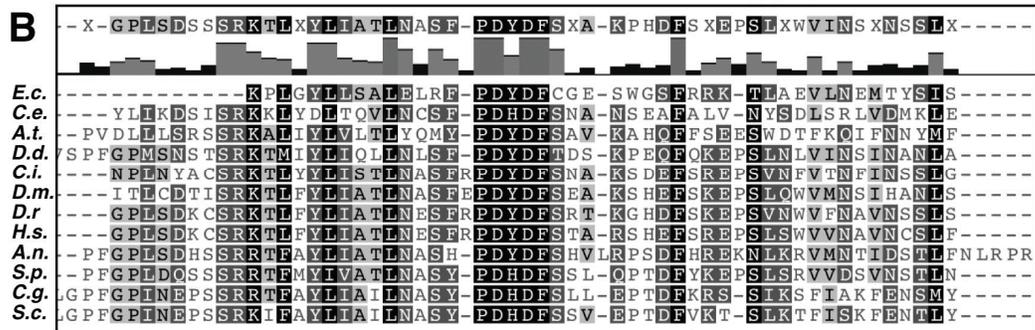
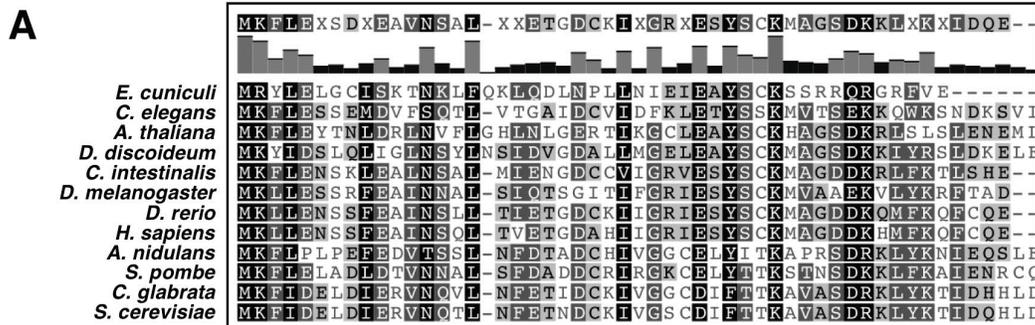
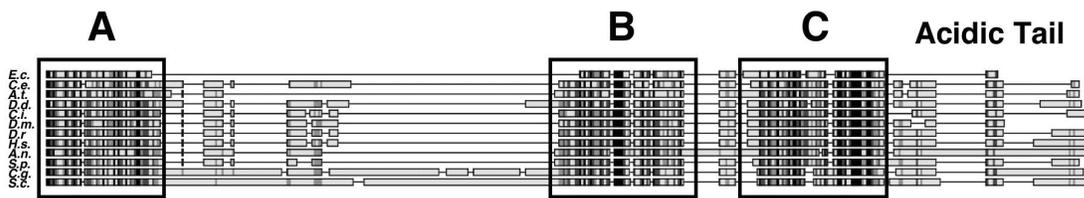


Figura 21: Representação esquemática dos domínios dos ortólogos de MAF1. As letras A, B e C, representam os respectivos domínios em destaque. As espécies representadas no alinhamento das seqüências de MAF1 são: *Encephalitozoon cuniculi*, 161 aa; *Caenorhabditis elegans*, 245 aa; *Arabidopsis thaliana*, 224 aa; *Dictyostelium discoideum*, 278 aa; *Ciona intestinalis*, 233 aa; *Drosophila melanogaster*, 226 aa; *Danio rerio*, 247 aa; *Homo sapiens*, 256 aa; *Aspergillus nidulans*, 314 aa; *Schizosaccharomyces pombe*, 238 aa; *Candida glabrata*, 391 aa; e *Saccharomyces cerevisiae*, 395 aa. Extraído de Gajda et al., 2010.

A RNA Polimerase III (RNA Pol III) transcreve genes que codificam pequenos RNAs não traduzidos, como tRNAs e 5S rRNA, os RNAs U6 e H1, envolvidos em processamento de mRNA e tRNA, respectivamente, e o RNA 7SL, componente do complexo ribonucleoproteico SRP, além de pequenos RNAs regulatórios (White, 2004). Os genes alvos da RNA Pol III são essenciais em todas as células e estão envolvidos em processos fundamentais, como biogênese de ribossomos e proteínas, processamento de RNA e transporte de proteínas. A transcrição da RNA Pol III é altamente co-regulada com a atividade da RNA Pol I, as quais juntas respondem por mais de 80% da transcrição de genes nucleares das células em crescimento (Grummt, 2003; Paule e White, 2000; Willis et al., 2004).

Em humanos, a falta de regulação na transcrição da RNA Pol I e III é característica marcante de muitas células cancerígenas e, portanto, este fenômeno tornou-se alvo de pesquisas importantes nos últimos anos. Uma grande variedade de células transformadas mostrou uma superexpressão de produtos da RNA Pol I e III, incluindo linhagens de células transformadas por DNA e RNA de vírus tumorais e carcinógenos químicos (White, 2004), além de tumores *in situ*, verificados em ovários, mama, pulmão e carcinomas de língua (Winter et al, 2000; Chen et al., 1997), ou seja, a superexpressão de transcritos da RNA Pol I e III é vantajoso para o desenvolvimento do câncer (Marshall e White, 2008). Isso indica um papel crítico de RNA Pol III na tumorigênese. MAF1, como um repressor da transcrição da RNA Pol III, caracteriza-se, portanto, como um potencial supressor tumoral (White, 2005).

Estudos recentes em leveduras mostram que o tratamento com rapamicina (droga imunossupressora) leva a uma localização de MAF1 do núcleo para o nucléolo, onde o gene do 5S rRNA está localizado. O complexo TORC1, composto por Kog1, Lst8, Tor1 ou Tor2, atua como um passo essencial para a atividade de MAF1 no núcleo. Diante de condições normais de crescimento, TORC1 está ativo e fosforila MAF1, inativando-a e excluindo-a do nucléolo. O tratamento com rapamicina leva à inativação do complexo TORC1 e assim, a ativação da proteína MAF1 defosforilada (Wei et al., 2009). Na forma defosforilada, MAF1 se liga à RNA Pol III bloqueando sua interação com o fator TFIIIB ou interage com a subunidade Brf1 do fator TFIIIB, impedindo a montagem do complexo, e desse modo, prejudicando o recrutamento da RNA Pol III aos promotores alvos (Desai et al., 2005; Moir et al., 2006; Roberts et al., 2006).

Resultados similares têm sido obtidos em células humanas, onde fatores adicionais (ex.: p53, RB e c-Myc) também regulam a atividade da RNA Pol III. Igualmente, MAF1 humana atua como um repressor da RNA Pol III *in vivo* e *in vitro* (Goodfellow et al., 2008; Rollins et al., 2007; Reina et al., 2006) e sua atividade também é dependente da sua fosforilação.

Portanto, considerando que isolamos uma proteína de citros homóloga à MAF1 humana interagindo com PthA4, elaboramos uma hipótese na qual PthA poderia deslocar MAF1 da

interação com a RNA Pol III, restabelecendo a biogênese normal de ribossomos e tRNAs contribuindo assim para o desenvolvimento de hiperplasia e hipertrofia celular. Essa hipótese é consistente com análises de microarranjos realizadas por nosso grupo, que mostram que *X. citri* ativa a transcrição de um conjunto de genes associados à biogênese de ribossomos (Cernadas *et. al.*, 2008). De forma semelhante, a expressão transiente de PthA em citros induz a transcrição de várias proteínas ribossomais (Pereira & Benedetti, dados não publicados). Além disso, um trabalho recente publicado por nosso grupo (Domingues *et al.*, 2012) revela que PthA pode ativar a transcrição através da modulação da atividade do complexo CsCyp/Tdx/Uev/Ubc13 associado ao CTD da RNA Pol II de citros, fornecendo fortes evidências de que efetores TAL atuam como ativadores da transcrição através da sua interação com fatores da maquinaria de transcrição basal da célula hospedeira.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a interação de CsMAF1 com PthA4 através de *pull down*;
- Mapear a região de interação de PthA4 com CsMAF1 através de duplo híbrido;
- Confirmar a interação de CsMAF1 com a RNA Polimerase III através de *pull down*;
- Complementar a cepa de levedura mutante *maf1* Δ (YI3945) com CsMAF1 e confirmar o papel de repressor da RNA Pol III de CsMAF1;
- Realizar silenciamento e superexpressão do gene *maf1* de *Citrus* e verificar as alterações na expressão gênica de genes alvos da RNA Pol III através de PCR em tempo real.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUBCLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE CsMAF1 RECOMBINANTE

EM *E. coli*

3.1.1 CsMAF1 em pGEX-4T-1 e pET28a

O cDNA de CsMAF1 foi removido do vetor pOAD com as enzimas de restrição Sall/NotI e subclonado nos vetores de expressão pGEX-4T-1 e pET28a para a expressão da proteína em *E. coli*. A metodologia de subclonagem e expressão desse clone é a mesma descrita no item 3.3.1 do capítulo II.

3.1.2 Expressão de CsMAF1 em pET28a para a produção de anticorpos

A construção pET28a-CsMAF1 previamente transformada na cepa BL21(DE3) por choque-térmico, foi expressa em 3 L de meio LB Kana (50 µg/mL) na temperatura de 30°C, sob agitação de 200 rpm. A cultura foi crescida até atingir a fase logarítmica – OD (optical density) a 600nm entre 0.6 e 0.8 unidades de absorvância e a síntese da proteína recombinante foi induzida por 3 horas com adição de 0.4 mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo, análogo da lactose). Para a purificação da proteína recombinante, foi realizada a lise das células utilizando-se tampão Tris (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 15 mM Imidazol, 20% Glicerol, 1 mM PMSF) + lisozima (1 mg/mL) + Nonidet p40 (0,5%) + Rnase (20 mg/mL) e sonicação (15 pulsos de 20s), a fim de aumentar a eficiência da lise. O extrato foi então centrifugado à 4°C por 1 hora a 14000 rpm e filtrado com filtro de 0,45 µm para prosseguir com a cromatografia de afinidade utilizando-se a coluna Hitrap Chelating HP, 1 mL (GE) no sistema de FPLC ou a purificação por afinidade usando a resina TALON (Clontech) na bancada. Em seguida, a proteína foi dialisada em tampão Tris (20 mM Tris-HCl pH 8). A concentração final da proteína foi determinada pela absorvância a 280 nm usando-se o coeficiente de extinção molar obtido no site Exspasy (<http://us.expasy.org/>) e esta foi enviada para a produção de anticorpos policlonais em ratos.

3.2 ENSAIO DE GST PULL-DOWN

A construção pGEX-4T-1_CsMAF1 (em fusão com GST) foi expressa em 100 mL de meio LB+Amp (100 µg/mL) na temperatura de 30°C, sob agitação de 200 rpm. A proteína recombinante foi ressuspensa em 1 mL de tampão de lise (PBS 1X pH 7,4; 1 mM de DTT) e 300 µL de lisozima 10 mg/ml, lisada através de sonicação e a fração solúvel obtida foi incubada com 50 µL de resina “*Glutathione Sepharose 4 Fast Flow*” (Amersham Bioscience), previamente equilibrada com tampão de ligação (igual ao de lise), por 1 hora e 30 minutos sob

leve agitação a 4°C. Após o período de incubação, a resina foi lavada com tampão de ligação (30 volumes de coluna), para remoção de amostra não ligada. Em seguida, esta resina foi incubada com 1 mL PthA4-6XHis previamente expressa e purificada por afinidade em resina NiNTA ou com 1 mL de extrato solúvel de células HEK 293 previamente lisadas com tampão de lise (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 %, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, Na₃SO₄ 2 mM, NaF 50 mM, pH 7,4) ao qual foi adicionado, imediatamente antes de usar, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, e 10 µM, benzamidina 20 µg/ml, e pepstatina 25 µg/ml). A incubação foi realizada por 2 horas sob leve agitação a 4°C ou a 16 horas sob leve agitação a 4°C. As amostras foram centrifugadas e a resina lavada com tampão de ligação (40 volumes de coluna). As proteínas ligadas à resina foram eluídas com tampão de amostra SDS sendo fervidas por 15 minutos a 95 °C e fracionadas em gel SDS-PAGE 10% para coloração com corante *Coomassie blue* e visualização por Western blot. Como controle negativo, foi realizado o mesmo procedimento para a proteína GST sozinha presa à resina e incubada com PthA4-6xHis purificada ou com extrato de células HEK 293.

3.3 WESTERN BLOT

A análise por Western Blot foi realizada a partir do gel de acrilamida 10% que continham as proteínas eluídas do *pull down*. As proteínas purificadas, separadas no gel, foram transferidas para membrana de PVDF (difluoreto de polivinila) em tampão de transferência (48 mM de Tris-base, 39 mM de glicina, 0,037% de SDS e 20% de metanol). A transferência foi realizada a 160 mA por 1 hora. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado em 1X TBS+Tween) por 1 hora. Logo em seguida, a membrana oriunda do *pull down* de CsMAF1 com PthA4 foi incubada com o anticorpo primário Anti-PthA (diluição 1:5000) ou Anti-GST (1:3000) em solução bloqueadora e a membrana proveniente do *pull down* de CsMAF1 com extrato de células HEK 293 foi incubada com o anticorpo primário Anti-Pol III (diluição 1:500 – C39-2 Santa Cruz) ou Anti-GST (1:3000) em solução bloqueadora. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes (de 10 minutos sob leve agitação) em solução TBS (20mM de Tris-base; 150mM de NaCl, pH 7,5) e incubadas com anticorpos secundários *anti-rabbit* (1:3000), para anti-PthA ou anti-mouse (1:3000), para anti-GST e anti-Pol III (ECL Kit – Amersham Biosciences), por 1 hora. As membranas foram novamente lavadas três vezes de 10 minutos em solução TBS. A detecção foi feita utilizando-se o método de quimioluminescência do Kit ECL (Amersham Biosciences).

3.4 ENSAIO DE DUPLO- HÍBRIDO

3.4.1 Mapeamento da interação de PthA4 com CsMAF1

Para mapear o domínio de interação de PthA4 com CsMAF1 foram utilizadas construções previamente disponíveis em nosso laboratório. As construções utilizadas clonadas no vetor pOBD (iscas) foram: PthA4 (PthA4 sem uma porção do N-terminal), PthA-ID4 (Domínio interno de 17,5 repetições do PthA4), PthA-5,5 (Domínio interno de 5,5 repetições de PthA4 e região C-terminal) e PthA-LRR (apenas região do *Leucine Rich Repeat*).

3.4.2 Transformação de leveduras competentes de *S. cerevisiae*

A metodologia desse experimento é a mesma descrita no item 3.2.1 do capítulo II.

3.4.3 Ativação de genes repórteres ADE2 e HIS3

A metodologia desse experimento é a mesma descrita no item 3.2.2 do capítulo II.

3.5 ENSAIO DE COMPLEMENTAÇÃO DE MUTANTE EM LEVEDURA

3.5.1 Clonagem de MAF1 em vetor pYEX 4T-1

Para realizar o ensaio de complementação de mutante em levedura, foi necessário clonar o gene da proteína CsMAF1 no vetor de expressão de levedura pYEX 4T-1 (Clontech). Esse vetor utiliza o promotor *CUP1* induzível por Cu^{2+} para promover a expressão do gene fusionado (Macreadie *et al.*, 1989). Possui marcadores seletivos para os genes *leu2-d* e *URA3* e é altamente eficiente na expressão da proteína GST (Glutathione S-transferase) em leveduras.

O plasmídeo pOAD-CsMAF1 foi digerido com as enzimas de restrição Sall e NotI, assim como o vetor pYEX 4T-1 vazio. O fragmento liberado na primeira digestão correspondia à ORF inteira de CsMAF1 e foi inserido, através de reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), no vetor também digerido com as mesmas enzimas, e então transformados em *E. coli DH5 α* competentes por choque térmico. As colônias transformantes foram selecionadas por PCR de colônia usando *primers* específicos para o vetor pYEX. Os clones transformantes foram então confirmados por sequenciamento de DNA. Em seguida, a cultura foi crescida em meio líquido LB+Amp e o plasmídeo foi purificado por *miniprep* (kit Plasmid Maxi Kit - Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Após a confirmação da clonagem, o plasmídeo foi usado para transformar células de levedura da cepa *S. cerevisiae* Y13945 (*maf1* Δ). Essa cepa possui o seguinte genótipo: MAT α , *his3*- Δ 1, *leu2*- Δ 0, *lys2*- Δ 0, *ura3*- Δ 0 e *maf1* Δ . Além disso, foi utilizado também o plasmídeo pYEX-PthA4, já disponível em nosso laboratório, para transformar a cepa mutante de levedura Y13945 (*maf1* Δ) previamente

transformada com pYEX-CsMAF1 e viabilizar a expressão tanto de PthA4 como de CsMAF1 na mesma cepa de levedura.

3.5.2 Transformação de pYEX-CsMAF1 e pYEX-PthA4 em levedura *S. cerevisiae* maf1Δ

A cepa Y13945 (maf1Δ) foi gentilmente cedida pela Dra. Magdalena Boguta e usada para o ensaio de complementação de mutante (Kwapiz et al. 2002). A transformação desta linhagem baseou-se no protocolo descrito por Gietz & Woods (2002). Primeiramente, a levedura foi estriada em meio YPD sólido (extrato de levedura 1%; peptona 2%; D-glicose 2%; Bacto-ágar 2%) e incubada por 48 horas em estufa 30°C. Foi preparado um inóculo contendo a levedura mutante (maf1Δ) em meio YPD líquido incubados por 16 horas a 30°C em *shaker* com 200 rpm. As células foram centrifugadas por 1 minuto a 14000 rpm. Ao *pellet* foi adicionado um Mix de transformação contendo 240 µL PEG 3350 50% w/v; 36 µL LiAc 1 M; 50 µL ssDNA de esperma de salmão (2 mg/mL) fervido por 5 minutos e resfriado em banho de gelo; 5 µL de plasmídeo pYEX-CsMAF1 e/ou pYEX-PthA4 e água Mili-Q autoclavada para completar o volume final de 360µL. As células foram ressuspensas com esse Mix, submetidas à choque térmico à 42°C por 2 horas e novamente centrifugadas. O *pellet* foi ressuspensado em 300 µL de água, então, alíquotas de 100 µL foram usadas para plaquear em meio sólido SC +Ade +His -Leu -Ura (0,66% base nitrogenada sem aminoácidos; 2% glicose; 0,008% adenina; 0,008% histidina; 2% Bacto-ágar) e incubadas em estufa a 30 °C por 4 dias.

3.5.3 Expressão de CsMAF1 e PthA4 em levedura

Colônias de levedura Y13945 (maf1Δ) transformadas com o plasmídeo pYEX-CsMAF1 ou pYEX-CsMAF1 + pYEX-PthA4 e colônias do tipo selvagem (BY4742) foram coletadas para fazer um pré-inóculo em meio líquido SC +Ade +His -Leu -Ura e incubados a 30°C em *shaker* a 200 rpm por 16 horas. Depois desse período, 1 ml desses inóculos foram adicionados em mais 100mL de meio SC +Ade +His -Leu -Ura e incubados em *shaker* a 200 rpm a 30°C por mais 16 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 550xg por 5 minutos, ressuspensas novamente em 50 mL de meio SC +Ade +His -Leu -Ura e incubadas novamente a 30°C até atingir a fase logarítmica- OD (*optical density*) a 600nm entre 0,8 e 1,2 unidades de absorbância. Após essa condição, as células de levedura pYEX-CsMAF1 e pYEX-CsMAF1 + pYEX-PthA4 foram induzidas à síntese da proteína recombinante pela adição de 0,5 mM de sulfato de cobre (CuSO₄) por 1 hora. Após esse período, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos à 4°C. Durante a expressão dessas leveduras,

foram coletadas alíquotas das células não induzidas e induzidas por cobre para avaliação em gel de poliácridamida (10%) SDS-PAGE e, posteriormente por Western blot.

3.5.4. Western blot para confirmar a expressão de CsMAF1 e PthA4 em levedura

A metodologia desse experimento é a mesma descrita no item 3.5 do capítulo II.

3.5.5 Extração de RNA de levedura

Os pellets provenientes da expressão das leveduras Y13945 (*maf1Δ*) transformadas com os plasmídeos pYEX-CsMAF1 e pYEX-CsMAF1 + pYEX-PthA4 e do tipo selvagem (BY4742) foram ressuspensos em 8 mL de tampão PBS 1X (Phosphate-buffered saline – 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄, em água DEPC [Dimetil Pirocarbonato]) mas apenas 4 mL foram usados na extração de RNA. A essa suspensão foi adicionado 1 mL de lyticase (20 µg/µL) e incubada por 20 minutos. Em seguida, a suspensão foi levada ao banho de ultra som por 30 minutos. Para isolar o RNA total das células, foi utilizado 6 mL de TRIzol® Reagent e as células foram homogeneizadas por 10 segundos e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Em sequência, foi adicionado 2 mL de clorofórmio, homogeneização das células e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. As células foram então, centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos a 8°C e a fase aquosa transferida para outro tubo de centrifuga. Esse passo de adição de clorofórmio, homogeneização das células e centrifugação foi repetido pelos menos 3 vezes até a fase aquosa se tornar límpida. Às amostras, foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1) e misturadas vigorosamente por 10 segundos. A fase aquosa foi novamente transferida para outro tubo e foi acrescentado 3 mL de álcool isopropílico, homogeneizado e incubado 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 8°C. O sobrenadante foi removido com cuidado e o *pellet* de RNA lavado com 6 mL de etanol 70% gelado. O *pellet* foi centrifugado novamente e após secar por 1 hora à temperatura ambiente, foi ressuspensado com 50 µL de água DEPC.

O RNA obtido foi analisado pela presença das bandas correspondentes ao rRNA 25S e 18S em eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v), preparado em tampão MOPS 10X, formaldeído e brometo de etídeo, conduzida sob voltagem constante (70 V) (Sambrook, et al., 1989) e pelo Bioanalyzer Agilent 2100 expert(www.agilent.com).

3.5.6 Northern Blot

Os RNAs extraídos das leveduras foram utilizados para a análise de Northern Blot. A concentração do RNA total de cada levedura (WT, MAF1Δ, MAF1Δ + pYEX-CsMAF e MAF1Δ

+ pYEX-CsMAF + pYEX-PthA4) foi ajustado para possuírem a mesma intensidade no gel de agarose 1,2 % (p/v) contendo formaldeído (2,2 M) e transferido por capilaridade para uma membrana de nylon positivamente carregada (HybondTMN+, Amersham Biosciences), em tampão 10 x SSPE (NaCl 1,8 M / NaHPO₄.2H₂O 50 mM / NaH₂PO₄.H₂O 50 mM / EDTA pH 8,0 10 mM) por 17 horas (Sambrook, et al., 1989). O RNA foi permanentemente fixado à membrana por exposição à radiação UV. A membrana foi pré-hibridizada com a solução 20 x SSPE (NaCl 3,6 M; NaHPO₄.2H₂O 100 mM; NaH₂PO₄.H₂O 100 mM; EDTA pH 8,0 20 mM) por 1 hora a 37 °C. O RNA foi hibridizado a 37°C por 16 horas na mesma solução com a sonda de oligonucleotídeos marcada com [γ -³²P] ATP e T4 polinucleotídeo quinase. A sonda usada foi: 5' GCCATCTCCTAGAATCGAACCAGG- 3' complementar a tRNA^{His}. Depois da hibridização, a membrana foi lavada uma vez com solução 2 x SSC (cloreto de sódio 0,3 M e citrato de sódio 0,03 M) contendo 0,1 % SDS (p/v) por 10 minutos a 37°C. Após lavagem, um filme de autoradiografia foi posicionado sobre a membrana hibridizada e este foi mantido na ausência de luz no interior de um cassete a -70 °C. O tempo de exposição foi de 4 dias (Sambrook, et al., 1989) e após esse período, o filme foi revelado manualmente em câmara escura por meio da seguinte sequência de lavagens: 4 minutos em solução reveladora (Kodak), 1 minuto em água destilada, 4 minutos em solução fixadora (Kodak), seguida de lavagem em água corrente.

3.6 SUPEREXPRESSION E SILENCIAMENTO DE PROTEÍNAS DE CITROS

Com o objetivo de obter plantas com silenciamento e superexpressão para os genes *maf1*, *trax* e *vip2*, oligonucleotídeos específicos (Tabela 5) foram construídos a partir das sequências desses genes para dar início à clonagem no vetor pHANNIBAL (CSIRO – figura 22). Esse vetor é constituído por um promotor para expressão constitutiva, 35S do vírus *Cauliflower mosaic virus* (CMV), um íntron com função de auxiliar na formação do *hairpin*, e por um terminador OCS da *Agrobacterium tumefaciens*. Nas regiões entre promotor e íntron, bem como entre íntron e terminador, existem dois sítios de clonagem distintos o que possibilita a inserção do mesmo fragmento do gene a ser silenciado em orientação senso e antisenso, com o íntron intercalando estas sequências reverso complementares.

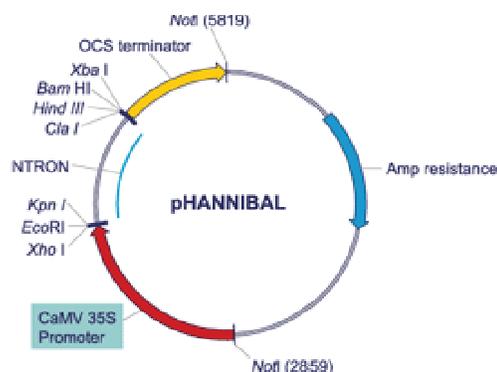


Figura 22: Vetor de clonagem pHANNIBAL (CSIRO).

BamHI, mesmas enzimas que foram adicionados à extremidade 5' dos *primers forward* e *reverse* respectivamente. Depois de digerido, esse fragmento foi subclonado no vetor pHANNIBAL com as mesmas enzimas de restrição acima, ocorrendo a perda do íntron, e digerido novamente com a enzima NotI para a liberação do cassete: CaMV35S Promoter – MAF1 – Terminador OCS (figura 24). Esse cassete foi subclonado no vetor pBlueScript II SK (+/-) com a enzima NotI. Na sequência, o fragmento desejado foi liberado após digestão por PstI e SacI e subclonado no vetor binário pCambia 1303 com as mesmas enzimas.

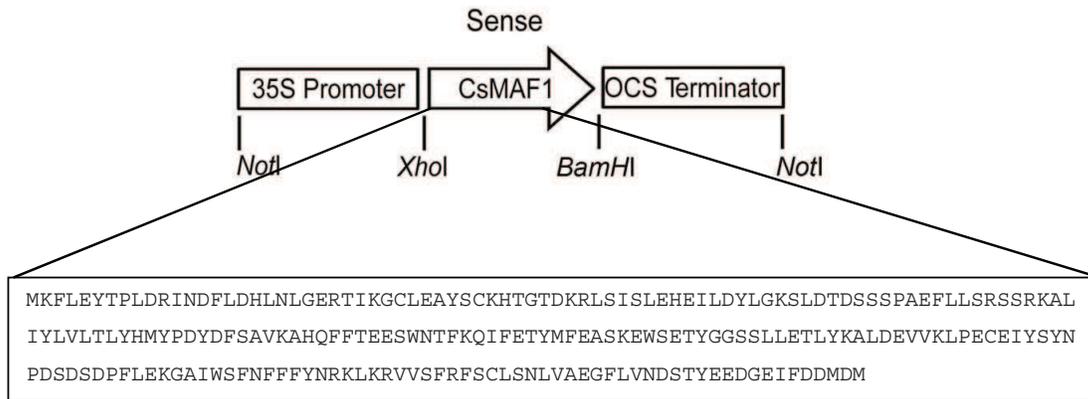


Figura 24: Vetor pHANNIBAL com a construção para a superexpressão de CsMAF1.

3.6.2 Clonagem de CsTRAX para silenciamento e superexpressão

Foi realizado o mesmo procedimento acima para a clonagem de CsTRAX no vetor de silenciamento pHANNIBAL, inclusive foram utilizados os mesmos sítios das enzimas de restrição de CsMAF1: KpnI/XbaI (sense) e XhoI/ClaI (antisense) que foram adicionados à extremidade 5' dos *primers forward* e *reverse*, respectivamente (Tabela 5). Como molde para a reação de PCR foi usado o plasmídeo pOAD-CsTRAX.

O fragmento para a construção da superexpressão de CsTRAX foi obtido através de PCR, utilizando os oligonucleotídeos Trax_HindIII-F e Trax_XhoI-R e usando como molde o plasmídeo pOAD-CsTRAX. Em seguida, foi clonado no vetor pGEM-T-Easy e digerido com essas mesmas enzimas de restrição que reconhecem os sítios de restrição HindIII e XhoI que foram adicionados à extremidade 5' dos *primers forward* e *reverse* respectivamente. Depois de digerido, esse fragmento foi subclonado no vetor pHANNIBAL com as mesmas enzimas de restrição acima e digerido novamente com a enzima NotI para a liberação do cassete: CaMV35S Promoter – TRAX – Terminador OCS. Esse cassete foi subclonado no vetor pFastBac Htb (Invitrogen) com a mesma enzima NotI. Na sequência, o fragmento desejado foi liberado após digestão por EcoRI e HindIII e subclonado no vetor binário pCambia 1303.

3.6.3 Clonagem de CsVIP2 para silenciamento

Foi realizado o mesmo procedimento acima para a clonagem de CsVIP2 no vetor de silenciamento pHANNIBAL, inclusive foram utilizados os mesmos sítios das enzimas de restrição de CsMAF1 e CsTRAX: KpnI/XbaI (sense) e XhoI/ClaI (antisense) que foram adicionados à extremidade 5' dos *primers forward* e *reverse*, respectivamente. Como molde para a reação de PCR foi usado o plasmídeo pOAD-CsVIP2. As subclonagens subsequentes nos vetores pGEM-T-Easy, pHANNIBAL e pCambia 1303 seguiu a mesma estratégia usada para CsTRAX.

A clonagem da superexpressão de CsVIP2 de citros não pôde ser realizada devido a essa proteína não estar completa, ou seja, não possuir a ORF inteira.

Tabela 5: *Primers* utilizados nas clonagens de silenciamento e superexpressão dos genes de citros.

Gene	Sequência
CsMAF - RNAi	5' TCTAGACTCGAGTAGACCGCATCAATGATTTCTTGG 3'(F) 5' ATCGATGGTACCATTGACTAGAAATCCCTCCGCCACC 3'(R)
CsMAF - Superexpressão	5' CTCGAGATGAAGTTCTTAGAATACACTC 3'(F) 5' GGATCCTCACATGTCCATGTCATCAAATATTTCTC 3' (R)
CsTRAX - RNAi	5'TCTAGACTCGAGCATAGCCAAAAGGCCGAGG 3' (F) 5'ATCGATGGTACCAATTGCCAACCGCATCAG 3'(R)
CsTRAX - Superexpressão	5' CTCGAGATGGCTTCCAAATCCAAAACCC 3'(F) 5' AAGCTTTCATGACTGCATGTCAGGCAC 3'(R)
CsVIP2 - RNAi	5' TCTAGACTCGAGTTGGTGGATCTATTCCGGGG 3'(F) 5' AAGCTTTCATGACTGCATGTCAGGCAC 3'(R)

3.6.4 Transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

O vetor binário obtido através das clonagens descritas acima foi transformado em células competentes de *A. tumefaciens* EHA 105, já disponíveis em nosso laboratório. Para eletroporação, foram utilizadas cubetas de 0,2 cm de espessura contendo 40 µL de células descongeladas e 1 µL de DNA plasmidial diluído. A eletroporação ocorreu nas condições de 2.500 volts, 25 mFD de capacitância e 200 OHM's (Gene Pulser da BIO-RAD). Logo após a transformação, foi adicionado 1 mL de meio YEP às células e estas ficaram sob agitação a 150 rpm por 3 horas a 28°C. As células foram centrifugadas a 9000xg por 30 segundos e ressuspensas em 100 µL de meio YEP. Foram plaqueados 10 µL de células em meio YEP contendo estreptomicina 100 mg/L e higromicina 5 mg/ml. As placas foram incubadas por três dias a 28°C. Em seguida, colônias de *Agrobacterium* transformadas foram selecionadas para a extração do DNA plasmidial e PCR para confirmação da clonagem.

3.6.5 Transformação genética de citros mediado por *A. tumefaciens*

Sementes de laranja doce “*Hamlin*” obtidas no Centro APTA Citros Sylvio Moreira / IAC, foram lavadas em água corrente e secas por 24 horas em temperatura ambiente, em seguida, foram retirados os seus tegumentos externos e desinfestadas em álcool a 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) e Tween-20 a 0,1% (v/v) por 15 minutos. Após esse período, foram lavadas três vezes em água Mili-Q estéril e incubadas *in vitro* em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura para germinação, contendo metade da concentração dos minerais nutrientes do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), consistindo de 100 mg/L de mio-inositol, 25 g/L de sacarose e 6,5 g/L de Agar Merck.

As sementes foram incubadas à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, em ausência de luz, por um período de quatro semanas e mais 2 semanas com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, estando prontas para a retirada de explantes para os experimentos de transformação genética, que consistiu do corte de segmentos de epicótilo (1 cm) de comprimento. A preparação do inóculo de *Agrobacterium* consistiu da retirada de colônia isolada cultivada em meio YEP suplementado com os antibióticos para seleção da bactéria, por 48 horas, a 28°C e inoculada em 50 mL de meio YEP líquido suplementado com os antibióticos higromicina (0,5 mg/ml) e rifampicina (50 mg/L) e incubada sob agitação a 200 rpm, 28°C , por 16 horas. A suspensão bacteriana foi quantificada em espectrofotômetro (600 nm), ajustada para a concentração de $10^8,5 \times 10^8$ ufc/mL, centrifugada a 3500 rpm, à temperatura ambiente, por 5 minutos e o precipitado foi ressuscitado em meio de cultura MS líquido (Murashige & Skoog, 1962).

Os explantes provenientes de segmentos de epicótilo (1 cm) derivados de sementes germinadas *in vitro* foram cortados transversalmente e incubados na suspensão bacteriana por 15 minutos à uma concentração de $10^8,5 \times 10^8$ ufc/mL e os explantes inoculados foram secos em papel de filtro para a retirada do excesso de *Agrobacterium*. Em seguida, os explantes foram co-cultivados por 2 dias a 27°C em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) semi sólido acrescido de 100 μM de acetoseringona (Sigma-Aldrich). Após o período de co-cultivo os explantes foram transferidos para meio seletivo de indução de gemas e brotos, suplementados com BAP, higromicina e Timentin® e repicados a cada duas semanas.

As brotações de laranja doce “*Hamlin*” foram enxertadas em porta-enxerto de limão cravo, transferidas para o meio MS acrescido de 1 mg/L de ANA e aclimatadas em sala de crescimento por 30 dias e após esse período transferidas para a casa de vegetação.

3.6.6 Extração de proteínas totais de citros e análise por Western blot

As plantas contendo as construções de silenciamento e superexpressão foram transferidas para a casa de vegetação. Cerca de 1 mg de folha de cada planta foi coletada para extração de proteínas totais e confirmação do silenciamento através de Western blot. As folhas coletadas foram maceradas em tampão de amostra 2X SDS-PAGE com corante azul de bromofenol (100 mM DTT, 2% SDS, 10% glicerol e 50 mM Tris-HCl pH 6,8) e as amostras aquecidas a 95°C por 15 minutos. Proteínas na fração solúvel e insolúvel foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente, resolvidas em gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE corados com *Coomassie blue* e detectadas por Western blot com o anticorpo anti-MAF.

3.7 PCR EM TEMPO REAL

3.7.1 Desenho de oligonucleotídeos para reação de qRT-PCR

Os níveis de expressão dos seguintes genes de *Citrus sinensis* foram analisados usando PCR quantitativo: tRNA^{His}, tRNA^{Thr} e tRNA^{Leu}. Os oligonucleotídeos correspondentes a esses genes foram desenhados utilizando o software Primer Express 3.0 (Life Technologies). Ver Tabela 6.

Tabela 6: Óligonucleotídeos dos genes de tRNAs usados como sondas para o PCR em tempo real.

Genes	Sequências
tRNA ^{His}	F – 5'GTGGCTGTAGTTTAGTGGT 3' R – 5' GTGGCTGCTGGGATTTCGAGC 3'
tRNA ^{Leu}	F – 5'GTCAGGATGGCCGAGTGGT 3' R – 5' GTCAGAAGTGGGATTTGAAC 3'
tRNA ^{Thr}	F – 5' GCTCTCGTAGCTCAGTTGG 3' R – 5' GCTCTCGTTGAGAGTCAAC 3'
Suc-1	F – 5' GCCCAATCGCTGCTCTCA 3' R – 5' CATATGACGCTGTAGTGGTTG 3'
IF	F – 5' CCACCGCTTTCATCTCTTC 3' R – GTCGATCGTTGAGAGTCGTTGCTAC 3'

3.7.2 Extração de RNA de tecido vegetal e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de folhas jovens de laranja doce (*Hamlin*) silenciadas ou parcialmente silenciadas para a o gene da proteína CsMAF1. As folhas foram congeladas e maceradas em nitrogênio líquido e em seguida, o RNA total foi extraído com o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA total extraído foi aferida por eletroforese em gel de agarose 1% desnaturante, com MOPS 1X (MOPS 20 mM; Acetato de Sódio 5 mM; EDTA 1 mM pH 7.0 em água DEPC 0,1%) e formaldeído 5%. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (Sambrook; Russell,

2001), por medida da absorbância da amostra, diluída em água DEPC 0,1%, nos comprimentos de onda 260 e 280nm.

3.7.3 Síntese de cDNA

O RNA quantificado foi tratado com DNase I (Fermentas) seguindo as recomendações do fabricante e em seguida foi realizada a síntese de fita simples de cDNA utilizando The Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) partindo de aproximadamente 2,5 µg de RNA total.

3.7.4 qRT – PCR e análise dos dados

A reação de qRT – PCR foi realizada em plataforma 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando diluições específicas do cDNA produzido para avaliar a quantidade necessária para detecção dos transcritos. O qRT – PCR foi realizado com Maxima® SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) com a adição do cDNA de interesse e dos oligonucleotídeos para cada gene analisado. Foram utilizados dois genes endógenos (Suc-1 e IF) como normalizadores da reação. As reações para quantificação do nível de expressão relativa de cada gene foram conduzidas em triplicatas biológicas e duplicatas técnicas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação de PthA4 com CsMAF1 requer o domínio central e C-terminal íntegros de PthA4.

Com o objetivo de mapear a região de interação de CsMAF1 com a proteína efetora PthA, foram utilizadas várias construções de PthA4 nos ensaios de duplo híbrido. As construções estão representadas na figura 25 e incluem: A) todas as variantes de PthA (1 ao 4, a partir do resíduo 128), B) pOBD-PthA4 (a partir do resíduo 128) e pOBD-PthA-ID4 (apenas domínio central de PthA4 com 17,5 repetições), C) pOBD-PthA-LRR (apenas região do domínio "Leucine Rich Repeat"), pOBD-PthA-5,5 (uma construção contendo as últimas 5,5 repetições do domínio central seguido da região C-terminal). O domínio N-terminal inteiro de PthA4 que compreende do resíduo 1 a 288 não pôde ser usado nos ensaios de duplo híbrido pois transativou os genes repórteres na levedura. Dessa forma, de acordo com os dados de duplo híbrido, podemos concluir que a interação de PthA4 com CsMAF1 requer a presença dos domínios central e C-terminal juntos.

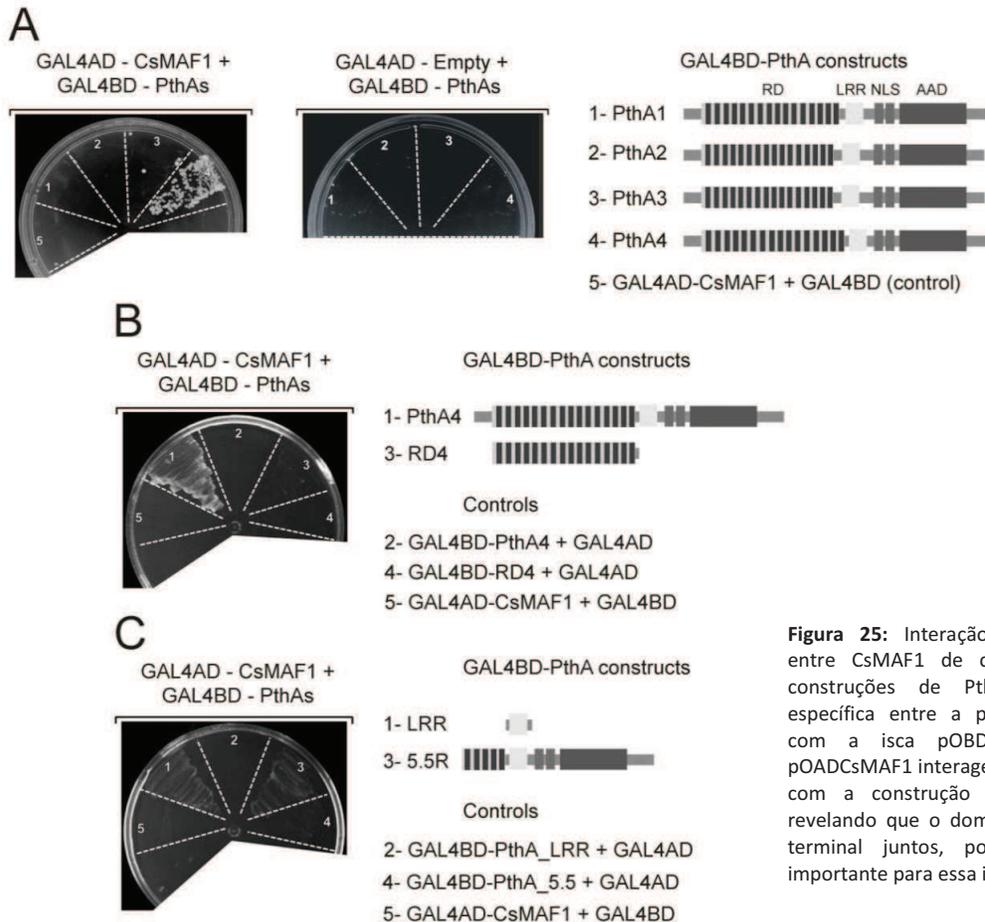


Figura 25: Interação proteína-proteína entre CsMAF1 de citros e diferentes construções de PthA. A) Interação específica entre a presa pOADCsMAF1 com a isca pOBD-PthA4. B e C) pOADCsMAF1 interage preferencialmente com a construção inteira de PthA4, revelando que o domínio central e o C-terminal juntos, possuem um papel importante para essa interação.

A sequência de 160 aminoácidos do domínio N-terminal de PthA possui um domínio ribonucleotídeo difosfato redutase (RNR). Proteínas ribonucleotídeo redutases catalisam a redução de ribonucleotídeos difosfato para desoxiribonucleotídeos difosfato (dNTPs), precursores essenciais da síntese de DNA. Além de proteínas RNR estarem envolvidas em reconhecimento de ribonucleotídeos, elas são cruciais para a rápida multiplicação celular e se tornam alvos para drogas anticâncer e antivirais (Xu et al., 2006). Ainda não sabemos a relevância biológica de PthA conter um domínio RNR, entretanto, cabe ressaltar que algumas proteínas de citros identificadas como alvos de PthA4 (Tabela 3) possuem domínios associados à ligação de RNA.

Com o objetivo de confirmar a interação de CsMAF1 com PthA4 *in vitro*, realizamos um ensaio de *pull down* imobilizando em resina de GST o extrato de CsMAF1 recombinante (em fusão GST) e incubando, em seguida, a proteína PthA4 (com cauda de histidina) purificada (figura 26). A proteína GST sozinha foi usada como controle negativo imobilizada em resina GST e incubada com PthA4 da mesma forma.

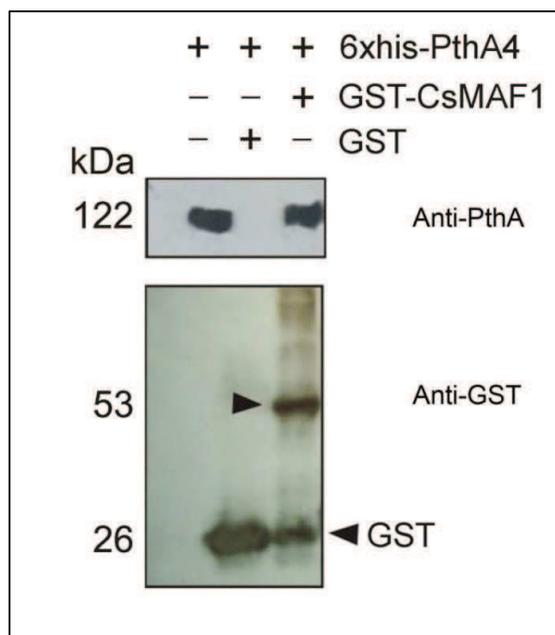


Figura 26: Western blot, com os anticorpos Anti-GST e Anti-PthA, confirmando a interação *in vitro* da proteína CsMAF1 com PthA4. A seta em preto sinaliza a proteína GST sozinha e a proteína CsMAF1 em fusão GST.

CsMAF1 interage com a RNA Pol III de células HEK 293.

Boguta e colaboradores mostraram pela primeira vez que a proteína MAF1 de levedura interagia com a subunidade maior da RNA Pol III (Rpc160 ou C160) através de um *screening* genético (Boguta et al., 1997). A MAF1 de humanos também interage com componentes da maquinaria de transcrição da Pol III que incluem a subunidade maior C160 e as subunidades Brf1 e Brf2 do complexo TFIIB, necessárias para a transcrição dos genes de tRNAs e dos RNAs U6, 7SK e H1, respectivamente (Reina et al., 2006; Rollins et al., 2007; Goodfellow et al., 2008).

Recentemente, Vannini e colaboradores, determinaram a estrutura tridimensional da MAF1 humana e do complexo de repressão Pol III-MAF1, corroborando dados anteriores do grupo. No modelo proposto, MAF1 humana interage com a subunidade C160 da RNA Pol III no seu domínio “clamp”, promovendo um rearranjo do subcomplexo C82/34/31, que é necessário para o início da transcrição. Dessa forma, MAF1 inibe a ligação da RNA Pol III ao complexo TBP-Brf1-promotor (Vannini et al., 2010). Portanto, com o objetivo de demonstrar a conservação da via de repressão da RNA Pol III através da MAF1, resolvemos testar se a CsMAF1 era capaz de interagir com a RNA Pol III através de ensaio de *pull down*. Devido à dificuldade de se obter anticorpos da RNA Pol III de citros e à facilidade de manuseio e acesso às células de mamíferos em nosso laboratório, resolvemos utilizar nesse ensaio o anticorpo anti-Pol III de humanos e extrato de células HEK 293. Além disso, análises de BLAST revelaram que a subunidade maior da RNA Pol III de humanos (C160) possui cerca de 50% de identidade com a subunidade equivalente da RNA Pol III de *Citrus sinensis* (figura 27).

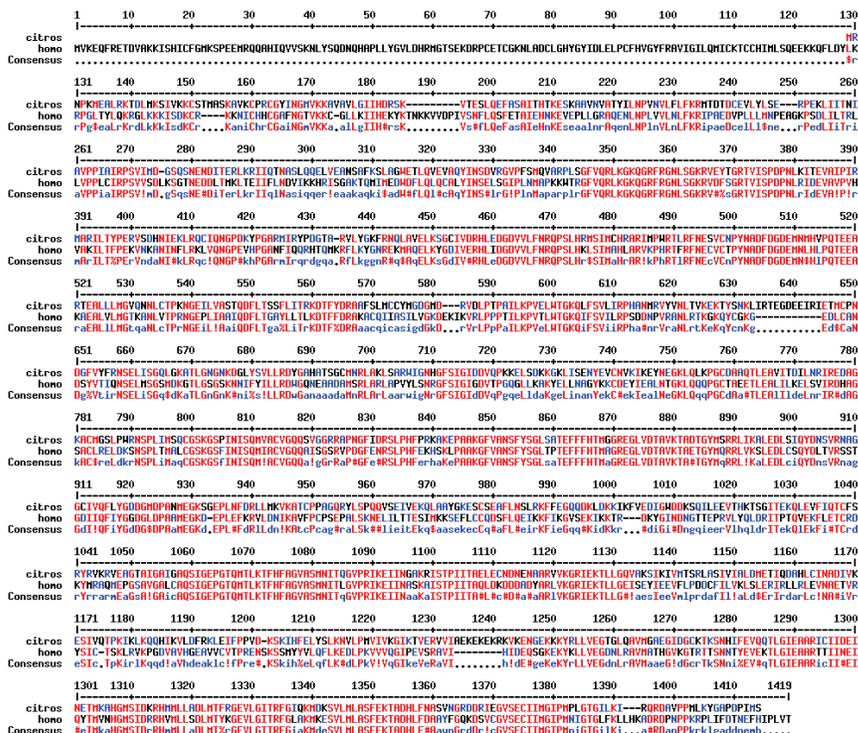


Figura 27: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da subunidade maior da RNA Pol III de citros e humanos. Ambas compartilham cerca de 50% de identidade.

Para tanto, a proteína CsMAF1 recombinante (em fusão GST) foi imobilizada em resina GST e incubada com extrato de células HEK 293. O mesmo procedimento foi realizado com a proteína GST sozinha, utilizada como controle negativo. A figura 28 mostra que CsMAF1 interage com a RNA Pol III de células HEK 293 em ensaio de GST-Pull down.

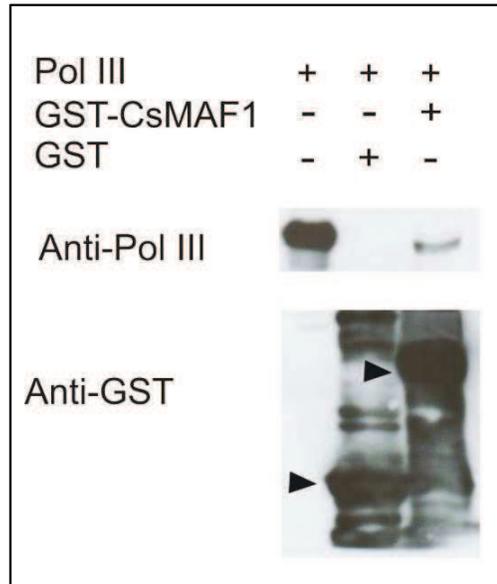


Figura 28: Western-blot, com os anticorpos Anti-GST e Anti-Pol III, confirmando a interação da proteína CsMAF1 com RNA Pol III de células HEK 293. As setas sinalizam a proteína GST (26 kDa) e CsMAF1 em fusão GST (53 kDa).

MAF1 de citros complementa fenótipo de mutante *maf1* de levedura.

A cepa de levedura mutante *maf1-Δ* (Y13945), produz um aumento no nível de tRNA na célula, devido à inativação do regulador negativo da RNA Pol III, a proteína MAF1 (Kwapisz *et al.*, 2002). Com o objetivo de confirmar se CsMAF1 de citros pertence realmente à família das MAF1 e possui a mesma função de regulador negativo da RNA Pol III de levedura, a construção pYEX 4T-1- CsMAF1 foi expressa em células da levedura mutante *maf1-Δ*.

De acordo com o Western blot anti-GST e anti-MAF1, apresentado na figura 29, CsMAF1 foi expressa na cepa mutante de levedura na porção solúvel sob indução por CuSO_4 (canaleta 4).

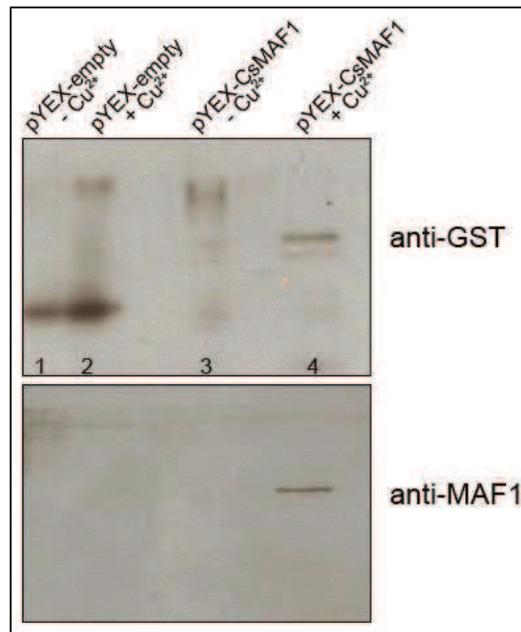


Figura 29: Western blot anti-GST e anti-MAF1 mostrando a expressão de CsMAF1 em levedura. 1) vetor pYEX-vazio não induzido; 2) vetor pYEX-vazio induzido por Cu^{2+} ; 3) pYEX-CsMAF1 não induzido e 4) pYEX-CsMAF1 induzido por Cu^{2+} .

O Northern blot, representado na figura 30, mostra que a cepa selvagem (WT) exibe uma transcrição normal de tRNA^{His} , enquanto a cepa mutante (*maf1*), apresenta transcrição significativamente aumentada desse tRNA e de 5S rRNA, pois a proteína MAF1 está ausente. A canaleta 3, que contém o mutante *maf1* complementado com a proteína CsMAF1 induzida por Cu^{2+} , revela uma severa contenção da transcrição de tRNA^{His} , confirmando que CsMAF1 de citros é capaz de complementar o fenótipo da cepa mutante de levedura. A canaleta 4 mostra o mutante complementado com CsMAF1 mas sem a indução por Cu^{2+} , confirmando a eficiência do promotor *CUP1* induzível por Cu^{2+} do vetor pYEX-4T-1.

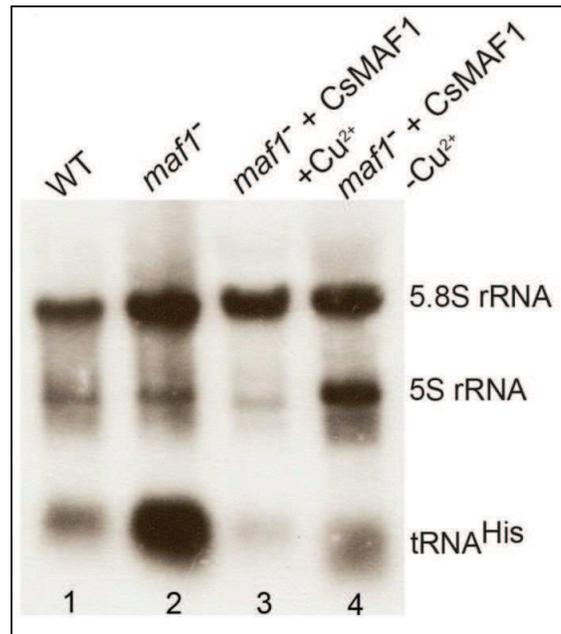


Figura 30: Northern blot mostrando a transcrição de tRNA^{His} nas cepas de levedura. A canaleta 2 mostra um nível maior de tRNA^{His} transcrito pela cepa mutante. A canaleta 3, mostra que a MAF1 de citros é capaz de complementar a função de repressor da RNA Pol III. 1) Wild type; 2) maf1Δ; 3) pYEX-CsMAF1 induzido por Cu²⁺; 4) pYEX-CsMAF1 não induzido.

Com o objetivo de compreender o papel da interação de PthA4 com CsMAF1, transformamos a cepa mutante de levedura complementada com CsMAF1 com o plasmídeo pYEX-PthA4.

Na figura 31, é possível notar, assim como na figura 30, que a cepa mutante complementada com CsMAF1 (canaleta 3) reprime a transcrição exacerbada de tRNA^{His}. Quando expressamos PthA4 nessa cepa (canaleta 4 da figura 31), ocorre um restabelecimento da transcrição de tRNA^{His} e de 5S rRNA. Portanto, uma vez que PthA regula um certo número genes envolvidos na biogênese de ribossomos, acreditamos que ele possa deslocar CsMAF1 do complexo com a RNA Pol III, permitindo, desse modo, que a transcrição de genes alvos da RNA Pol III (5S RNA e tRNAs) seja retomada, contribuindo para o aumento da proliferação celular que é a característica marcante do cancro cítrico.

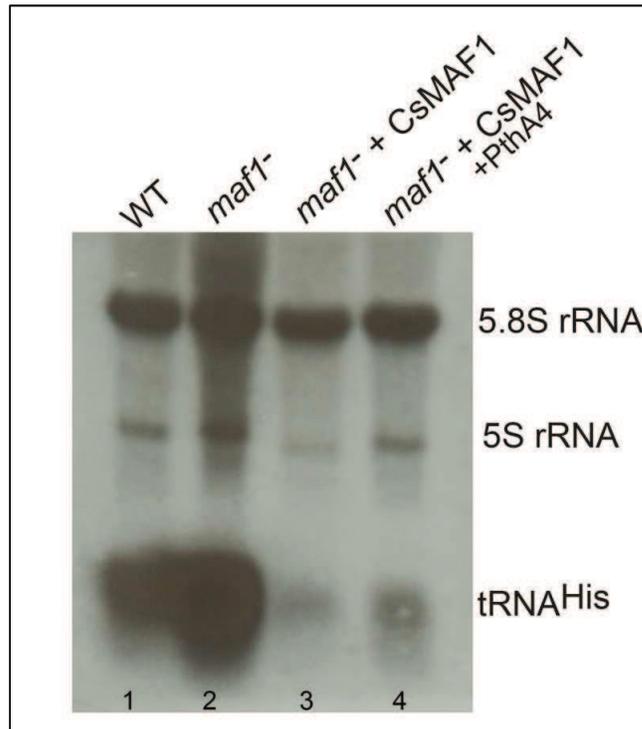


Figura 31: Northern blot mostrando a transcrição de tRNA^{His} nas cepas de levedura. A canaleta 2 mostra um nível maior de tRNA^{His} transcrito pela cepa mutante. A canaleta 3, mostra que a MAF1 de citros é capaz de complementar a função de repressor da RNA Pol III. A canaleta 4 mostra a cepa complementada com CsMAF1 e transformada com PthA4, indicando que a presença de PthA4 retoma a transcrição de tRNA.

O silenciamento do gene *maf1* de citros aumenta as lesões do cancro cítrico.

Com o objetivo de estudar a função da proteína CsMAF1 em citros e seu papel no desenvolvimento do cancro cítrico, a variedade de laranja doce “Hamlin” foi transformada com as construções para o silenciamento e superexpressão do gene *maf1*.

Os explantes de laranja doce da variedade “Hamlin”, transformados via *A. tumefaciens* com os vetores binários, foram transferidos para meio seletivo e foram repicados a cada três semanas, no entanto, após 90 dias, os explantes transgênicos regenerados não tiveram crescimento vigoroso e alguns apresentavam sinais de amarelamento nas folhas (figura 32 A). Por esse motivo, realizamos microenxertias em porta enxerto “Troyer” a fim de tentar minimizar o efeito do crescimento pouco vigoroso em meio ágar. A microenxertia pode ser vista na figura 32 B.

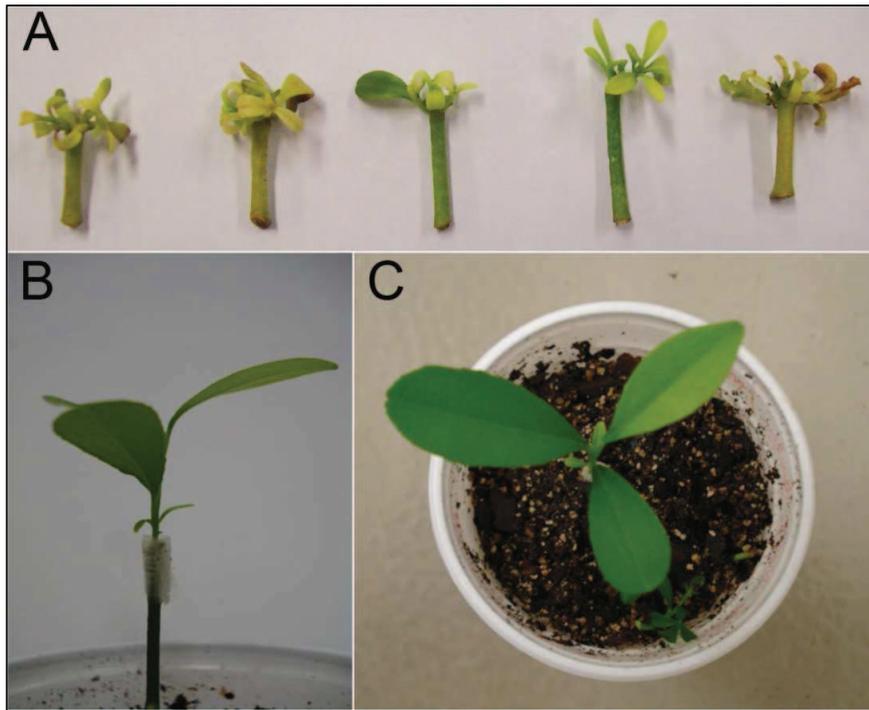


Figura 32: A) Epicótilos transformados e regenerados em meio ágar, mas com sinais de amarelamento. B) Microenxertia com porta enxerto “Troyer”. C) Crescimento das plantas microenxertadas.

Observou-se um rápido crescimento das plantas após a aplicação dessa técnica (figura 32 C). Em seguida, as plantas transgênicas foram transferidas para a casa de vegetação para mais um período de crescimento. Depois de dois meses na casa de vegetação, algumas folhas das plantas transgênicas que possuíam a construção para o silenciamento do gene *maf1* foram coletadas para a quantificação dos níveis de expressão dessa proteína através de Western blot. A transformação genética em citros com a construção para a superexpressão de CsMAF1 foi posterior à do silenciamento e por isso não foi possível ainda realizar as análises de expressão gênica nessas plantas.

As plantas transgênicas que carregavam a construção de silenciamento tiveram seus níveis de expressão de CsMAF1 analisados por Western blot usando-se o anticorpo anti-CsMAF1. Como pode ser visto na figura 33 A, a quantidade de proteína carregada no gel de acrilamida usado no *Western blot* foi equilibrada de acordo com a coloração com “*Coomassie Brilliant Blue*” das bandas correspondentes à subunidade maior da proteína Rubisco (RBCL). Podemos observar que o antisoro anti-CsMAF1 detectou duas bandas majoritárias nas amostras de proteínas de folhas da planta selvagem (figura 33 A).

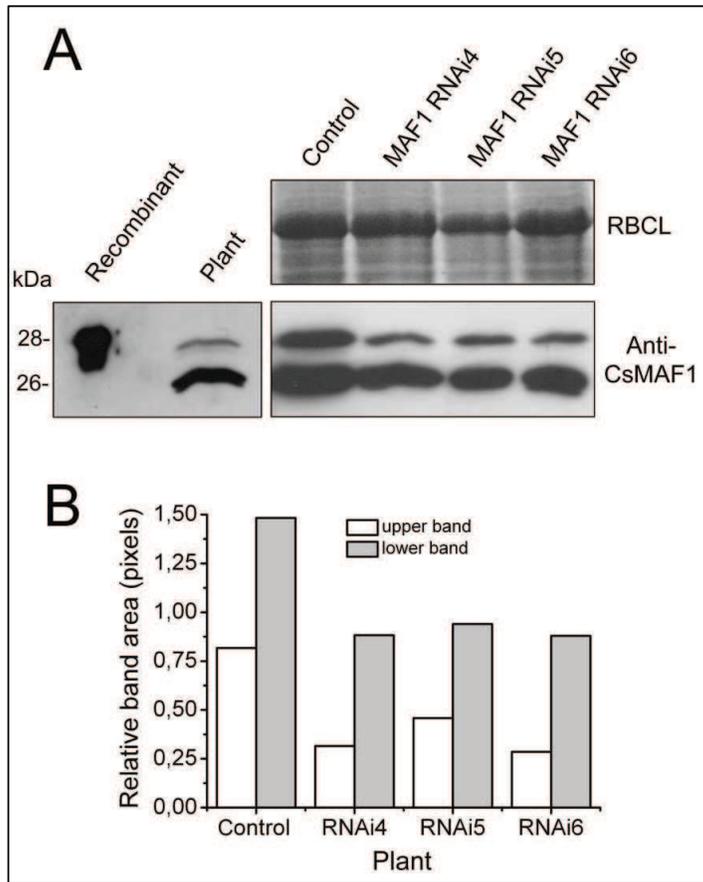


Figura 33: A) Western blot anti-MAF1 mostrando os níveis de expressão da proteína CsMAF1 endógena em plantas RNAi. A quantidade de proteínas carregadas no gel foi controlada pela coloração das bandas correspondentes à subunidade maior da proteína Rubisco (RBCL). B) O gráfico mostra a medida da área relativa de cada banda de CsMAF1 das plantas silenciadas em relação à planta controle.

De acordo com a figura 33 A, a banda superior com cerca de 28 kDa corresponde à forma fosforilada de CsMAF1, enquanto a banda inferior, com cerca de 26 kDa corresponde à forma não fosforilada da proteína. Essa questão sobre a fosforilação de CsMAF1 será abordada mais profundamente no capítulo IV. O gráfico da figura 33 B apresenta a medida da área relativa de cada banda da proteína CsMAF1 nas plantas silenciadas (RNAi4, RNAi5 e RNAi6) em relação à planta controle (não transformada).

É possível observar que as bandas de 28 kDa nas plantas silenciadas apresentam cerca de 50% de redução em relação ao controle, enquanto as bandas inferiores tiveram uma redução de 45% em relação ao controle.

Após a confirmação da diminuição da expressão de CsMAF1 nas plantas RNAi por Western blot, a técnica de qRT-PCR foi utilizada com o objetivo de analisar as variações na expressão de genes alvos da RNA Pol III, neste caso, tRNAs.

Os cDNAs provenientes das amostras de RNA de folhas dessas plantas RNAi (figura 34), inclusive do controle (planta não transformada), foram analisados por qRT-PCR para verificar a quantidade de transcritos dos genes escolhidos.

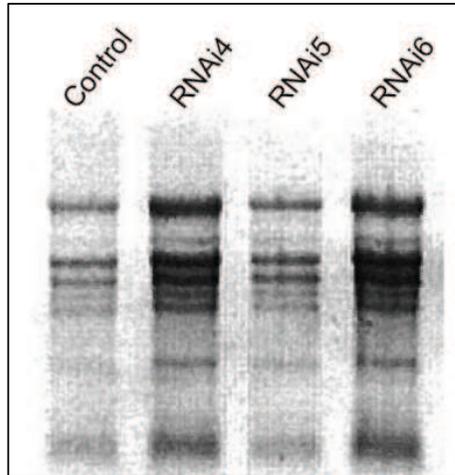


Figura 34: Gel de agarose não desnaturante usado para confirmar a qualidade do RNA total extraído das folhas das plantas silenciadas.

Os genes escolhidos foram: tRNA^{His}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Thr} e como controle endógeno, dois genes constitutivos: Suc-1 (succinato desidrogenase) e IF (initiation factor). As sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados na reação de PCR em tempo real podem ser visualizadas na tabela 6.

De acordo com os gráficos obtidos a partir do qRT-PCR (figura 35), todos os genes tRNAs analisados apresentaram um aumento significativo nas plantas RNAi em relação ao controle (planta não transformada).

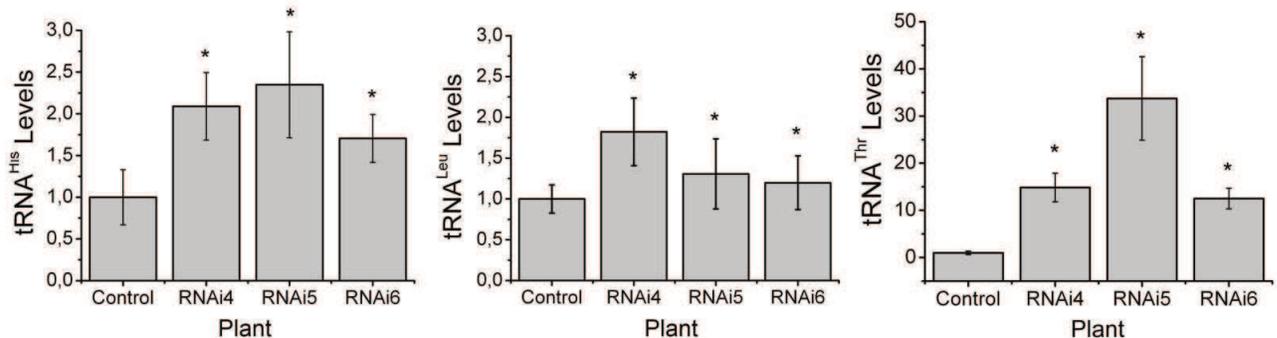


Figura 35: Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância relativa de transcritos de genes de tRNAs em plantas de citros silenciadas para o gene *maf1*. Os três tRNAs analisados (His, Leu e Thr) apresentaram os níveis de transcritos significativamente aumentados nas plantas silenciadas em relação à planta controle (não transformada). * indica que as médias diferem do controle no teste t-student ($p < 0,05$).

Esses resultados corroboram os dados obtidos nas figuras 30 e 31 e são consistentes com as observações feitas com o mutante *maf1* de levedura (Kwapisz et al., 2002). Mas o que nos surpreendeu foi que embora o silenciamento de CsMAF1 tenha sido parcial, isso foi suficiente para que houvesse um aumento significativo na transcrição de tRNAs nessas plantas.

O fenótipo dessas plantas, após serem infiltradas com um inóculo de *X. citri* com OD_{600nm} de 0,01, corrobora os dados do PCR em tempo real, pois o aumento de tRNAs implica em um aumento na síntese proteica da célula e conseqüentemente, vemos uma proliferação celular mais acentuada com um maior número de pústulas coalescentes e eruptivas nas plantas RNAi, como pode ser visto na imagem das plantas RNAi5 e 6 (figura 36).

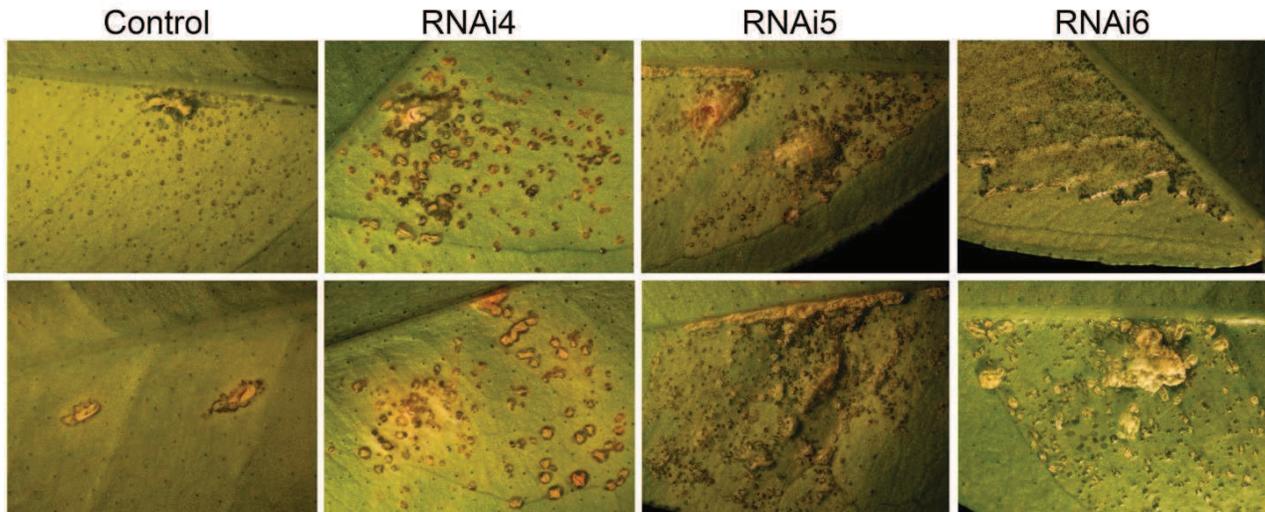


Figura 36: Folhas de plantas de citros silenciadas para o gene *maf1*, infiltradas com *X. citri* com OD_{600nm} de 0,01. Os controles são folhas de plantas não transformadas. A planta RNAi4 possui cerca de 58% de silenciamento da proteína CsMAF1, a planta RNAi5 possui cerca de 41% e a planta RNAi6 possui cerca de 66% de silenciamento em relação ao controle. Essas fotos foram tiradas 15 dias após a infiltração com *X.citri*.

Desse modo, pensamos que a superexpressão de CsMAF1 poderia causar o efeito contrário ao do silenciamento e diminuir ou até mesmo conter os sintomas do cancro cítrico. Estudos realizados com a MAF1 humana mostraram que a superexpressão dessa proteína inibiu a formação oncogênica, provavelmente devido à sua habilidade de reprimir a transcrição dependente da RNA Pol III (Johnson et al., 2007).

CAPÍTULO IV: Caracterização estrutural e funcional da proteína CsMAF1 de *Citrus sinensis*.

1. INTRODUÇÃO

A atividade da RNA Pol III requer o constante monitoramento do ambiente e a interrupção imediata da transcrição mediante condições de estresse. Em levedura, a proteína MAF1 é o único regulador negativo da RNA Pol III que age como um efetor de várias vias de sinalização (Upadhya et al., 2002; Desai et al., 2005).

Em condições de crescimento favoráveis, MAF1 é inativada por fosforilação, que opera em vários níveis para impedir a repressão da RNA Pol III. Além de diminuir a ligação direta de MAF1 à RNA Pol III, a fosforilação também atua para facilitar a exportação de MAF1 do núcleo e para impedir a sua importação do citoplasma para o núcleo. Diferentes quinases regulam essas funções através da fosforilação da MAF1.

O transporte núcleo-citoplasma é regulado pela quinase PKA. A fosforilação de MAF1 de levedura por PKA, em dois sítios adjacentes ao sinal de localização nuclear na região N-terminal, impede que ela seja importada para o núcleo e reprima a RNA Pol III (Moir et al., 2006). A fosforilação da MAF1 nuclear pela Sch9 presumivelmente, favorece a sua interação com a exportina Msn5 e, conseqüentemente, seu transporte para fora do núcleo. Além de afetar o transporte nuclear, a fosforilação de MAF1 por Sch9 causa um impacto na sua interação com RNA Pol III, pois estudos revelaram que a inativação de todos os potenciais sítios de fosforilação de Sch9, resultou em um aumento na associação MAF1-RNA Pol III (Huber et al., 2009; Lee et al., 2009; Boguta, 2009).

Embora ocorra essa translocação de MAF1 entre núcleo e citoplasma, essa atividade não é essencial para a ativação da RNA Pol III, mas sim a fosforilação de MAF1 em função de uma mudança na condição de crescimento, de desfavorável para favorável (Huber et al., 2009; Towpik et al., 2008; Wei et al., 2009). Várias evidências indicam que a levedura pode regular a atividade de MAF1 sem excluí-la do núcleo. Em células de levedura em que a exportina nuclear Msn5 é deletada ou em células W303a, em que MAF1 é constitutivamente nuclear, a fosforilação de MAF1 e a atividade da Pol III podem ser completamente reguladas por outras quinases, como a TORC1 (Moir et al., 2006; Towpik et al., 2008; Wei et al., 2009). Portanto, apesar do entusiasmo inicial do transporte de MAF1 citoplasma-núcleo estar relacionado com a fosforilação e ser resposta da inibição da via TOR, isso se tornou dispensável para a sua regulação, sugerindo que os passos essenciais para a regulação da função repressora de MAF1 ocorresse dentro do núcleo, mais especificamente no nucléolo, que é o sítio da biogênese de ribossomos, onde está localizado o DNA ribossomal 5S e tRNAs

(Wei Y. & Zheng S., 2010). O transporte nucleoplasma-núcleolo de MAF1 proporciona um novo mecanismo de regulação da MAF1 dentro do núcleo.

A quinase TOR de mamíferos (mTOR) localiza-se em genes de tRNA e 5S rRNA através da interação com TFIIC, um fator de ligação ao DNA que reconhece os promotores desses genes. Por causa dessa associação, a fosforilação mediada por mTOR de MAF1, funcionalmente contribui para a regulação da atividade repressiva de MAF1 em genes tRNA e 5S rRNA de mamíferos (Kantidakis et al., 2010).

Em contraste, o complexo TORC1 de levedura liga-se à rDNA da cromatina dos genes 35S assim como do 5S, e não é detectada nos genes de tRNA (Wei et al., 2009). Tem sido postulado que TORC1 fosforila MAF1 no *loci* do rDNA, regulando dessa forma, seu transporte do nucléolo para o nucleoplasma (Wei et al., 2009). No entanto, a fosforilação por TORC1 foi detectada apenas na MAF1 recombinante de levedura e os sítios de fosforilação não foram identificados (Wei et al., 2009). Além disso, a associação de MAF1 com genes de rDNA 5S tem sido controverso (Graczyk et al., 2011). TORC1 fosforila Sch9 em múltiplos locais, e esta fosforilação é necessária para a atividade catalítica de Sch9 em levedura (Huber et al., 2009). Portanto, TORC1 poderia controlar MAF1 de levedura indiretamente, através da fosforilação de Sch9 no nucleoplasma.

A regulação da RNA Pol III envolve outra quinase importante, a CK2, conhecida por estar envolvida na sinalização direcionada da transcrição e regulação do ciclo celular (Olsten e Litchfield, 2004). Foi demonstrado há uma década, que a fosforilação mediada por CK2 de TBP, uma subunidade do fator TFIIB de levedura, é necessária para o recrutamento eficiente do complexo TFIIB para os promotores da RNA Pol III. Sob condições favoráveis de crescimento, CK2 interage fisicamente com TFIIB, mas sob condições de estresse, sua subunidade catalítica se dissocia do complexo (Ghavidel e Schultz, 2001). O mecanismo de controle da RNA Pol III pela CK2 não é completamente conhecido, mas tem sido postulado a participação de um fator adicional (Schultz, 2003). Recentemente, um trabalho apresentou evidências de que a quinase CK2 de levedura está presente em genes tRNA, mas não é detectada em genes 5S rRNA (Graczyk et al., 2011), contrastando com TORC1 que está preferencialmente presente em genes 5S rRNA (Wei et al., 2009). Curiosamente, MAF1 também é detectada, principalmente, em genes tRNA e não é encontrada em genes 5S rRNA (Graczyk et al., 2011). Além disso, MAF1 interage com e é fosforilada por CK2, sugerindo assim, que MAF1 poderia ser o fator adicional envolvido na regulação da RNA Pol III mediada por CK2 (Graczyk et al., 2011).

O modelo da figura 37 mostra a regulação de MAF1 através de múltiplos níveis de fosforilação.

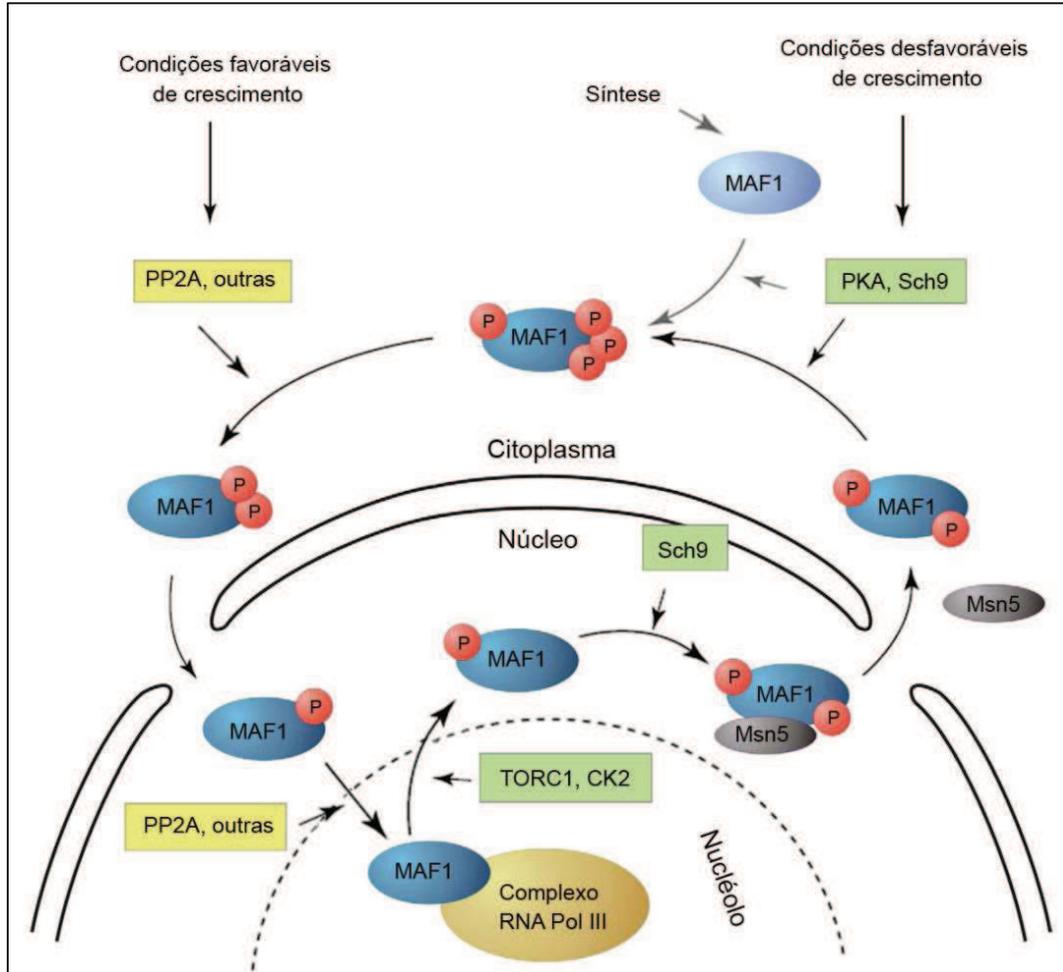


Figura 37: MAF1 é regulada em múltiplos níveis. A proporção de MAF1 no núcleo e sua interação com a RNA Pol III é regulada através de sua fosforilação mediada por sinais de estresse e escassez de nutrientes. Tratamento com rapamicina e outras condições desfavoráveis ao crescimento, induzem a defosforilação de MAF1 citoplasmática pela PP2A ou outras fosfatases, e sua importação para o núcleo. No nucleoplasma, a MAF1 está sujeita à subsequentes defosforilações, permitindo sua localização no nucléolo, onde ela se liga ao complexo da RNA Pol III e inibe sua transcrição. Sob a mudança da repressão para condições favoráveis de crescimento, a fosforilação de MAF1 dependente de CK2 induz sua dissociação do complexo da RNA Pol III associado com o tDNA. Em paralelo, a fosforilação de MAF1 dependente de TORC1, induz sua dissociação do complexo da RNA Pol III associado com 5S DNA, permitindo seu transporte do nucléolo para o nucleoplasma. Os passos seguintes envolvem a fosforilação de MAF1 dependente de PKA e/ou Sch9 e sua exportação do núcleo dependente da Msn5. No citoplasma, MAF1 recém sintetizada é também sujeita a fosforilação dependente de PKA e/ou Sch9, prevenindo assim, sua importação para o núcleo. Extraído de Boguta & Graczyk, 2011.

Os resultados que serão apresentados a seguir, confirmam que a CsMAF1 também é fosforilada por PKA e possui sítios de fosforilação da quinase TOR altamente conservados. Além disso, observamos que CsMAF1 se localiza no núcleo de células de mamíferos, dando indícios de que sua regulação realmente aconteça nesse local.

Porém, questões relativas à regulação de CsMAF1 por fosforilação, sua interação com a RNA Pol III na forma dimérica ou monomérica e como PthA4 interfere com a interação CsMAF1-RNA Pol III ainda precisam ser elucidadas. Cabe ressaltar, que até o momento não há dados relevantes na literatura sobre essa proteína em plantas e trabalhos sobre a sua regulação pela via TOR são recentes e limitados. Portanto, o papel da fosforilação no controle do estado dimérico da CsMAF1 e, conseqüentemente, sua afinidade pela RNA Pol III poderia caracterizar um novo mecanismo regulatório para proteínas dessa família em plantas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fosforilar CsMAF1 com as quinases PKA, PKC e mTOR;
- Mapear o sítio de fosforilação de PKA através de espectrometria de massas;
- Realizar sublocalização celular de CsMAF1 em células de mamíferos;
- Realizar ensaios espectroscópicos com a proteína CsMAF1, como: Dicroísmo circular (CD), Dynamic Light Scattering (DLS) e Desnaturação Térmica Progressiva;
- Confirmar as interações entre as proteínas de citros isoladas no *screening* de duplo híbrido com CsMAF1;
- Realizar modelagem computacional por homologia da CsMAF1 e compará-la com a estrutura de MAF1 humana, recém resolvida;
- Realizar mutagênese sítio dirigida em um dos supostos sítios de fosforilação de TOR em CsMAF1;
- Realizar tentativas de cristalização de CsMAF1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ENSAIOS DE FOSFORILAÇÃO *IN VITRO* COM PKA E PKC

A reação de fosforilação *in vitro* com a PKA (murine), foi realizada com cerca de 1 µg/µL de proteína CsMAF1 (com His-tag) ou CsMAF1-Ser45Ala/Asp recém purificada, 1X PKA Reaction Buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5), 0,2 mM de ATP “frio”, 500 µCi/µMol de [γ -³²P]ATP e 2500 U da subunidade catalítica da proteína quinase A (PKA). A reação de fosforilação com PKC (rat brain) foi realizada com cerca de 1 µg/µL de proteína CsMAF1 (com His-tag) recém purificada, 1X PKC Reaction Buffer (20 mM HEPES, pH 7,4; 1 mM DTT, 1 mg/ml Type III-S histone; 10 mM MgCl₂; 1,7 mM CaCl₂; 0,6 mg/ml phosphatidyl serine), 500 µCi/µMol de [γ -³²P]ATP e 1000 U da proteína quinase C (PKC). Ambas as reações, cujo volume total foi de 20 µl, foram incubadas por 30 minutos a 30°C. Em seguida, as reações foram interrompidas com a adição de 10 µl de tampão de amostra SDS-PAGE 2X e imediatamente fervidas a 95°C por 5 minutos. Apenas 15 µl de amostra de cada reação de fosforilação foi aplicada em gel de SDS-PAGE 10% e procedeu-se com uma corrida de 1 hora de 30 minutos a 120V. Após a corrida, o gel foi seco à vácuo com Gel Dyer 583 (Bio Rad) por 1 hora e 30 minutos e exposto a um filme autoradiográfico, que ficou incubado 24 horas a -80°C. A proteína Glutathione-S-Transferase (GST) foi utilizada como controle negativo tanto da fosforilação por PKA quanto por PKC.

3.2 ENSAIO DE FOSFORILAÇÃO mTOR

O ensaio de fosforilação *in vitro* de CsMAF1 com a quinase mTOR, foi realizado após a imunoprecipitação dessa quinase em células HeLa. Células transfectadas com o plasmídeo Myc-mTOR foram lavadas uma vez com PBS gelado, em seguida lisadas com o tampão de lise mTOR (40 mM HEPES pH7.4; 2 mM EDTA; 10 mM β-glicerofosfato; 0,3% (w/v) CHAPS e inibidores de protease). O material insolúvel foi removido por centrifugação e o anticorpo anti-Myc (Sigma) foi incubado com o lisado por 2 horas a 4°C. Foi adicionada resina de proteína G-Sepharose ao lisado e incubado por mais 1 hora a 4 °C para imunoprecipitar o complexo Myc-mTOR. A resina foi lavada uma vez com tampão de baixo teor de sal (40 mM HEPES pH7.4; 10 mM β-glicerofosfato; 150 mM NaCl; 0,3% (w/v) CHAPS e inibidores de protease), depois, mais duas vezes com tampão de alto teor de sal (40 mM HEPES pH7.4; 10 mM β-glicerofosfato; 400 mM NaCl; 0,3% (w/v) CHAPS e inibidores de protease), para remover a proteína inibitória PRAS40. Em seguida, mais duas lavagens com tampão HEPES/KCl (25 mM HEPES pH 7.4; 20 mM KCl). A resina foi dividida em tubos de 1,5 mL para a reação de fosforilação seguindo o protocolo do item 3.1 acima.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO DE PKA

As bandas referentes à fosforilação de CsMAF1 por PKA foram recortadas do gel e as proteínas foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina. Os peptídeos foram separados por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 (100 µm x 100 mm) (Waters) em nano *Acquity Ultra Performance LC* (Waters) acoplado a uma interface de ESI nanospray em um espectrômetro de massa do tipo Q-ToF Ultima (MicroMass/Waters). Os arquivos de dados gerados pelo Q-ToF foram processados em programa Mascot Distiller v.2.3, 2009 (Matrix Science Ltd.). Com o objetivo de identificar as proteínas foi utilizado o programa *Mascot Server* v.2.3 (Matrix Science Ltd.), tendo como parâmetros uma clivagem perdida pela tripsina, modificação fixa de carbamidometilação, modificações variáveis de oxidação da metionina e fosforilação em serina, treonina e tirosina e 0,1 Da de tolerância de massas para precursores e 0,1 Da de tolerância de massas para fragmentos. As buscas foram realizadas utilizando o banco de dados *citrus EST* do NCBI (3307740 sequências; 848920132 resíduos). Foi realizada a validação manual dos espectros para confirmação dos sítios de fosforilação.

3.4 SUBLOCALIZAÇÃO CELULAR DE CsMAF1

3.4.1 Clonagem de CsMAF1 no vetor pEGFP-C1

Com o objetivo de realizar o ensaio de sublocalização celular de CsMAF1, foi necessário clonar o gene da proteína MAF1 de citros no vetor de expressão de mamíferos pEGFP-C1 (Clontech). Quando clonado no MCS (múltiplo sítio de clonagem) deste vetor, o gene da proteína de interesse é expresso como uma proteína de fusão ligada a EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). O gene de CsMAF1 foi subclonado do vetor pOAD com as enzimas de restrição PstI e Sall para o vetor pEGFP-C1, digerido com PstI e XhoI, gerando fragmentos de DNA com final coesivo compatível. Após a digestão com essas enzimas, vetor e inserto foram extraídos do gel de agarose (1%), purificados com Kit de Extração de DNA (Qiagen) e ligados com T4 DNA ligase sob incubação no banho a 16°C por 16 horas. Em seguida foi transformado em DH5α e a confirmação da inserção do gene no vetor desejado foi feita através de sequenciamento.

3.4.2 Transfecção de pEGFP-CsMAF1 em linhagem de células HEK 293 E HeLa

A transfecção transiente das células, com o plasmídeo pEGFP-CsMAF1 foi realizada com o reagente lipofectamine (Invitrogen). No dia anterior à transfecção, foram distribuídas 35000 células por poço em placas de 6 poços (cada um com 10cm² de diâmetro) em 500 µL de meio de cultura completo sem antibiótico, para que a confluência das células fosse de 50 a 80% no momento da transfecção. A transfecção foi feita seguindo as recomendações do fabricante.

Foi diluído cerca de 0.4 µg de DNA em 25 µl de OptiMEM sem soro (Invitrogen) misturando-se gentilmente. A lipofectamina também foi diluída para 5 µl em 25 µl de OptiMEM sem soro (Invitrogen). Para cada poço, foi misturado o DNA diluído (25 µl) e a lipofectamina diluída (25 µl), em um volume total de 50 µl e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi acrescentada 150 µl do meio OptiMEM, gerando um volume total de 200 µl e misturado gentilmente. O meio de crescimento foi removido das células e substituído por 200 µl de meio sem soro. Em cada poço foi adicionado 200 µl dos complexos diluídos e incubados a 37°C em um incubador de CO₂ por 24 horas. Foi adicionado 400 µl do meio de crescimento contendo 2X mais a concentração normal de soro, sem remover o mix de transfecção.

3.5 MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA ESTRUTURAL

A modelagem molecular da estrutura de MAF1 de *Citrus* foi realizada pelo pesquisador Dr. Paulo Sérgio de Oliveira do Laboratório Nacional de Biociências em caráter de colaboração. A modelagem foi realizada utilizando-se o programa Yasara (Yer Another Scientific Artificial Reality Application). O programa recebe uma sequência de aminoácidos como entrada e retorna um modelo refinado de alta resolução, usando um protocolo aprovado pela CASP (Critical Assessment of Structure Prediction) (Krieger et al., 2009). O processo de modelagem encontra-se descrito abaixo:

A sequência de aminoácidos dada como entrada é comparada contra a base de dados Uniprot através da ferramenta PSI-BLAST (Altschul et al., 1997) de forma a se construir uma matriz de pontuação posição-específica (PSSM, na sigla em inglês) a partir de sequências relacionadas. O perfil obtido é usado em uma busca no PDB (Protein Data Bank) por homólogos que possam servir de molde para a modelagem da sequência de entrada. Nessa etapa, descartaremos as sequências de entrada cuja homologia seja muito remota (baseado no E-valor) para ser detectada pelo PSI-BLAST. Cada molde obtido é, então, classificado segundo sua pontuação de alinhamento e sua qualidade estrutural, determinada pelo programa WHAT_CHECK (Hoofst et al., 1996a), o qual é obtido da base de dados PDBFinder2 (Hoofst et al., 1996b).

Os modelos serão criados utilizando-se apenas os moldes com maior pontuação. Para cada molde disponível, é feito um alinhamento baseado em estrutura entre o molde e a sequência de entrada. Tal alinhamento é parcialmente baseado nas matrizes de pontuação SSALN (Qiu & Elber, 2006). Ele é otimizado iterativamente usando informações adicionais como: informação evolutiva contida em sequências provenientes do SwissProt e do TrEMBL, informação estrutural proveniente do molde, bem como a estrutura secundária predita para a

sequência de entrada (King & Sternberg, 1996; Jones DT, 1999). Caso o alinhamento feito não seja acurado, alinhamentos alternativos que usam uma abordagem estocástica (Mueckstein et al., 2002) são criados e para todos eles modelos serão construídos.

Se os moldes encontram-se em estados oligoméricos (de acordo com a base de dados PQS), os modelos podem ser construídos nesse mesmo estado, de forma que interações entre as cadeias laterais sejam consideradas. No caso de haver inserções e/ou deleções, um subconjunto não-redundante do PDB (Wang & Dunbrack, 2003) é usado para determinar quais os melhores pontos de ancoragem para a alça e obter informações sobre as possíveis conformações de alças.

As conformações são classificadas por um sistema de pontuação que considera a similaridade entre as sequências, choques com o restante da estrutura e o encaixe nos pontos de ancoragem. No entanto, neste último caso, uma vez que as alças extraídas do banco nem sempre se encaixam perfeitamente, é usado o algoritmo de minimização cíclica de coordenadas (Canutescu & Dunbrack, 2003) para o ajuste. Ocorre então a etapa de modelagem das cadeias laterais. Nessa etapa, é feita a otimização das alças, que consiste em uma análise sequencial, na qual, para cada alça, são testadas as diversas conformações obtidas do banco de dados (Wang & Dunbrack, 2003) e, para cada uma dessas conformações, otimiza-se as cadeias laterais dos resíduos presentes na alça e adjacências, através do cálculo das energias de interação e solvatação.

Após esse primeiro processo de modelagem estrutural, as ligações de hidrogênio do modelo obtido são otimizadas, levando em consideração o pH e a existência de ligantes, através da utilização de uma versão aprimorada do método WHAT IF (Hooft et al., 1996c). Um refinamento de alta resolução na presença de moléculas de solvente é realizado pelo método de minimização de energia, usando os modelos de campos de força mais recentes (AMBER94, AMBER96, AMBER99, AMBER03, NOVA, YAMBER, YAMBER2 and YAMBER3, YASARA e YASARA2) e o resultado passa por um processo de validação feito pela ferramenta WHAT_CHECK (Hooft et al., 1996a) para assegurar que o refinamento não moveu o modelo na direção errada. Nos modelos resultantes, indicadores de qualidade para cada resíduo são determinados. Um modelo híbrido é construído, no qual regiões mal modeladas são substituídas iterativamente por fragmentos dos outros modelos.

Os rotâmeros das cadeias laterais de proteínas são fortemente influenciados pela conformação do esqueleto polipeptídico (Hooft et al., 1995), por isso, para a modelagem das cadeias laterais, o programa extrai os rotâmeros preferenciais e suas probabilidades associadas de uma biblioteca de rotâmeros dependentes do esqueleto da cadeia peptídica (Dunbrack & Cohen, 1997). Baseado nesses rotâmeros, são determinadas quais cadeias laterais podem influenciar potencialmente umas as outras e um grafo é construído de forma

que cada dois resíduos que potencialmente interajam entre si compartilhem uma aresta (Canutescu et al., 2003). O grafo resultante é particionado em subgrafos que não compartilham nenhuma aresta entre si. Esses subgrafos, por sua vez, são partidos em componentes biconexas, que são grafos que não podem ser desconectados pela remoção de um único vértice. O problema combinatório é então reduzido a encontrar a energia mínima dos componentes biconexos e combinar os resultados para se determinar a conformação de energia mínima global. Para tanto, o Yasara usa uma função simplificada de energia de repulsão, que leva em conta, principalmente, forças repulsivas de Van der Waals. Porém, para levar em consideração as complexas interações eletrostáticas na superfície, o programa realiza uma nova rodada de otimização, só que dessa vez considerando explicitamente efeitos eletrostáticos e de solvatação, bem como preferências de empacotamento e desvios na geometria dos rotâmeros ideais.

O dímero de CsMAF1 foi construído pela superposição de dois monômeros idênticos sobre os monômeros do dímero da proteína estruturalmente similar Integron cassette protein VCH_CASS14 (3IMO).

3.6 MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA

Foram desenhados óligos específicos para mutação sítio dirigida da Ser45 e da Thr62 de CsMAF1 de acordo com as instruções do manual: QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit da Stratagene, ver tabela 7.

Tabela 7: Óligonucleotídeos utilizados para a mutagênese sítio dirigida no resíduo T62 de CsMAF1.

Mutação	Óligo	Função
Ser45 → Ala	F - GGAAGTATAAAAGACTGGCCATCAGCTTGGAAACATGAG R - CTCATGTTCCAAGCTGATGGCCAGTCTTTTATCAGTTCC	Não fosforilável
Ser45 → Asp	F - GGAAGTATAAAAGACTGGACATCAGCTTGGAAACATGAG R - CTCATGTTCCAAGCTGATGTCCAGTCTTTTATCAGTTCC	Mimetiza fosforilação
Thr62 → Ala	F - TTGGGAAATCATTGGATGCTGACTCTTCCTCACCAGCTG R - CAGCTGGTGAGGAAGAGTCAGCATCCAATGATTTCCCAA	Não fosforilável
Thr62 → Asp	F - TTGGGAAATCATTGGATGATGACTCTTCCTCACCAGCTG R - CAGCTGGTGAGGAAGAGTCATCATCCAATGATTTCCCAA	Mimetiza fosforilação

O PCR mutagênico foi realizado de acordo com as instruções do kit do fabricante (Stratagene). Logo após o PCR, as amostras foram resfriadas até 37°C e incubadas com 1 µL da enzima DpnI (10U/µl) por 1 hora a 37°C. Em seguida, 1 µl de cada amostra foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5α por eletroporação. Os clones positivos foram confirmados por sequenciamento.

3.7 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DA PROTEÍNA CsMAF1

3.7.1 Dicroísmo Circular (CD)

Os ensaios de CD, para verificar o conteúdo de estrutura secundária de CsMAF1 foi realizado com 36 μM de proteína. Os espectros de CD foram obtidos utilizando-se um espectropolarímetro J-810 (JASCO), no comprimento de onda de 200 a 260nm, com cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico. A concentração de proteína foi determinada pela absorbância a 280nm usando-se o coeficiente de extinção molar obtido no site ExPASy (<http://us.expasy.org/>).

Além de denotar a estrutura secundária da proteína, o aparelho também foi utilizado para análise do comportamento da proteína ao longo de um gradiente crescente de temperatura com intervalos de 5 °C, cuja amplitude foi de 20 °C a 95 °C, seguida de diminuição gradativa de temperatura.

3.7.2 DLS (Dynamic Light Scattering)

Os ensaios de DLS realizados para verificar a homogeneidade e monodispersividade da amostra, recomendado para ensaios cristalográficos, foram realizados logo após a purificação por gel filtração e utilizando-se o aparelho Protein Solutions DynaPro, na temperatura de 20°C, com 100 medidas com 10 acumulações cada e 10 μM de proteína por amostra.

3.8 TENTATIVA DE CRISTALIZAÇÃO DE CsMAF1

As tentativas de cristalização da proteína CsMAF1 foram realizadas utilizando-se a técnica de *sitting drop* com difusão de vapor. As gotas foram feitas pelo robô Honeybee Pipettor e os screenings iniciais foram realizados com 6 kits, totalizando 544 condições. As placas de cristalização foram mantidas em um laboratório de cristalografia à 18°C e estão sendo periodicamente visualizadas através de microscópios.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

CsMAF1 é uma proteína com múltiplos sítios de fosforilação.

MAF1 de levedura possui cinco sítios de fosforilação identificados, enquanto MAF1 humana possui sete sítios identificados (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8: Identificação por Espectrometria de Massas dos sítios de fosforilação de MAF1 de *S. cerevisiae* (Extraído de Michels, 2011).

Resíduo Fosforilado	Chi et al., 2007	Li et al., 2007	Albuquerque et al., 2008	Huber et al., 2009
Ser ⁹⁰	Não	Não	Sim	Não
Ser ¹⁷⁷	Sim	Não	Não	Sim
Ser ²⁰⁹	Não	Sim	Não	Não
Ser ²¹⁰	Não	Sim	Sim	Não
Ser ³⁴⁶	Não	Não	Sim	Não

Tabela 9: Identificação por Espectrometria de Massas dos sítios de fosforilação de MAF1 humana (Extraído de Michels, 2011).

Resíduo Fosforilado	Olsen et al., 2006	Matsuoka et al., 2007	Stokes et al., 2007	Dephoure et al., 2008	Mayya et al., 2009	Olsen et al., 2010	Shor et al., 2010	Michels et al., 2010
Ser ⁶⁰	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Thr ⁶⁴	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Ser ⁶⁵	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Ser ⁶⁸	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Ser ⁷⁵	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Thr ²¹²	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Ser ²¹⁴	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim

A primeira quinase identificada em levedura que fosforila MAF1 foi a PKA. A MAF1 de levedura possui seis sítios consenso de PKA (Ser⁹⁰, Ser¹⁰¹, Ser¹⁷⁷, Ser¹⁷⁸, Ser²⁰⁹ e Ser²¹⁰) que são fosforilados por essa quinase *in vitro* (Moir et al., 2006). A enzima PKA participa da via TOR, que está relacionada com proliferação celular em resposta a fatores de crescimento e/ou nutrientes em leveduras e mamíferos (Jacinto e Hall, 2003). Assim como a via TOR, a via Pkc1 também está envolvida na transdução de sinais mediante condições de estresse e limitação de nutrientes em células de levedura. A principal quinase efetora dessa via é a PKC (Roberts et al., 2006). Por essa razão, resolvemos fazer uma busca para encontrar sítios consenso de PKA e PKC em CsMAF1 e testar se ela é também fosforilada por essas duas quinases. O programa utilizado para a busca foi NetPhosK 1.0 Server e os resíduos com maior *score* para sítios de PKA foram: Ser⁴⁵, Ser⁷⁶, Ser¹³⁶ e Ser²¹⁰ (figura 38, sítios Ser⁴⁵ e

Ser⁷⁶ em amarelo) e para PKC foram: Thr⁹⁸ e Thr¹¹² (figura 38, sítios respectivamente, destacados em azul).

```

                                     45
MKFLEYTPLDRINDFLDHLNLGERTIKGCLEAYSCKHTGTDKRLSISLEHEILDYLG
                                     76
KSLDTDSSSPAEEFLLSRSSRKALIIYLVLTLYHMYPDYDFSIVKAHQFFTEESWNIFK
                                     98
QIFETYMFEASKEWSETYGGSSLLETLYKALDEVVKLPECEIYSYNPDSDSDFLEK
                                     112
GAIWSFNFFFYNRKLRVVSFRFPCLSNLVAEGFLVNDSTYEEDGEIFDDMDM

```

Figura 38: Sítios consensos de PKA (Ser⁴⁵ e Ser⁷⁶, em amarelo) e de PKC (Thr⁹⁸ e Thr¹¹², em azul) preditos para CsMAF1 pelo programa NetPhosK 1.0 Server.

O resultado do ensaio de fosforilação *in vitro* com a enzima PKA e PKC pode ser visto na figura 39.

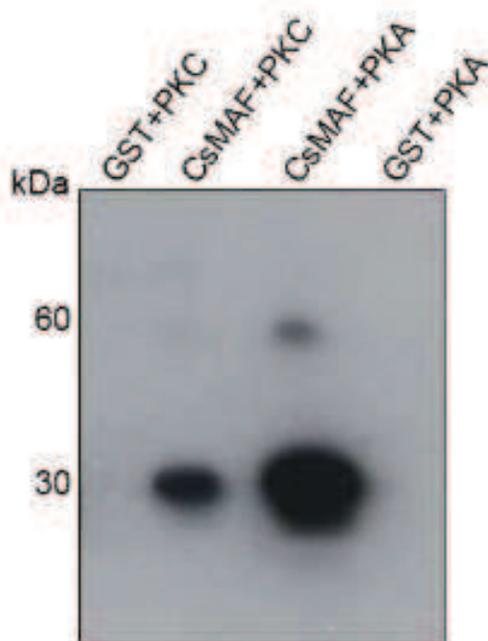


Figura 39: Ensaio de fosforilação *in vitro* de CsMAF1 com as quinases PKC e PKA, respectivamente. Os controles utilizados para as duas enzimas foi a proteína GST.

As duas quinases fosforilam CsMAF1 *in vitro*, porém CsMAF1 é muito mais fosforilada por PKA, já que foi usada a mesma concentração dessa proteína nos ensaios com as duas enzimas. Embora seja um gel desnaturante, é possível visualizar uma maior concentração do

monômero do que do dímero, sugerindo que a fosforilação poderia desestabilizar o dímero. Além disso, foi possível mapear e confirmar os sítios de fosforilação da PKA através de espectrometria de massas. Segundo o espectro resultante da análise (figura 40), a serina fosforilada por PKA em CsMAF1 é a Ser⁴⁵ (destacada em vermelho na figura 38).

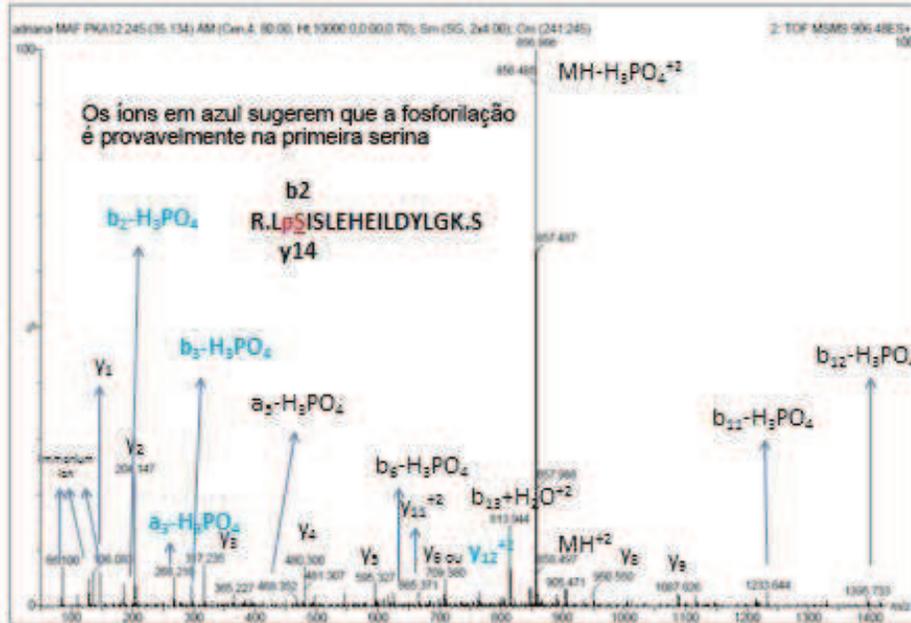


Figura 40: Espectro de MS/MS do fosopeptídeo de CsMAF1, mostrando que a serina fosforilada é a Ser45.

Mas qual seria o papel da fosforilação na função de MAF1? Um dos papéis proposto por muitos autores é que a fosforilação de MAF1 de levedura determina sua localização celular. MAF1 de levedura possui dois sítios de localização nuclear (NLS), um na região N-terminal e outro na região C-terminal. O NLS do N-terminal é regulado através da fosforilação de todos os seguintes resíduos: Ser⁹⁰, Ser¹⁰¹, Ser¹⁷⁷, Ser¹⁷⁸, Ser²⁰⁹ e Ser²¹⁰. Quando esses resíduos são mutados para alanina, MAF1 torna-se constitutivamente nuclear, corroborando a idéia de que a fosforilação atua como um sinal de exclusão nuclear, ou seja, a fosforilação “esconde” o sítio de localização nuclear de MAF1 e impede que ela seja importada para o núcleo em condições normais de crescimento (Moir *et al.*, 2006 e Wei e Zheng, 2009). Mas a fosforilação de MAF1 de levedura por PKA ou Sch9 não é suficiente para impedir a repressão da RNA Pol III. Mutações simultâneas nos sítios de PKA (Ser⁹⁰, Ser¹⁰¹, Ser¹⁷⁷, Ser¹⁷⁸, Ser²⁰⁹ e Ser²¹⁰) para glutamato, mimetizando a fosforilação de MAF1 e, portanto, a sua inativação, não foram suficientes para impedir a repressão da RNA Pol III durante o estresse (Moir *et al.*, 2006),

revelando a existência de um outro mecanismo envolvido na regulação da função repressora de MAF1 dentro do núcleo.

Um estudo recente mostrou que a quinase TORC1 (principal complexo da via TOR) também modula a localização nucleolar de MAF1 e sua associação com a cromatina, que é essencial para a inibição da atividade da RNA Pol III (Wei & Zheng, 2009). Estudos em MAF1 humana sugerem uma regulação um pouco distinta da MAF1 de levedura, pois não ocorre o transporte núcleo-citoplasma mediado por fosforilação, uma vez que em células de mamíferos, MAF1 se encontra predominantemente no núcleo. Vale a pena mencionar que o sinal de localização nuclear de MAF1 de levedura está próximo aos sítios de fosforilação e na proteína humana não (Michels, 2011). Estudos recentes revelaram que MAF1 humana é fosforilada por mTOR na Ser⁷⁵, mas que pode haver sítios adicionais a este que levam a uma hiperfosforilação da proteína e, conseqüentemente, sua inativação (Kantidakis *et al.*, 2010, Michels *et al.*, 2010 e Shor *et al.*, 2010).

A superexpressão de MAF1 humana com o resíduo Ser⁷⁵ mutado para alanina (MAF1-S75A) ou MAF1 com mutações combinadas nos resíduos Ser⁶⁰, Thr⁶⁴, Ser⁶⁸ e Ser⁷⁵ também para alanina (MAF1-4A) em condições de crescimento normal, resultaram em uma redução pronunciada da transcrição de tRNA quando comparada com a superexpressão da MAF1 selvagem. A redução foi mais significativa em MAF1-4A do que em MAF1-S75A, indicando que somente a fosforilação no resíduo Ser⁷⁵ é insuficiente para a completa inibição de MAF1 (Shor *et al.*, 2010).

Até o momento, os dados de fosforilação obtidos com a CsMAF1 confirmaram a presença de vários sítios de fosforilação e que ela sofre fosforilação *in vitro* por PKA e PKC. Embora tenha, dentro do domínio conservado na região C-terminal, um sinal de localização nuclear, o sítio de fosforilação identificado em CsMAF1 (Ser⁴⁵) se encontra na região N-terminal. Mutação sítio dirigida no resíduo Ser⁴⁵ de CsMAF1 para Alanina (não fosforilável) e Ácido aspártico (mimetiza fosforilação), ajudaram a confirmar o sítio de fosforilação de PKA. A figura 41 mostra que esses mutantes não são capazes de sofrer fosforilação por PKA, devido à alteração de aminoácidos no resíduo 45.

Baseado neste alto grau de conservação, realizamos um ensaio de fosforilação *in vitro* de CsMAF1 com a quinase mTOR, imunoprecipitada de células HeLa transfectadas com o vetor Myc-mTOR (figura 43).

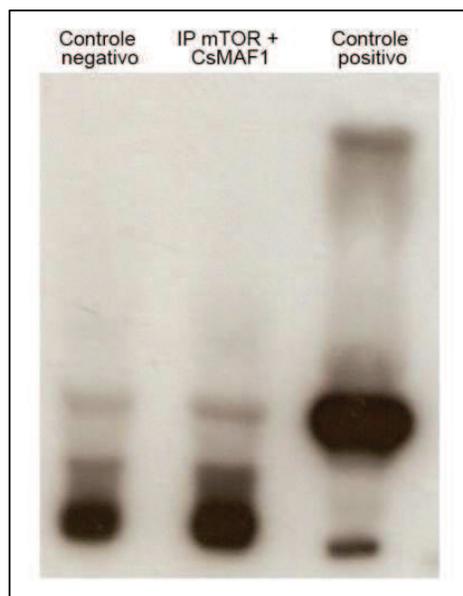


Figura 43: Fosforilação *in vitro* de CsMAF1 com a quinase mTOR. Como controle negativo foi usado extrato de células HeLa não transfectadas e como controle positivo foi realizado um ensaio de fosforilação de CsMAF1 com PKA. O experimento é inconclusivo devido ao aparecimento de bandas no controle negativo idênticas às da reação com mTOR.

O resultado obtido nesse experimento foi inconclusivo, visto que o controle negativo composto por células não transfectadas, apresenta o mesmo padrão de bandejamento que a reação contendo CsMAF1 + mTOR. Uma possível explicação seria a presença de alguma outra quinase que também fosforila CsMAF1 no extrato de células do controle e na imunoprecipitação realizada com anti-Myc, gerando uma contaminação. Alguns ajustes serão necessários para aperfeiçoar esse experimento.

Embora CsMAF1 seja fosforilada por PKA e tenha um sítio de localização nuclear adjacente ao sítio de fosforilação dessa quinase, assim como em levedura, a similaridade de sequência de aminoácidos é muito maior com a MAF1 humana do que com a de levedura. Além disso, os sítios de fosforilação da mTOR na MAF1 humana são altamente conservados na CsMAF1, enquanto em levedura, não há identificação desses sítios. Portanto, podemos dizer que a MAF1 de citros se comporta como um híbrido, compartilhando características tanto da MAF1 humana quanto de levedura.

CsMAF1 se localiza no núcleo de células de mamíferos.

A fosforilação de MAF1 regula tanto o transporte citoplasma-núcleo (Moir *et al.*, 2006 e Roberts *et al.*, 2006) quanto o transporte nucleoplasma-nucléolo (Wei Y. *et al.*, 2009), que é o passo essencial para a regulação da RNA Pol III. Em leveduras, as quinases responsáveis pelo transporte citoplasma-núcleo de MAF1 são PKA e Sch9 (Moir *et al.*, 2006 e Yuehua e Zheng, 2009) e é interessante notar que ambas compartilham os mesmos sítios de fosforilação. Entretanto, em células de mamíferos essa questão do transporte citoplasma-núcleo ainda não está muito bem esclarecida, embora a MAF1 humana possua um sítio de localização nuclear no C-terminal. Alguns autores defendem a localização predominantemente nuclear de MAF1 de mamíferos em células HeLa e em outras linhagens de células cancerígenas, independentemente do tratamento com rapamicina (Rollins *et al.*, 2007; Kantidakis *et al.*, 2010).

Diante da facilidade de manuseio e do acesso às células de mamíferos em nosso laboratório, além de garantirem que as proteínas sintetizadas possuam todos os elementos pós-traducionais necessários à sua atividade biológica *in vivo*, transfectamos a construção pEGFP-CsMAF1 (plasmídeo: *enhanced green fluorescent protein*) em células HEK 293 e HeLa. A figura 44 mostra células HEK 293 vivas (não fixadas) expressando CsMAF1 fusionada à proteína GFP. É possível notar que CsMAF1 se encontra tanto no citoplasma quanto no núcleo dessas células. Assim como a MAF1 de humanos em células HeLa, como descrito anteriormente por Kantidakis *et al.* (2010), vemos a localização de CsMAF1 predominantemente nuclear (figura 45).

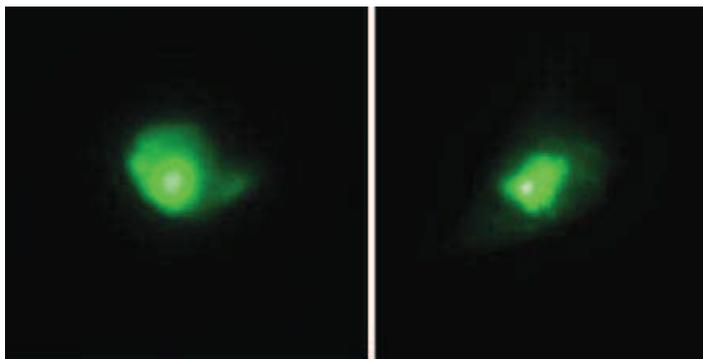


Figura 44: Localização nuclear de pEGFP-CsMAF1 através de microscopia de fluorescência (100X) em células HEK 293 vivas (não fixadas).

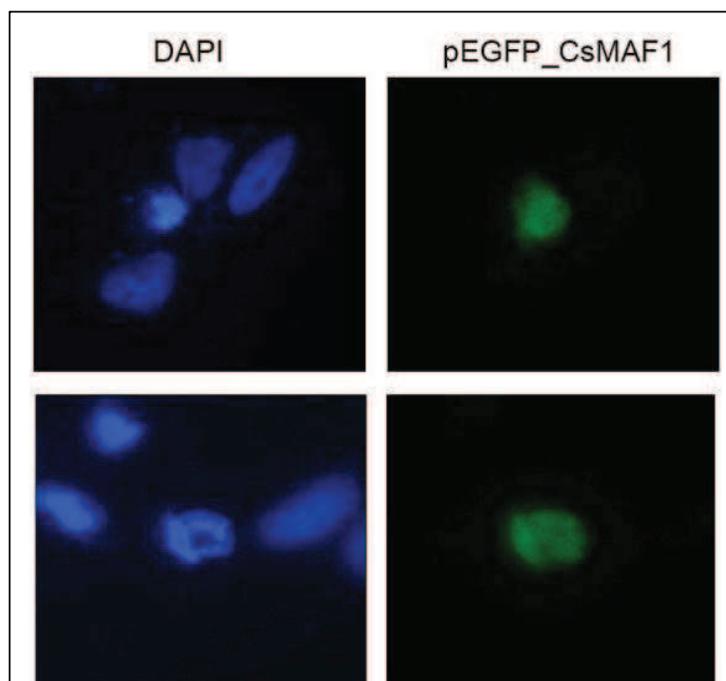


Figura 45: Localização nuclear de pEGFP-CsMAF1 através de microscopia de fluorescência (100X) em células HeLa fixadas.

Portanto, é possível concluir que CsMAF1 localiza-se mais intensamente no núcleo de células HEK 293 e exclusivamente no núcleo de células HeLa.

Evidências da dimerização de CsMAF1.

A proteína CsMAF1 clonada em pET28a em fusão com His-tag foi induzida na temperatura de 30°C por 3 horas, apresentando uma alta solubilidade nessa temperatura. A proteína foi purificada com resina de cobalto e obteve-se grande quantidade de proteína recombinante purificada. A figura 46 mostra que a proteína recombinante CsMAF1 migra com peso molecular de aproximadamente 30 kDa e 60 kDa. A banda de 30 kDa já era esperada, de acordo com a sequência primária de aminoácidos da proteína mais a cauda de histidina, mas a banda com 60 kDa não era esperada, sugerindo a formação de dímeros mesmo em condições desnaturantes. Isso demonstra que a dimerização pode ocorrer através de interações hidrofóbicas, visto que pontes dissulfeto se desestabilizariam nessas condições.

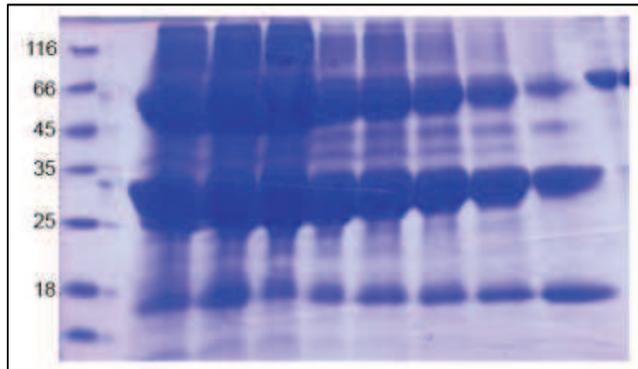


Figura 46: Purificação por afinidade com resina de cobalto de CsMAF1 (His-tag). A banda superior possui cerca de 60 kDa e a inferior cerca de 30 kDa, correspondendo ao dímero e ao monômero, respectivamente.

Alguns experimentos foram realizados na tentativa de confirmar a presença do dímero de CsMAF1, como por exemplo, eletroforese em gel nativo, cromatografia de exclusão molecular, DLS, Western blot, análise da proteína por espectrometria de massas e duplo híbrido.

A eletroforese em gel nativo revelou que o dímero de CsMAF1 migra com a mesma massa molecular da proteína BSA, que possui aproximadamente 62 kDa (figura 47).

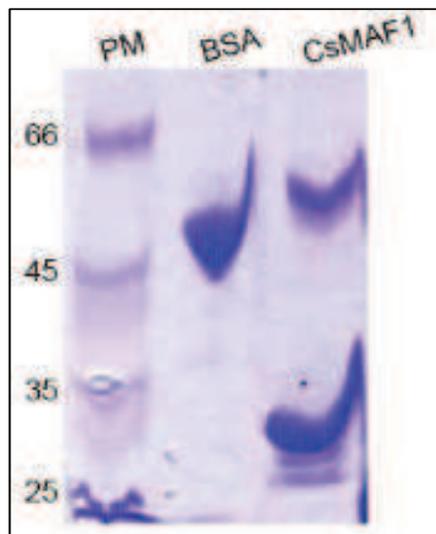


Figura 47: Gel Nativo 8% de acrilamida. Canaleta PM= marcador de peso molecular; 1) BSA (Bovine serum albumin) peso molecular de 62 kDa; 2) CsMaf1_6xHIS, com peso molecular de aproximadamente 60 kDa (dímero) e 30 kDa (monômero).

O cromatograma da exclusão molecular (gel filtração), que pode ser visto na figura 48, revela 2 picos que se referem à proteína CsMAF1. As frações eluídas dos dois picos podem ser observadas em gel SDS PAGE 10% e confirmam que a proteína encontra-se tanto na forma dimérica quanto monomérica, com peso molecular de 60 kDa e 30 kDa, respectivamente.

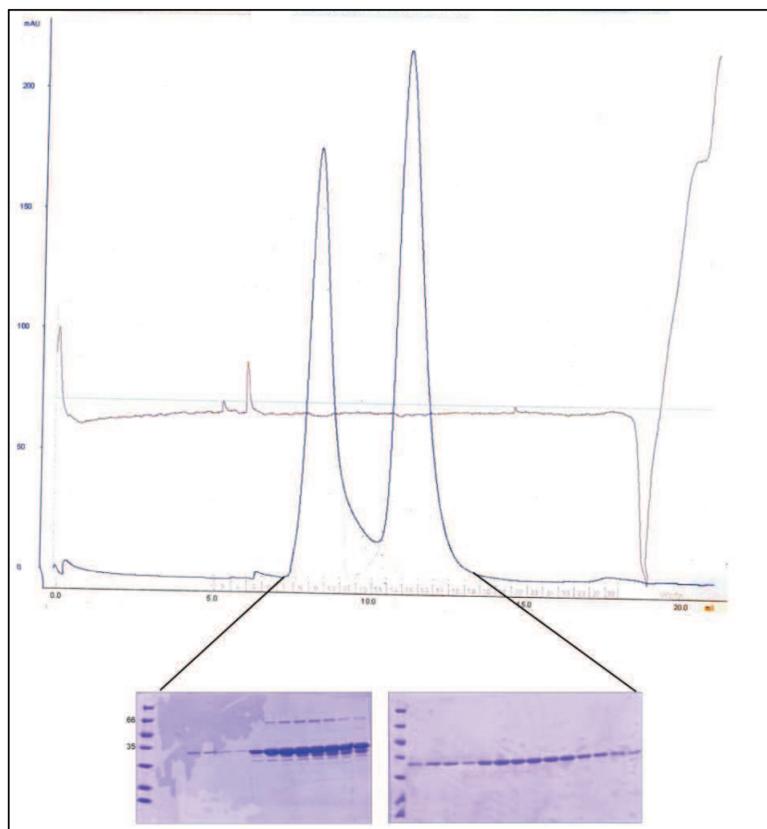


Figura 48: Purificação da proteína CsMAF1 por gel filtração na coluna Superdex 75 10/300 GL. Os géis desnaturantes mostram as frações coletadas dos dois picos, indicando o peso molecular do dímero, 60 kDa e do monômero, 30 kDa, respectivamente.

O ensaio de DLS foi realizado com a proteína recém purificada da gel filtração em coluna Superdex 75 10/300 GL. O raio hidrodinâmico obtido foi de 3.4 nm e o peso molecular estimado foi de 58 kDa, bem próximo ao peso molecular esperado para o dímero de CsMAF1, que é de aproximadamente 60 kDa. Esta análise indicou 13.1% de monodispersividade, a intensidade foi de 62.6% e a massa de 99.9%, indicando que a proteína se encontra pura e predominantemente dimérica em solução (figura 49).

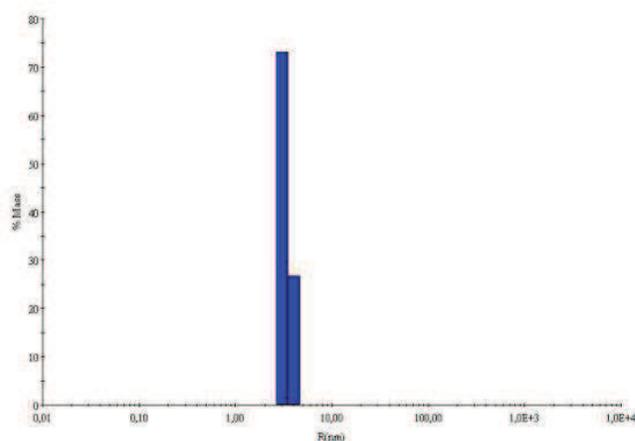


Figura 49: Gráfico de DLS da proteína CsMAF1. O gráfico mostra a % da intensidade por raio hidrodinâmico em nm (raio aproximado da proteína).

Tabela 10: A tabela indica a de % polidispersividade da amostra, o tamanho estimado das partículas presentes e a % de intensidade e massa das partículas em solução.

Amostra	Massa Molecular (kDa)	Raio Hidrodinâmico (nm)	% Pd	% Int	% Massa
Tampão MES pH 6,5	615073000	3396.0	0.0	37.4	0.1
CsMAF1	58	3.4	13.1	62.6	99.9

Com o objetivo de se obter anticorpos de CsMAF1 para a realização de Western blots, alíquotas da eluição da purificação por afinidade de CsMAF1 foram dialisadas, concentradas a 5 mg/ml, liofilizadas e enviadas para a produção de anticorpos por imunização seriada em ratos. Com o objetivo de comprovar a especificidade e a qualidade do antisoro produzido, foram testadas 4 alíquotas da proteína nas seguintes concentrações: 0,03 µg, 0,015 µg, 0,007 µg e 0,003 µg em gel SDS PAGE 10%. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF por técnica de Western blot. Além disso, extrato de proteínas de citros também foi testado com o anticorpo na diluição 1:3000. O resultado do Western blot pode ser visto na figura 50 A e B.

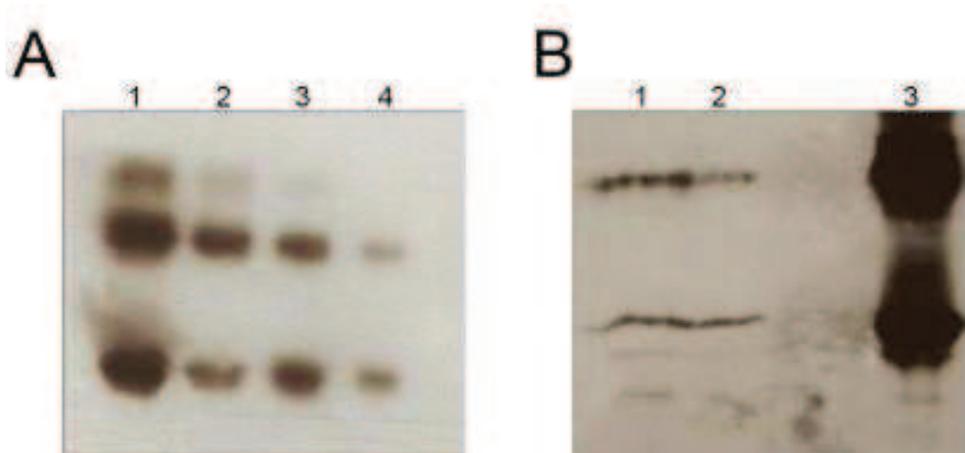


Figura 50: A) Western blot de alíquotas de 0,03 µg (1); 0,015 µg (2); 0,007 µg (3) e 0,003 µg (4) da proteína recombinante MAF1 de citros reveladas com anticorpo anti-MAF1 na diluição 1:3000. B) Western blot do extrato solúvel (1) e extrato insolúvel (2) da proteína endógena CsMAF1 e da proteína recombinante CsMAF1 (3) detectadas pelo anti-corpo anti-MAF1.

As análises de Western blot mostraram que o antisoro é específico e capaz de detectar cerca de até 3 ng da proteína recombinante CsMAF1 com uma diluição de 1:3000, tanto na forma dimérica quanto monomérica. Além disso, o antisoro foi capaz de detectar CsMAF1 endógena no extrato de proteína total de epicótilo de citros. Curiosamente, a proteína endógena também é detectada na forma dimérica e monomérica. Adicionalmente, alíquotas da proteína CsMAF1, eluídas da purificação por afinidade foram separadas em gel SDS PAGE 10% com ou sem o agente redutor DTT (figura 51) e identificadas por espectrometria de massas. Tanto a banda correspondente ao monômero quanto a banda correspondente ao dímero foram confirmadas sendo a proteína CsMAF1.

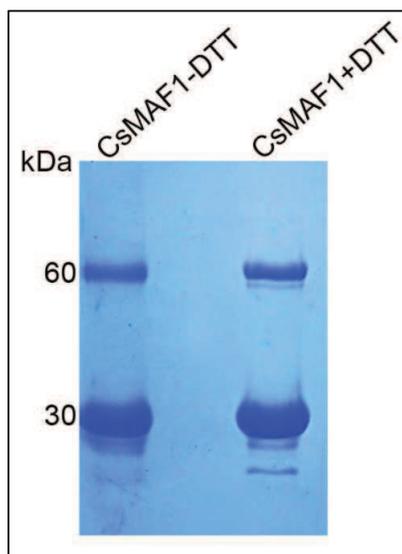


Figura 51: Gel de acrilamida 10% da proteína CsMAF1 recombinante com ou sem DTT. As bandas superiores e inferiores foram cortadas do gel e enviadas para análise por espectrometria de massas.

Dados de duplo híbrido também confirmaram a dimerização de CsMAF1, além de sua interação com outras proteínas isoladas no *screening* de duplo híbrido inicial e componentes do complexo proteico descrito no capítulo II. A figura 52 A, B e C mostra que a isca pOBD-CsMAF1 interagiu com as presas: pOAD-CsMAF1, pOAD-CsTRAX e pOAD-CsPABP2 em meio com estrigência gradativa (SC-Ade com 0, 3 e 5 mM de 3AT). A figura 52 D, E e F confirma a interação de pOBD-CsMAF1 com as presas: pOAD-CsSMC, pOAD-CsVIP2 e pOAD-CsPCBP em meio com estrigência gradativa (SC-Ade com 0, 3 e 5 mM de 3AT). Até o momento, não há relatos na literatura sobre a dimerização de proteínas da família MAF1, e sua provável relevância biológica. No entanto, vale destacar, que um estudo recente demonstrou que os domínios A e BC da proteína MAF1 humana bem como a de levedura interagem entre si e que esta interação é crucial para a regulação da atividade de MAF1 através da fosforilação (Gajda et al., 2010)

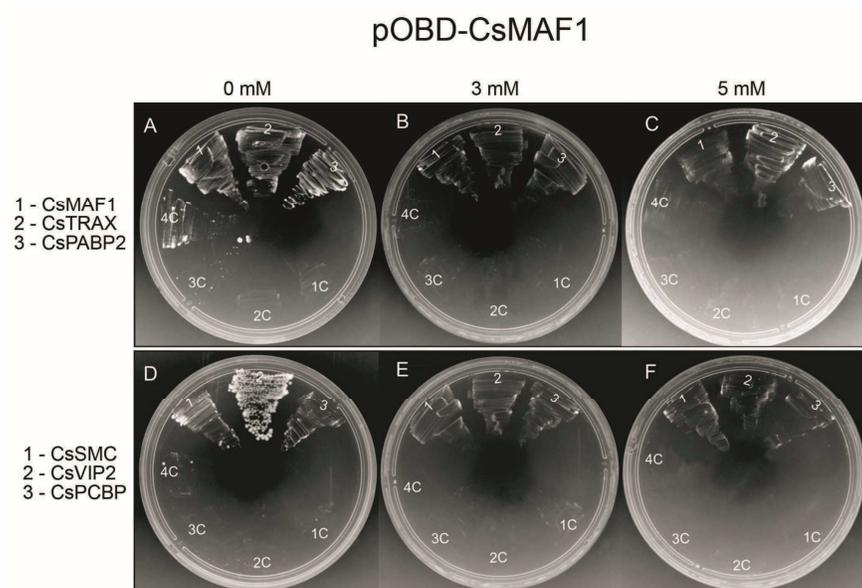


Figura 52: Interações entre a isca pOBD-CsMAF1 e as presas: pOAD-CsMAF1, pOAD-CsTRAX, pOAD-CsPABP2 (A, B e C); pOAD-CsSMC, pOAD-VIP2 e pOAD-CsPCBP (D, E e F) em meio SC –Ade – His –Leu –Trp nas concentrações de 0, 3 e 5 mM de 3AT. Os controles 1C a 4C de todas as placas correspondem aos controles negativos, ou seja, pOBD-CsMAF1 + pOAD-vazio (1C) e pOBD –vazio + presas (de 2C a 4C).

A estrutura tridimensional da MAF1 humana foi resolvida recentemente (Vannini *et al.*, 2010), no entanto, a estrutura se refere a uma variante da MAF1 humana que não tem duas regiões móveis, portanto a proteína não está inteira. A porção cristalizada abrange os resíduos

1 a 35 e 83 a 205. Tendo como base a estrutura tridimensional da MAF1 humana, propusemos a modelagem molecular por homologia estrutural da CsMAF1 como uma maneira de compararmos as duas proteínas e uma ferramenta para entendermos a relação da estrutura com a fosforilação e a dimerização da CsMAF1, que é uma característica exclusiva dessa proteína em citros. A técnica baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua sequência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na sequência, em geral, resultam em apenas, sutis modificações na estrutura tridimensional (Nayeem *et al.*, 2006). A figura 53 mostra a comparação estrutural e da distribuição de cargas da MAF1 humana (item A, extraído de Vannini *et al.*, 2010) e de CsMAF1 (item B), resultado da modelagem molecular realizada em colaboração com o pesquisador Dr. Paulo Sérgio de Oliveira, do LNBio.

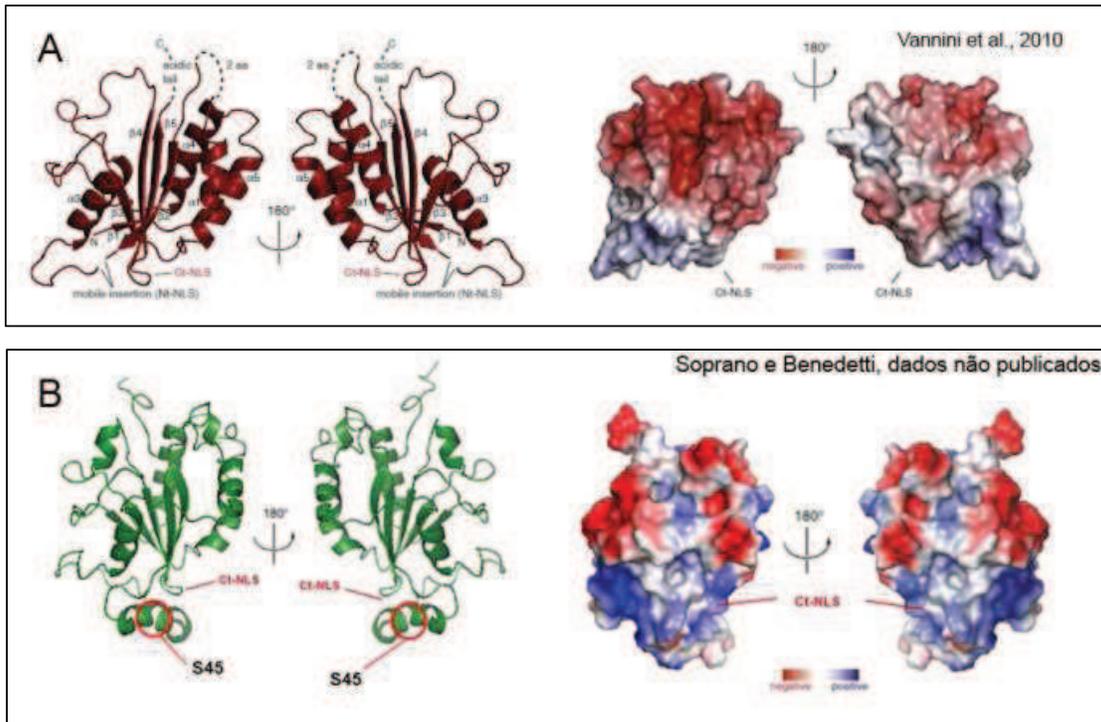


Figura 53: A) Estrutura e distribuição de cargas da proteína MAF1 humana (PDB: 3NR5). B) Estrutura e distribuição de cargas do modelo predito para o monômero da proteína CsMAF1, destacando o loop onde se encontra a Ser⁴⁵ fosforilada por PKA.

É evidente a semelhança na estrutura e na distribuição de cargas entre as duas proteínas. Na região onde ocorre a fosforilação nas duas proteínas, no caso da MAF1 humana, a região móvel do N-terminal (não aparece estruturado na figura 53 A) e no caso da CsMAF1 a região

do *loop* onde se encontra a Ser⁴⁵, podemos notar que a carga dos resíduos é positiva, proporcionando um ambiente propício para a fosforilação. O que chama mais atenção no modelo da CsMAF1 é que o sinal de localização nuclear localizado na região C-terminal da sequência linear primária de aminoácidos da proteína (figura 42) está estrategicamente localizado acima da Ser⁴⁵ fosforilada pela PKA. Isso indica que quando fosforilada, esse sítio pode ficar inacessível, dificultando a importação da proteína para o núcleo, como ocorre em levedura.

O dímero de CsMAF1 foi construído a partir de exaustivas simulações de “*docking*” e dinâmica molecular, bem como cálculos de perturbação de energia livre. Surpreendentemente, buscas realizadas com o software CATH, disponibilizado pelo banco de dados PDB, revelaram que a superposição de dois monômeros de CsMAF1 sobre o dímero da proteína “Integron cassette protein VCH_CASS14” (3IMO), cristalizada na forma dimérica e que é estruturalmente bastante similar à CsMAF1, não se conflitaram estruturalmente. Embora essa proteína não tenha similaridade funcional com MAF1, o *score* obtido pelo software revela que o modelo é muito confiável e tem grande chance de refletir uma estrutura real (figura 54).

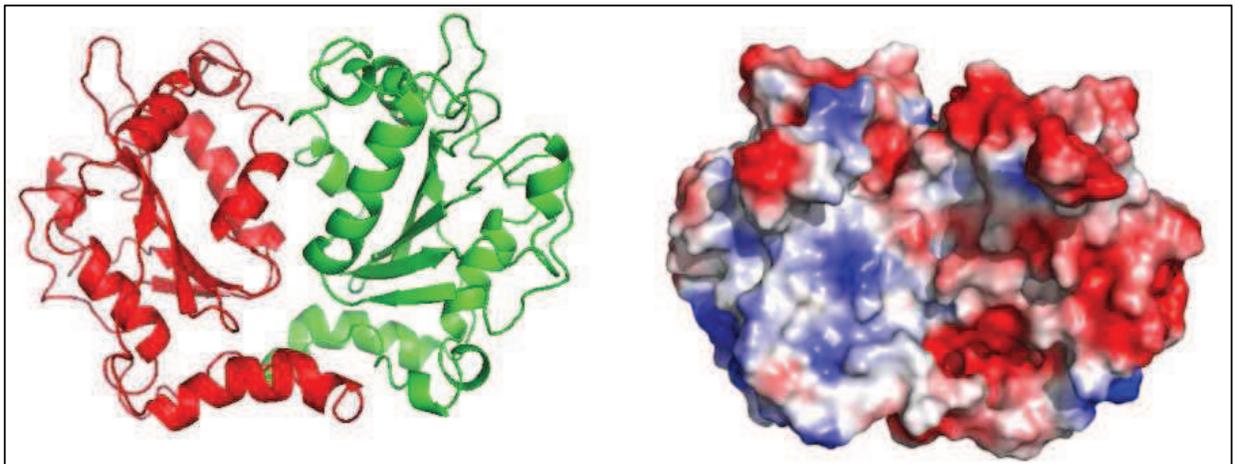


Figura 54: Estrutura e distribuição de cargas do modelo predito para a o dímero da proteína CsMAF1.

É interessante observar no modelo do dímero de CsMAF1 (figura 55 A) que justamente na face de dimerização da proteína encontramos o resíduo Thr⁶² (destacado em preto), equivalente ao Thr⁶⁴ da MAF1 humana que juntamente com Ser⁶⁰, Ser⁶⁸ e Ser⁷⁵ são apontadas como sítios de fosforilação da mTOR. Os sítios equivalentes da TOR em CsMAF1 estão destacados na figura 55 B: Ser⁷³ em azul, Ser⁶⁶ em amarelo e Thr⁶² em preto.

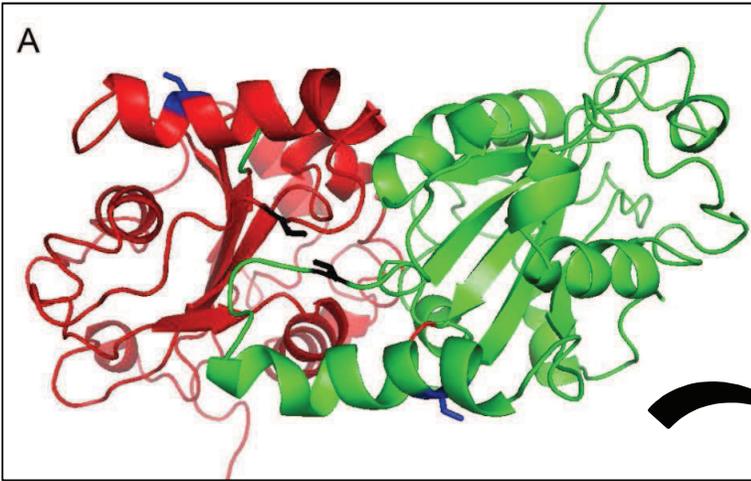
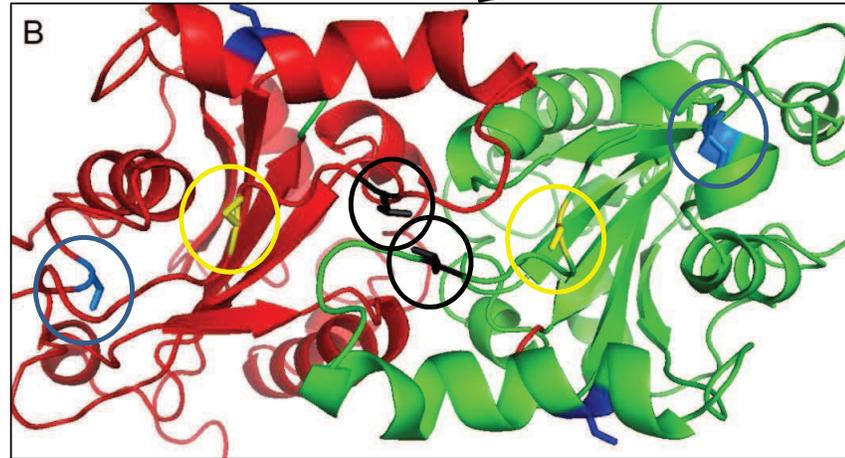


Figura 55: A) Perspectiva do dímero de CsMAF1 mostrando a face inferior onde se localiza o sítio de dimerização. A Thr⁶² dos dois monômeros está destacada em preto. B) Ampliação do sítio de dimerização de CsMAF1. Os círculos em azul são as Ser⁷³ dos dois monômeros, em amarelo são as Ser⁶⁶ e em preto as Thr⁶² dos dois monômeros.



Na figura 55 B é possível notar que os resíduos de CsMAF1 que são equivalentes aos resíduos fosforilados por mTOR na MAF1 humana, formam uma espécie de “zíper molecular” por toda a extensão do sítio de dimerização. Isso nos leva a crer que conforme esses resíduos são fosforilados, ocorra a desestabilização do dímero e, possivelmente, a ruptura do mesmo. Vale a pena lembrar que provavelmente esse dímero está ligado à RNA Pol III e que a fosforilação, através da TOR, pode ser um mecanismo para diminuir a afinidade de CsMAF1 à RNA Pol III e abolir sua função repressora. Essa é a hipótese que formulamos para tentar explicar o papel da fosforilação na dimerização e na função da proteína. Para tentar provar essa hipótese, realizamos mutagênese sítio dirigida no resíduo Thr⁶² da MAF de citros para alanina (não fosforilável) e para ácido aspártico (mimetiza a fosforilação) a fim de verificar se

somente a fosforilação desse resíduo, que está exatamente na interface de dimerização, seria suficiente para desestabilizar o dímero e, conseqüentemente, eliminar a atividade de repressão da CsMAF1 sobre a RNA Pol III.

A figura 56 mostra que houve uma diminuição sutil na concentração do dímero na proteína mutante (CsMAF1 Thr62Asp) em relação à proteína selvagem (CsMAF1 WT) na purificação por afinidade. Mas esses são dados muito preliminares e necessitam de outros experimentos, que estão sendo realizados em colaboração com a pesquisadora Dra. Juliana Smetana, para comprovar que essa mutação no resíduo Thr62 é capaz de desestabilizar o dímero. Como perspectiva futura, temos a intenção de mutar os outros três sítios de fosforilação putativos da TOR em CsMAF1 (figura 42) e verificar se a proteína mutante que carrega essas 4 mutações é capaz de interagir com a RNA Pol III e se mantém a estrutura dimérica ou é convertida totalmente para a forma monomérica.

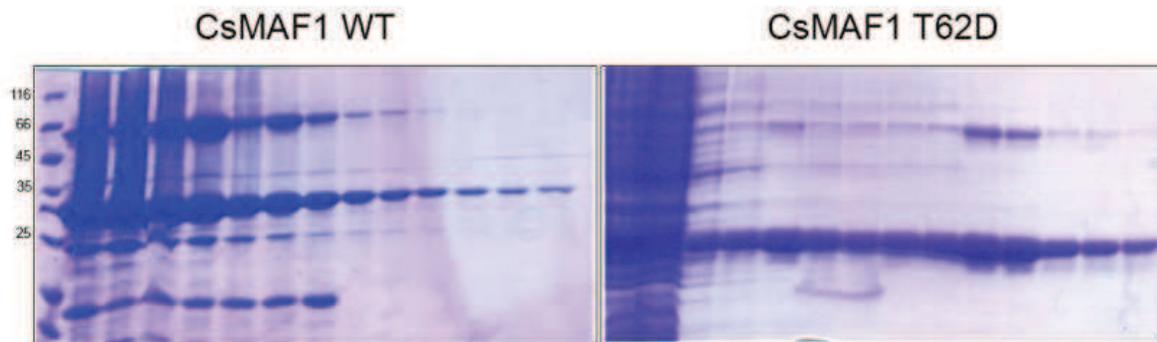


Figura 56: Purificação por afinidade em resina de cobalto de CsMAF1 selvagem (WT) e CsMAF1 mutante (T62Asp). É possível observar uma sutil diminuição na concentração do dímero na proteína mutante em relação à proteína selvagem.

A proteína CsMAF1 também foi analisada quanto ao conteúdo de estrutura secundária, utilizando-se a técnica espectroscópica de dicroísmo circular (CD). A análise foi feita com 36 μM de proteína diluída em água. O gráfico obtido a partir da análise dos dados fornecidos após a coleta dos espectros pelo espectropolarímetro J-810 (JASCO), pode ser observado na figura 57 A. Os resultados indicam que a proteína está bem estruturada e apresenta 55% de α -hélice, 20% de estrutura secundária tipo fitas β , 20% de estrutura desordenada e 4% de turns.

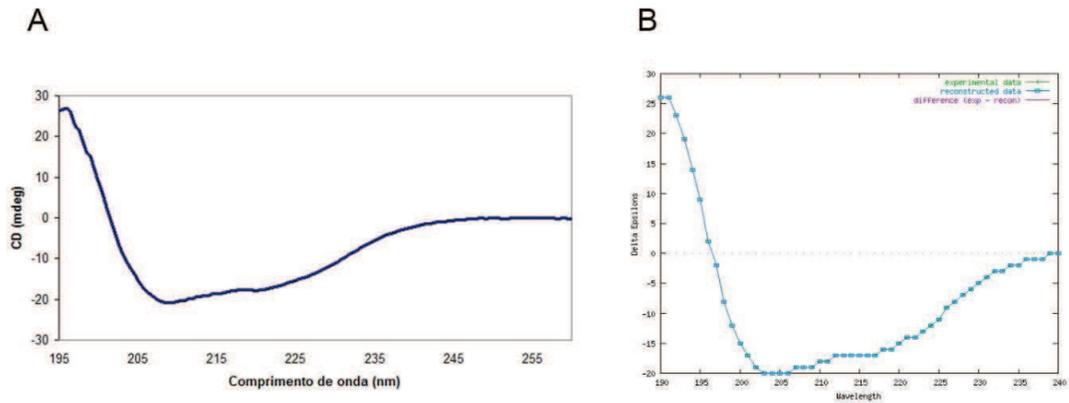


Figura 57: Espectro de CD da proteína CsMAF1 (WT). A) Espectro de Dicroísmo circular de 36 μM de CsMAF1 em água, coletado na faixa de 195-260 nm, 10 acumulações. B) Deconvolução do espectro de CD de CsMAF1 (figura 55 - A) pelo algoritmo CDSSTR disponível no site DICHROWEB

Com o objetivo de analisar a estabilidade térmica da proteína CsMAF1, realizamos ensaios de desnaturação térmica progressiva, para determinar a influência da temperatura na sua estrutura secundária. Esse ensaio consistiu num gradiente crescente de temperatura, onde a estrutura secundária da proteína foi observada em intervalos de 5 °C, cuja amplitude foi de 20 °C a 90 °C (figura 58).

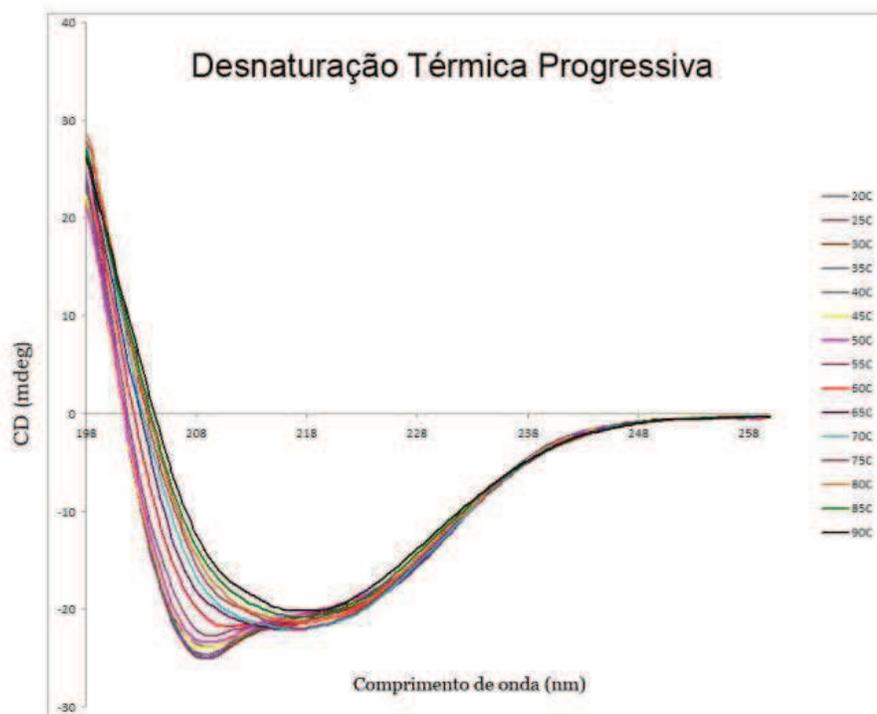


Figura 58: Gradiente crescente de temperatura, com análise da estrutura secundária da proteína CsMAF1 em intervalos de 5° C, com amplitude de 20 °C a 90 °C. Pode-se observar que a temperatura onde há a mudança da conformação da estrutura secundária de CsMAF1 é a partir de 60 °C.

Conforme mostra a figura 58, ocorre uma mudança na conformação da estrutura secundária da proteína CsMAF1, cuja temperatura limite é de 60 °C, na qual a proteína perde quase toda a porcentagem de α -hélices. Assim, foi realizada a deconvolução no site DICHROWEB, para a obtenção dos valores de cada estrutura, nas temperaturas de 20°C, 65°C e 90°C (figura 59).

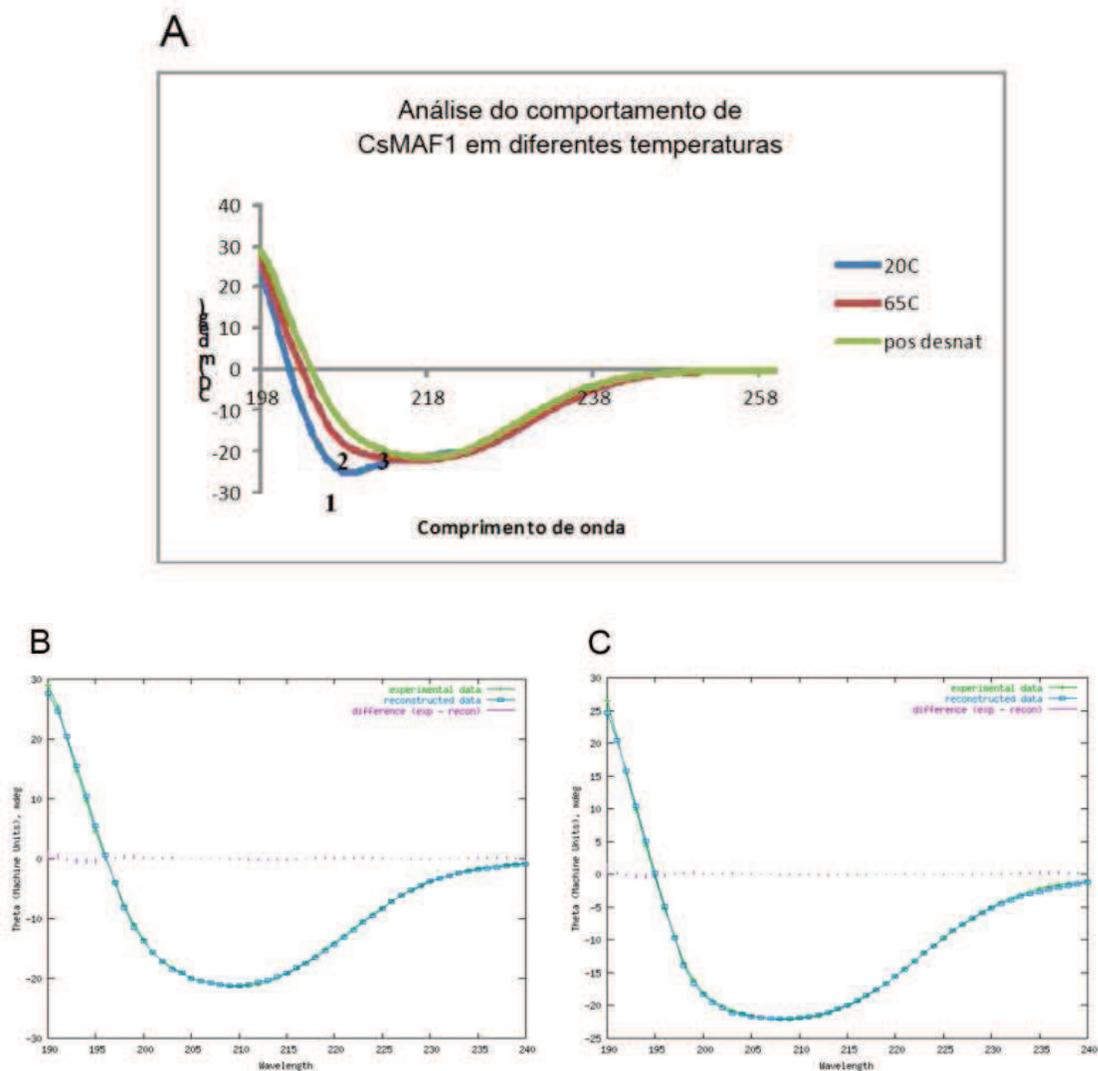


Figura 59: Análise do comportamento de CsMAF1 em diferentes temperaturas. A) Curvas 1) 20°C, 2) 65°C, 3) 90°C. B) Deconvolução da curva 1 da figura 59 A, representando 20°C. C) Deconvolução da curva 2 da figura 59 A, representando 65°C.

Os resultados mostraram que a proteína CsMAF1 apresenta porcentagens diferentes de estruturas secundárias em diferentes temperaturas, indicando uma alteração em sua estrutura secundária nativa ao longo da progressão da temperatura. A tabela 11 apresenta as porcentagens das estruturas secundárias de CsMAF1 nas temperaturas de 20°C, 65°C e 90°C, obtidos após a deconvolução por DICHROWEB.

Tabela 11: Porcentagens das estruturas secundárias de CsMAF1 em diferentes temperaturas.

Temperatura	α - hélice (%)	Folhas β (%)	β turns (%)	Estrutura desordenada (%)
20° C	55	20	4	20
65° C	8	36	23	33
90° C	8	37	22	33

De acordo com os resultados apresentados na figura 59 e na tabela 11, é possível inferir que ao longo do gradiente de aumento de temperatura a proteína CsMAF1 perde 86% de sua estrutura α -hélice, aumentando 44% em estruturas do tipo folhas β , 83% nas estruturas tipo β turns e 39% de estruturas desordenadas. Isso mostra a mudança de conformação da proteína CsMAF1, cuja temperatura limite de desnaturação gira em torno de 60°C. Após essa temperatura, a porcentagem de estruturas secundárias não varia e a proteína começa a apresentar uma conversão estrutural para estruturas do tipo folhas β .

Adicionalmente, tentativas de cristalização da CsMAF1 e da mutante CsMAF1-Thr62Asp, estão sendo realizadas. Novas purificações foram feitas a fim de aumentar a concentração da proteína em cerca de 20 mg/mL. Além disso, estão sendo testadas digestões com tripsina e/ou quimiotripsina (*proteólise in situ*) para tentar conseguir cristais adequados para a determinação da estrutura, visto que CsMAF1 possui algumas regiões móveis e desenoveladas. Essa técnica tem se mostrado bastante eficiente para se obter cristais de proteínas recalcitrantes (Dong *et al.*, 2007 e Wernimont & Edwards, 2009). Até o momento, não observamos a formação de cristais nas placas, somente a presença de precipitados cristalinos e a formação de pequenas esferulitas.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O objetivo principal deste trabalho foi a identificação e caracterização de proteínas de laranja doce que interagem com o efector PthA4 de *Xanthomonas citri*.

Apesar dos avanços na compreensão da estrutura e função de efetores TAL, pouco se sabe ainda como essas proteínas interagem com a maquinaria transcricional basal do hospedeiro para ativar ou modular a transcrição. Portanto, caracterizar esse novo papel proposto para efetores TAL, se torna uma quebra de paradigma, já que o grande enfoque da atividade desses efetores, atualmente, tem sido na sua habilidade em ligar-se ao DNA do hospedeiro e promover a transcrição de genes alvos. Desse modo, o trabalho atual se torna muito significativo ao passo que contribui para a compreensão de como a patogenicidade de PthA atua dentro da planta, propondo novos mecanismos de manipulação da maquinaria de controle transcricional do hospedeiro.

O presente trabalho, em especial o conteúdo dos capítulos III e IV, descreve um novo alvo de PthA4, a proteína de citros CsMAF1, regulador negativo da RNA Polimerase III. Os resultados obtidos até o momento, referentes à MAF1 de citros, nos permitiram concluir que:

- I – A interação de PthA4 com CsMAF1 requer os domínios central e C-terminal de PthA4 unidos;
- II – CsMAF1 interage com a RNA Pol III de células de mamíferos;
- III – CsMAF1 se localiza no núcleo de células de mamíferos, indicando intensa atividade nessa região;
- IV - CsMAF1 complementa o fenótipo do mutante *maf1* de levedura, reprimindo a transcrição de tRNA^{His} e a expressão de PthA4 na cepa complementada restaura a síntese desse tRNA, indicando que PthA4 altera o estado repressor de CsMAF1 sobre a RNA Pol III;
- V – Plantas de citros com níveis reduzidos de CsMAF1 apresentam aumento significativo no número e intensidade de lesões hiperplásticas ou eruptivas quando infiltradas com *X. citri*, e o aumento das lesões se correlaciona com um aumento expressivo de certos tRNAs;
- VI- CsMAF1 recombinante e endógena encontram-se diméricas em solução;
- VII – CsMAF1 é uma fosfoproteína e é fosforilada *in vitro* pelas quinases PKA e PKC e o sítio de fosforilação de PKA é o resíduo Ser45. Além dessas quinases, CsMAF1 possui sítios de fosforilação conservados para a quinase TOR, incluindo o resíduo Thr62;
- VIII- A mutação do resíduo de treonina Thr62 para ácido aspártico (Asp62) diminui a proporção dímero:monômero de CsMAF1, indicando que a fosforilação de resíduos na interface de dimerização pode desestabilizar o dímero e que esse pode ser um mecanismo regulatório novo para essa classe de proteína.

As perspectivas para esse trabalho incluem i) a identificação de novos parceiros de interação de CsMAF1, principalmente quinases e fosfatases; ii) confirmação e análise de plantas que superexpressam CsMAF1, com o objetivo de ver diminuição nos sintomas do cancro cítrico; iii) realizar mutações adicionais nos outros três sítios de fosforilação putativos da TOR em CsMAF1 e verificar se a proteína mutante que carrega essas 4 mutações é capaz de interagir com a RNA Pol III e se mantém a estrutura dimérica ou é convertida totalmente para a forma monomérica; iv) levando em consideração que a MAF1 de *Arabidopsis* (AtMAF1) possui 81% de identidade com a CsMAF1, pretendemos usar uma linhagem de *Arabidopsis* silenciada transientemente para o gene da *tor* para investigar se esse mutante influencia a fosforilação de AtMAF1 e qual papel que o complexo TOR desempenha no crescimento e desenvolvimento da planta, permitindo extrapolar os resultados para citros. Além disso, é possível transformar *Arabidopsis* com PthA4 e verificar se a presença do efetor TAL aumenta ou diminui a fosforilação de AtMAF1 na planta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Saadi, A.; Reddy, J.D.; Duan, Y.P.; Brunings, A.M.; Yuan, Q.; Gabriel, D.W. All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Molecular Plant Microbe Interactions.*, 20 (8):934-943, 2007.
- Altenbach, D. & Robatzek, S. Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant Microbe Interactions*, 20(9): 1031-1039, 2007.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaeffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. and Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*,(25): 3389-3402, 1997.
- Anand, A.; Krichevsky, A.; Schornack, S.; Lahaye, T.; Tzfira, T.; Tang, Y.; Citovsky, V.; Mysore, K. S. *Arabidopsis* VIRE2 INTERACTING PROTEIN2 Is Required for Agrobacterium T-DNA Integration in Plants. *The Plant Cell*, 19: 1695–1708, 2007.
- Andino, R.; Boddeker, N.; Silvera, D.; Gamarnik, A.V. Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol*, 7:76–82, 1999.
- Aoki, K.; Suzuki, K.; Sugano, T.; Tasaka, T.; Nakahara, K.; Kuge, O.; Omori, A.; Kasai, M. A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. *Nature*, 10: 167-174, 1995.
- Aoki, K; Ishida, R; Kasai M. Isolation and characterization of a cDNA encoding a Translin-like protein, TRAX. *FEBS Letters*, 401(2-3):109-12, 1997.
- Azzouz, N.; Panasenko, O.O.; Deluen, C.; Hsieh, J.; Theiler, g.; Collart, M.A. Specific roles for the CCR4-Not complex subunits in expression on the genomes. *RNA*, 15: 377-383, 2009.
- Balatsos, N.A.; Nilsson, P.; Mazza, C.; Cusack, S.; Virtanen, A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J Biol Chem*, 281: 4517–4522, 2006.
- Belasque Jr., J.; Parra, A.L.; Chagas, M.C.M.; Behe, C.; Ayres, A.J.; Parra, J.R.P.; Hartung, J.S. Interaction of citrus bacterial canker, citrus leaf miner and pest management. *Phytopathology*, 91 (supplement): S7., 2001.
- Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 100, No. 6, (Mar 18), pp. 3027-3030, ISSN 0027- 8424, 2003.
- Blyn, L.B; Towner, J.S.; Semler, B.L.; Ehrenfeld, E. Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J Virol*, 71:6243–6246, 1997.
- Boch, J. & Bonas, U. *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu.Rev. Phytopathol.*, 48:419–36, 2010.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., Bonas, U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959): 1509-1512, 2009.

- Bogdanove, A.J.; Schornack, S.; Lahaye, T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol* 13: 394–401, 2010.
- Boguta, M., Czerska, K., and Zo1adek, T. Mutation in a new gene MAF1 affects tRNA suppressor efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 185, 291–296, 1997.
- Boguta M. Control of RNA polymerases I and III by the TOR signaling pathway. *Cell Cycle*, 8: 4023–4024, 2009.
- Boguta, M and Graczyk, D. RNA polymerase III under control: repression and de-repression. *Trends in Biochemical Sciences*, September 9 (36), 2011.
- Bonas, U., Stall, R. E. e Staskawicz, B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet*, 218(1): 127-136, 1989.
- Brunnings, A.M.; & Gabriel, D.W. *Xanthomonas citri*:breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4 (3):141-157. Rev., 2003.
- Brykailo M. A.; Corbett A. H.; Fridovich-Keil J. L. Functional overlap between conserved and diverged KH domains in *Saccharomyces cerevisiae* SCP160. *Nucleic Acids Res*, 35:1108–1118, 2007.
- Burd C.G. & Dreyfuss G. RNA binding specificity of hnRNP A1, significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J.*, 13:1197–1204, 1994.
- Canutescu, A.A.; Shelenkov, A.A and Dunbrack, R.L Jr. A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Sci.*, (12): 2001-2014., 2003.
- Canutescu, A.A and Dunbrack, R.L Jr. Cyclic coordinate descent: A robotics algorithm for protein loop closure. *Protein Sci.*, (12): 963-972, 2003.
- Cernadas, R. A.; Camillo, L. R.; Benedetti, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Mol. Plant Pathology*, 9(5), 2008.
- Cernadas, R.A. and Benedetti, C.E. Role of auxin and gibberellin in citrus canker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Plant Sci.* 177, 190-195, 2009.
- Chekanova, J.A; Gregory, B.D; Reverdatto, S.V; Chen, H; Kumar, R.; Hooker, T.; Yazaki, J.; Li, P.; Skiba, N.; Peng, Q.; Alonso, J.; Brukhin, V.; Grossniklaus, U.; Ecker, J.R.; Belostotsky, D.A. Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the *Arabidopsis* transcriptome. *Cell*, 131, 1340-1353, 2007.
- Chen, W.; Bocker, W.; Brosius, J.; Tiedge, H. Expression of neural BC200 RNA in human tumours. *J Pathol*, 183(3):345-51, 1997.
- Chen, E.S.; Sutani, T.; Yanagida, M. Cti1/C1D interacts with condensin SMC hinge and supports the DNA repair function of condensin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* , 101: 8078–8083, 2004.

- Cheng, Y.; Kato, N.; Wang, W.; Li, J.; Chen, X. Two RNA binding proteins Hen4 and HUA1, act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell*, 4: 53-66, 2003.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. e Felix, G. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, 18(2): 465-476, 2006.
- Chinchilla, D.; Zipfel, C.; Robatzek, S.; Kemmerling, B.; Nürnberger, T.; Jones, J. D.; Felix, G. e Boller, T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448(7152): 497-500, 2007.
- Chisholm, S.; Coaker, G.; Day, B. and Staskawicz, B. J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4): 803-814, 2006.
- Cléry A.; Blatter, M.; H-T Allain, F. RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Science*, 18:290–298, 2008.
- Cobbe N. & Heck M.M. SMCs in the world of chromosome biology: From prokaryotes to higher eukaryotes. *J. Struct. Biol.*, 129:123–143, 2000.
- Collart, M.A. Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene*, 313:1–16, 2003.
- Collart M.A. & Timmers H.T. The eukaryotic Ccr4-not complex: A regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 77:289–322, 2004.
- Collier, B.; Goobar-Larsson, L.; Sokolowski, M.; Schwartz, S. Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogenous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *J Biol Chem*, 273:22648–22656, 1998.
- da Silva, A. C.; Ferro, J. A.; Reinach, F. C.; Farah, C. S.; Furlan, L. R.; Quaggio, R. B.; Monteiro- Vitorello, C.B.; Van Sluys, M.A.; Almeida, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417:459-463, 2002.
- Deng, D.; Yan, C.; Pan, X.; Mahfouz, M.; Wang, J.; Zhu, J.; Shi, Y.; Yan, N. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. *Science*, 335: 720-723, 2012.
- Deo, R.C.; Bonanno, J.B.; Sonenberg, N., and Burley, S.K. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell*, 98: 835–845, 1999.
- Deo, R.; Sonenberg, N.; Burley, S. K. X-ray structure of the human hyperplastic discs protein: An ortholog of the C-terminal domain of poly(A)-binding protein. *PNAS*, 98 (8): 4414–4419, 2001.
- Desai, N.; Lee, J.; Upadhyya, R.; Chu, Y.; Moir, R.D. and Willis, I.M. Two steps in Maf1-dependent repression of transcription by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* 280, 6455–6462, 2005.
- de Souza, T. A. Caracterização molecular da interação entre proteínas de citos envolvidas no controle da expressão gênica e a proteína efetora PthA, indutora do cancro cítrico. 2010. 88 f.

Dissertação [Mestrado em Genética e Biologia Molecular] – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas. 2010.

de Souza, T.A.; Soprano, A.S.; Lira, N.P.V.de.; Quaresma, A.J.C.; Pauletti, B.A.; Paes Leme, A. F.; Benedetti, C. E. The TAL Effector PthA4 Interacts with Nuclear Factors Involved in RNA-Dependent Processes Including a HMG Protein That Selectively Binds Poly(U) RNA. PLoS ONE 7(2): e32305. doi:10.1371/journal.pone.0032305, 2012.

Dias, S.M.; Wilson, K.F.; Rojas, K.S.; Ambrosio, A.L.; Cerione, R.A. The molecular basis for the regulation of the cap-binding complex by the importins. Nat. Struct. Mol. Biol., 16: 930–937, 2009.

Dias, S.M.; Cerione, R.A.; Wilson, K.F. Unloading RNAs in the cytoplasm: An “importin” task. Nucleus, 1: 139–143, 2010.

Domingues, M. N.; Souza, T. A.; Cernadas, R. A.; Oliveira, M. L. P.; Docena, C.; Farah, S. C.; Benedetti, C. E. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. Molecular Plant Pathology, 11 (5), 663-675, 2010.

Domingues, Noronha. M.; Campos, B. M.; de Oliveira, M. L. P.; de Mello, U. Q.; Benedetti, C. E. TAL effectors target the C-terminal domain of RNA polymerase II (CTD) by inhibiting the prolyl-isomerase activity of a CTD-associated cyclophilin. PLoS ONE, 2012 – *in press*.

Duan, Y.P.; CASTAÑEDA, A.; ZHAO, G.; ERDOS, G.; GABRIEL, D.W. expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. Mol Plant-Microbe Interact, 12 (6):556-560, 1999.

Dunbrack, Jr. and Cohen F. E. Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences. Protein Science, 6:1661-1681, 1997.

Dunger, G; Garofalo, C. G; Gottig, N; Garavaglia, B. S; Pereda, M. C; Farah, C. S; Orellano, E. G; Ottado, J. Analysis of three *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* effector proteins in pathogenicity and their interactions with host plant proteins. Mol. Plant Pathology, DOI: 10.1111/J.1364-3703.2012.00797.X, 2012.

Edwards, D.; Murrey, J.A.H.; Smith, A.G. Multiple genes coding the conserved CCAAT-box transcription complex are expressed in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 117:1015-1022, 1998.

Erdemir, T.; Bilican, B.; Oncel, D.; Goding, C.; Yavuzer, U. DNA damage-dependent interaction of the nuclear matrix protein C1D with translin-associated factor X (TRAX). Journal of Cell Science, 115 (1): 207-215, 2002a.

Erdemir, T.; Bilican, B.; Cagatay, T.; Goding, C.R.; Yavuzer, U. *Saccharomyces cerevisiae* C1D is implicated in both non-homologous DNA end joining and homologous recombination. Mol Microbiol 46: 947–957, 2002b.

Fabian, M.R.; Mathonnet, G.; Sundermeier, T.; Mathys, H.; Zipprich, J.T. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. Mol. Cell, 6: 868–880, 2009.

Fedoroff, N. V. RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? Science, 5:452–459, 2002.

- Fujikawa, T., Ishihara, H., Leach, J.E. and Tsuyumu, S. Suppression of defense response in plants by *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19, 342–349, 2006.
- Gajda, A.; Towpik, J.; Steuerwald, U.; Mu, C. W.; Lefebvre, O. and Boguta, M. Full repression of RNA polymerase III transcription requires interaction between two domains of its negative regulator Maf1. *J. Biol. Chem.*, 285: 35719–35727, 2010.
- Gamarnik, A.V.; Andino, R. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the noncoding region of poliovirus RNA. *RNA*, 3:882–892, 1997.
- Ghavidel, A. and Schultz, M.C. Casein kinase II regulation of yeast TFIIIB is mediated by the TATA-binding protein. *Genes Dev.* 11, 2780–2789, 1997.
- Ge, H.; Zhou, D.; Tong, S.; Gao, Y.; Teng, M.; Niu, L. Crystal structure and possible dimerization of the single RRM of human PABPN1. *Proteins*, 1539-1545, 2008.
- Gietz, R.D., Woods, R.A., Manivasakam, P., Schiestl, R.H. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. *Technical Tips Online*, 1998.
- Gietz, R. D. & Woods, R. A.. Transformation of yeast by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Methods in Enzymology*, 350: 87-96, 2002.
- Gottig, N.; Garavaglia, B. S.; Garofalo, C. G.; Zimaro, T.; Sgro, G. G.; Ficarra, F. A.; Dunger, G.; Daurelio, L. D.; Thomas, L.; Gehring, C.; Orellano, E. G. and J. Ottado. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Mendez-Vilas (Ed). 2010
- Gómez-Gómez, L. e Boller, T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, 5(6): 1003-1011, 2000.
- Goodfellow, S.J.; Graham, E.L.; Kantidakis, T.; Marshall, L.; Coppins, B.A.; Oficjalska-Pham, D. Regulation of RNA polymerase III transcription by Maf1 in mammalian cells. *J. Mol. Biol.*, 378:481-91, 2008.
- Graczyk, D.; Debskia, J; Muszynska, G; Bretner, M; Lefebvre, O; Boguta, M. Casein kinase II-mediated phosphorylation of general repressor Maf1 triggers RNA polymerase III activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:4926–4931, 2011.
- Graham, J.H., GOTTWALD, T.R., CUBERO, J., ACHOR, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker *Mol Plant Pathol.* v.5, p.1-15, 2004.
- Grasser, K.D.; Launholt, D.; Grasser, M. High mobility group proteins of the plant HMGB family: dynamic chromatin modulators. *Biochim Biophys Acta*, 1769: 346–357, 2007.
- Grummt, I. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.*, 17, 1691–1702, 2003.

- Gupta, G.D; Makde, R.D; Kamdar, R.P; d'Souza, J.S; Kulkarni, M.G; Kumar, V; Rao, B.J. Co-expressed recombinant human Translin-Trax complex binds DNA. *FEBS Lett.*, 579 (14):3141-6, 2005.
- Gürlebeck, D.; Szurek, B.; Bonas, U. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.*, 42:175-187, 2005.
- Gusmaroli, G.; Tonelli, C.; Mantovani, R. Regulation of the CCAAT-binding NF-Y subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 264:173-185. 2001.
- Gusmaroli, G.; Tonelli, C.; Mantovani, R. Regulation of novel members of the *Arabidopsis thaliana* CCAAT-binding nuclear factor Y subunit. *Gene*, 283:41-48, 2002.
- Han, J. R.; W. Gu and N. B. Hecht. Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3' untranslated regions of transported brain mRNAs. *Biol. Reprod.*, 53: 707–717, 1995a.
- Hirano, T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes & Dev.*, 16:399–414, 2002.
- Hong, F; Attia, K; Wei, C; Li, K; He, G; Su, W; Zhang, Q; Qian, X; Yang, J. Overexpression of the rFCA RNA Recognition Motif Affects Morphologies Modifications in Rice (*Oryza sativa* L.). *Biosci Rep.*, 2007.
- Hooft, R.W.W.; Vriend, G.; Sander, C.; Abola, E.E. Errors in protein structures. *Nature*, (381): 272.a, 1996.
- Hooft, R.W.W.; Sander, C. and Vriend G. The PDBFINDER database: A summary of PDB, DSSP and HSSP information with added value. *CABIOS/Bioinformatics*, (12): 525-529 b, 1996.
- Hooft, R.W.W.; Sander, C.; Vriend, G. Positioning hydrogen atoms by optimizing hydrogen-bond networks in protein structures. *Proteins*, (4): 363-376 c, 1996.
- Hou, X.; Xie, K.; Yao, J.; Qi, Z.; Xiong, L. A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6410–6415, 2009.
- Huber, A.; Bodenmiller, B.; Uotila, A.; Stahl, M.; Wanka, S.; Gerrits, B. Characterization of the rapamycinsensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev*, (23): 1929-43, 2009.
- Ishida, R; Okado, H; Sato, H; Shionoiri, C; Aoki, K; Kasai, M. A role for the octameric ring protein, Translin, in mitotic cell division. *FEBS Lett.*, 525(1-3):105-10, 2002.
- Jacinto, E. & Hall, M. N. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 4, pp. 117–126, 2003.
- James, P.; Halladay, J.; Craig, E.A. Genomics libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, v. 144, p. 1425-1436, 1996.

- Joachims, M.; Van Breugel, P. C. & Lloyd, R. E. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *Journal of Virology*, 73, 718-727, 1999.
- Johnson, S.S.; Zhang, C.; Fromm, J.; Willis, I.M.; Johnson, D.L. Mammalian Maf1 is a negative regulator of transcription by all three nuclear RNA Polymerases. *Molecular Cell*, 26: 367-379, 2007.
- Jones, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J.Mol.Biol.*, (292): 195-202, 1999.
- Kahvejian A., Roy, G., and Sonenberg, N. The mRNA closed-loop model: The function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66: 293–300, 2001.
- Kanamori, H. e Tsuyumu, S. Comparison of nucleotide sequences of canker-forming and non-canker-forming pthA homologues in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Annu Phytopathol Soc Jpn*, 64:462-470, 1998.
- Kantidakis, T.; Ramsbottom, B., A.; Birch, J., L.; Dowding, S., N.; White, R., J. mTOR associates with TFIIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *PNAS*, (107): 11823-11828, 2010.
- Kay, S.; Hahn, S.; Marois, E.; Hause, G.; Bonas, U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318: 648-651, 2007.
- Kay, S. e Bonas, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol*, 12(1): 37-43, 2009.
- Keller, R.W.; Kühn, U.; Aragón, M.; Bornikova, L.; Wahle, E. & Bear, DG. The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. *J Mol Biol.*, Vol. 297, No.3, (March), pp. 569-583, 2000.
- Kerekatte, V., Keiper, B. D., Badorff, C., Cai, A., Knowlton, K. U. & Rhoads, R. E. Cleavage of poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *Journal of Virology*, 73, 709-717, 1999.
- King, R.D and Sternberg, MJE. Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Sci.*, (5): 2298- 2310, 1996.
- Koshland, D., and A. Strunnikov. Mitotic chromosome condensation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12:305–333, 1996.
- Krieger, E.; Joo, K.; Lee, J.; Raman, S.; Thompson, J.; Tyka, M.; Baker, D.; Karplus, K. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins*, (77) Suppl 9,114-122, 2009.
- Krohn, N.M.; Yanagisawa, S.; Grasser, K.D. Specificity of the stimulatory interaction between chromosomal HMGB proteins and the transcription factor Dof2 and its negative regulation by protein kinase CK2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, 277: 32438–324344, 2002.

- Kühn, U. and Wahle, E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1678: 67-84, 2004.
- Kuhn, U. & Pieler, T. J. *Xenopus* poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *Mol. Biol.*, 256, 20–30, 1996.
- Kwapisz, M.; Smagowicz, W.J.; Oficjalska, D.; Hatin, I.; Rousset, J.P.; Zoladek, T.; Boguta, M. Up-regulation of tRNA biosynthesis affects translational readthrough in *maf1-delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 42: 147-152, 2002.
- Kwon, Y. K. and Hecht, N. B. Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation. *Mol. Cell. Biol.*, 13(10), 6547–6557, 1993.
- Lacava, J.; Houseley, J.; Saveanu, C.; Petfalski, E.; Thompson, E.; Jacquier, A.; and Tollervey, D. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713-724, 2005.
- Lee, J.; Moir, R.D.; and Willis, I.M. Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway. *J. Biol. Chem.*, 284, 12604–12608, 2009.
- Lemay, J.F.; D'Amours, A.; Lemieux, C.; Lackner, D.H.; St-Sauver VG, Bahler J, Bachand F. The nuclear poly(A)-binding protein interacts with the exosome to promote synthesis of noncoding small nucleolar RNAs. *Mol Cell*, 37:34-45, 2010.
- Lorkovic, Z.J. & Barta, A. Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 30:623-635, 2002.
- Lotan, T.; Ohto, M.; Yee, K.M.; West, M.A.L.; Lo, R.; Kwong, R.W.; Tamagishi, K.; Fisher, R.L.; Goldberg, R.B.; Harada, J.J. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93, 1195–1205, 1998.
- Liu, Y.; Ye, X.; Jiang, F.; Liang, C.; Chen, D. C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science* 325: 750–753, 2009.
- Macreadie IG, Jagadish MN, Azad AA, Vaughan PR. Versatile cassettes designed for the copper inducible expression of proteins in yeast. *Plasmid* 21: 147-150, 1989.
- Mak, A.N.; Bradley, P.; Cernadas, R.A.; Bogdanove, A.J.; and Stoddard, B.L. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, 335, 716–719, 2012.
- Mandel, C.R.; Bai, Y.; Tong, L. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci*, 65: 1099–1122, 2008.
- Marshall, L.; White, R.J. Non-coding RNA production by RNA polymerase III is implicated in cancer. *Nat Rev Cancer*, 8(12):911-4, 2008.
- Marois, E.; Ackerveken, G.V.; Bonas, U. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hyperthrophy in the susceptible host. *Mol Plant Microbe Interact*, 15 (7):637-646, 2002.

- Meinke D. A homeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science*, 258, 1647–1650, 1992.
- Michels, A.A. MAF1: a new target of mTORC1. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 487–491, 2011.
- Michels, A.A.; Robitaille, A.M.; Buczynski-Ruchonnet, D.; Hodroj, W.; Reina, J.H.; Hall, M.N. and Hernandez, N. mTORC1 directly phosphorylates and regulates human MAF1. *Mol. Cell Biol.* 30, 3749–3757, 2010.
- Miyoshi, K.; Ito, Y.; Serizawa, A.; Kurata, N. OsHAP3 genes regulate chloroplast biogenesis in rice. *Plant J.*, 36: 532–540, 2003.
- Moir, R.; D.; Lee, JaeHoon.; Haeusler, R., A.; Desai, N.; Engelke, D., R.; Willis, I., M. Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proc Natl Acad Sci USA* (103) 41: 15044-15049, 2006.
- Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. A simple cipher governs TAL effector-DNA recognition. *Science*, 326, 1501, 2009.
- Mueckstein, U.; Hofacker, I.L. and Stadler, P.F. Stochastic pairwise alignments. *Bioinformatics*, (18): Suppl.2 153-160, 2002.
- Mukhtar, M.S.; Carvunis, A.R.; Dreze, M.; Epple, P.; Steinbrenner, J. Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science*, 333: 596–601, 2011.
- Murakami, M. T.; Sforça, M. L.; Neves, J. L.; Paiva, J. H.; Domingues, M. N.; Pereira, A. L. A.; Zeri, A. C. e Benedetti, C. E. The repeat domain of the type III effector protein PthA shows a TPR-like structure and undergoes conformational changes upon DNA interaction. *Proteins*, 78(16): 3386-3395, 2010.
- Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15(3): 473-497, 1962.
- Murawski, M.; Szcześniak, B.; Zoladek, T.; Hopper, A.K.; Martin, N.C.; Boguta M. *maf1* mutation alters the subcellular localization of the Mod5 protein in yeast. *Acta Biochim Pol* 41(4):441-8, 1994.
- Musco, G.; Stier, G.; Joseph, C.; Castiglione Morelli, M.A.; Nilges, M., Gibson; T.J., and Pastore, A. Three-dimensional structure and stability of the KH domain: Molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*, 85: 237–245, 1996.
- Nayeem, A.; Sitkoff, D.; Junior, S.K. A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein Science*, (15): 808-824, 2006.
- Nemeth, A.; Krause, S.; Blank, D.; Jenny, A.; Jenö, P.; Lustig, A. and Wahle, E. Isolation of genomic and cDNA clones encoding poly(A) binding protein II. *Nucl. Acids Res.* 23, 4034-4041, 1995.
- Neves, M.; Trombin, V. G.; Milan, P.; Lopes, F. F.; Cressoni, F.; Kalaki, R.O Retrato da Citricultura Brasileira. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010.

- Nürnberg, T.; Brunner, F.; Kemmerling, B. and Piater, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198:249–266, 2004.
- Oficjalska-Pham, D.; Harismendy, O.; Smagowicz, W.,J.; Gonzalez de Peredo, A.; Boguta, M.; Sentenac, A.; Lefebvre, O. General repression of RNA polymerase III transcription is triggered by protein phosphatase type 2A-mediated dephosphorylation of Maf1. *Mol Cell*, (5):623-32, 2006.
- Olsten, M.E. and Litchfield, D.W. Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochem. Cell Biol.* 82, 681–693, 2004.
- Ostareck D.H.; Ostareck-Lederer A.; Shatsky, I.N.; Hentze, M.W. Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation. The 39UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell*, 104:281–290, 2001.
- Paule, M.R. and White, R.J. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28, 1283–1298, 2000.
- Perreault, A.; Lemieux, C., and Bachand, F. Regulation of the nuclear poly(A)-binding protein by arginine methylation in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 282, 7552–7562, 2007.
- Pfalz, J.; Bayraktar, O.A.; Prikryl, J.; Barkan, A. Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 59 and 39 mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J*, 28: 2042–2052, 2009.
- Pluta, K.; Lefebvre, O.; Martin, N.C.; Smagowicz, W.J.; Stanford, D.R.; Ellis, S.R. Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, (21): 5031-40, 2001.
- Prasad, R.; Liu, Y.; Deterding, L.J.; Poltoratsky, V.P.; Kedar, P.S. HMGB1 is a cofactor in mammalian base excision repair. *Mol Cell* 27: 829–841, 2007.
- Prikryl, J.; Rojas, M.; Schuster, G.; Barkan, A. Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 415–420, 2011.
- Qiu, J. and Elber, R. SSALN: An alignment algorithm using structure-dependent substitution matrices and gap penalties learned from structurally aligned protein pairs. *Proteins*, (62): 881-891., 2006.
- Reina, J.H.; Azzouz, T.N.; and Hernandez, N. Maf1, a new player in the regulation of human RNA polymerase III transcription. *PLoS ONE* 1, e134, 2006.
- Roberts, D.N.; Wilson, B.; Huff, J.T.; Stewart, A.J., and Cairns, B.R. Dephosphorylation and genome-wide association of Maf1 with Pol III-transcribed genes during repression. *Mol. Cell*, 22, 633–644, 2006.
- Rollins J.; Veras, I.; Cabarcas, S.; Willis, I.; Schramm, L. Human Maf1 negatively regulates RNA polymerase III transcription via the TFIIIB family members Brf1 and Brf2. *Int. J. Biol. Sci.*, 3 (5): 292-302, 2007.
- Römer, P.; Hahn, S.; Jordan, T.; Strauss, T.; Bonas, U. & Lahaye, T. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, 318, 645-648, 2007.

- Römer, P.; Strauss, T.; Hahn, S.; Scholze, H.; Morbitzer, R.; Grau, J.; Bonas, U. & Lahaye, T. Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiol.* 150, 1697–1712, 2009.
- Rybak, M.; Minsavage, G.V.; Stall, R.E. and Jones, J.B. Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in a heterologous expression host. *Mol. Plant Pathol.* 10, 249–262, 2009.
- Sambrook, J.; Russel, D.W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd ed, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulso, A.R. n, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.74: 5463-5467, 1977.
- Sato, H. & Maquat, L.E. Remodeling of the pioneer translation initiation complex involves translation and the karyopherin importin beta. *Genes Dev* 23: 2537–2550, 2009.
- Schaad, N.W.; Postnikova, E.; Lacy, G.; Sechler, A.; Agarkova, I.; Stromberg, P.E.; Stromberg, V.K. and Vidaver, A.K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 2, 690–695. doi: 10.1016/j.syapm.2006.08.001, 2006.
- Shor, B.; Wu, J.; Shakey, Q.; Toral-Barza, L.; Shi, C.; Follettie, M. and Yu, K. Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 285, 15380–15392, 2010.
- Schornack, S.; Meyer, A.; Römer, P.; Jordan, T. e Lahaye, T. Gene-for-genemediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J Plant Physiol*, 163(3): 256-272, 2006.
- Schultz, M.C. DNA damage regulation of the RNA components of the translational apparatus: new biology and mechanisms. *IUBMB Life* 55, 243–247, 2003.
- Shiotani, H.; Fujikawa, T.; Ishihara, H.; Tsuyumu, S. and Ozaki, K. A *pthA* homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. *J. Bacteriol.* 189, 3271–3279, 2007.
- Siomi H.; Matunis, M.J.; Michael, W.M. and Dreyfuss, G. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.*, 21, 1193–1198, 1993.
- Strunnikov, A. SMC proteins and chromosome structure. *Science*, 8: 454-459, 1998.
- Strunnikov, A. & Jessberger, R. Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins. *FEBS, Minireview*, 263, 6-13, 1999.
- Sun, X.; Stall, R. E.; Jones, J. B.; Cubero, J.; Gottwald, T. R.; Graham, J. H.; Dixon, W. N.; Schubert, T. S.; Chaloux, P. H.; Stromberg, V. K.; Lacy, G. H. and Sutton, B. D. Detection and characterization of a new strain of citrus bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Dis.* 88:1179-1188, 2004.
- Swanson M.S. Function of nuclear pre-mRNA/mRNA binding proteins. In Lamond, A. (ed.), *Pre-mRNA processing*. R.G.Landes Publishers, Gergetown, TX, pp. 18–3, 1995.

- Szurek, B.; Marrois, E.; Bonas, U.; van den Ackerveken, G. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.*, 26:523-534, 2001.
- Szurek, B.; Rossier, O.; Hause, G. & Bonas, U. Type III dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.*, 46, 13–23, 2002.
- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M. T. e Gabriel, D. W. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol Plant Microbe Interact* 5(3): 204-213, 1992.
- Swarup, S.; De Feyter, E.; Brlansky, R.H.; Gabriel, D.W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology*, 81:802-809, 1991.
- Tampakaki, A.P, Fadouloglou, V. E.; Gazi, A. D.; Panopoulos, N . J. and Kokkinidis, M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol*, 6, 805-16, 2004.
- Towpik ,J.; Graczyk, D.;Gajda, A.; Lefebvre, O.; Boguta M. Derepression of RNA polymerase III transcription by phosphorylation and nuclear export of its negative regulator, Maf1. *J Biol Chem* 283:17168–17174, 2008.
- Tucker, M.; Valencia-Sanchez, M. A.; Staples, R. R.; Chen, J.; Denis C. L. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104: 377–386, 2001.
- Ueda, T. & Yoshida, M. HMGB proteins and transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 1799: 114–118, 2010.
- Upadhyya, R.; Lee, J.; Willis I. Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. *Mol Cell.*, (10): 1489-94, 2002.
- Vanacova, S.; Wolf, J.; Martin, G.; Blank, D.; Dettwiler, S.; Friedlein, A.; Langen, H.; Keith, G. and Keller, W. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol.* 3, e189. 10.1371/journal.pbio.0030189, 2005.
- Vannini, A.; Ringel, R.; Kusser, A. G.; Berninghausen, O.; Kassavetis, G. A.; Cramer, P. Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell*, (143): 59-70, 2010.
- Verniere, C.; Hartung, J.S.; Pruvost, O.P.; Civerolo, E.L.; Alvarez, A.M.; Maestri, P.; Luisetti, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 477-487, 1998.
- Xu, H.; Faber, C.; Uchiki, T.; Racca, J.; Dealwis, C. Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I define gemcitabine diphosphate binding and subunit assembly. *PNAS.*,. 103(11): 4028-4033.
- Wang, S.W., Stevenson, A.L., Kearsley, S.E., Watt, S., and Bahler, J. (2008). Global role for polyadenylation-assisted nuclear RNA degradation in posttranscriptional gene silencing. *Mol. Cell. Biol.*, 28, 656–665, 2006.

- Wang, G. and Dunbrack, R.L Jr. PISCES: a protein sequence culling server. *Bioinformatics*, (19): 1589-1591, 2003.
- Warner, JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, (24): 437-440, 1999.
- Wei, Y.; Tsang, C.K.; Zheng, X.F. Mechanisms of regulation of RNA polymerase III dependent transcription by TORC1. *EMBO J*, 28:2220-2230, 2009.
- Wei, Y. and Zheng, X.F. Maf1 regulation. A model of signal transduction inside the nucleus. *Nucleus*, (1): 162-165, 2010.
- Weiss, I.M. & Liebhaber, S.A. Erythroid cell-specific mRNA stability elements in the alpha 2-globin 3' nontranslated region. *Mol Cell Biol* 15:2457-2465, 1995.
- West, M.A.L.; Yee, K.M.; Danao, J.; Zimmerman, J.L.; Fischer, R.L.; Goldberg, R.B.; Harada, J.J. LEAFY COTYLEDON1 is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 6, 1731-1745, 1994.
- White, R.J. Control of rRNA and tRNA production is closely related to cell growth. In *Cell Growth; Control of Cell Size*. Monograph 42. Edited by Hall MN, Raff M, Thomas G. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 371-412, 2004.
- Williams-Carrier, R.; Kroeger, T.; Barkan, A. Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA*, 14: 1930-1941, 2008.
- Willis, I.M.; Desai, N. and Upadhyaya, R. Signaling repression of transcription by RNA polymerase III in yeast. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 77, 323-353, 2004.
- Winter, A.G.; Sourvinos, G.; Allison, S.J.; Tosh, K.; Scott, P.H.; Spandidos, D.A.; White, R.J. RNA polymerase III transcription factor TFIIIC2 is overexpressed in ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(23):12619-24, 2000.
- White, R.J. RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:69-78, 2005.
- Yang, Y. e Gabriel, D.W. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol Plant-Microbe Interact*, 8:627-631, 1995 b.
- Yang, S; Hecht, NB. Translin associated protein X is essential for cellular proliferation. *FEBS Lett*, 576 (1-2): 221-5, 2004.
- Yeap, B.B.; Voon, D.C.; Vivian, J.P.; McCulloch, R.K.; Thomson, A.M. Novel binding of HuR and poly(C)-binding protein to a conserved UC-rich motif within the 3'-untranslated region of the androgen receptor messenger RNA. *J Biol Chem*, 277: 27183-27192, 2002.
- Ye, X.; Huang, N.; Liu, Y.; Paroo, Z.; Huerta, C. Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nat Struct Mol Biol* 18: 650-657, 2011.

7. ANEXOS

I – Artigo publicado em fevereiro de 2012 na revista PLoS One, no qual participo como co-primeira autora.

II – Artigo publicado em março de 2011 na revista JBC (Journal of Biological Chemistry), no qual participo como terceira autora.

The TAL Effector PthA4 Interacts with Nuclear Factors Involved in RNA-Dependent Processes Including a HMG Protein That Selectively Binds Poly(U) RNA

Tiago Antonio de Souza¹, Adriana Santos Soprano¹, Nayara Patricia Vieira de Lira, Alexandre José Christino Quaresma², Bianca Alves Pauletti, Adriana Franco Paes Leme, Celso Eduardo Benedetti*

Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brazil

Abstract

Plant pathogenic bacteria utilize an array of effector proteins to cause disease. Among them, transcriptional activator-like (TAL) effectors are unusual in the sense that they modulate transcription in the host. Although target genes and DNA specificity of TAL effectors have been elucidated, how TAL proteins control host transcription is poorly understood. Previously, we showed that the *Xanthomonas citri* TAL effectors, PthAs 2 and 3, preferentially targeted a citrus protein complex associated with transcription control and DNA repair. To extend our knowledge on the mode of action of PthAs, we have identified new protein targets of the PthA4 variant, required to elicit canker on citrus. Here we show that all the PthA4-interacting proteins are DNA and/or RNA-binding factors implicated in chromatin remodeling and repair, gene regulation and mRNA stabilization/modification. The majority of these proteins, including a structural maintenance of chromosomes protein (CsSMC), a translin-associated factor X (CsTRAX), a VirE2-interacting protein (CsVIP2), a high mobility group (CsHMG) and two poly(A)-binding proteins (CsPABP1 and 2), interacted with each other, suggesting that they assemble into a multiprotein complex. CsHMG was shown to bind DNA and to interact with the invariable leucine-rich repeat region of PthAs. Surprisingly, both CsHMG and PthA4 interacted with PABP1 and 2 and showed selective binding to poly(U) RNA, a property that is novel among HMGs and TAL effectors. Given that homologs of CsHMG, CsPABP1, CsPABP2, CsSMC and CsTRAX in other organisms assemble into protein complexes to regulate mRNA stability and translation, we suggest a novel role of TAL effectors in mRNA processing and translational control.

Citation: de Souza TA, Soprano AS, de Lira NPV, Quaresma AJC, Pauletti BA, et al. (2012) The TAL Effector PthA4 Interacts with Nuclear Factors Involved in RNA-Dependent Processes Including a HMG Protein That Selectively Binds Poly(U) RNA. PLOS ONE 7(2): e32305. doi:10.1371/journal.pone.0032305

Editor: Jianming Qiu, University of Kansas Medical Center, United States of America

Received: October 3, 2011; **Accepted:** January 26, 2012; **Published:** February 22, 2012

Copyright: © 2012 de Souza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (www.fapesp.br) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (www.cnpq.br), grant numbers 2010/00634-1 and 470410/2008-6, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: celso.benedetti@lnbio.org.br

† These authors contributed equally to this work.

‡ Current address: Department of Cell Biology and Cancer Center, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, United States of America

Introduction

Plant pathogenic bacteria have developed sophisticated mechanisms to suppress defenses and modulate transcription of host plants to cause disease. Such mechanisms usually involve the transfer of the so-called bacterial type-III effectors to the interior of the plant cell by the type-III secretion system [1]. The transcriptional activator-like (TAL) effectors of the AvrBs3/PthA protein family are good examples of bacterial proteins that are targeted to the nucleus of plant cells to manipulate gene expression [2]. These proteins have the ability to activate transcription in host and non host plants through the recognition of specific promoter regions of target genes [3–6]. The interaction of a TAL effector with its target DNA is mediated by the repeat domain of the protein, which comprises a variable region made of nearly identical tandem repeats of 34 amino acids that define the DNA specificity [7–9].

In the interaction of citrus plants with *Xanthomonas citri*, the causal agent of citrus canker, it has been shown that the TAL

effector protein PthA is not only required for canker elicitation but sufficient to promote cell hypertrophy [10–14]. However, while target genes and DNA specificity of TAL effectors have been elucidated in great detail in the past few years [2,15], how TAL effectors control transcription in the host is not yet clear.

To address this question, and considering that the activity of TAL effectors as transcriptional activators would likely depend on the action of host nuclear factors, we performed numerous two-hybrid screenings of a sweet orange (*Citrus sinensis*) cDNA library using different variants of PthAs as baits. Initial screenings using PthAs 2 and 3 as baits revealed a number of interactions with citrus proteins implicated in nuclear import, transcriptional regulation and DNA repair mechanisms [16]. Among the isolated proteins, a citrus protein complex comprising a cyclophilin (CsCYP), a thioredoxin (CsTDX) and the CsUEV/UBC13 heterodimer, involved in K63-linked ubiquitination and DNA repair, was characterized [16]. Surprisingly, while all PthA variants strongly interacted with the sweet orange importin- α ,

required for their nuclear import, PthAs 1 and 4 interacted weakly with the citrus protein complex compared to PthAs 2 and 3 [16]. This fact suggested that the PthA variants, although highly homologous to each other, have preferential protein targets in citrus cells.

In line with this idea, and to gain further insights into the mode of action of PthA proteins as transcription factors, we performed two-hybrid screening using PthA4 as bait, which is considered the main PthA variant required for canker elicitation [12,14]. Here, we describe new interacting partners of PthA4 and show that all of them are homologous to nuclear factors involved in chromatin remodeling and repair, transcriptional regulation and mRNA stabilization/modification. Additionally, we show that the majority of the PthA4 interactors recognize other PthA variants and interact with each other, indicating the existence of an as yet uncharacterized citrus multiprotein complex. In this work, we characterize in more detail the features of one of the components of this multiprotein complex, a high-mobility group protein (CsHMG) that associates with all PthA variants and is homologous to the Arabidopsis HMGB1 involved in cell growth [17].

Although HMG proteins are known to play important roles as DNA-bending transcriptional factors by facilitating the recruitment and assembly of nuclear proteins involved in chromatin remodeling, transcriptional regulation and DNA repair [18–22], they were recently shown to bind branched RNA molecules and to possibly participate in mRNA processing [23]. We show here that, in addition to binding to double strand DNA, CsHMG selectively binds to poly(U) RNA, a property that is novel among HMG-box proteins. Furthermore, we surprisingly found that PthA4 also selectively binds to poly(U) RNA and that both CsHMG and PthA4 interact with two poly(A)-binding proteins (PABP1 and 2), which are connected to the citrus multiprotein complex via interactions with a structural maintenance of chromosomes protein (CsSMC) and a translin-associated factor X (CsTRAX). Thus, the results shown here suggest that CsHMG and PthA4 may play roles beyond that of an architectural DNA-bending factor and transcriptional activator, respectively, including mRNA stabilization and processing.

Materials and Methods

Yeast two-hybrid assays

Yeast two-hybrid screenings were performed using the PthA4 protein cloned into the pOBD vector as bait and a *C. sinensis* leaf cDNA library cloned into the pOAD vector as prey [16]. The initial screening was performed on synthetic complete medium lacking tryptophan, leucine and histidine (SC -Trp -Leu -His). Isolated colonies were picked and subsequently grown for 5 days at 30°C on SC lacking Trp, Leu, His and adenine (SC -Trp -Leu -His -Ade). pOAD plasmids recovered from positive clones were sequenced and, when required, the full-length citrus cDNAs were obtained by reverse-transcription PCR and subcloned downstream of and in frame with the fusion proteins Gal4AD (pOAD), Gal4BD (pOBD), GST (pGEX-4T1) and 6xHis (pET28). The invariable leucine-rich repeat (LRR) domain of PthAs was amplified by PCR and subcloned into the *NdeI/NdeI* sites of pOBD and into the *Sall/NdeI* sites of pGEX4T-1.

Protein-protein interactions were further verified by yeast two-hybrid assays using baits (pOBDs) and full-length preys (pOADs), including controls (empty pOBD+pOAD-prey and pOBD-bait+empty pOAD), as previously described [16]. The cells were grown on SC -Trp -Leu -His in the presence or absence of adenine and containing 0, 3 or 5 mM 3-aminotriazole (3AT) for 5 days at 30°C.

Protein purification and GST pulldown

The full-length 6xHis-tagged PthAs (1 to 4) and a derivative carrying 5.5 repeat units plus the C-terminus (PthA5.5rcp+CT) were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells and purified by affinity chromatography, as described previously [16]. Prey proteins and the PthA LRR were subcloned into pGEX4T1 and expressed in BL21(DE3) cells upon IPTG induction for 3 h at 30°C. Cell pellets were suspended in PBS buffer containing 1 mM DTT and lysozyme (1.0 mg/ml). After sonication and centrifugation, soluble fractions of GST fusions were immobilized on glutathione resin and non-bound proteins were removed with four PBS washes. Approximately 50 µg of the 6xHis-tagged proteins were incubated with the resins containing GST and GST-fusions for 2 h at 4°C. The beads were washed four times with PBS then eluted with reduced glutathione buffer. Eluted fractions were resolved on 10% and 13% SDS-PAGE gels. Proteins were transferred onto nylon membranes, probed with the anti-PthA (1:5000), anti-CsHMG (1:3000) or anti-GST (1:3000) sera and developed with the ECL kit (GE Healthcare).

CsHMG purification and antibody production

The full-length CsHMG, its HMG-box domain only (CsHMGΔNΔC) or the N- (CsHMGΔN) and C- (CsHMGΔC) terminal truncated derivatives were expressed in BL21(DE3) cells grown at 37°C in LB supplemented with kanamycin (50 µg/mL) to an OD_{600 nm} = 0.6, followed by induction with 0.4 mM IPTG for 3 h. Cells were harvested by centrifugation, suspended in binding buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) and incubated on ice with lysozyme (1.0 mg/ml) and sonicated. Clarified supernatants were loaded on a HiTrap chelating HP column (GE Healthcare). Eluted fractions were concentrated, treated with DNaseI (10 µg/mL) and RNase A (10 µg/mL) for 20 min at 4°C, and loaded on an ionic-exchange HiTrap heparin column. Protein fractions were eluted with phosphate buffer (20 mM phosphate, 50 mM NaCl, pH 6.6) and analyzed by SDS-PAGE. Purified CsHMG (~1 mg) was used to immunize rabbits for anti-serum production.

CsHMG detection in plant cell extracts

Six-month-old plants of sweet orange (*C. sinensis*) were obtained from certified nurseries and kept in a growth room at 25–28°C under 14 h/day fluorescent light. Etiolated epicotyls of sweet orange ‘Hamlin’ were obtained according to de Oliveira et al. [24]. Seeds of *Arabidopsis thaliana* Col-1 and T-DNA insertion line SAIL261_B02, corresponding to the heterozygous mutant *hmg-1* [17], were purchased from ABRC and grown in soil in a growth room at 18–22°C under a 16 h/day light regime. Plant materials were frozen and ground in liquid nitrogen and the powder was suspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 7.2) under slow agitation at 4°C. Cell debris and insoluble materials were separated by centrifugation at 5000 rpm at 4°C and the soluble fractions were analyzed by 13% SDS-PAGE gels and transferred onto nylon-membranes for Western-blot detection.

Sweet orange leaves were ground in phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 10 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100, 10 mM EDTA and 0.1 mM PMSF. The suspension was cleared by centrifugation and soluble proteins were incubated overnight at 4°C, under agitation, with the purified PthA2 and 4-GST fusions, or GST alone, immobilized on glutathione resins. Resins were washed four times with 20 resin volumes of extraction buffer at 4°C and bound proteins were resolved on 13% polyacrylamide SDS gels and probed with the anti-CsHMG serum.

Mass spectrometry analysis

Young leaves of sweet orange were macerated in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 15 mM imidazole, 25 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% Triton X-100, 0.1 mM PMSF) and cleared by centrifugation. Purified 6xHis-tagged CsSMC and CsTRAX, immobilized on a cobalt resin, were incubated with the citrus cell lysates overnight at 4°C, under agitation. The resins were washed four times with 20 resin volumes of lysis buffer at 4°C and bound proteins were resolved on 10% polyacrylamide SDS gels. Silver-stained bands were cut, reduced, alkylated and digested with trypsin. The resulting peptide mixtures were reconstituted in 0.1% formic acid and analyzed on an ETD enabled Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) connected to nanoflow liquid chromatography (LC-MS/MS) by an EASY-nLC system (Proxeon Biosystem) through a Proxeon nano-electrospray ion source. Peptides were separated on a 2–90% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid using a pre-column EASY-Column (2 cm × id 100 μm, 5 μm particle size) and an analytical column EASY-Column (10 cm × id 75 μm, 3 μm particle size) at a flow rate of 300 nl/min over 20 min. The nano-electrospray voltage was set to 1.7 kV and the source temperature was 275°C. All instrument methods for the Orbitrap Velos were set up in the data dependent acquisition mode. The full scan MS spectra (m/z 300–2000) were acquired in the Orbitrap analyzer after accumulation to a target value of 1e⁶. Resolution was set to r = 60,000 and the 20 most intense peptide ions with charge states ≥ 2 were sequentially isolated to a target value of 5,000 and fragmented in the linear ion trap by low-energy CID (normalized collision energy of 35%). The signal threshold for triggering an MS/MS event was set to 1000 counts. Dynamic exclusion was enabled with an exclusion size list of 500, exclusion duration of 60 s, and repeat count of 1. An activation q = 0.25 and activation time of 10 ms were used. Peak lists (mgf) were generated from the raw data files by the software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.) and searched against the citrus EST (>200,000 sequences) and citrus genome (13,000 unigenes) databases using engine Mascot v.2.3.01 (Matrix Science Ltd.), with carbamidomethylation as fixed modifications, oxidation of methionine as variable modification, one trypsin missed cleavage and a tolerance of 10 ppm for precursor ions and 1 Da for fragment ions. Only peptides with a minimum of five amino acid residues which showed significant threshold (p < 0.05) in Mascot-based score were considered in the analysis.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

EMSA was performed using 40 pmoles of double-stranded DNA from the citrus *pr5* promoter or derived from the multiple-

cloning site of the pBluescript plasmid vector (Stratagene). Purified full-length CsHMG (100 to 500 ng) was incubated on ice with the DNA fragments in binding buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10% glycerol e 1 mM EDTA, pH 7.5) for 15 min. Complexes were resolved on TBE-buffered non-denaturing 6% polyacrylamide gels and visualized by ethidium bromide staining. For the RNA-protein interactions, the oligoribonucleotides A-20, C-20, G-20, U-20 or the 5'-UUAUUAUUUUUUUUUUUUUU-3' probe were labeled with ³²P using 1 U of T4 PNK (Fermentas) and 20 μCi of [γ-³²P]-ATP. Labeled probes were purified and incubated for 20 min with the full-length or truncated forms of CsHMG or PthA4 (100 to 500 ng) in 20 μL reactions in binding buffer containing 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10% glycerol e 1 mM EDTA, pH7.5 (for CsHMG) or in 12 mM Tris-HCl, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 2.5% glycerol, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA and 0.05% NP-40, pH 7.5 (for PthA4). RNA-protein complexes were resolved in non-denaturing 13% polyacrylamide gels, for CsHMG-RNA complexes, or 6% polyacrylamide gels, for PthA4-RNA complexes, and exposed to radiographic films for visualization. For CsHMG, the binding mixes were also cross-linked in a UV-crosslinker (Stratagene) for 5 min to form stable RNA-protein complexes. The samples were loaded in a denaturing 10% polyacrylamide gel and detected by autoradiography.

Results

Identification of DNA and RNA-binding proteins as PthA4 interactors

To extend our knowledge on the mode of action of PthA proteins as eukaryotic transcriptional modulators, yeast two-hybrid screenings of a sweet orange cDNA library [16] were performed using the PthA4 variant as bait. The majority of the isolated prey proteins could be classified into only three major functional categories including chromatin remodeling and repair, transcriptional regulation and RNA stabilization/modification. Table 1 lists the PthA4-interacting proteins implicated in chromatin structure, DNA repair and mRNA regulatory processes for which yeast two-hybrid and GST pulldown assays were confirmed (see below).

The selected preys include a high-mobility group protein (CsHMG), two poly(A)-binding proteins designated CsPABP1 and CsPABP2, a poly(C)-binding protein with a KH domain (CsPCBP), a translin-associated factor X (CsTRAX), a structural maintenance of chromosomes domain-containing protein (CsSMC), a VirE2-interacting protein (CsVIP2), an RNA-recognition motif (RRM) protein (CsRRMP1) and a homolog of the OsHAP3A (CsHAP3)

Table 1. *Citrus sinensis* proteins identified as targets of PthA4 are homologous to nuclear factors involved in chromatin remodeling and repair, transcription regulation and mRNA stabilization/modification.

Protein	Accession	Features	Predicted biological function	PthA interactor	References
CsHMG	JN600529	DNA binding; HMG-box domain	chromatin remodeling; DNA repair; transcription control	1, 2, 3, 4	[17–22,34–39]
CsPABP1	JN556038	RNA binding; RRM	mRNA stabilization/modification	2, 3, 4	[46–49]
CsPABP2	JN600528	RNA binding; RRM	mRNA stabilization/modification	2, 3, 4	[46–51]
CsPCBP	JN600525	RNA binding; PCBP_KH domains	mRNA processing/splicing; translational activation	2, 3	[45,61,62]
CsTRAX	JN600526	Translin domain	RNA-induced gene silencing; DNA repair/recombination	2, 3, 4	[40,41,43,44]
CsSMC	JN600522	SMC/Mnd1 domain	chromatin segregation; DNA repair/recombination	2, 3, 4	[25,42,44]
CsVIP2	JN600527	CCR4-NOT domain	chromatin remodeling; DNA integration	4	[50,63]
CsRRMP1	JN600523	RNA binding; RRM	mRNA stabilization/modification	2, 3	
CsHAP3	JN600524	DNA binding	transcription regulation	2, 3	[64]

doi:10.1371/journal.pone.0032305.t001

transcriptional factor (Table 1). Interestingly, all the prey proteins have either single or multiple RNA and/or DNA-binding motifs and are predicted to be nuclear. With the exception of CsRRMP1, all the identified preys have yeast, human or plant homologs with three-dimensional structure and/or biological function known (Table 1). Additional prey proteins involved in transcription regulation, including an auxin-response factor (CsARF) and a homolog of human MAF1 (CsMAF1), a negative regulator of RNA polymerase III, were isolated but will be described elsewhere.

As reported previously, some of the citrus proteins that were identified as targets of PthAs 2 and 3 also interacted with other PthA variants [16]. Thus, the identified PthA4 preys were tested

for interactions with the four PthA variants in yeast two-hybrid assays. As shown in Fig. 1A, the majority of the preys interacted not only with PthA4, confirming the primary two-hybrid screening, but with PthAs 2 and 3, preferentially. Notably, CsVIP2 interacted specifically with PthA4, whereas CsPCBP, CsRRMP1 and CsHAP3 interacted with PthAs 2 and 3 under more stringent conditions (no adenine). By contrast, CsHMG was the only prey capable of interacting with all the PthA variants in the absence of adenine (Fig. 1A).

To confirm the interactions observed in yeast, GST pulldown assays were performed using one or more of the PthA variants as representative baits (Fig. 1B). For instance, CsHMG was tested

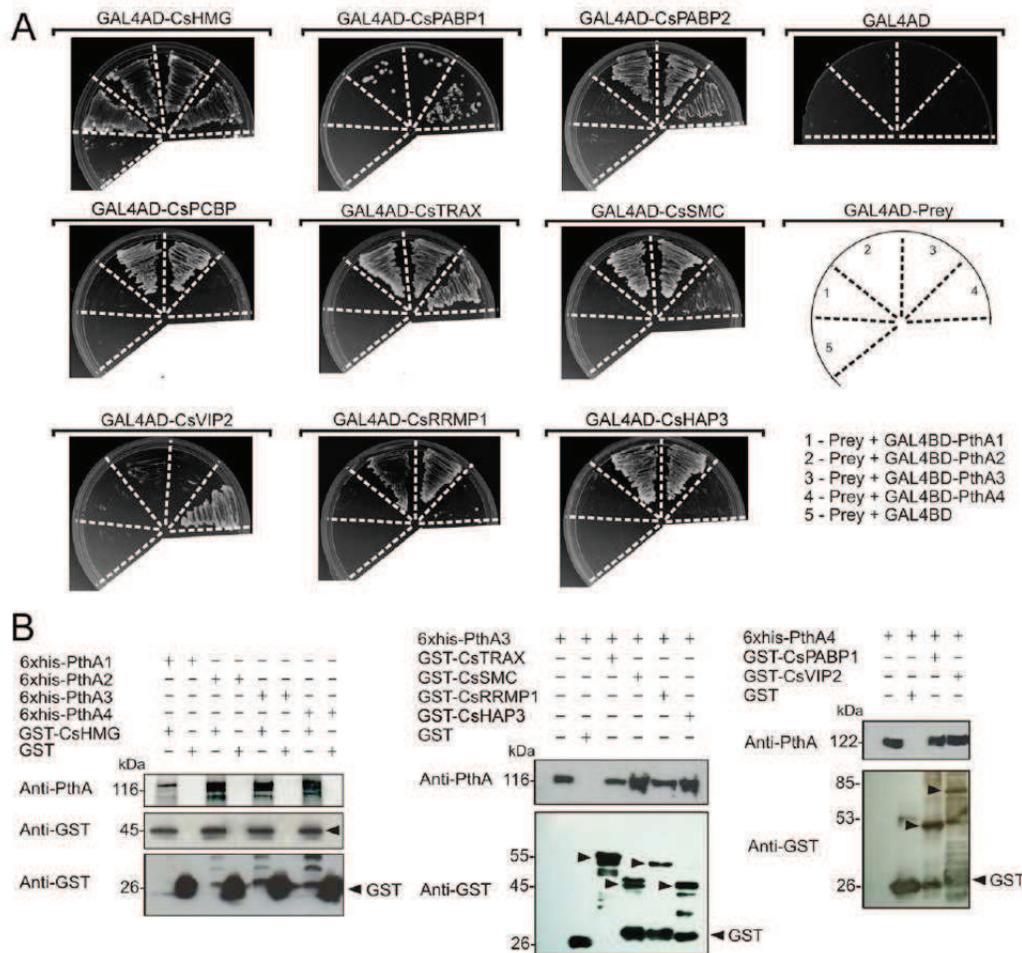


Figure 1. Protein-protein interactions between PthAs and citrus nuclear proteins. (A) Citrus preys fused to yeast GAL4-AD (GAL4AD-prey) or control plasmid (GAL4AD) were moved into yeast cells carrying one of the four PthA variants fused to GAL4-BD domain as shown in the diagram (1 to 4, respectively). Yeast double-transformants were grown on SC -Trp -Leu -His -Ade in the presence of 5 mM of 3AT. None of prey fusions transactivated the reporter genes when co-transformed with empty bait vector (5). The PthA baits also did not transactivate the reporter genes when co-transformed with the empty prey vector in the same growth conditions (GAL4AD). (B) Western blot detection of eluted fractions from GST pulldown assays using the purified 6xHis-PthAs 1–4 as prey and immobilized GST or GST-fusion proteins as baits. Arrows indicate bands corresponding to the expected size for the GST-fusion proteins CsHMG (~45 kDa), CsTRAX (~55 kDa), CsSMC (~45 kDa), CsRRMP1 (~50 kDa), CsRRMP2 (~46 kDa), CsPABP1 (~53 kDa) and CsVIP2 (~85 kDa) detected by the GST anti-serum. PthA proteins (~116–122 kDa) were detected using the anti-PthA serum. Recombinant PthAs 3 and 4 were added as references in the first lanes of the gels shown in the middle and right panels, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0032305.g001

against all PthAs since it showed no preference for any of the PthA variants. PthA4 was used to probe the interactions with CsPABP1 and CsVIP2, whereas CsTRAX, CsSMC, CsRRMP1 and CsHAP3 were tested against PthA3, since they interacted more strongly with this bait in the two-hybrid assays (Fig. 1A). As shown in Fig. 1B, all prey-bait interactions were confirmed by GST pull-down assays, indicating that the citrus proteins identified as PthA4-interactors are indeed novel PthA targets. The citrus proteins CsPCBP and CsPABP2 were expressed in the insoluble fraction in *E. coli* cells and thus could not be tested in the GST pull-down assays.

Evidence for protein-protein associations among the PthA interactors

Considering that the newly-identified PthA interactors are functionally related (Table 1), we tested whether they would interact with each other. As shown in Fig. 2A, a substantial number of protein-protein associations were detected relating for instance CsTRAX with CsSMC, CsPABP1, CsRRMP1 and

CsVIP2. In addition CsTRAX self-interacted in yeast two-hybrid assays (Fig. 2A). Accordingly, CsSMC used as bait also interacted with CsTRAX, CsPABP1, CsPABP2 and CsVIP2, and it self-interacted (Fig. 2B), corroborating literature data [25]. CsVIP2 and CsPABP2 interacted with each other in reciprocal yeast two-hybrid assays and they also self-interacted (Fig. 2C). Moreover, CsVIP2 associated with CsPCBP, whereas CsHMG showed weak interactions with PABP1 and PABP2 (Fig. 2D).

These results pointed to a network of interactions among the PthA4 targets and suggested the existence of a citrus multiprotein complex where CsSMC would possibly function as a hub protein (Fig. 2E). To further investigate this, and considering that CsSMC and CsTRAX were the two proteins displaying higher number of protein-protein interactions, cell extracts of citrus leaves were incubated with the 6xHis-tagged CsSMC or CsTRAX immobilized in cobalt beads. Bound proteins separated by gel electrophoresis were identified by mass spectrometry (Figure 2F). Consistent with the two-hybrid data, we detected peptides corresponding to

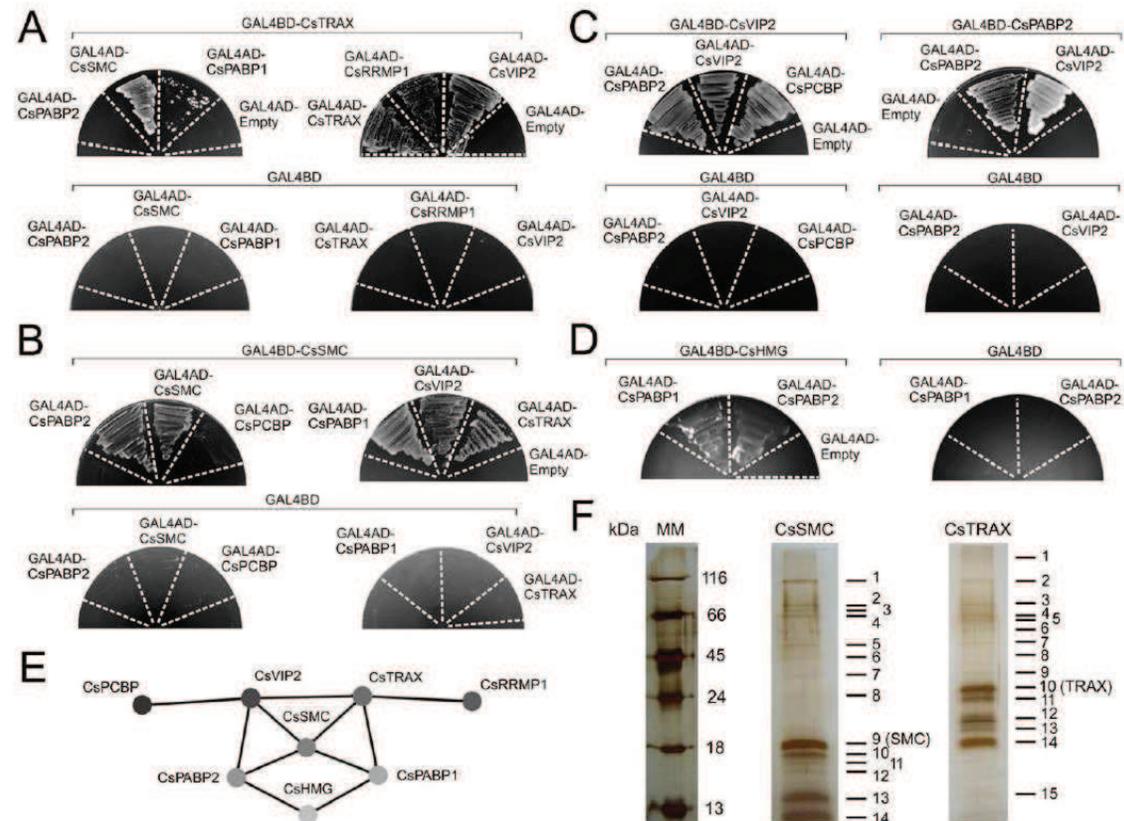


Figure 2. Protein-protein interactions among the PthA4 interactors detected by yeast two-hybrid and mass spectrometry. Yeast cells double-transformed with the indicated prey-bait constructs were grown in SC -Trp -Leu -His -Ade in the presence of 5 mM 3AT. (A) Positive interactions observed between CsTRAX and CsSMC, CsPABP1, CsTRAX, CsRRMP1 and CsVIP2. (B) Protein-protein interactions observed between CsSMC and CsPABP2, CsSMC, CsPABP1, CsVIP2 and CsTRAX, but not between CsSMC and CsKH. (C) Interactions of CsVIP2 with CsKH, reciprocal interactions between CsPABP2 and CsVIP2, and self interactions of CsVIP2 and CsPABP2. (D) Weak interactions between CsHMG and the poly(A)-binding proteins CsPABP2 and CsPABP1. (E) A diagram illustrating the network of interactions observed among the citrus PthA targets. (F) Silver-stained SDS polyacrylamide gels of citrus proteins trapped in cobalt beads carrying the recombinant 6xHis-tagged CsSMC or CsTRAX as baits (bands 9 and 10, respectively). Protein bands excised from the gels, indicated by the numbers, were identified by mass spectrometry (see Table 2 for details). The molecular markers (MM) are shown on the left. doi:10.1371/journal.pone.0032305.g002

Table 2. *Citrus sinensis* proteins identified as binding partners of CsSMC and CsTRAX by mass spectrometry.

Protein bands	Binding partners of CsSMC/CsTRAX	Accession number	Peptide sequences identified by mass spectrometry	m/z	Charge
CsSMC					
1,4,6–10,12	CsSMC	110848831	LRAEIANSEK	565.8135	+2
			KGYAENYEHGQVMEK	594.9451	+3
			QELTGOAQMMSQDLVR	925.9453	+2
1	Argonaute 1 (AGO1)	188428433	SLYTAGPLPFLSK	697.3930	+2
			GGVGMGSGGRGGHSGGPTR	828.8859	+2
2,3	HSP70	110877680	VEIANDQGNR	614.8190	+2
			NQVAMNPSNTIFDAK	825.4041	+2
			IINEPTAAAIAYGDKK	894.5037	+2
	PABP2 homolog	94441024	VAEAMEVLR	509.2771	+2
			GMPDVSMPGVGGMLPIPYGDMAAMPLR	936.7758	+3
		55396367	NMQDFPFDMGAGMLPVPVDMGAGIPR	962.0988	+3
5	Translation elongation factor 1a	56584680	GFVASNSKDDPAR	682.3378	+2
			YYCTVIDAPGHR	726.3433	+2
			VETGVLPKGMWVTFGSPGLTTEVK	816.1167	+3
	CsMAF1	110836827	EWSETYGGSSLLETLYK	981.9786	+2
	CsTRAX	188246976	MDTMLQSVLK	583.3041	+2
			LHQLSGTALQSIK	489.6172	+3
	PABP2 homolog	63075332	NLSESTTEEDLQK	747.3532	+2
			GSGFVAFSTPEEASRALLEMNGK	1207.5867	+2
11	Translation initiation factor 5a	21651392	DGFAEGK	362.1706	+2
			VVEVTSK	424.7421	+2
			DDLRLPTDENLLSQQK	624.0058	+3
13	Histone H4	188254614	TLYGFGG	714.3515	+1
			TVTAMDVVYALK	663.8570	+2
	CsCYP homolog	46214048	VVADSGELP	493.2626	+2
	RNA-binding protein	188444131	SNGGSGGERGGR	545.7521	+2
CsTRAX					
1,9–11	CsTRAX	188291689	LHQLSGTALQSIK	733.9211	+2
			AEADLVAVKDQYISR	839.4460	+2
			DAFANYAGYLNELNEK	916.4340	+2
2	Argonaute 1 (AGO1)	55289153	QADAPQEQALQVLDIVLR	940.0219	+2
			SGNILPGTVVDSK	643.8547	+2
		55288894	GQSENSQEAFR	691.3056	+2
3	HSP70	38053102	NALENYAYNMR	679.8090	+2
			ATAGDTHLGGEDFDNR	838.3737	+2
			NAVVTVPAYFNDSQR	840.9252	+2
4	TPR-containing protein	218827114	RIPLDFLQGEK	658.3755	+2
			MLQADQVSLAEK	666.8473	+2
			SLAQYTWSSAVK	734.8757	+2
5	Ribosomal protein	188380114	YPLTDSMPKNIDDK	877.4249	+2
6	Nucleosome protein	188306400	LQNLQAGQHSVLEK	776.4106	+2
7	Translation elongation factor 1a	56584680	MDATTPK	382.1881	+2
			GFVASNSKDDPAR	682.3345	+2
			YYCTVIDAPGHR	726.3430	+2
8	Protein kinase	56534189	GALSPSTAVNFALDIAR	851.9663	+2
			GMAYLHNEPNVIHR	588.6417	+3
12	CsMAF1	110836827	INDFLDHLNLGER	778.4004	+2
			EWSETYGGSSLLETLYK	981.9799	+2
			LPECEIYSNPDSQSDPFLK	1259.5583	+2

Table 2. Cont.

Protein bands	Binding partners of CsSMC/CsTRAX	Accession number	Peptide sequences identified by mass spectrometry	m/z	Charge
13	BTF3 factor	188439148	MNVKLMNMAGALR	805.3939	+2
14	CsSMC	110848831	LTADLQQVPALK QELTGAQMMSQDLVR	648.8824 917.9503	+2 +2
15	B53-like protein	188271719	MKEQAAGVEAIVGAGTSGSLATAACLSLQSIPIYVILR	1302.0349	+3

Protein bands are numbered and they correspond to those depicted in Fig. 2F.
doi:10.1371/journal.pone.0032305.t002

CsTRAX and a PABP 91% identical to CsPABP2 in the CsSMC sample (Table 2). Similarly, we identified CsSMC in the CsTRAX sample, but most interestingly, we found CsMAF1 and additional proteins implicated in transcriptional and translational control, such as transcription factor BTF3, Argonaute protein AGO1, translation initiation factor 5a and translation elongation factor 1-alpha, as binding partners of CsSMC and CsTRAX (Table 2). Moreover, a peptide corresponding to a citrus cyclophilin that is 81% identical to CsCYP, identified previously as an interactor of PthAs [16], was detected in the CsSMC sample (Table 2). Intriguingly, one of the citrus proteins identified by mass spectrometry associated with CsTRAX is a homolog of Bs3, a flavin monooxygenase that is induced by AvrBs3 and confers resistance against *Xanthomonas vesicatoria* strains carrying AvrBs3 [4].

Taken together, these results strongly indicate that the citrus proteins identified as PthA4 interactors assemble into single or multiple protein complexes.

CsHMG is a group B HMG homologous to AtHMGB1

Among the PthA4-interacting proteins identified (Table 1), CsHMG was the only one to interact with all the PthA variants (Fig. 1), suggesting that it is another generic target of PthAs, as the citrus importin- α [16]. In addition, CsHMG is unique in the sense that it is implicated in a variety of biological processes associated with chromatin remodeling, DNA repair and general transcriptional control [18–22]. Hence, CsHMG was selected for further characterization.

CsHMG is a 165 amino acid protein with a central alpha-helical HMG-box domain that is flanked by a K-rich N-terminal and a DE-rich C-terminal domain (Fig. 3A). Multiple sequence alignments and phylogenetic analysis place CsHMG into the group B of the plant HMG protein family (Fig. 3B). CsHMG is 78% identical to Arabidopsis AtHMGB1, a chromatin-associated protein that influences cell growth [17]. Thus, to confirm the identity of CsHMG to AtHMGB1, protein extracts of sweet orange leaves and epicotyls were compared to that of seedlings of *A. thaliana* wild type and *hmg-1* heterozygous mutant [17] using an anti-CsHMG serum raised against the recombinant CsHMG. As shown in Fig. 3C, the anti-CsHMG serum detected a unique band of approximately 18 kDa in citrus epicotyls and leaves. A band of approximately 20 kDa, which corresponds to the molecular weight of AtHMGB1, was also detected in seedlings of the wild type and *hmg-1* mutant of Arabidopsis. As expected, in the heterozygous *hmg-1* mutant, the band is less pronounced confirming the identity of CsHMG to AtHMGB1 (Fig. 3C).

PthA binds to CsHMG *in vivo* through its invariable LRR region

To confirm the interactions between PthAs and CsHMG *in vivo*, PthAs 2 and 4 fused to GST were immobilized in glutathione

resins and allowed to interact with proteins from citrus cell extracts. As shown in Fig. 4A, both PthAs 2 and 4, but not GST bound to CsHMG, confirming that CsHMG is an interacting partner of PthAs.

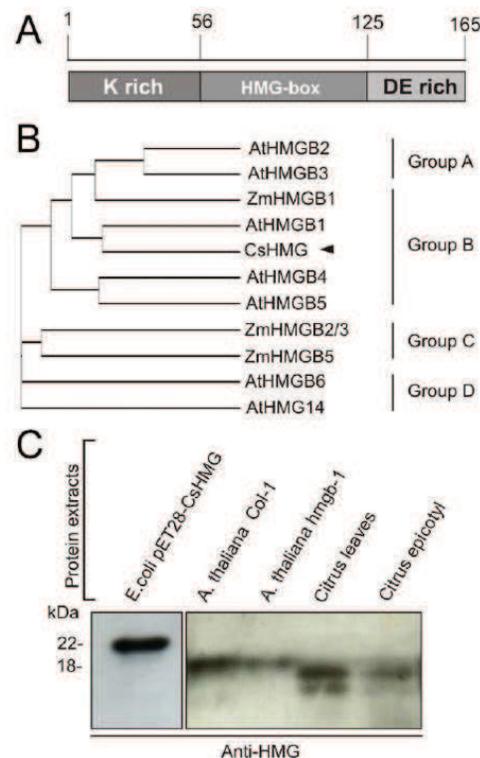


Figure 3. CsHMG shows identity to plant HMGBs of group B. (A) Schematic representation of the CsHMG primary structure showing its central HMG-box domain flanked by the basic K-rich N-terminal and the acidic DE-rich C-terminal. (B) Phylogenetic analysis of plant HMGB proteins showing that CsHMG belongs to group B HMGBs. (C) Western blot detection of the recombinant 6xHis-CsHMG (~22 kDa) made in bacteria compared to bands detected in citrus cell extracts with the expected molecular size for the endogenous CsHMG (~16 kDa). The anti-CsHMG serum also cross-reacted with a band of similar size in the cell extracts of *A. thaliana* wild-type and heterozygous *hmg-1* mutant. This band, which has the expected molecular weight for AtHMGB1 (~18 kDa), is less pronounced in the heterozygous *hmg-1* mutant, thus indicating that CsHMG is structurally related to AtHMGB1.
doi:10.1371/journal.pone.0032305.g003

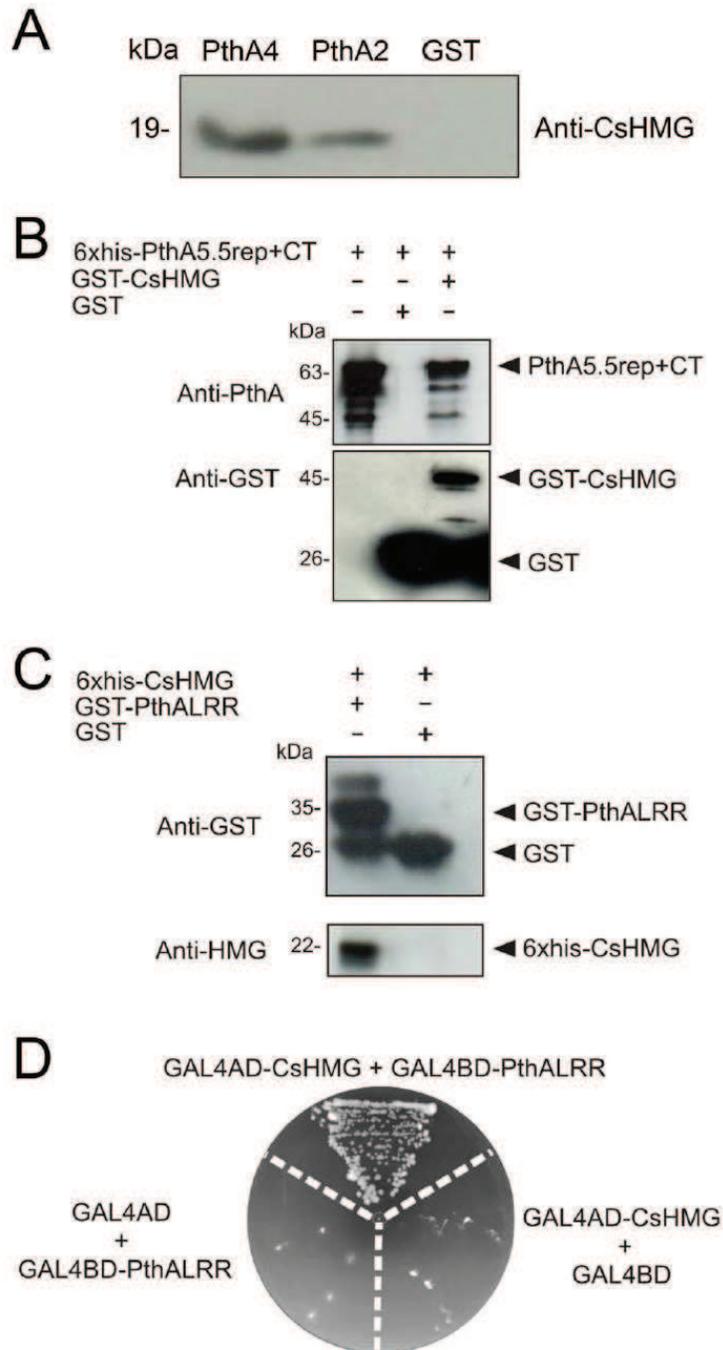


Figure 4. PthA binds to CsHMG *in vivo* through its invariable LRR region. (A) PthA2-GST, PthA4-GST or GST alone bound to glutathione resins were incubated with a citrus cell lysate. Bound proteins were separated by gel electrophoresis and CsHMG was detected by the anti-CsHMG serum in the PthA samples only. (B) Western blot of GST-pulldown assay of immobilized GST or GST-CsHMG as baits and purified 6xHis-PthA5.5rep+CT2 as prey. The eluted 6xHis-PthA5.5rep+CT2 (~63 kDa) was detected by the anti-PthA serum only when GST-CsHMG was used as bait. The purified 6xHis-PthA5.5rep+CT2 was added in the first lane of the gel as reference. (C) Western blot analysis of eluted fractions of GST-pulldown

assay of immobilized GST or GST-PthALRR as baits and purified 6xHis-CsHMG as prey. The eluted 6xHis-CsHMG (~22 kDa) was detected only when GST-PthALRR was used as bait. (D) Yeast two-hybrid assay showing the interaction between CsHMG and the PthA LRR domain. Yeast double-transformants, including controls (GAL4AD+GAL4BD-PthALRR and GAL4BD+GAL4AD-CsHMG), were grown in SC -Trp -Leu -His -Ade in the presence of 5 mM 3AT.
doi:10.1371/journal.pone.0032305.g004

The observation that CsHMG was the only prey to interact with the four PthA variants (Fig. 1) led us to map the PthA region required for such interactions. As the C-terminal domain of PthAs is the least variable region among the PthA variants, and that this region includes a leucine-rich repeat (LRR) that is invariable among all PthAs [16], we tested whether the C-terminal would account for the interaction with CsHMG. GST pull-down assays were performed with PthA2 constructs carrying the entire C-terminal domain or the LRR alone. Both the entire C-terminal domain and the LRR alone interacted with CsHMG, indicating that the invariable LRR is sufficient for the interaction (Fig. 4B and C). This result was confirmed by a two hybrid assay which shows that the LRR interacts with CsHMG in yeast (Fig. 4D).

CsHMG binds DNA and poly(U) RNA

HMGs are highly abundant chromosomal proteins known to bind DNA in a non-specific manner [26,27]. Thus, we examined the ability of the recombinant CsHMG to bind DNA in gel-shift assays by testing its interaction with two unrelated double-strand DNA probes, one derived from the citrus *pr5* promoter [28] and another derived from a bacterial cloning vector. As shown in Fig. 5A, CsHMG bound to the two DNA probes, indicating that the citrus protein does not display DNA sequence specificity, a general feature of HMGs. Although this result is in line with the literature data and with our observation that CsHMG made in *E. coli* co-purifies with bacterial DNA (not shown), we also noticed that the removal all traces of nucleic acids from our recombinant CsHMG preparations required an RNase treatment, which indicated that CsHMG had affinity for RNA as well. To test this hypothesis, we performed gel-shift assays to probe the binding of CsHMG to single-strand RNAs. Surprisingly, we found that CsHMG not only binds to single-strand RNA *in vitro* but it shows specificity to poly(U) RNAs (Fig. 5B, upper panel). The specific binding of CsHMG to poly(U) RNA was further confirmed by an UV-crosslinking gel-shift assay (Fig. 5B, bottom panel).

Next, to test whether CsHMG would preferentially bind to poly(U) RNA or DNA, we performed a competition gel-shift assay using a double strand DNA as competitor. The results shown in Fig. 5C suggest that CsHMG binds to the poly(U) RNA preferentially.

CsHMG selectively binds to poly(U) RNA through its HMG-box domain

To test whether CsHMG is capable of binding to non-contiguous U-rich sequences, an AU-rich probe was used in the gel-shift assays. As shown on Fig. 6A, no shifted bands were detected when an AU-rich RNA was used as a probe at different concentrations. Moreover, the AU-rich probe could not compete with the poly(U) probe in a competition gel-shift assay (Fig. 6B), indicating that the RNA-binding activity of CsHMG is specific towards contiguous U-rich sequences.

To map the CsHMG region responsible for the RNA interaction, three truncated forms of CsHMG, CsHMG Δ N (no N-terminal), CsHMG Δ C (no C-terminal) and CsHMG Δ N Δ C (only the HMG-box) were employed in gel-shift assays (Fig. 6C). All truncations were capable of binding the poly(U) probe (Fig. 6D), indicating that the HMG-box domain alone is sufficient for the RNA-binding activity of CsHMG and to confer the

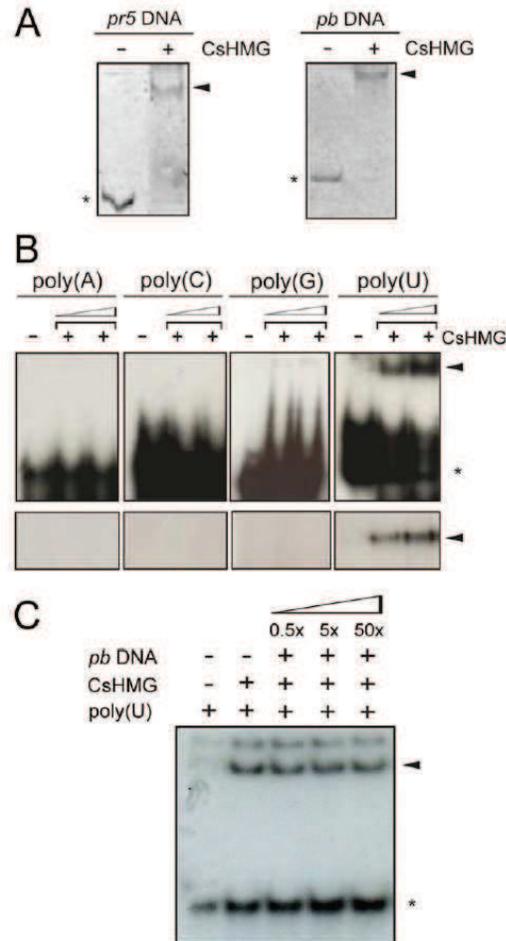


Figure 5. CsHMG shows DNA and RNA-binding activities *in vitro*. (A) EMSA using the recombinant 6xHis-CsHMG protein (5 μ g) and DNA probes (200 ng) derived from the citrus *pr5* promoter and the multiple-cloning site of the pBluescript vector. The DNA-protein complexes and free probes detected by ethidium bromide staining are indicated by the arrows and asterisks, respectively. (B) Upper panel, EMSA using 32 P-labelled single strand RNA probes at a final concentration of 12.5 nM and increased amounts of purified CsHMG (0.1 and 0.5 μ g). Shifted bands corresponding to CsHMG:RNA complexes observed with the poly(U) RNA and the free probes are indicated by the arrow and asterisk, respectively. Bottom panel, SDS-PAGE of UV-crosslink EMSA showing the selective binding of CsHMG to the poly(U) RNA probe (arrow). (C) EMSA using the 32 P-labelled poly(U) RNA as probe at a final concentration of 12.5 nM, 100 ng of CsHMG and increasing amounts of the double strand DNA (multiple-cloning site of the pBluescript vector) as competitor. Shifted bands corresponding to CsHMG:RNA complexes and the free probe are indicated by the arrow and asterisk, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0032305.g005

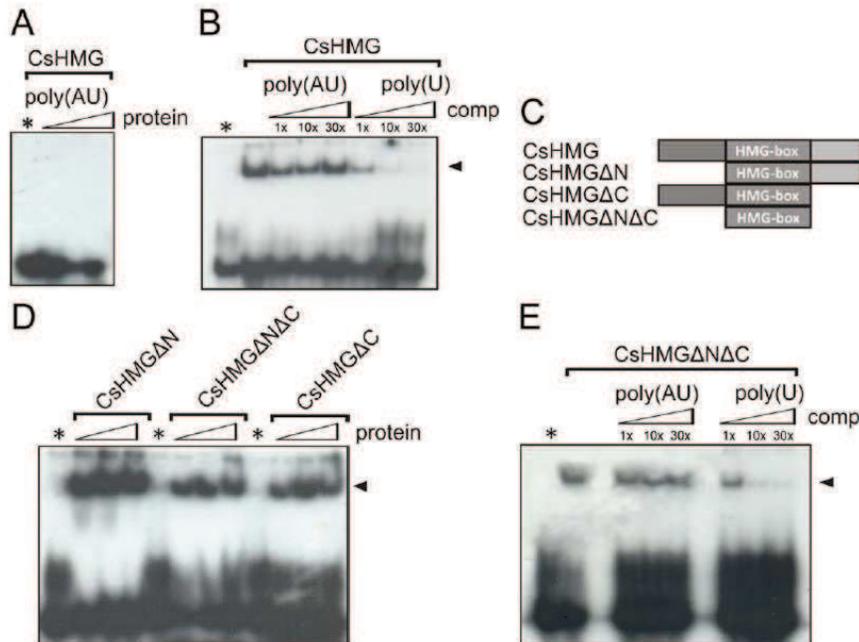


Figure 6. CSHMG selectively binds to poly(U) RNAs through its HMG-box domain. (A) EMSA showing that CSHMG (0.5 and 1.0 μg) does not bind to the AU-rich RNA probe (5'-UUAUUUUUUUUUUUUUUUU-3'). (B) Competition EMSA showing that the AU-rich RNA probe at 1, 10 and 30 times molar excess does not compete with the poly(U) probe for the binding to CSHMG, as opposed to the cold poly(U) probe. (C) Schematic representation of the truncated versions of CSHMG used in the experiments depicted in D and E. (D) All CSHMG truncations were capable of binding to the poly(U) RNA probe. (E) Competition EMSA showing that the AU-rich RNA probe at 1, 10 and 30 times molar excess does not compete with the poly(U) probe for the binding to the HMG-box (CSHMGΔNΔC), as opposed to the cold poly(U) probe, indicating that the HMG-box of CSHMG is sufficient to confer the poly(U) RNA-binding specificity. doi:10.1371/journal.pone.0032305.g006

specificity to poly(U) RNA. In fact, CSHMGΔNΔC retained its selective binding to poly(U) even when the poly(AU) probe was used as a competitor in the gel-shift assay (Fig. 6E).

PthA4 forms higher molecular weight complexes with poly(U) RNA in the presence of CSHMG

Considering that (i) CSHMG selectively binds to poly(U) RNA, (ii) CSHMG and PthA4 interact with two poly(A)-binding proteins, (iii) most of the PthA4 interactors have RNA recognition motifs and are implicated in mRNA stabilization and processing, (iv) recombinant PthAs made in *E. coli* co-purifies with RNA, and (v) the DNA-binding domain of PthAs is predicted to fold like a pentatricopeptide repeat (PPR) [28], a protein domain that recognizes U-rich sequences and plays roles in mRNA stabilization and editing [29–31], we tested whether PthA4 would interact with RNA molecules. Surprisingly, we found that PthA4 and its internal repetitive DNA-binding domain were capable of selectively binding to poly(U) RNA in gel shift assays (Fig. 7A). Furthermore, in the presence of CSHMG, PthA4 formed higher molecular weight complexes with poly(U) RNA (Fig. 7B), suggesting formation of a ternary complex.

Discussion

Despite the abundant genetic data showing that bacterial TAL effectors function as transcriptional activators in host cells, little is known about the molecular mechanism through which they act.

Previously, we identified CsCYP, CsTDX and CsUEV/CsUBC13 heterodimer as targets of PthAs. These proteins, which are associated with the basal transcription machinery, interact with each other and affect DNA repair [16]. Here, we present evidence suggesting that PthAs target a novel nuclear multiprotein complex whose components are implicated in chromatin remodeling and repair, transcription regulation, mRNA stabilization/modification and translational control (Tables 1 and 2).

A component of this protein complex, CSHMG, shows selective binding to poly(U) RNA. Although homologs of CSHMG in animals participate in a variety of biological processes associated with sex determination, DNA repair and cancer [20,21,32,33], the roles played by CSHMG homologs in plants are less clear [34,35]. Plant HMGBs similar to CSHMG have been suggested to promote the assembly of nucleoprotein complex involved in transcriptional control [19]. In maize, HMGB1 interacts with transcription factors of the bZip and Dof families and promotes Dof DNA binding through its acidic C-terminal domain [19,36]. In mammals, HMGB1 interacts with the N-terminus of the TATA-binding protein (TBP) to form a stable ternary complex with TBP and the TATA element to repress transcription [37,38]. Interestingly, the basal transcriptional factor TFIIA was shown to bind TBP and displace HMGB1 from the inhibitory HMGB1/TBP/TATA complex, allowing transcription initiation [39]. Thus, it is possible that PthAs could play a similar role as TFIIA. This idea is in line with the observation that PthAs bind to sites at or close to predicted TATA-box elements of citrus promoters (unpublished results).

affect splicing, 3'-end formation and to inhibit mRNA deadenylation [55–58].

Finally, the identification of CsSMC as a hub in the PthA4 interactome is in agreement with recent data showing that independently evolved effectors converge onto hubs as common targets [59]. Surprisingly, most of these hubs associate with proteins controlling RNA binding/translation, DNA binding/chromatin remodeling/transcription and ubiquitination [59]. Although the Arabidopsis homolog of CsSMC was not identified as a target of *Pseudomonas* and *Hyaloperonospora* effectors, CsSMC is related to SKIP-interacting protein 30, a rice hub [60].

Taken together, our data suggest that PthA proteins target a novel citrus multiprotein complex involved in mRNA stabilization and processing associated with translational control.

References

- Mansfield JW (2009) From bacterial avirulence genes to effector functions via the *hop* delivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity. *Mol Plant Pathol* 10: 721–734.
- Boch J, Bonas U (2010) *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* 48: 419–436.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 318: 648–651.
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, et al. (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 318: 645–648.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Wieduwild R, Bonas U (2009) Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3DeltaREP16. *Plant J* 59: 859–871.
- Römer P, Strauss T, Hahn S, Scholze H, Morbitzer R, et al. (2009) Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiol* 150: 1697–1712.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, et al. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509–1512.
- Moscou M, Bogdanove A (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326: 1501.
- Yuan T, Li X, Xiao J, Wang S (2011) Characterization of *Xanthomonas oryzae* responsive cis-acting element in the promoter of rice race-specific susceptibility gene Xa13. *Mol Plant* 4: 300–309.
- Swarup S, de Feyter R, Brlansky R, Gabriel D (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathogens of *Xanthomonas campestris* to elicit canker-like lesions on citrus. *Phytopathol* 81: 802–809.
- Swarup S, Yang Y, Kingsley MT, Gabriel DW (1992) A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol Plant Microbe Interact* 5: 204–213.
- Duan Y, Castañeda A, Zhao G, Erdos G, Gabriel D (1999) Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 556–560.
- Brunings AM, Gabriel DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol* 4: 141–157.
- Al-Saadi A, Reddy J, Duan Y, Brunings A, Yuan Q, et al. (2007) All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one pthA homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 934–943.
- Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol* 13: 394–401.
- Domingues MN, de Souza TA, Cermadas RA, de Oliveira ML, Docena C, et al. (2010) The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Mol Plant Pathol* 11: 663–675.
- Lidballe DL, Pedersen DS, Kalamajka R, Emmersen J, Houben A, et al. (2008) The expression level of the chromatin-associated HMGB1 protein influences growth, stress tolerance, and transcriptome in Arabidopsis. *J Mol Biol* 5: 389–321.
- Krohn NM, Yanagisawa S, Grasser KD (2002) Specificity of the stimulatory interaction between chromosomal HMGB proteins and the transcription factor DoF2 and its negative regulation by protein kinase CK2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 32438–32434.
- Grasser KD, Launholt D, Grasser M (2007) High mobility group proteins of the plant HMGB family: dynamic chromatin modulators. *Biochim Biophys Acta* 1769: 346–357.
- Prasad R, Liu Y, Deetering IJ, Poltoratsky VP, Kedar PS, et al. (2007) HMGB1 is a cofactor in mammalian base excision repair. *Mol Cell* 27: 829–841.
- Lange SS, Vasquez KM (2009) HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. *Mol Cell* 34: 571–580.
- Ueda T, Yoshida M (2010) HMGB proteins and transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 1799: 114–118.
- Bell AJ, Jr., Chauhan S, Woodson SA, Kallenbach NR (2008) Interactions of recombinant HMGB proteins with branched RNA substrates. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 262–267.
- de Oliveira MLP, Febres VJ, Costa MGC, Moore GA, Otoni WC (2009) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep* 28: 387–395.
- Hirano M, Hirano T (2002) Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *EMBO J* 21: 5733–5744.
- Štros M (2010) HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta* 1799: 101–113.
- Reeves R (2010) Nuclear functions of the HMGB proteins. *Biochim Biophys Acta* 1799: 3–14.
- Murakami MT, Sforza ML, Neves JL, Paiva JH, Domingues MN, et al. (2010) The repeat domain of the type III effector protein PthA shows a TPR-like structure and undergoes conformational changes upon DNA interaction. *Proteins* 78: 3386–3395.
- Williams-Carrier R, Kroeger T, Barkan A (2008) Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA* 14: 1930–1941.
- Pfalz J, Bayraktar OA, Prikrýl J, Barkan A (2009) Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J* 28: 2042–2052.
- Prikrýl J, Rojas M, Schuster G, Barkan A (2011) Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 415–420.
- Fusco A, Fedele M (2007) Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 12: 899–910.
- Cunha JL, Soardi FC, Bernardi RD, Oliveira LE, Benedetti CE, et al. (2011) The novel p.E89K mutation in the SRY gene inhibits DNA binding and causes the 46,XY disorder of sex development. *Braz J Med Biol Res* 44: 361–365.
- Pedersen DS, Merkle T, Markl B, Lidballe DL, Antosch M, et al. (2010) Nucleocytoplasmic distribution of the Arabidopsis chromatin-associated HMGB2/3 and HMGB4 proteins. *Plant Physiol* 154: 1831–1841.
- Launholt D, Merkle T, Houben A, Schulz A, Grasser KD (2006) Arabidopsis chromatin-associated HMGA and HMGB use different nuclear targeting signals and display highly dynamic localization within the nucleus. *Plant Cell* 18: 2904–2918.
- Yanagisawa S (1997) Dof DNA-binding domains of plant transcription factors contribute to multiple protein-protein interactions. *Eur J Biochem* 250: 403–410.
- Sutrias-Grau M, Bianchi ME, Bernués J (1999) High mobility group protein 1 interacts specifically with the core domain of human TATA box-binding protein and interferes with transcription factor IIB within the pre-initiation complex. *J Biol Chem* 274: 1628–1634.
- Das D, Scovell WM (2001) The binding interaction of HMGB-1 with the TATA-binding protein/TATA complex. *J Biol Chem* 276: 32597–32605.
- Dasgupta A, Scovell WM (2003) TFIIB abrogates the effects of inhibition by HMGB1 but not E1A during the early stages of assembly of the transcriptional preinitiation complex. *Biochim Biophys Acta* 1627: 101–110.
- Liu Y, Ye X, Jiang F, Liang C, Chen D, et al. (2009) C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science* 325: 750–753.
- Ye X, Huang N, Liu Y, Paroo Z, Huerta C, et al. (2011) Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nat Struct Mol Biol* 18: 650–657.
- Chen ES, Sutani T, Yanagida M (2004) Cti1/C1D interacts with condensin SMC hinge and supports the DNA repair function of condensin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8078–8083.
- Erdemir T, Blican B, Oncl D, Goding CR, Yavuzer U (2002) DNA damage-dependent interaction of the nuclear matrix protein C1D with Transin-associated factor X (TRAX). *J Cell Sci* 115: 207–216.

Acknowledgments

We thank Jörg Kobarg (LNBio) for helpful discussions. We also acknowledge Jacqueline Silva and Jackeline Zanella (LNBio) for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TAS ASS AJCQ AFPL CEB. Performed the experiments: TAS ASS NPVL AJCQ BAP AFPL CEB. Analyzed the data: TAS ASS AJCQ BAP AFPL CEB. Contributed reagents/materials/analysis tools: TAS ASS AJCQ AFPL CEB. Wrote the paper: TAS ASS AFPL CEB.

44. Erdemir T, Bilcan B, Cagatay T, Godling CR, Yavuzer U (2002) *Saccharomyces cerevisiae* C1D is implicated in both non-homologous DNA end joining and homologous recombination. *Mol Microbiol* 46: 947–957.
45. Yeap BB, Voon DC, Vivian JP, McCulloch RK, Thomson AM, et al. (2002) Novel binding of HuR and poly(C)-binding protein to a conserved UC-rich motif within the 3'-untranslated region of the androgen receptor messenger RNA. *J Biol Chem* 277: 27183–27192.
46. Lemay JF, Lemieux C, St-André O, Bachand F (2010) Crossing the borders: poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biol* 7: 291–295.
47. Kahvejian A, Roy G, Sonenberg N (2001) The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66: 293–300.
48. Jones L, Keining T, Eamens A, Vaistij FE (2006) Virus-induced gene silencing of *agonate* genes in *Nicotiana glauca* demonstrates that extensive systemic silencing requires *Argonaute*-like and *Argonaute*-like genes. *Plant Physiol* 141: 598–606.
49. Wang Z, Day N, Trifillis P, Kiledjian M (1999) An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA *in vitro*. *Mol Cell Biol* 19: 4552–4560.
50. Grosset C, Chen CY, Xu N, Sonenberg N, Jacquemin-Sablon H, et al. (2000) A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a *c-fos* RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* 103: 29–40.
51. Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zippich JT, et al. (2009) Mammalian mRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* 6: 869–880.
52. Huntzinger E, Braun JE, Heimstädt S, Zekri L, Izaurralde E (2010) Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J* 29: 4146–4160.
53. Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, Jan 5. [Epub ahead of print].
54. Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N (2012) Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, Jan 5. [Epub ahead of print].
55. Balatsos NA, Nilsson P, Mazza C, Cusack S, Virtanen A (2006) Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J Biol Chem* 281: 4517–4522.
56. Dias SM, Wilson KF, Rojas KS, Ambrosio AL, Cerione RA (2009) The molecular basis for the regulation of the cap-binding complex by the importins. *Nat Struct Mol Biol* 16: 930–937.
57. Dias SM, Cerione RA, Wilson KF (2010) Unloading RNAs in the cytoplasm: An “importin” task. *Nucleus* 1: 139–143.
58. Sato H, Maquat LE (2009) Remodeling of the pioneer translation initiation complex involves translation and the karyopherin importin beta. *Genes Dev* 23: 2537–2550.
59. Mukhtar MS, Carvunis AR, Dreze M, Epple P, Steinbrenner J, et al. (2011) Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* 333: 596–601.
60. Hou X, Xie K, Yao J, Qi Z, Xiong L (2009) A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6410–6415.
61. Cheng Y, Kato N, Wang W, Li J, Chen X (2003) Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1, act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Cell* 4: 53–66.
62. Ogram SA, Spear A, Sharma N, Flanagan JB (2010) The 5'CL-PCBP RNP complex, 3' poly(A) tail and 2Apro are required for optimal translation of poliovirus RNA. *Virology* 397: 14–22.
63. Anand A, Krichevsky A, Schornack S, Lahaye T, Tzifira T, et al. (2007) Arabidopsis VIRE2 INTERACTING PROTEIN2 is required for *Agrobacterium* T-DNA integration in plants. *Plant Cell* 19: 1695–1708.
64. Miyoshi K, Ito Y, Serizawa A, Kurata N (2003) OsHAP3 genes regulate chloroplast biogenesis in rice. *Plant J* 36: 532–540.

Plant Pathogenic Bacteria Utilize Biofilm Growth-associated Repressor (BigR), a Novel Winged-helix Redox Switch, to Control Hydrogen Sulfide Detoxification under Hypoxia^{*[5]}

Received for publication, February 23, 2011, and in revised form, March 24, 2011. Published, JBC Papers in Press, June 1, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.234039

Beatriz G. Guimarães^{1,2}, Rosicler L. Barbosa¹, Adriana S. Soprano, Bruna M. Campos, Tiago A. de Souza, Celisa C. C. Tonoli, Adriana F. P. Leme, Mario T. Murakami, and Celso E. Benedetti³

From the Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo CP6192, Brazil

Winged-helix transcriptional factors play important roles in the control of gene expression in many organisms. In the plant pathogens *Xylella fastidiosa* and *Agrobacterium tumefaciens*, the winged-helix protein BigR, a member of the ArsR/SmtB family of metal sensors, regulates transcription of the bigR operon involved in bacterial biofilm growth. Previous studies showed that BigR represses transcription of its own operon through the occupation of the RNA polymerase-binding site; however, the signals that modulate its activity and the biological function of its operon are still poorly understood. Here we show that although BigR is a homodimer similar to metal sensors, it functions as a novel redox switch that derepresses transcription upon oxidation. Crystal structures of reduced and oxidized BigR reveal that formation of a disulfide bridge involving two critical cysteines induces conformational changes in the dimer that remarkably alter the topography of the winged-helix DNA-binding interface, precluding DNA binding. This structural mechanism of DNA association-dissociation is novel among winged-helix factors. Moreover, we demonstrate that the bigR operon is required for hydrogen sulfide detoxification through the action of a sulfur dioxygenase (Blh) and sulfite exporter. As hydrogen sulfide strongly inhibits cytochrome *c* oxidase, it must be eliminated to allow aerobic growth under low oxygen tension, an environmental condition found in bacterial biofilms, xylem vessels, and root tissues. Accordingly, we show that the bigR operon is critical to sustain bacterial growth under hypoxia. These results suggest that BigR integrates the transcriptional regulation of a sulfur oxidation pathway to an oxidative signal through a thiol-based redox switch.

Winged-helix proteins belong to a larger ensemble of helix-turn-helix (HTH)⁴ factors employed by living organisms to

sense and respond to diverse environmental cues (1). For example, in bacterial cells, winged-helix transcriptional factors function as metal sensors, which control metal tolerance (2).

In the plant pathogens *Xylella fastidiosa* and *Agrobacterium tumefaciens*, the winged-helix repressor protein BigR (biofilm growth-associated repressor) controls the expression of the bigR operon through the recognition of the -10 region in the operator site, thus blocking transcription of the operon genes (3). bigR operons are evolutionarily conserved in some plant-associated bacteria and human opportunistic pathogens and encode BigR itself, membrane transporters, and Blh, a DUF442- β -lactamase domain protein related to the mitochondrial sulfur dioxygenase ETHE1 involved in sulfide detoxification in mammals (3, 4). Previous studies have shown that the bigR operon is actively transcribed in *Xylella* and *Agrobacterium* biofilms and that mutants lacking BigR can attach more tightly to glass and root surfaces than normal bacteria. Although these results strongly indicated that the bigR operon plays an important role in bacterial biofilm formation or cell adhesion, the biological function of the operon genes and the signals that modulate the repressor activity of BigR remained elusive (3).

Due to sequence similarities to bacterial metal sensors, BigR was designated a member of the ArsR/SmtB protein family. Nevertheless, the sequence homology to metalloregulatory repressors is restricted to the HTH DNA-binding domain, and BigR does not preserve the metal-binding sites usually found in the metal sensors (5). Moreover, the DNA binding activity of BigR, activation of the operon, and growth of the *Agrobacterium bigR⁻* and *blh⁻* mutants were not influenced by metal ions (3). These findings led us and others to propose that BigR and a related group of uncharacterized ArsR-like proteins (supplemental Fig. S1) comprise a new subfamily of winged-helix repressors (3, 6, 7).

In this new subfamily of winged-helix repressors, a conserved methionine (Met-18) and two invariant cysteines (Cys-42 and Cys-108) are predicted to be close in the structure, suggesting a structural or functional role in protein activity or regulation (3). Interestingly, the conserved cysteines, which are not present in the metal sensors, are found in the recently characterized SoxR regulator (supplemental Fig. S1) involved in sulfur oxidation (8). Thus, the similarities shared by BigR and Blh with SoxR and ETHE1, respectively, suggested a role of the bigR operon in sulfur metabolism.

* This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

The atomic coordinates and structure factors (codes 3PQK and 3PQJ) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S6 and a supplemental movie.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Present address: Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin BP 48 91192, France.

³ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 55-19-3512-1111; Fax: 55-19-3512-1006; E-mail: celso.benedetti@inbio.org.br.

⁴ The abbreviations used are: HTH, helix-turn-helix; BigR, biofilm growth-associated repressor; Blh, β -lactamase-like hydrolase; ArsR, arsenic resistance repressor.

Here we show how the conserved cysteines affect the DNA binding activity of BigR through a structural mechanism of DNA association/dissociation that is novel among the winged-helix repressors. In addition, we provide evidence suggesting that Blh is structurally related and functions as a glutathione-dependent sulfur dioxygenase similar to mouse ETHE1 and that its activity is coupled to a sulfite exporter. In summary, our results unveil the biological role of the bigR operon in hydrogen sulfide detoxification under oxygen-limiting conditions. These features may help bacterial cells to form thicker biofilms and to colonize plant tissues with low oxygen tension.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein Purification and Crystallization—*Xylella* BigR was initially purified by ion exchange and hydrophobic interaction chromatographies and crystallized as described previously (9). In an alternative purification protocol, protein extracts were loaded into a Q Sepharose fast flow in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, with 0.5 mM DTT. After elution, BigR was dialyzed in the same buffer, loaded into a Hi-Trap heparin HP column, and eluted with a linear NaCl gradient. The protein was further purified on a Superdex G75-16/60 column, and crystals were obtained by mixing 1 μ l of protein solution (6.5 mg/ml in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT) with 1 μ l of reservoir buffer (100 mM imidazole, pH 8.0, 10% PEG 8000).

X-ray Data Collection and Processing—X-ray diffraction data from native and Se-Met-labeled crystals were collected at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, and although data processing indicated that the crystals belonged to space group P3₂1 (9), structure refinement could only be performed without imposing any crystal symmetry. Thus, diffraction data collected from Se-Met-labeled crystals at the wavelength corresponding to the maximum of f'' was reprocessed in the triclinic space group using the XDS package (10). This data set was chosen due to its higher completeness in space group P1 in comparison with the native data set. Statistics from this data set were labeled as oxidized BigR (see Table 1).

The crystals produced by the alternative purification protocol were cryoprotected with 30% (v/v) PEG 400 added to the mother liquor prior to flash-cooling in a 100 K nitrogen stream. The crystals belonged to space group P1 and diffracted up to 2.5-Å resolution. The diffraction data corresponding to reduced BigR were processed with the XDS package, and the statistics are shown in Table 1.

Structure Solution and Refinement—The structure of the oxidized form of BigR was solved by multiwavelength anomalous diffraction method from Se-Met-labeled crystals. Initial phase calculation in the space group P3₂1 and density modification using autoSHARP (11) resulted in interpretable electron density maps. Nevertheless, although alternating cycles of model building using COOT (12) and refinement with REFMAC5 (13) allowed the modeling of 96 out of the 102 residues expected in the asymmetric unit (a single monomer), $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ values remained at 0.230/0.263, and the addition of water molecules caused the R_{free} to rise. Refinement was done against both native and derivative data processed in the space group P3₂1, and the same problem was encountered. At this point, lower symmetry space groups were applied, and structure refinement

could only be accomplished in P1. Diffraction data collected from the Se-Met-labeled crystal at the wavelength corresponding to the maximum of f'' were reprocessed in P1, and the structure refinement was performed with BUSTER 2.9.1 (14). Non-crystallographic symmetry was applied in all steps of the refinement using the local structure similarity restraints method implemented in the program BUSTER. The local structure similarity restraints method involves local distances between pairs of atoms instead of domain separation as in conventional superposition-based non-crystallographic symmetry treatments. The “autoncs” method in BUSTER automatically detects and applies the local structure similarity restraints. Alternating cycles of refinement and model building using COOT (12) allowed the modeling of 603 out of the 612 expected residues for the six monomers in the asymmetric unit. One hundred and thirty three solvent atoms were added during the last refinement cycles, and the R -factor/ R_{free} values converged to 0.209/0.242. The stereochemistry of the model was analyzed with MolProbity (15), and no outliers were observed in the MolProbity Ramachandran plot, which showed 94.3% of the residues in the most favored region. Additional refinement details are summarized in Table 1.

The structure of reduced BigR was solved by molecular replacement with the program PHASER (16) using the atomic coordinates of an *E. coli* repressor YgaV (PDB code 3CUO) (17) as the search model. BigR shares 29% identity and 55% similarity at the amino acid level with YgaV. Two copies of the polyaniline dimer used as model were placed in the asymmetric unit. Extensive attempts to use the oxidized form of BigR as a model for molecular replacement were unsuccessful, possibly due to the structure flexibility. Model refinement was performed by alternating cycles of BUSTER with visual inspection of the electron density maps and manual rebuilding with COOT. Non-crystallographic symmetry was applied in all steps of the refinement. A total of 385 residues were modeled out of the 408 expected for the four monomers in the asymmetric unit. The stereochemistry of the model was analyzed with MolProbity, and no outliers were observed in the Ramachandran plot with 99.2% of the residues in the most favored region. Additional refinement details are summarized in Table 1. Electrostatic potentials were calculated using the Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (18) through the PDB2PQR Server (19). The three-dimensional coordinates of oxidized and reduced BigR have been deposited in the Protein Data Bank (accession codes 3PQK and 3PQJ, respectively).

Molecular Modeling and Docking—The crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* ETHE1 protein, 2GCU (20), and *Escherichia coli* rhodanese YnjE, 3IPP (21), were used as templates for restraint-based modeling of the Blh ETHE1-like and DUF442 domains, respectively, using MODELLER (22). Ten models were generated based on the alignment obtained by the prediction method pGenTHREADER from the PSIPRED server (23–25). Models were evaluated with the discrete optimized protein energy potential, and those with the lower global scores were selected for explicit solvent molecular dynamics simulation using GROMACS (26) to check their stability and consistency. The overall and local quality analyses of the final models were assessed by VERIFY3D (27), PROSA (28), and VADAR

BigR, a Novel Redox Switch

(29). Three-dimensional structures were displayed, analyzed, and compared using the program COOT (12).

GSH were modeled into the putative active site of the ETHE1-like domain of Blh using the Molegro Virtual Docker (30). Typical docking runs consisted of a single ligand with the ETHE1-like domain with no solvent molecules. The iron metal in the binding site was considered in the docking runs, taking into account steric (van der Waals) and electrostatic interactions. The docking procedure was randomized with a minimum of 10 runs and 5000 iterations per ligand. The best 10 poses (ligand orientation) generated were recalculated and reranked by analyzing the energy scores, binding affinities, and ligand-residue (H-bond) interactions. Video images were produced using the UCSF Chimera package from the Resource for Bio-computing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (31).

Protein Oxidation and Disulfide Bond Formation—*E. coli* cells expressing the His₆-BigR protein were lysed in the presence of 30 mM oxidized glutathione (GSSG). The lysates were incubated for 30 min on ice, and the protein was purified by affinity chromatography (3). BigR samples were analyzed by mass spectrometry and gel-shift assays.

Molecular Mass Determination by Mass Spectrometry—Purified BigR with reduced and oxidized thiols were treated with 50 mM iodoacetamide and analyzed by a Q-ToF Ultima API spectrometer (Waters Corp.), operated in MS continuum mode. Data acquisition was from *m/z* 100–3,000 at a scan rate of 1 s and an interscan delay of 0.1 s. The spectra were accumulated over about 300 scans, and the multiple charged data produced on the *m/z* scale were converted to the mass scale using the maximum entropy-based software (32) supplied with the MassLynx 4.1 software package. The processing parameters were: output mass range was 6,000–20,000 Da at a resolution of 0.1 Da/channel, the simulated isotope pattern model was used with the spectrum blur width parameter set to 0.2 Da, and the minimum intensity ratios between successive peaks were 20% (left and right). The deconvoluted spectrum was smoothed (2 × 3 channels, Savitzky-Golay smooth), and the mass centroid values were obtained using 80% of the peak top and a minimum peak width at half-height of four channels.

Site-directed Mutagenesis and Gel-shift Assays—The Cys-42 and Cys-108 residues were each replaced by serines by site-directed mutagenesis, generating the C42S (M1) and C108S (M2) mutant proteins. The proteins, subcloned into pET28a, were expressed as His₆ fusions, purified by affinity chromatography, and used in gel-shift assays as described previously (3), except that those treated with GSSG were also incubated with tris(2-carboxyethyl)phosphine prior to analysis.

Fluorometric Assays—GFP fluorescence as a measurement of the transcriptional activity of the operon was performed as described previously (3). Bacterial cells carrying the reporter plasmid (Blh promoter fused to GFP) were transformed with the wild type and mutated BigR proteins. Cells were grown in LB medium to *A*_{600 nm} = 1.0, and the expression of the repressors was induced by 0.1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside. After growth at 37 °C for 3 h, cells were collected, resuspended in PBS buffer, and lysed with lysozyme (0.2 mg/ml) in the presence of 10 mM GSSG for 2 h on ice. The suspension was

disrupted by sonication, and GFP fluorescence was measured in the supernatant.

Growth of *Agrobacterium* Cells—The wild type *A. tumefaciens* strain C58 and the insertion mutants defective in BigR (*bigR*[−]) and Blh (*blh*[−]) production were grown in YEP medium, pH 7.5, as described previously (3), or in YEP supplemented with 50 mM MES buffer, pH 5.8. For growth in gradient plates, 3 μl of a bacterium suspension (*A*_{600 nm} = 0.05) were spotted on each plate containing ammonium sulfide (0–1 mM), thiosulfate (0–25 mM), or GSSG (0–5 mM), and the cells were grown at 30 °C for 2–4 days.

Sulfite production by the bacterial cells was measured semi-quantitatively using the sulfite test strips (Merckoquant, Merck), by visual comparison of the reaction zone of the test strip with the color scale provided by the manufacturer. Bacterial cells were grown at 30 °C for 16 h in buffered YEP, pH 5.8, supplemented with 0.5 mM ammonium sulfide. Cells were removed by centrifugation, and the amount of sulfite was measured in the supernatant.

A. tumefaciens wild type and insertion mutants were grown inside glass vials with screw-capped gas-tight seals. Three μl of the bacterial suspensions were streaked on the surface of the MES-buffered medium. The vials were closed tight and purged with 100% nitrogen at a flow rate of 25 ml/min using inlet and outlet needles. Bacterial cells were grown at 30 °C for different time periods under atmospheric oxygen or after a purge with 0.75 or 1.5 liters of nitrogen.

RESULTS

BigR Shows a Typical Winged-helix Fold but Two Redox States—To gain insights into the structure-function relationship of BigR and to elucidate the structural/regulatory role of the conserved cysteines in this type of winged-helix repressor, the crystal structure of BigR was solved. We observed that BigR purified by two independent procedures produced two types of protein crystals (Table 1). Surprisingly, the three-dimensional structures derived from these crystals revealed that although BigR adopts a typical winged-helix fold of homodimeric repressors of the ArsR family, the protein was found in two redox states. The structure of oxidized BigR revealed an intrachain disulfide bond between the conserved Cys-42 and Cys-108 residues that links helix 2 to helix 5 (Fig. 1, A and B). This observation strongly suggested that the invariant cysteines could indeed play a critical role in the structure and function of the repressor.

The Cys-42–Cys-108 Disulfide Bridge Induces Conformational Changes in BigR—When the structures of oxidized and reduced BigR were compared with each other, significant changes in the tertiary and quaternary structures of the repressor were observed. The main conformational changes between the two redox-state monomers occur in the N terminus of helix 1, β-hairpin wing, and C terminus of helix 5 (Fig. 1A). The loop preceding helix 4 also adopts a slightly different conformation. Most notably, however, in reduced BigR, the β-hairpin wing approaches helix 4 more closely, whereas in oxidized BigR, the disulfide bond induces a large displacement of helix 5 and introduces a small 3₁₀ helix comprising residues Cys-108–Glu-111 (Fig. 1A). In addition, the BigR quaternary structures show a

TABLE 1
Data collection and refinement statistics

	Oxidized BigR	Reduced BigR
Data statistics^a		
Space group	P1	P1
Unit cell	$a = 34.36 \text{ \AA}; b = 34.37 \text{ \AA};$ $c = 141.31 \text{ \AA} \alpha = \beta =$ $90.01^\circ; \gamma = 120.01^\circ$	$a = 40.59 \text{ \AA}; b = 47.84 \text{ \AA}; c = 54.70 \text{ \AA} \alpha = 90.03^\circ \beta = 89.96^\circ;$ $\gamma = 105.34^\circ$
Wavelength (Å)	0.9795	1.433
Resolution range (Å)	29.01–2.10 (2.22–2.10)	39.10–2.50 (2.63–2.50)
No. of unique reflections	30801	13185
Multiplicity	2.2	3.9
Completeness (%)	94.0 (92.4)	93.8 (83.8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.3 (2.8)	13.2 (4.0)
R_{meas} (%)	6.7 (45.8)	9.7 (43.7)
Refinement statistics		
Resolution range (Å)	18.59–2.10	20.86–2.50
No. of reflections	30782	13169
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.209/0.242	0.194/0.249
r.m.s.d. ^b bond length (Å)	0.010	0.010
r.m.s.d. ^b bond angle (°)	1.03	1.17
Mean B -value protein (all atoms) (Å ²)	37.3	43.30
Mean B -value solvent (Å ²)	41.3	44.86
Protein atoms	4603	2923
Solvent atoms	133	129
Residues in Ramachandran plot regions (%)		
Most favored	94.25	99.18
Allowed	5.75	0.82
Outliers	0	0

^a Numbers in parentheses are for the highest resolution shell.^b r.m.s.d., root mean square deviation.

remarkable reorientation of the HTH domain and β -hairpin wing of one monomer relative to the other upon the disulfide bond formation (Fig. 1C). The dimer of reduced BigR is much more compact. For instance, the distance between the C- α atoms of Gln-67 (helix 4) from opposite monomers goes from 34.8 Å in the oxidized structure to 31.2 Å in reduced BigR (Fig. 1C).

Oxidized BigR Does Not Bind to DNA, Allowing Transcription of Its Operon—The fact that BigR was found in two redox states strongly suggested that the Cys-42–Cys-108 disulfide bridge observed in the crystal structure was the basis of a DNA association/dissociation mechanism and transcriptional regulation of the operon. To test this hypothesis, BigR was expressed in the presence and absence of molar excess of GSSG to promote intrachain disulfide bond formation. Mass spectrometry analysis of the purified proteins revealed molecular mass peaks consistent with a mixture of reduced (S–H) and oxidized (S–S) forms of BigR on both GSSG-treated and untreated samples (supplemental Fig. S2), indicating that the GSSG treatment was effective to promote the intrachain disulfide bond formation.

Gel-shift assays showed that BigR from the GSSG-treated sample does not bind to its target DNA, except when in the presence of the reducing agent tris(2-carboxyethyl)phosphine (Fig. 2A). These results indicated that in the oxidized form, BigR loses its affinity to DNA. To confirm this, the Cys-42 and Cys-108 were each replaced by serines, and the DNA binding properties of the mutated proteins were evaluated. As expected, both the C42S and the C108S mutants shifted the target DNA, similar to the wild type BigR in its reduced form (Fig. 2B). In addition, the mutated proteins strongly repressed the transcription of a GFP reporter gene under the control of the BigR target promoter, similar to the wild type BigR (Fig. 2C). Because the mutated proteins cannot form an intrachain disulfide bond, the results confirm that BigR binds to DNA in its reduced form.

To show, however, that BigR releases transcription upon Cys-42–Cys-108 bond formation, the wild type and mutated proteins were expressed in *E. coli* carrying the operon reporter plasmid, and the expression of the reporter gene was quantified in response to the GSSG treatment. The results clearly show a significant increase in GFP fluorescence only in the GSSG-treated cell extracts expressing the wild type BigR, thus confirming that in the S–S form, BigR dissociates from DNA, allowing transcription of the operon (Fig. 2D).

The Structural Basis of the Molecular Switch and Redox-regulated DNA Binding—The crystal structures of oxidized and reduced BigR provide the structural basis of the redox-regulated DNA binding. In the oxidized dimer, the side chains of a number of basic residues from both monomers are exposed and arranged in a slightly less compact and continuous basic patch when compared with the reduced dimer (Fig. 3, A and B). These residues are from the HTH domain and β -hairpin wing and are predicted to bind DNA (33). Thus, in the more open conformation of oxidized BigR (Fig. 1C), the side chains of these basic residues are thought to retract from DNA. In addition, a closer look at the Cys-42 and Cys-108 environments reveals the molecular basis of the redox switch. In reduced BigR, the N terminus of helix 1 sits in between helices 2 and 5 of the opposite monomer (Fig. 3, C and D). Accordingly, the C terminus of helix 5 retracts, and the side chains of Cys-42 and Cys-108 are no longer in position to interact. Furthermore, in reduced BigR, the side chain of the conserved Met-18, which is stabilized by a hydrophobic interaction with Tyr-104 from the opposite monomer, occupies almost the exact position of the disulfide bond in the oxidized structure (Fig. 3D). The Cys-42 sulfur acts as a proton donor in a hydrogen bond with the carbonyl oxygen of Leu-38, whereas the Cys-108 sulfur forms a hydrogen bond with the main-chain amide of Met-13 from the oppo-

BigR, a Novel Redox Switch

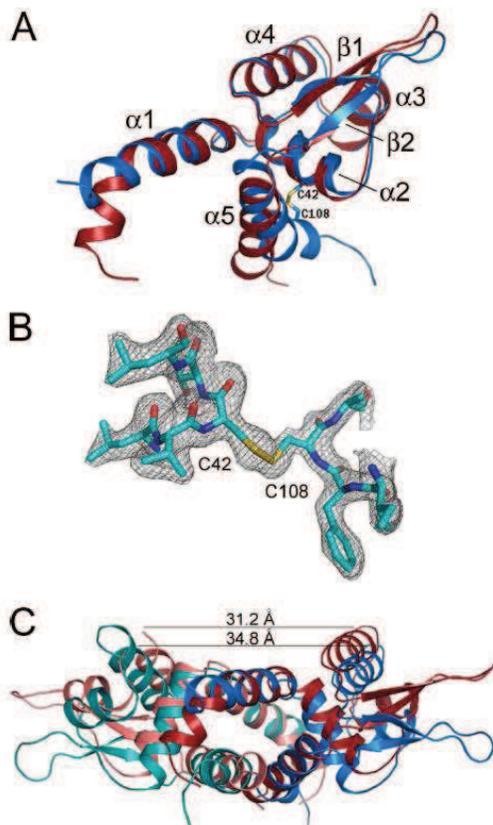


FIGURE 1. Structure and conformational changes of oxidized and reduced BigR. *A*, structural comparison of the oxidized (blue) and reduced (red) monomers. The intrachain disulfide bond is represented as sticks, and the corresponding cysteine residues are labeled. Secondary structure elements are indicated. *B*, $2F_o - F_c$ electron density map contoured at 1.2σ showing the disulfide between Cys-42 and Cys-108 in the oxidized monomer. *A*, *C*, superposition of the BigR dimers. Light and dark colors are used to distinguish the homodimer subunits. The figure was produced by superposing the C- α atoms of residues 21–32 (helix 1) from both monomers. The distances between the Gln-67 C- α atoms of helix 4 from opposite subunits are indicated.

site monomer. The Cys-108–Met-13 interaction contributes to the stabilization of the twisted conformation of helix 1 in reduced BigR, whereas in oxidized BigR, Met-18 is largely displaced and interacts with Met-39 from the opposite monomer. Met-39 is partially conserved in this subgroup of winged-helix repressors and is replaced in some repressors by a leucine, which conserves the hydrophobic character in this position (supplemental Fig. S1). In summary, a network of interactions involving sulfur-containing residues appears to regulate the redox-induced conformational changes in BigR. This observation, together with the fact that BigR and Blh are both similar to proteins involved in sulfur oxidation, led us to investigate a possible role of BigR and its operon in sulfur metabolism.

The bigR Operon Is Required for Hydrogen Sulfide Detoxification—Despite the low sequence identity observed between the β -lactamase domain of Blh and the sulfur dioxygenase

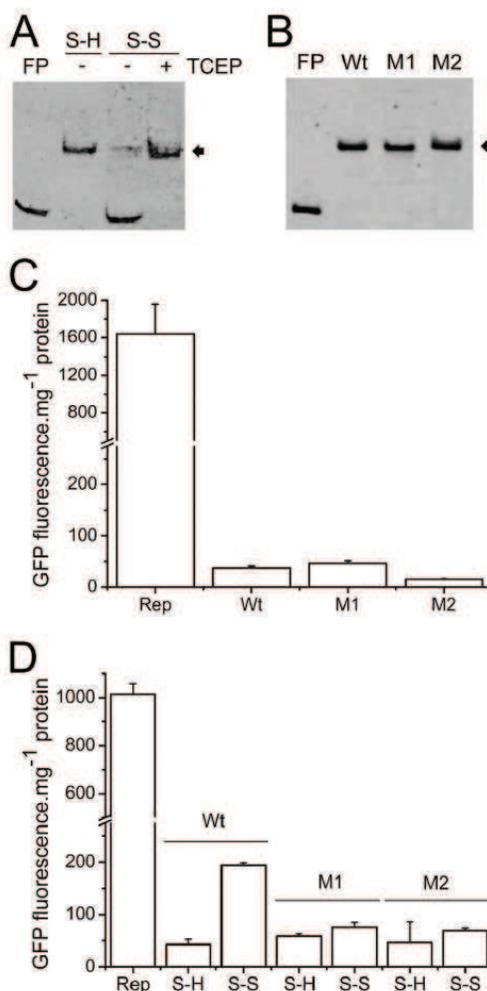


FIGURE 2. Oxidized BigR ceases from binding to DNA and releases transcription. *A*, gel-shift assay showing that oxidized (S-S) BigR does not bind to the target DNA as reduced (S-H) BigR; however, binding is restored upon tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) treatment. Shifted bands are indicated by arrows, and FP is the free probe. *B*, gel-shift assay showing that both the C42S (M1) and the C108S (M2) mutants bind to the target DNA as the wild type (Wt) protein. Shifted bands are indicated by arrows, and FP is the free probe. *C*, GFP fluorescence as a measurement of the transcriptional activity of the bigR operon reporter plasmid alone (Rep) or in the presence of the wild type BigR, M1, or M2 proteins. *D*, GFP reporter gene assay of *E. coli* cell extracts expressing the wild type or mutated BigR proteins, in the presence (S-S) or absence (S-H) of GSSG. Error bars indicate S.E.

ETHE1, protein sequence alignments show that the amino acid residues that are involved in metal binding or that have been shown to affect the function of the human ETHE1 protein (20) are conserved in Blh (supplemental Fig. S3). Moreover, molecular modeling not only indicates that Blh is structurally related to ETHE1 but supports previous data showing that these are glutathione-dependent enzymes (34) (supplemental Fig. S3). Thus, to test whether Blh would play a role similar to mammalian ETHE1 in hydrogen sulfide oxidation, we employed the *Agrobacterium blh*⁻ and *bigR*⁻ mutants. Although the *blh*⁻

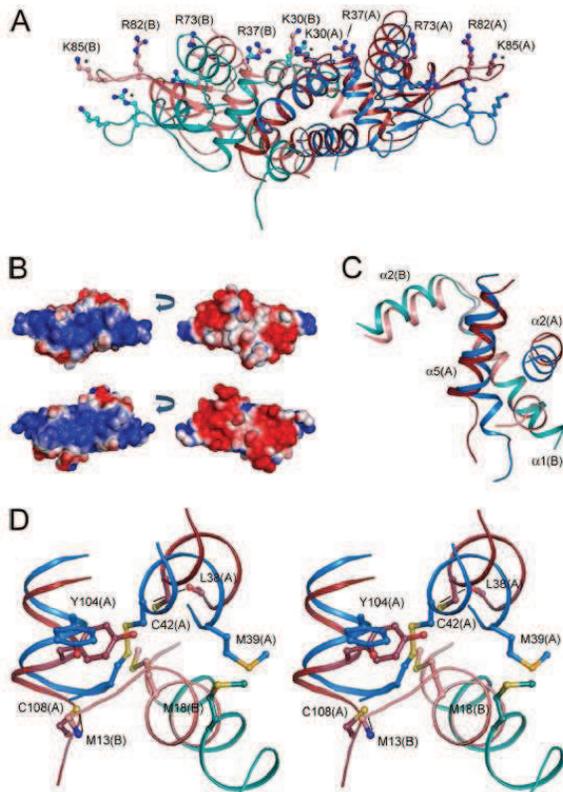


FIGURE 3. The structural basis for the redox-regulated DNA binding in BigR. A, basic residues potentially involved in DNA interaction in oxidized (blue) and reduced BigR (red) are represented in ball-and-sticks format. Dark and light colors are used to distinguish monomers A and B, respectively. Residues marked with an asterisk are replaced by alanines in the refined structure, and their side chains were modeled to produce this image. B, electrostatic surface of reduced (top) and oxidized (bottom) BigR showing differences in the basic DNA-binding region as well as in the negatively charged surface of the opposite face of the dimers. The bonds for potential contour map visualization are ± 2 kT/e. C, comparison of the secondary structure elements in oxidized (blue) and reduced (red) BigR showing the N terminus of helix 1 in between helices 2 and 5 in the reduced structure. Dark and light colors correspond to monomers A and B, respectively. D, stereo view of the Cys-42 and Cys-108 neighborhood depicting a network of sulfur-containing residues.

mutant does not produce Blh, the *bigR*⁻ mutant expresses high levels of the operon proteins (3). The *Agrobacterium* wild type and mutant cells were grown in the presence of bismuth (BiGGY agar), an indicator of hydrogen sulfide production. As sulfide combines with bismuth, brown to black pigmented colonies develop. In agreement with the operon regulation, the *bigR*⁻ mutant produces fewer pigmented colonies when compared with the wild type bacteria (Fig. 4A), suggesting that when the operon is activated, hydrogen sulfide does not accumulate. By contrast, the *blh*⁻ mutant grows much darker colonies in BiGGY agar than the wild type and *bigR*⁻ cells, indicating that it accumulates higher levels of hydrogen sulfide.

To further verify whether hydrogen sulfide affects bacterial growth, the *A. tumefaciens* wild type and mutant cells were grown under increased amounts of thiosulfate or ammonium

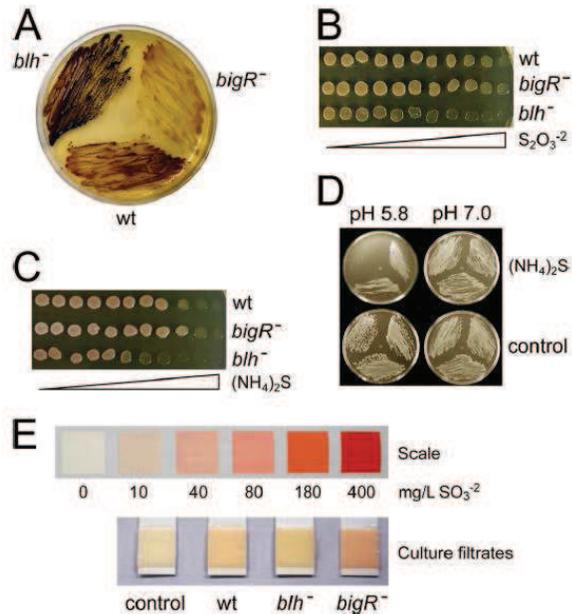


FIGURE 4. The *bigR* operon is required for hydrogen sulfide detoxification. A, growth of *A. tumefaciens* wild type and *bigR*⁻ and *blh*⁻ insertion mutants in BiGGY agar medium, showing that the *blh*⁻ cells accumulate higher levels of hydrogen sulfide relative to wild type (*wt*) and *bigR*⁻ mutant. B and C, growth of the wild type, *bigR*⁻, and *blh*⁻ cells in thiosulfate (0–25 mM) or ammonium sulfide (0–1 mM) gradient plates, respectively. D, effect of pH on the toxicity of 1 mM ammonium sulfite relative to control (no ammonium sulfide). The growth of the *blh*⁻ cells is affected by the acidic pH only. Bacterial cells were plated as indicated in A. E, sulfite levels in the culture supernatants of wild type, *bigR*⁻, and *blh*⁻ cells estimated by the sulfite test strip, according to the scale. Culture medium without bacterial growth (*control*) is shown for comparison.

sulfide, which at acidic pH generate hydrogen sulfide. It was found that although *blh*⁻ cells are more sensitive to thiosulfate and ammonium sulfide, *bigR*⁻ cells are able to tolerate higher amounts of both compounds relative to the wild type bacteria (Fig. 4, B and C), indicating that the *bigR* operon is important for hydrogen sulfide detoxification. The toxic effects of ammonium sulfide and thiosulfate are pH-dependent and were observed at pH ~5.8, (Fig. 4D), which is close to the pH where molecular hydrogen sulfide predominates in solution. Because *blh*⁻ cells accumulate higher levels of hydrogen sulfide, their growth is inhibited by the low pH (Fig. 4D).

These results indicated that Blh acts as a sulfur dioxygenase similar to mouse ETHE1, which oxidizes hydrogen sulfide to sulfur dioxide (4). Because sulfur dioxide readily interconverts into sulfite and one of the proteins of the *bigR* operon carries a TauE domain found in sulfite exporters (35), we tested whether the bacterial cells would export sulfite. Surprisingly, higher amounts of sulfite were detected in the culture supernatants of the *bigR*⁻ relative to wild type and *blh*⁻ cells in medium supplemented with ammonium sulfide (Fig. 4E), strongly indicating that when the operon is active, sulfite is exported. Taken together, the results show that the *bigR* operon is important for hydrogen sulfide detoxification through the action of a sulfur dioxygenase that operates in conjunction with a sulfite exporter.

BigR, a Novel Redox Switch

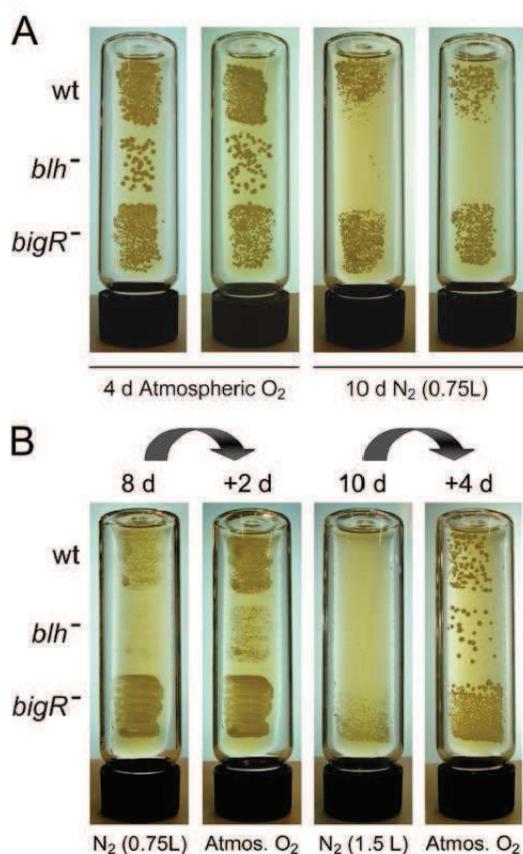


FIGURE 5. The *bigR* operon is critical for growth under oxygen-limiting conditions. A, growth of *A. tumefaciens* wild type and *bigR*⁻ and *blh*⁻ mutants under nitrogen-purged atmospheres (N₂). Bacterial cells were grown for the time periods indicated either under atmospheric oxygen or after a purge of nitrogen. B, after incubation under nitrogen-purged air (0.75 or 1.5 liters of N₂) for the time periods indicated, the flasks were opened, and the cells were further grown for 2–4 days to show that oxygen restored their growth. Atmos. O₂, under atmospheric oxygen.

The bigR Operon Is Critical to Sustain Growth under Hypoxia—Hydrogen sulfide is a potent inhibitor of cytochrome *c* oxidase (36). Because *X. fastidiosa* and *A. tumefaciens* are obligate aerobic organisms (37, 38), we thought that hydrogen sulfite accumulation due to metabolic processes might become a limiting factor for bacterial growth in environments of low oxygen tension, particularly in places where these organisms live. For instance, oxygen levels in vascular tissues and roots can vary considerably, depending on the organism, plant age, tissue type, and cortex architecture, and can be as low as 0.5% (39–43). To test whether the *bigR* operon plays an adaptive role under oxygen-limiting conditions, the *A. tumefaciens* wild type and mutant cells were grown under nitrogen-purged atmospheres. As observed in Fig. 5A, the growth of the *blh*⁻ mutant was impaired in nitrogen-purged air, relative to the wild type and *bigR*⁻ mutant. On the other hand, the *bigR*⁻ mutant grew faster under nitrogen-purged air and recovered faster from lack of oxygen than the wild type and *blh*⁻ mutant after subsequent cultivation in atmospheric oxygen (Fig. 5B). Thus, the results

show that low oxygen tension is a limiting factor for the growth of hydrogen sulfide-producing bacteria and that the *bigR* operon, which detoxifies hydrogen sulfide, allows bacteria to survive in oxygen-limited environments.

DISCUSSION

To successfully colonize the plant vascular tissue and to induce crown galls, which are made of numerous vascular bundles, *X. fastidiosa* and *A. tumefaciens*, respectively, have to adapt to these particular niches (44, 45). Here we show that the *bigR* operon in these pathogens, previously shown to influence bacterial biofilm formation (3), is required for hydrogen sulfide detoxification to allow bacterial growth under oxygen-limited conditions. Because hydrogen sulfide inhibits respiration, aerobic obligate bacteria such as *Xylella* and *Agrobacterium* must eliminate it to be able to grow under hypoxia, an environmental condition encountered by these pathogens in the interior of plant tissues (39, 41, 43). The data presented here indicate that hydrogen sulfide is oxidized to sulfite by the sulfur dioxygenase Blh and that sulfite, which is also toxic to the cells, is exported. This mechanism of hydrogen sulfide detoxification has not been reported before, and it highlights the adaptive role of the *BigR* operon in the colonization of the plant vascular tissues. In addition, production of hydrogen sulfide in bacterial biofilms may inhibit cell growth if oxygen levels in the biofilm layers are limited. This explains why the *bigR* operon is expressed at higher levels in *Xylella* and *Agrobacterium* biofilms (3). At least in the *Xylella*-citrus interaction, biofilm formation inside xylem vessels is the main cause of disease. Curiously, substantial quantities of sulfur were detected in *Xylella* biofilms inside the xylem vessels, and sulfur-linked structures on the surface of bacterial cells were suggested to promote bacterium adhesion and aggregation (44). Because the *bigR*⁻ mutant appears to be more “sticky,” it is possible that the *bigR* operon may also favor bacterial aggregation by increasing the external sulfur contents through the export of sulfite.

Related *BigR* operons occur in other plant and human opportunistic pathogens, and in a number of cases, the DUF442 domain of Blh is found separate from the ETHE1-like domain, an indication that these domains have independent but coupled enzymatic activities (3). Although Blh seems to function as a sulfur dioxygenase, the precise role of DUF442 is still unknown. DUF442 is structurally related to protein-tyrosine phosphatases (46); however, the C-(X)₅-R motif of the catalytic loop of classical protein-tyrosine phosphatases is replaced by C-(X)₄-R in Blh. Thus, we searched for proteins having the C-(X)₄-R consensus and found that rhodanases (sulfurtransferases) have highly conserved active-site loops with a CRXGX(R/T) motif (47). Surprisingly, the superposition of the Blh DUF442 with the catalytic domain of *E. coli* rhodanase YnjE (21) shows that the two domains have a similar fold and a remarkable conservation of the active-site residues, including the catalytic cysteine (supplemental Fig. S4), suggesting that DUF442 could display a rhodanase-like activity. Considering that rhodanases catalyze the transfer of sulfane sulfurs and have been implicated in cyanide detoxification (48), it is possible that by acting as a rhodanase, DUF442 could provide an extra

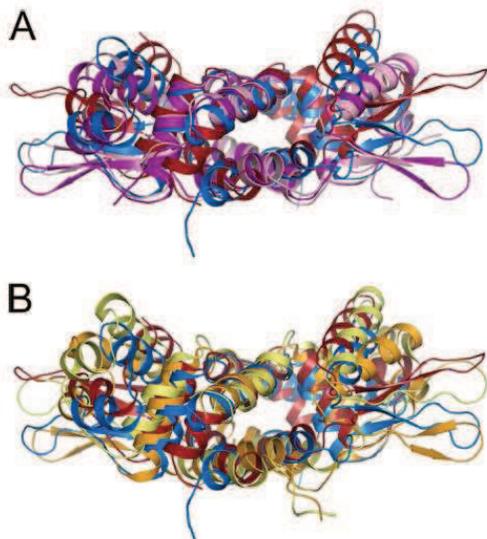


FIGURE 6. Conformational changes of BigR and related metal sensors. A, superposition of the BigR and SmtB dimers showing the conformational changes in the quaternary structures of reduced (red) and oxidized (blue) BigR relative to the structures of SmtB in its apo (purple) and zinc-bound forms (pink). Oxidized BigR adopts a more compact conformation than the apo and zinc SmtBs, as judged by the distances between the C- α atoms of Gln-67 (34.8 Å) and equivalent His-78 in the apo (40.9 Å) and zinc SmtB (37.4 Å). B, superposition of BigR and CzrA dimers showing that oxidized and reduced BigR have quaternary conformations similar to zinc CzrA (orange) and CzrA bound to DNA (yellow), respectively, indicating that the more compact (closed) conformation associated with high DNA binding affinity is conserved between BigR and CzrA. The figures were produced by superposing the C- α atoms of helix 1 of both monomers.

protection against cytochrome *c* oxidase inhibition under low oxygen tension.

In addition to the role played by the bigR operon, the three-dimensional structures of the BigR repressor presented here show that although BigR has a typical winged-helix fold of homodimeric repressors, its DNA binding activity is modulated by the redox status of a cysteine pair. To our knowledge, this is the first report on a winged-helix repressor whose mechanism of DNA association/dissociation is controlled by a redox switch involving a disulfide bond. Thus, we propose that BigR and related proteins be considered as a new subfamily of HTH repressors, named redox switches. In these repressors, a disulfide bridge between helices 2 and 5 induces large conformational changes in the dimer that lead to a retraction of the DNA-binding structures, precluding DNA interaction.

Conformational changes in the quaternary structure of homodimeric wing-helix repressors were reported for the metal sensors SmtB and CzrA (2, 49). A comparison of the quaternary structures of BigR, SmtB, and CzrA shows that BigR in its open conformation (oxidized form) is more compact than both apo and zinc SmtB structures and becomes even more compact when reduced (closed conformation) (Fig. 6A). On the other hand, although the conformations of apo and zinc CzrA are virtually the same (49), the quaternary structures of zinc CzrA and CzrA bound to DNA are similar to the oxidized and

reduced BigR structures, respectively (Fig. 6B). Thus, despite the fold similarities found between BigR and metal sensors, the dimer conformation associated with high DNA binding affinity does not appear to be conserved among these repressors because the closed conformation of SmtB bound to metal has the lower DNA binding affinity (2). Considering that charge distribution in the winged-HTH domain of BigR is not substantially altered between the low and high DNA binding affinity conformations (Fig. 3B), the binding-site topography and relative orientation of the winged-HTH domains become relevant for DNA regulation. In this respect, it is notable that BigR footprints a 22-bp palindrome extending ~ 75 Å (3), a distance that matches more closely the length of the DNA-binding site of reduced BigR than the oxidized BigR, estimated to be ~ 84 Å long. Furthermore, the consensus BigR box has two conserved TATA elements separated by ~ 28 Å (3). Because the heads of helices 4, predicted to contact the major groove of the DNA (33, 49), are ~ 31 Å apart in reduced BigR (Fig. 1C), it is reasonable to suggest that they would recognize the two TATA elements of the BigR box. Interestingly, the distance between the two winged-helix domains of the CzrA dimer in complex with its target DNA is slightly wider than that of reduced BigR (Fig. 6B), which is consistent with the fact that CzrA recognizes a longer 28-bp palindrome (49). Therefore, it appears that BigR and related proteins change the aperture of their winged-HTH domains not only to control their DNA binding affinity but also to match their target DNA sequences.

Redox-sensitive transcriptional factors belonging to other protein families have been described. The prokaryotic OxyR and yeast Yap1, which play roles as hydrogen peroxide sensors, are also modulated by intramolecular disulfide bonds (50, 51). In the case of OxyR, the disulfide bond causes a structural change in the DNA-binding domain of the repressor, affecting DNA regulation (52). Similarly, reversal of disulfide bond formation between distant cysteines is an effective way to induce large conformational changes in the DNA-binding domain of BigR. The transition between the two BigR redox states can be viewed in the animation depicting the molecular movement displayed by the BigR dimer, which resembles a butterfly movement (supplemental Movie S1).

A question that remains unanswered is what oxidizes BigR. Structural comparisons between the reduced and oxidized dimers reveal that although there is a channel leading to the disulfide bridge in oxidized BigR, the unbound cysteines are inaccessibly buried in the structure of the reduced protein (supplemental Fig. S5). This helps to explain why BigR is easily reduced but difficult to oxidize. Although we have some clues of what factors might have contributed to the oxidation of BigR during its purification, how BigR is oxidized *in vivo* is presently unknown. Hydrogen sulfide is unlikely to be the oxidizing agent itself due to its redox potential. Nevertheless, its toxicity also involves the formation of reactive oxygen species as a consequence of the electron transport chain inhibition (53). We believe that hydrogen sulfide-induced reactive oxygen species could play a role in BigR oxidation. Thiol groups of redox-sensitive cysteines have characteristic pK_a values as low as ~ 3.5 . Thus, at pH ~ 5.8 , where toxicity of hydrogen sulfide was observed, the

BigR, a Novel Redox Switch

thiolate anions are highly susceptible to oxidation by reactive oxygen species and can undergo various oxidative modifications including disulfide bonds (54). This idea is consistent with the fact that GSSG oxidized BigR in cell extracts and that *blh*⁻ mutants are more sensitive to GSSG than the wild type and *bigR*⁻ cells (supplemental Fig. S6). Alternatively, BigR could be a target of a thiol peroxidase similar to Gpx3, a hydroperoxide sensor that promotes the intramolecular disulfide bond that activates Yap1 (51). Proteins similar to Gpx3 exist in most *Xylella* and *Agrobacterium* strains.

In summary, we have described a novel winged-helix repressor that integrates the transcriptional regulation of a sulfur oxidation operon to an oxidative signal through a thiol-based redox switch. Furthermore, because the BigR operon is important for bacterial growth under hypoxia and influences biofilm formation, BigR could become a target to block the operon expression. Small ligands could be identified to either hold helix 1 in between helices 2 and 5 or directly prevent the disulfide bond formation, keeping the repressor bound to its target DNA. This approach might be useful to control biofilm formation in hydrogen sulfide-producing bacteria.

Acknowledgments—We gratefully acknowledge Thais Caroline Dalabona Dombroski and Simone Bau Betim for technical assistance in mass spectrometry and nitrogen gas experiments, respectively, and Jörg Kobarg and José Xavier Neto for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Gajiwala, K. S., and Burley, S. K. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 110–116
- Eicken, C., Pennella, M. A., Chen, X., Koshlap, K. M., VanZile, M. L., Sacchettini, J. C., and Giedroc, D. P. (2003) *J. Mol. Biol.* **333**, 683–695
- Barbosa, R. L., and Benedetti, C. E. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 6185–6194
- Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, L., Mineri, R., Tiveron, C., Levitt, M. D., Prella, A., Fagioli, G., Rimoldi, M., and Zeviani, M. (2009) *Nat. Med.* **15**, 200–205
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A., and Giedroc, D. P. (2003) *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 131–143
- Campbell, D. R., Chapman, K. E., Waldron, K. J., Tottey, S., Kendall, S., Cavallaro, G., Andreini, C., Hinds, J., Stoker, N. G., Robinson, N. J., and Cavet, J. S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 32298–32310
- Liu, T., Chen, X., Ma, Z., Shokes, J., Hemmingsen, L., Scott, R. A., and Giedroc, D. P. (2008) *Biochemistry* **47**, 10564–10575
- Mandal, S., Chatterjee, S., Dam, B., Roy, P., and Das Gupta, S. K. (2007) *Microbiology* **153**, 80–91
- Barbosa, R. L., Rinaldi, F. C., Guimarães, B. G., and Benedetti, C. E. (2007) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 596–598
- Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800
- Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P., and Bricogne, G. (2006) in *Macromolecular Crystallography Protocols* (Doublé, S., ed) Vol. 2, pp. 215–230, Humana Press, Totowa, NJ
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
- Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Smart, O. S., Vonrhein, C., and Womack, T. O. (2009) *BUSTER*, version 2.9.1. Global Phasing Ltd., Cambridge, UK
- Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., 3rd, Snoeyink, J., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, W375–W383
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674
- Gueuné, H., Durand, M. J., Thouand, G., and DuBow, M. S. (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1954–1958
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10037–10041
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., and Baker, N. A. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, W665–W667
- McCoy, J. G., Bingman, C. A., Bitto, E., Holdorf, M. M., Makaroff, C. A., and Phillips, G. N., Jr. (2006) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 964–970
- Hänzelmann, P., Dahl, J. U., Kuper, J., Urban, A., Müller-Theissen, U., Leimkühler, S., and Schindelin, H. (2009) *Protein Sci.* **18**, 2480–2491
- Fiser, A., and Sali, A. (2003) *Methods Enzymol.* **374**, 461–491
- Jones, D. T. (1999) *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202
- Bryson, K., McGuffin, L. J., Marsden, R. L., Ward, J. J., Sodhi, J. S., and Jones, D. T. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**, W36–38
- Lobley, A., Sadowski, M. I., and Jones, D. T. (2009) *Bioinformatics* **25**, 1761–1767
- Lindahl, E., Hess, B., and van der Spoel, D. (2001) *J. Mol. Model.* **7**, 306–317
- Eisenberg, D., Lüthy, R., and Bowie, J. U. (1997) *Methods Enzymol.* **277**, 396–404
- Wiederstein, M., and Sippl, M. J. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, W407–W410
- Willard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R. F., Sykes, B. D., and Wishart, D. S. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 3316–3319
- Thomsen, R., and Christensen, M. H. (2006) *J. Med. Chem.* **49**, 3315–3321
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
- Ferrige, A. G., Seddon, M. J., Green, B. N., Jarvis, S. A., Skilling, J., and Staunton, J. (1992) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6**, 707–711
- Cook, W. J., Kar, S. R., Taylor, K. B., and Hall, L. M. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 337–346
- Rohwerder, T., and Sand, W. (2003) *Microbiology* **149**, 1699–1710
- Weinitschke, S., Denger, K., Cook, A. M., and Smits, T. H. (2007) *Microbiology* **153**, 3055–3060
- Lloyd, D. (2006) *Trends Microbiol.* **14**, 456–462
- Wells, I. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., and Brenner, D. J. (1987) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 136–143
- Kanvinde, L., and Sastry, G. R. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2087–2092
- Thomson, C. J., and Greenway, H. (1991) *Plant Physiol.* **96**, 1294–1301
- Eklund, L. (2000) *Trees Structure and Function* **14**, 177–180
- van Dongen, J. T., Schurr, U., Pfister, M., and Geigenberger, P. (2003) *Plant Physiol.* **131**, 1529–1543
- Spicer, R., and Holbrook, N. M. (2007) *J. Exp. Bot.* **58**, 1313–1320
- Armstrong, W., Webb, T., Darwent, M., and Beckett, P. M. (2009) *Ann. Bot.* **103**, 281–293
- Leite, B., Ishida, M. L., Alves, E., Carrer, H., Pascholati, S. F., and Kitajima, E. W. (2002) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**, 645–650
- Pavlovkin, J., Okamoto, H., Wächter, R., Läuchli, A., and Ullrich, C. I. (2002) *J. Exp. Bot.* **53**, 1143–1154
- Krishna, S. S., Tautz, L., Xu, Q., McMullan, D., Miller, M. D., Abdubek, P., Ambing, E., Astakhova, T., Axelrod, H. L., Carlton, D., Chiu, H. J., Clayton, T., DiDonato, M., Duan, L., Elsiger, M. A., Grzechnik, S. K., Hale, J., Hampton, E., Han, G. W., Haugen, J., Jaroszewski, L., Jin, K. K., Klock, H. E., Knuth, M. W., Koesema, E., Morse, A. T., Mustelin, T., Nigoghossian, E., Oommachen, S., Reyes, R., Rife, C. L., van den Bedem, H., Weekes, D., White, A., Hodgson, K. O., Wooley, J., Deacon, A. M., Godzik, A., Lesley, S. A., and Wilson, I. A. (2007) *Proteins* **69**, 415–421
- Cipollone, R., Ascenzi, P., and Visca, P. (2007) *IUBMB Life* **59**, 51–59
- Wilson, K., Mudra, M., Furne, J., and Levitt, M. (2008) *Dig. Dis. Sci.* **53**, 277–283
- Arunkumar, A. I., Campanello, G. C., and Giedroc, D. P. (2009) *Proc. Natl.*

BigR, a Novel Redox Switch

- Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18177–18182
50. Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S. E. (2001) *Cell* **105**, 103–113
51. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002) *Cell* **111**, 471–481
52. Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G., and Ryu, S. E. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1179–1185
53. Eghbal, M. A., Pennefather, P. S., and O'Brien, P. J. (2004) *Toxicology* **203**, 69–76
54. Brandes, N., Schmitt, S., and Jakob, U. (2009) *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 997–1014

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron
Título do projeto: Caracterização da interação entre a proteína PthA de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* e as proteínas Translina e WSP de *Citrus sinensis*, envolvidas em proliferação celular
Pesquisador responsável: Celso Eduardo Benedetti
Experimentador: Adriana Santos Soprano

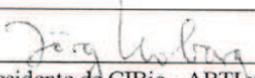
Nível do treinamento do experimentador: -Iniciação científica, -mestrado, -doutorado, -doutorado direto, -pós-doutorado, -nível técnico, -outro, especifique: _____
Resumo do projeto:

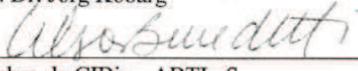
O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), constitui uma doença que afeta a maioria das espécies do gênero *Citrus*, ocorre praticamente em todos continentes e se destaca como uma das maiores ameaças à citricultura brasileira. No Brasil, o cancro cítrico está presente de forma endêmica nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A doença é facilmente disseminada pelas chuvas, ventos fortes e pelo próprio homem, através do manejo indiscriminado de instrumentos de colheita contaminados.

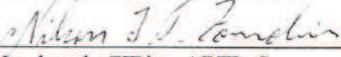
O mecanismo molecular pelo qual Xac causa cancro não é inteiramente conhecido, entretanto, sabe-se que a bactéria, ao infectar a planta, utiliza o sistema secretório tipo III (T3S) para injetar proteínas de patogenicidade, entre elas, PthAs da família AvrBs3/PthA. Quando expresso na célula hospedeira, PthA induz lesões características do cancro, como hipertrofia e hiperplasia e estudos recentes tem sugerido que membros dessa família atuam como fatores de transcrição. Portanto, a elucidação de como PthA atua a transcrição é de grande importância para o entendimento do seu mecanismo de ação e desenvolvimento das lesões do cancro. Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo caracterizar as interações entre PthA e as proteínas de laranja doce (*Citrus sinensis*) Translina e WSP (water stress protein), previamente identificadas em ensaios de duplo híbrido. Ambas Translina e WSP estão associadas aos processos de transcrição e tradução em eucariotos e envolvidas em proliferação celular em mamíferos e plantas, respectivamente.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 22.07.08 .

Parecer final: -projeto aprovado, -projeto recusado, -projeto com deficiências, favor comentários abaixo:


 Presidente de CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Jörg Kobarg


 Membro da CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


 Membro da CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin