

JOÃO PAULO BATISTA MACHADO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ALVOS
CELULARES DA PROTEÍNA NIG (*NSP-
INTERACTING GTPASE*)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

JOÃO PAULO BATISTA MACHADO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ALVOS
CELULARES DA PROTEÍNA NIG (*NSP-
INTERACTING GTPASE*)**

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

APROVADA: 20 de julho de 2011.

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior

Pesq. Anésia Aparecida dos Santos

Prof^a. Claudine Márcia Carvalho
(Coorientadora)

Prof^a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

*Aos meus pais Antonio e
Maria Lucia, e aos meus irmãos
Elisangela, Edilaine e Marco Antônio.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força e perseverança para chegar até aqui, por providenciar tudo que sou e que tenho, e por me ensinar a reconhecer, nas coisas simples do dia-a-dia, sua providência divina.

Aos meus pais Antonio e Maria Lucia, exemplos de vida e de coragem, por me apoiarem e acreditarem em mim. Agradeço também por não cessarem de rezar e interceder por mim, dando-me forças principalmente nos momentos em que o desânimo me fazia fraco.

Aos meus irmãos Elisângela, Edilaine e Marco Antônio, por me incentivarem em cada nova etapa da minha vida. Tenho muito orgulho de vocês!

À Universidade Federal de Viçosa, por todas as oportunidades de estudo oferecidas durante toda minha vida acadêmica;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À professora Elizabeth, exemplo de dedicação profissional, pela orientação durante todo esse tempo que passei em seu laboratório. Agradeço também pela oportunidade de desenvolver este projeto, que permitiu meu crescimento profissional, e por permitir que em seu laboratório eu pudesse dar os primeiros passos na pesquisa.

À professora Claudine, pela amizade, dedicação a este trabalho, e por toda ajuda nos ensaios realizados, principalmente pelas horas gastas no microscópio confocal.

Aos grandes amigos Pedro, Cris, Murilo, Iara, Gustavo, Kênia, Giselle, Rejane por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar. Obrigado por aturarem minhas reclamações, minha chatice e meu mau humor, e por todos os momentos divertidos que passamos durante este tempo.

À estudante de iniciação científica Iara, que além de uma estagiária, foi uma amiga. Agradeço por sua incansável dedicação a este trabalho, por toda sua ajuda na condução dos experimentos (mesmo que nos finais de semana) e pelo companheirismo. Agradeço também ao Marcos que me ajudou na fase final deste trabalho.

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, os antigos e os atuais, pela prazerosa convivência durante estes anos e por tornarem cada dia de trabalho uma oportunidade única de aprendizado.

À Marlene e à Gláucia pela presteza.

E a todos que passaram pela minha vida durante a realização deste trabalho e que deixaram sua contribuição para a concretização do mesmo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Geminivírus: classificação, genoma funcional e ciclo de infecção.....	4
Movimento intra e intercelular do genoma viral.....	5
Interações de fatores do hospedeiro com as proteínas de movimento MP e NSP.....	7
Transporte nucleocitoplasmático.....	11
Proteínas GTPases com domínio ArfGAP.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
Clonagem de <i>NIG</i> e de seus domínios em vetores de expressão em levedura e planta.....	24
Transformação de levedura e avaliação da atividade de transativação.....	27
Triagem pelo sistema de duplo híbrido em leveduras utilizando o domínio Pro-Rich como isca.....	28
Clonagem dos genes que codificam as possíveis proteínas de interação com <i>NIG</i> em vetores de expressão em planta.....	30
Confirmação da interação entre <i>NIG</i> e <i>CSN5A</i> ou <i>At2G41020</i> , por meio do sistema de duplo híbrido, utilizando o cDNA completo de <i>CSN5A</i> e de <i>At2G41020</i>	31
Expressão transiente em folhas de tabaco por agroinoculação.....	32
Microscopia confocal e processamento das imagens.....	32
Ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC).....	33
Co-imunoprecipitação.....	34
Técnicas de biologia molecular.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
Identificação de proteínas que interagem com <i>NIG</i> (<i>NSP-interacting GTPase</i>).....	36
Pro-Rich interage especificamente com <i>CSN5A</i> e com <i>At2G41020</i>	41

A proteína CSN5A é um componente do COP9 signalossomo.....	45
A proteína At2G41020 é homóloga a proteínas que ligam a poliglutaminas (PQBP1/Npw38) de humanos.....	47
A proteína NIG interage <i>in vivo</i> com as proteínas CSN5A e At2G41020.....	50
Localização subcelular das proteínas CSN5A e At2G41020.....	53
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

RESUMO

MACHADO, João Paulo Batista, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2011. **Identificação e caracterização de alvos celulares da proteína NIG (*NSP-Interacting GTPase*)**. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Claudine Márcia Carvalho e Gilberto Sachetto Martins.

A proteína NSP (*nuclear shuttle protein*) de geminivírus facilita o transporte intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma e atua juntamente com a proteína MP (*movement protein*) na propagação do DNA viral para células adjacentes. No entanto, o mecanismo pelo qual NSP medeia o movimento nucleocitoplasmático do DNA viral não é conhecido. Recentemente, foi identificada uma GTPase, denominada NIG (*NSP-interacting GTPase*), cujas propriedades estruturais e bioquímicas indicam um possível envolvimento no transporte nucleocitoplasmático do genoma viral, atuando como cofator específico de NSP. Com o objetivo de determinar a função celular de NIG, e assim verificar se esta GTPase desempenha algum papel na translocação do genoma viral, foi realizada uma triagem de proteínas que interagem com o domínio C-terminal (Pro-Rich) de NIG, por meio do sistema de duplo híbrido em leveduras. A estirpe de levedura AH109, previamente transformada com pBD-Pro-Rich, foi co-transformada com a biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, clonada no vetor pEXP-AD502. Os duplos transformantes foram selecionados em meio deficiente dos aminoácidos leucina e triptofano. A seleção da interação entre BD-Pro-Rich e proteínas codificadas pela biblioteca de cDNA fusionadas ao domínio de ativação de Gal4 (AD) foi feita em meio deficiente de histidina, suplementado com 10 mM de 3AT. Entre os cinco cDNAs isolados que apresentaram prototrofia à histidina e atividade de β -galactosidase, CSN5A e At2G41020 foram selecionados para análises mais detalhadas. CSN5A (*COP9 Signalosome 5A*) é um dos componentes do complexo COP9 signalossomo

(CSN) e consiste na subunidade responsável pela atividade de isopeptidase exibida por este complexo. A proteína At2G41020 não possui função conhecida e tem sido associada à maquinaria de spliceossomo, devido à sua homologia com a proteína Npw38 de humanos. A interação *in vivo* entre NIG e CSN5A ou At2G41020 foi demonstrada por ensaios de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) e parece ocorrer no núcleo, bem como em agregados citoplasmáticos. A confirmação da interação entre NIG e CSN5A *in vivo* foi reforçada por meio de ensaio de co-immunoprecipitação. A proteína CSN5A, fusionada à GFP, localiza-se tanto no núcleo como no citoplasma, enquanto que a proteína quimérica At2G41020-GFP está localizada predominantemente no núcleo, consistente com um possível envolvimento com o spliceossomo. Embora tenha sido demonstrado que a proteína NIG está localizada no citosol, a co-expressão de YFP-NIG com CSN5A-GFP ou com At2G41020-GFP resultou no seu redirecionamento para o núcleo. Coletivamente, estes resultados apontam CSN5A e At2G41020 como alvos na elucidação do papel funcional de NIG no transporte celular de macromoléculas.

ABSTRACT

MACHADO, João Paulo Batista, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2011. **Identification and characterization of cellular targets of the protein NIG (NSP-Interacting GTPase)**. Advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisors: Claudine Márcia Carvalho and Gilberto Sachetto Martins.

The geminivirus nuclear shuttle protein (NSP) facilitates the intracellular transport of viral DNA from the nucleus to the cytoplasm and acts along with the movement protein (MP) to translocate the viral DNA to adjacent cells. However, the mechanism by which NSP mediates the nucleocytoplasmic movement of the viral DNA is unknown. Recently, a GTPase, designated NIG (NSP-interacting GTPase), which displays biochemical and structural properties consistent with a role in the nucleocytoplasmic transport of viral DNA, has been identified. NIG may act as a cellular cofactor for NSP function. To assess the potential role of NIG in general cellular nucleocytoplasmic transport of protein complexes, we performed yeast two-hybrid screens with a Pro-rich domain of NIG as bait. The yeast strain AH109, previously transformed with pBD-Pro-Rich, was co-transformed with a cDNA library from *Arabidopsis thaliana* cloned into pEXP-AD502 vector. Double transformants were selected on medium lacking leucine and tryptophan. To select for interactions between the bait BD-Pro-Rich and Arabidopsis cDNA library-encoded proteins, double transformants were plated on medium lacking His and supplemented with 10mM 3AT. Among five isolated cDNAs that displayed His prototrophy and β -galactosidase activity, CSN5A and At2G41020 were selected for further analyses. CSN5A (*COP9 Signalosome 5A*) is one of the components of COP9 signalosome complex (CSN) and corresponds to the subunit responsible for the isopeptidase activity displayed by this complex. The function of the deduced protein from At2G41020 is unknown but has been associated with the spliceosome machinery due to its homology to the human

Npw38. Interactions between NIG and CSN5A or At2G41020 were also detected *in vivo* by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays and appear to occur in the nucleus and in cytosolic aggregates. The *in vivo* interaction between NIG and CSN5A was further confirmed by co-immunoprecipitation assays. A CSN5A-GFP fusion was located in the nucleus and cytoplasm, whereas At2G41020-GFP was predominantly localized in the nucleus, consistent with its possible involvement with the spliceosome. Although NIG has been shown to be located in the cytoplasm, co-expression of YFP-NIG with CSN5A-GFP or At2G41020-GFP resulted in its relocation to the nucleus. Collectively, these results indicate that CSN5A and At2G41020 may be targets for the elucidation of the functional role of NIG in the cellular transport of macromolecules.

INTRODUÇÃO

O mecanismo de compartimentalização de funções biológicas em diferentes organelas tem sido utilizado pelas células eucarióticas como um meio eficiente de controle de respostas adaptativas, através do fracionamento regulado de componentes de vias de sinalização. Neste contexto, o transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas tem enorme relevância como um conversor regulatório que promove interações controladas destes componentes em resposta a estímulos específicos. Na última década, têm sido alcançados progressos significativos na identificação de componentes da maquinaria de transporte nucleocitoplasmático em plantas, por meio da homologia funcional com diferentes organismos (Merkle, 2004). Apesar disso, muito pouco se sabe sobre o processo de liberação de complexos de macromoléculas do poro nuclear para o citosol, e características específicas da maquinaria do transporte nuclear de células vegetais ainda não foram identificadas. Em células de mamíferos, vírus, cujo genoma transita entre núcleo e citoplasma durante o processo de infecção, têm sido utilizados como alvos para identificação de componentes da maquinaria celular de transporte nucleocitoplasmático. Similarmente, os geminivírus, que infectam uma ampla gama de espécies de plantas e replicam seu genoma no núcleo de células infectadas, representam modelos relevantes no estudo de replicação do DNA, controle do ciclo celular e transporte intra e intercelular de proteínas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Gutierrez 2002; Carvalho *et al.*, 2008a). Particularmente relevante no transporte intracelular do DNA viral é a proteína de geminivírus bissegmentados, designada NSP (*nuclear shuttle protein*), que se liga ao DNA viral recém replicado no núcleo e facilita seu transporte para o citoplasma, provavelmente por meio de interações com a

maquinaria de transporte nucleocitoplasmático das células hospedeiras (Lazarowitz e Beachy, 1999).

Recentemente, a proteína NIG (*NSP-interacting GTPase*) de *Arabidopsis thaliana* foi identificada por interagir, *in vitro* e *in vivo*, com a proteína NSP de geminivírus. Esta GTPase apresenta propriedades estruturais e bioquímicas que condizem com um possível papel no transporte nucleocitoplasmático do genoma viral, atuando como provável cofator específico para a função da proteína viral NSP (Carvalho *et al.*, 2008a). A porção N-terminal de NIG apresenta similaridade de sequência com hRIP (*Rev-interacting protein*), uma proteína celular que interage com a proteína Rev de HIV e que foi demonstrada ser um cofator celular essencial no movimento do RNA da periferia do núcleo para o citoplasma e sua subsequente liberação do complexo de exportação nuclear (Sánchez-Velaz *et al.*, 2004). Rev atua no transporte do vírus do núcleo para o citoplasma, exercendo função semelhante à verificada para NSP em geminivírus. Assim como hRIP, NIG exibe na região N-terminal um domínio ArfGAP, típico de proteínas envolvidas no tráfego de vesículas, localização intracelular de proteínas ou sinalização. A similaridade de sequência entre NIG e hRIP sugere que ambas exerçam uma função similar na exportação nuclear (Carvalho *et al.*, 2008a). No entanto, diferentemente de hRIP que se localiza no núcleo de células de mamíferos, a proteína NIG se acumula ao redor do envelope nuclear em células vegetais (Carvalho *et al.*, 2008a).

Além de se associar com NSP, a proteína NIG redireciona a proteína viral do núcleo para o citoplasma. Embora estes resultados tenham posicionado NIG no mecanismo de transporte intracelular do DNA viral (Carvalho *et al.*, 2008a), a função dessa GTPase no transporte nucleocitoplasmático celular geral de complexos proteína - ácidos nucleicos ainda não foi determinada. Considerando que não existe nenhuma vantagem para a célula vegetal em sintetizar uma proteína exclusiva para atuar no transporte ativo do DNA viral, é razoável

pressupor que NIG esteja envolvida em eventos importantes de transporte nucleocitoplasmático de proteínas celulares. Assim, para determinar se esta GTPase está envolvida neste mecanismo de transporte, torna-se imprescindível a identificação dos seus principais alvos celulares.

REVISÃO DE LITERATURA

Geminivírus: classificação, genoma funcional e ciclo de infecção

A família *Geminiviridae*, composta pelos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, constitui um grupo de vírus de plantas de grande importância econômica, pois infectam culturas agrônomicas relevantes. Os quatro gêneros podem ser diferenciados de acordo com o tipo de inseto vetor do vírus, a gama de hospedeiros (monocotiledôneas ou dicotiledôneas) e a organização genômica, podendo apresentar um ou dois componentes de DNA (Fauquet *et al.*, 2008). Dentre os gêneros de geminivírus, o *Begomovirus* possui o maior número de representantes e inclui vírus transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci* para várias espécies de dicotiledôneas (Fauquet *et al.*, 2008). Os begomovírus podem ser bipartidos, possuindo dois componentes genômicos, ou monopartidos, com apenas um componente de DNA, mas com dois genes adicionais, ambos codificando proteínas envolvidas no movimento do vírus (Rojas *et al.*, 2001). Todos os begomovírus encontrados no Brasil são bipartidos, ou seja, possuem dois componentes genômicos denominados componentes A e B (Ribeiro *et al.*, 2003).

Os begomovírus estão associados com duas classes de satélites, denominadas alfassatélites e betassatélites (Briddon e Stanley, 2006). Os betassatélites ocorrem apenas no Velho Mundo, e a grande maioria tem sido identificada em associação com begomovírus monopartidos (Briddon *et al.*, 2008; Briddon e Stanley, 2006). Os alfassatélites, por sua vez, além de se associarem com begomovírus monopartidos associados com betassatélites no Velho Mundo, recentemente, têm sido mostrado estarem associados com

begomovírus ocorrendo no Novo Mundo (Romay *et al.*, 2010; Paprotka *et al.*, 2010).

O DNA-A da maioria dos begomovírus contém cinco genes (*Cp*, *Rep*, *Trap*, *Ren* e *AC4*), alguns deles sobrepostos, que codificam para as funções requeridas na replicação do DNA, controle da expressão gênica, supressão das defesas do hospedeiro e encapsidação (Elmer *et al.*, 1998; Fontes *et al.*, 1994; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Settlege *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2005; Trinks *et al.*, 2005; Vanitharani *et al.*, 2004; Chellappan *et al.*, 2005). O DNA-B contém os genes que codificam as proteínas de movimento NSP (*nuclear shuttle protein*) e MP (*movement protein*), na fita viral e complementar, respectivamente (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Estas proteínas estão envolvidas com o movimento do vírus durante a infecção e afetam a patogenicidade viral (Rojas *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007).

Movimento intra e intercelular do genoma viral

Para o estabelecimento de uma infecção produtiva, os geminivírus devem replicar-se no núcleo das células, mover-se célula-a-célula e, finalmente, mover-se por toda a planta via transporte mediado pelo floema. Neste processo, os geminivírus precisam transpor duas barreiras distintas, impostas pelo envelope nuclear e pela parede celular, para assim infectar a planta de forma sistêmica (Rojas *et al.*, 2005). Em geminivírus bipartidos foram identificadas duas proteínas relacionadas ao movimento viral. A proteína MP, codificada pelo gene *BC1* e a proteína NSP, codificada pelo gene *BV1* (Brough *et al.*, 1988; Etesami *et al.*, 1988), são as únicas proteínas consideradas de movimento, uma vez que mutações que inativam os genes correspondentes levam à perda completa de infectividade em plantas, sem causar qualquer efeito aparente na replicação do

genoma viral (Lazarowitz, 1992). Plantas transgênicas expressando MP apresentam sintomas típicos de infecção, enquanto que aquelas expressando NSP possuem aparência normal (Ingham *et al.*, 1995; Pascal *et al.*, 1993). Além disso, NSP e MP diferem quanto à localização subcelular. Em plantas infectadas, NSP localiza-se no núcleo (Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995) e MP encontra-se na membrana plasmática (Pascal *et al.*, 1993).

Estudos bioquímicos, moleculares e celulares têm mostrado que NSP se liga ao DNA viral fita simples e o transporta do núcleo para o citoplasma, ao passo que MP facilita o movimento célula-a-célula (Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995, 1996; Rojas *et al.*, 1998; Noueiriy *et al.*, 1994; Lazarowitz e Beachy, 1999; Hehnle *et al.*, 2004). Dois mecanismos têm sido propostos para descrever o movimento de geminivírus bipartidos. O modelo “*relay race*” foi proposto baseado em experimentos de microinjeção e ensaios de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) utilizando *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV; Noueiriy *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998). Estes ensaios forneceram evidências que NSP transporta DNA plasmidial entre o núcleo e o citoplasma e que MP transporta dsDNA, mas não ssDNA, para células vizinhas (Noueiriy *et al.*, 1994). Além disso, foi demonstrado que ssDNA e dsDNA ligam-se à NSP e à MP, de um modo dependente de forma e tamanho (Rojas *et al.*, 1998). De acordo com este modelo, NSP transfere o dsDNA do núcleo para o citoplasma. No citoplasma o dsDNA é entregue para MP, seguido pelo movimento do complexo MP-DNA célula-a-célula através dos plasmodesmas. Um segundo modelo, “*couple-skating*”, foi proposto baseado em estudos utilizando as proteínas de movimento de *Squash leaf curl virus* (SqLCV) e *Abutilon mosaic virus* (AbMV; Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995, 1996; Hehnle *et al.*, 2004). Foi observada uma ligação mais forte de NSP com ssDNA do que com dsDNA, e apenas uma interação fraca de MP com ssDNA e nenhuma interação com dsDNA. De acordo com este modelo, NSP se liga ao genoma viral

ssDNA recém-replicado no núcleo, e o complexo é transportado para o citoplasma. MP, localizada na periferia celular, se liga ao complexo NSP-ssDNA e facilita seu movimento através da parede celular para uma célula adjacente não-infectada (Hehnle *et al.*, 2004; Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; Zhang *et al.*, 2001).

O transporte de partículas virais do núcleo para o citoplasma e vice-versa é fundamental para o estabelecimento e desenvolvimento do vírus em células do hospedeiro. Considerando a importante função de NSP no transporte do vírus na planta, acredita-se que essa proteína interaja com proteínas do hospedeiro nos diversos compartimentos celulares (Lazarowitz e Beachy, 1999). Da mesma forma, independentemente dos modelos citados, o transporte célula-a-célula de geminivírus representa um mecanismo com vários passos, no qual a proteína MP tem que mediar uma série de funções distintas: (i) ligação ao complexo DNA/NSP ou DNA (dependendo do modelo), (ii) direcionamento e modificação do plasmodesma, (iii) passagem através do plasmodesma e (iv) liberação do substrato transportado após a transferência ser completada (Lucas, 2006). Durante estes processos, uma série de interações de MP com proteínas do hospedeiro são esperadas. Tem sido sugerido que o estado de fosforilação de MP especifica seu conjunto de funções (Waigmann *et al.*, 2000). Lee (2008) mostrou que MP de BDMV pode ser fosforilada em sua porção carboxiterminal por proteínas cinases associadas à parede celular. Isto pode ser necessário no aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas, permitindo assim, o movimento viral célula-a-célula.

Interações de fatores do hospedeiro com as proteínas de movimento MP e NSP

Durante o ciclo de infecção, os geminivírus dependem extensivamente de interações intermoleculares entre as suas proteínas e as proteínas do hospedeiro, que são necessárias tanto para uma compatibilidade básica quanto para a modulação da infecção viral, suprimindo as respostas de defesa (Nelson *et al.*, 2005). Deste modo, para entender melhor os mecanismos do movimento inter e intracelular dos vírus, vários grupos têm buscado identificar as proteínas do hospedeiro que podem estar envolvidas nestes processos, baseando-se na sua habilidade de ligação às proteínas de movimento viral (Oparka, 2004).

Por meio de triagem pelo sistema de duplo híbrido em leveduras, Krenz *et al.* (2010) identificaram uma chaperone, uma proteína de choque térmico cognata de 70KDa (cpHSC70-1) codificada no núcleo e direcionada para os plastídeos de *Arabidopsis thaliana*, como uma possível proteína de interação com a proteína MP de *Abutilon mosaic virus* (AbMV). A interação entre estas proteínas foi avaliada *in vivo*, e estudos, utilizando linhagens de *Nicotiana benthamiana* silenciadas para esta chaperone, sugerem um envolvimento de cpHSC70 no ciclo de infecção do AbMV (Krenz *et al.*, 2010). Outra proteína, uma sinaptotagmina (SYTA), foi identificada também pelo sistema de duplo híbrido em leveduras, utilizando a proteína MP de *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) como isca (Lewis e Lazarowitz, 2010). A interação entre SYTA e MP de CaLCuV foi confirmada *in vitro*. Estudos com linhagens *knockdown* para SYTA, bem como a utilização de uma forma dominante negativa da mesma, mostraram que esta proteína regula tanto a reciclagem de endossomos quanto a atividade de MP no movimento viral célula-a-célula (Lewis e Lazarowitz, 2010). O fato de MP de diferentes vírus interagirem com SYTA sugere que as proteínas de movimento de vírus distintos transportam seus cargos para o plasmodesma para a propagação célula-a-célula, por meio de uma via de reciclagem endocítica (Lewis e Lazarowitz, 2010).

A proteína NSP codificada por CaLCuV interage diretamente com a proteína AtNSI (*nuclear shuttle protein interactor*) de *Arabidopsis thaliana*, uma acetiltransferase nuclear (McGarry *et al.*, 2003) capaz de acetilar as histonas H2A e H3 *in vitro*, bem como a proteína capsidial viral. Apesar da interação, a proteína NSP não consiste em um substrato para esta acetiltransferase (McGarry *et al.*, 2003). De fato, foi mostrado que NSP pode inibir a atividade de NSI por interferir com a sua montagem em complexos ativos, sugerindo um mecanismo no qual NSP possa recrutar NSI para regular a exportação nuclear do genoma viral (Carvalho *et al.*, 2006).

Florentino *et al.* (2006) identificaram uma proteína de *Arabidopsis*, denominada NsAK (*NSP-associated Kinase*), capaz de interagir especificamente com NSP de CaLCuV. NsAK pertence à família de receptores do tipo serina/treonina cinases (RLK, *receptor-like kinase*) classificada como PERK-like. Foi demonstrado que NSP funciona como substrato de NsAK e que a perda de função desta cinase reduz a eficiência de infecção e atenua o desenvolvimento de sintomas. Isto indica que NsAK atua como um contribuidor positivo para a infecção de geminivírus podendo atuar na regulação da função de NSP.

A interação entre membros da família LRR-RLK (*leucine rich-repeat - receptor-like kinase*), denominados NIK (*NSP-interacting kinase*), e NSP de geminivírus é conservada entre homólogos de NIK de diferentes espécies hospedeiras e NSP de diferentes geminivírus (Mariano *et al.*, 2004). NIKs são proteínas cinases autênticas, com propriedades bioquímicas de receptores de sinalização. A ligação de NSP à NIK inibe a sua atividade cinase, e a perda da função do gene *NIK* aumenta a suscetibilidade à infecção por geminivírus (Fontes *et al.*, 2004). Da mesma forma, mutações no A-loop de NIK, que impedem a sua autofosforilação, prejudicam a capacidade de NIK em elicitar a resposta de defesa contra geminivírus (Santos *et al.*, 2009). Por outro lado, a

superexpressão de NIK1 de *Arabidopsis* em tomateiro atenua o desenvolvimento de sintomas e atrasa a infecção viral (Carvalho *et al.*, 2008c).

Outra proteína de *Arabidopsis* foi identificada por interagir, *in vitro* e *in vivo*, com a proteína NSP de geminivírus (Carvalho *et al.*, 2008a). Esta proteína, denominada NIG (*NSP-interacting GTPase*), exibe na sua porção N-terminal um domínio ArfGAP, característico de proteínas regulatórias envolvidas no tráfego de vesículas, na localização intracelular de proteínas ou sinalização (Fritz *et al.*, 1995; Sabe *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2001). Além disso, apresenta grande similaridade de sequência com a proteína hRIP (*Rev-interacting protein*), identificada pela interação com a proteína Rev de HIV (Sánchez-Velar *et al.*, 2004). Rev atua no transporte do vírus do núcleo para o citoplasma (Fritz *et al.*, 1995), enquanto hRIP atua como um cofator celular essencial, que auxilia no transporte do RNA da periferia do núcleo para o citoplasma e sua subsequente liberação do complexo de exportação nuclear (Sánchez-Velar *et al.*, 2004). Embora apresentem sequências similares, NIG e hRIP divergem quanto à sua localização subcelular, uma vez que hRIP se localiza no núcleo de células de mamíferos (Sánchez-Velar *et al.*, 2004), e a proteína NIG se localiza no citoplasma, com um evidente acúmulo ao redor do envelope nuclear em células vegetais (Carvalho *et al.*, 2008a). Além das propriedades estruturais e da localização subcelular de NIG, outras propriedades bioquímicas são consistentes com seu papel no transporte nucleocitoplasmático (Carvalho *et al.*, 2008a). NIG apresenta ligação específica a GTP e possui atividade GTPase intrínseca, uma característica comum de proteínas regulatórias envolvidas no tráfego de proteínas. De fato, a co-expressão transiente de NIG e NSP em folhas de tabaco resulta no redirecionamento da proteína viral do núcleo para o citoplasma. Além disso, a superexpressão de NIG em plantas transgênicas acarreta o aumento da suscetibilidade à infecção por geminivírus, como esperado para um regulador positivo do ciclo de infecção (Carvalho *et al.*, 2008a).

Com base nas propriedades estruturais e bioquímicas, na localização subcelular e na capacidade de NIG mover o complexo NSP-DNA do núcleo para o citoplasma, foi proposta a sua atuação como um cofator celular para NSP (Carvalho *et al.*, 2008b). Neste modelo, NIG se ligaria à NSP no lado citoplasmático do complexo poro nuclear e facilitaria o transporte intracelular do complexo DNA-NSP do envelope nuclear para a periferia celular, onde ocorreria sua substituição por MP (Carvalho *et al.*, 2008b).

Transporte nucleocitoplasmático

A compartimentalização celular é uma característica de células eucarióticas que permite a concentração de conjuntos específicos de macromoléculas e metabólitos, bem como a separação entre os processos celulares. Além disso, permite controlar o tráfego de macromoléculas e regular a transdução de sinal entre os compartimentos individuais da célula (Merkle, 2001). O transporte de macromoléculas entre o núcleo e o citoplasma consiste em um processo essencial em células eucarióticas, uma vez que o envelope nuclear separa o citoplasma, onde ocorre a síntese de proteínas, do núcleo, onde o RNA é sintetizado através da transcrição do DNA genômico (Merkle, 2004). Nos últimos anos, um crescente número de componentes da maquinaria de transporte nuclear tem sido caracterizado em plantas. Este progresso, embora longe de ser concluído, confirmou que as características gerais do transporte nuclear são conservadas entre plantas e outros organismos. Sendo assim, a maioria dos estudos para identificação de fatores envolvidos no transporte de cargos específicos tem-se baseado em genética reversa e homologia estrutural (Pay *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006), embora componentes

específicos de plantas também estejam sendo identificados (Meier, 2007; Merkle, 2004).

O transporte entre o núcleo e o citoplasma ocorre exclusivamente através do complexo poro nuclear, que interrompe o envelope nuclear e permite a passagem de moléculas entre os dois compartimentos (Fahrenkrog *et al.*, 2001). No entanto, o complexo poro nuclear cria uma barreira permeável, por exclusão hidrofóbica (Ribbeck e Görlich, 2002), onde apenas receptores de transporte nuclear são capazes de passar de forma eficiente (Frey e Görlich, 2009). Estes receptores, juntamente com as proteínas adaptadoras, garantem a seletividade do processo, pois reconhecem de forma específica os sinais presentes em suas moléculas-cargo, transportando-as eficientemente através do complexo poro nuclear (Pemberton e Paschal, 2005).

A maioria dos receptores de transporte nuclear são proteínas de ligação à Ran (*Ran Binding Proteins* - RanBPs). No genoma humano, RanBPs são codificadas por uma família gênica de pelo menos 20 membros; em leveduras e em *Arabidopsis thaliana*, são encontrados, respectivamente, 14 e 17 genes codificando diferentes RanBPs (Merkle, 2004). A importina beta foi o primeiro receptor de transporte nuclear identificado (Görlich *et al.*, 1995a), pertencendo à grande família de receptores de transporte nuclear importina beta-like (Görlich *et al.*, 1997). Estes receptores se ligam e transportam classes diferentes de cargo através do envelope nuclear, com afinidades distintas, em função de sua associação ou não com RanGTP (Görlich *et al.*, 1996). As importinas, que atuam como receptores de importação nuclear, apresentam alta afinidade com sua molécula-cargo na ausência de RanGTP, se dissociando como consequência da ligação de RanGTP, à medida em que o complexo importina-cargo alcança o compartimento nuclear (Figura 1). Em contraste, as exportinas, receptores de exportação nuclear, se ligam a seus cargos cooperativamente com RanGTP, se desligando somente após a sua hidrólise, mediada por proteínas regulatórias de

Ran localizadas no citoplasma, RanGAP1 (*Ran-GTPase-activating protein 1*) e RanBP1 (*Ran-binding protein 1*; Merkle, 2011).

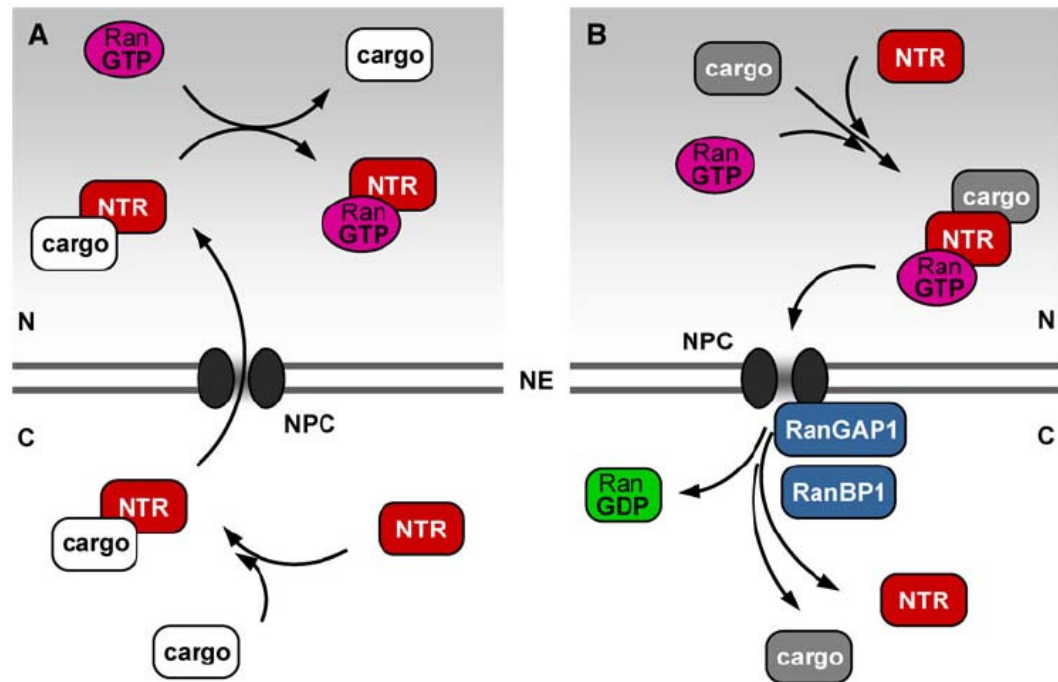


Figura 1: Esquema simplificado dos processos de importação e exportação nuclear facilitada por receptores de transporte nuclear (NTR) pertencentes à família importina beta. O complexo poro nuclear (NPC) fornece o acesso para a troca de moléculas entre o núcleo (N) e o citoplasma (C) através do envelope nuclear (NE). As importinas se ligam a sua molécula carga na ausência de RanGTP no citoplasma, e se dissociam da mesma no núcleo, após a sua interação com RanGTP, conforme mostrado em (A). A molécula carga importada é liberada no nucleoplasma e a importina retorna para o citoplasma associada à RanGTP, onde o complexo importina-RanGTP é dissociado devido a hidrólise de RanGTP. Diferentemente das importinas, as exportinas se ligam a sua molécula carga de forma cooperativa com RanGTP no núcleo, conforme mostrado em (B). Após a translocação através do NPC, este complexo ternário é dissociado por meio da hidrólise de RanGTP, catalisada por RanGAP1 (*Ran-GTPase-activating protein 1*) e RanBP1 (*Ran-binding protein 1*). A molécula carga exportada é liberada no citoplasma e a exportina retorna para o núcleo por conta própria (Merkle *et al.*, 2011).

Enquanto muitas moléculas-carga se ligam diretamente a seus receptores de transporte nuclear, outras são ligadas por intermédio de uma proteína adaptadora. A importina alfa (Görlich *et al.*, 1994), pertencente à grande família de proteínas contendo repetições ARM em plantas (Mugdil *et al.*, 2004), é

uma proteína adaptadora que atua como receptor para proteínas contendo sinal de localização nuclear (Görlich *et al.*, 1994, 1995a, b). Estes sinais de localização nuclear consistem de um pequeno segmento de resíduos de aminoácidos básicos, ou dois destes motivos separados por um pequeno espaçador (sinal de localização nuclear bipartido). A maioria das proteínas cariofílicas contém este sinal de localização nuclear básico e são importadas para o núcleo como um complexo triplo, consistindo da molécula-cargo, da proteína adaptadora importina alfa e do receptor de importação importina beta (Görlich *et al.*, 1995a, b). Após a ligação de RanGTP à importina beta no núcleo, o complexo é dissociado e a molécula-cargo é liberada no nucleoplasma (Görlich e Kutay, 1999; Pemberton e Paschal, 2005). Enquanto a proteína adaptadora importina alfa é reciclada de volta ao citoplasma através de um receptor de exportação nuclear exclusivo, exportina 2 (Kutay *et al.*, 1997; Haasen e Merkle, 2002), o receptor de transporte nuclear importina beta volta ao citoplasma por conta própria, ligado à RanGTP.

Além do sinal de localização nuclear básico, existem vias de importação nuclear adicionais que funcionam independentemente do heterodímero importina alfa/beta (Görlich e Kutay, 1999; Pemberton e Paschal, 2005), também caracterizados em plantas, como é o caso do receptor de transporte nuclear transportina 1 (TRN1; Ziemienowicz *et al.*, 2003). TRN1 de humanos reconhece o domínio M9 presente em algumas ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs). Ziemienowicz *et al.* (2003) identificaram três proteínas de *Arabidopsis* que contêm domínio M9-like e que são reconhecidos de forma específica por *AfTRN1*.

Em plantas, sete receptores de transporte nuclear da família importina beta-like foram caracterizados funcionalmente. Embora estes receptores transportem moléculas-cargo específicas de plantas, observa-se uma alta conservação funcional de proteínas importina beta-like entre vertebrados e

plantas (Merkle, 2011). Além disso, os sinais que conferem o transporte nuclear são permutáveis entre organismos, sugerindo uma alta conservação do princípio básico do processo de transporte nuclear (Merkle, 2011).

RanBP1 representa outro tipo de RanBPs. Proteínas *RanBP1-like* formam uma pequena família de seis membros em *Arabidopsis* e de três em humanos. Estas proteínas contêm um domínio de ligação à Ran diferente do encontrado em proteínas importina beta-*like* (Görlich *et al.*, 1997) e, embora não atuem como receptores, apresentam um papel regulatório importante no processo de transporte nuclear. RanBP1 é restrita ao citoplasma devido à presença de um sinal de exportação nuclear rico em leucina na sua porção C-terminal (Richards *et al.*, 1996; Haasen *et al.*, 1999). RanBP1 coopera com RanGAP1 para catalisar a hidrólise de GTP ligado à Ran no citoplasma (Bischoff *et al.*, 1995). O genoma de *Arabidopsis* contém três genes que codificam para proteínas muito similares à RanBP1 (RanBP1a, RanBP1b e RanBP1c; Haasen *et al.*, 1999). Todas as três proteínas contem sinal de exportação nuclear rico em leucina (Haasen *et al.*, 1999; Kim e Roux, 2003), e apresentam uma localização exclusivamente citoplasmática (Haasen *et al.*, 1999). RanBP1a se liga de forma específica à RanGTP (Haizel *et al.*, 1997) e RanBP1c atua como coativador de RanGAP1, *in vitro* (Kim e Roux, 2003). Outras três proteínas com domínio de ligação à Ran do tipo RanBP1, designadas proteínas *RanBP1-like* (RanBPL1-3), são encontradas em *Arabidopsis*, embora não tenham sido caracterizadas funcionalmente (Merkle, 2011). RanBPL1 e RanBPL2 parecem estar relacionadas à RanBP3 de humanos, e RanBPL3 agrupa com Nup50 de humanos (Merkle, 2011). RanBP3 de humanos atua como cofator na via de exportação nuclear dependente de exportina 1, influenciando a sua afinidade a diferentes substratos no núcleo (Englmeier *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 2001) e promovendo a montagem eficiente de complexos de exportação contendo exportina 1 (Nemergut *et al.*, 2002). A proteína Nup50 de humanos atua como

cofator importante que acompanha o complexo de importação importina alfa/beta para o núcleo e estimula a importação nuclear (Lindsay *et al.*, 2002). Além disso, Matsuura e Stewart (2005) reportaram que Nup50 desloca proteínas com sinal de localização nuclear da importina alfa. A presença de proteínas RanBPL em *Arabidopsis* apresentando alta similaridade de sequência com as proteínas RanBP3 e Nup50 de humanos sugere que estas funções possam ser conservadas em *Arabidopsis* (Merkle, 2011).

A informação topológica fornecida pelo gradiente excessivo de RanGTP através do envelope nuclear, criado pelas características do ciclo de Ran GTPases, é explorado para fornecer direcionalidade ao processo de transporte nuclear mediado por receptores da família importina beta (Izaurralde *et al.*, 1997). Em *Arabidopsis* há três genes que codificam proteínas Ran muito similares (Ran1-3; Haizel *et al.*, 1997). As características extraordinárias das pequenas Ran GTPases consistem em (i) ser uma pequena proteína G solúvel; (ii) estar localizada no núcleo e no citoplasma e (iii) apresentar suas duas formas, RanGTP e RanGDP, distribuídas de forma assimétrica sobre o envelope nuclear (Moore e Blobel, 1993; Görlich *et al.*, 1996; Izaurralde *et al.*, 1997; Nachury e Weis, 1999). Esta última característica é um resultado da distribuição assimétrica das principais proteínas regulatórias para o ciclo de Ran GTPases (Figura 2). A RanGEF (*Ran-specific Guanine nucleotide Exchange Factor*), que facilita a dissociação de GDP de Ran permitindo a ligação de GTP (Bischoff e Ponstingl, 1991a), é uma proteína associada a cromatina (Bischoff e Ponstingl, 1991b), conseqüentemente, a concentração de RanGTP é muito maior no núcleo. Nenhuma RanGEF ainda foi identificada em plantas (Merkle, 2011). Por outro lado, RanGAP1 e RanBP1 cooperam na hidrólise de GTP ligado à Ran e são confinadas no citoplasma (Figura 2). A ligação de RanBP1 promove a liberação de RanGTP do complexo RanBP-Receptor de transporte nuclear, ao mesmo tempo em que apresenta RanGTP à RanGAP1, atuando como um

coativador para RanGAP1 (Bischoff *et al.*, 1995; Bischoff e Görlich, 1997). Desta forma, a concentração de RanGTP é mantida muito baixa no citoplasma.

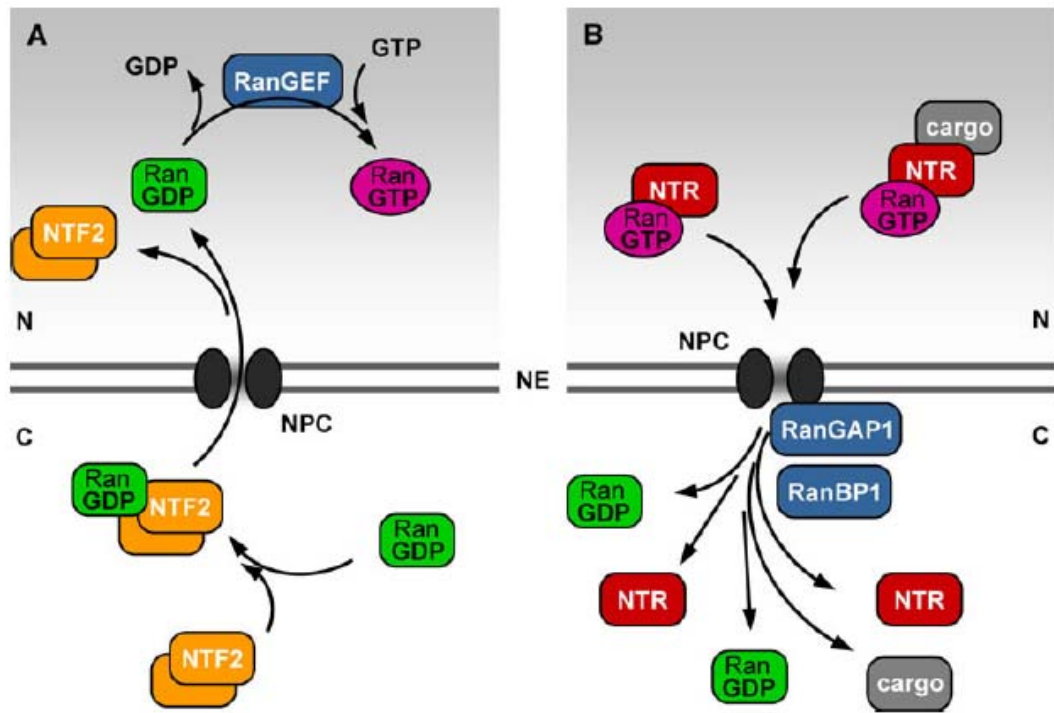


Figura 2: Esquema simplificado do ciclo de RanGTPase. Ran existe em duas conformações estáveis, uma ligada à GTP e outra ligada à GDP. As proteínas regulatórias (mostradas em azul) catalisam a alternância entre estas duas conformações. (A) RanGEF (*Ran-specific Guanine nucleotide Exchange Factor*) catalisa a troca de GDP por GTP no núcleo, portanto, a concentração de RanGTP é muito maior no núcleo. (B) RanGTP é exportada para o citoplasma como parte do complexo de exportação nuclear ou a cada reciclagem de importina. No citoplasma RanGTP é hidrolisado pelas proteínas regulatórias RanGAP1 (*Ran-GTPase-activating protein 1*) e RanBP1 (*Ran-binding protein 1*), resultando na desmontagem do complexo de exportação nuclear. Como consequência, a concentração de RanGTP no citoplasma é muito baixa. Para compensar o fluxo de Ran do núcleo para o citoplasma, NTF2 (*nuclear transport factor 2*) atua como um receptor de importação nuclear para RanGDP, conforme mostrado em (A), e o ciclo é completado (Merkle *et al.*, 2011).

Experimentos para visualizar diretamente o gradiente de RanGTP em células vivas (Kalab *et al.*, 2006) não foram realizados em células de planta (Merkle, 2011). No entanto, provavelmente, uma situação muito similar ocorre em células de plantas, como sugerido por experimentos de complementação usando proteínas de plantas (Ach e Gruissem, 1994; Merkle *et al.*, 1994; Haizel

et al., 1997; Pay *et al.*, 2002), pelo alto grau de conservação entre proteínas de planta, levedura e vertebrados, e pela localização citoplasmática de RanBP1 de *Arabidopsis* (Haasen *et al.*, 1999) e localização citoplasmática/envelope nuclear de RanGAP1 de *Arabidopsis* (Jeong *et al.*, 2005) durante a intérfase. Uma vez que o GTP ligado à Ran é hidrolisado no citoplasma, RanGDP é transportada de volta ao núcleo por NTF2 (*Nuclear Transport Factor 2*), que é altamente conservado entre os organismos (Figura 2). NTF2 forma homodímeros que se ligam à RanGDP no citoplasma, impedindo a dissociação de GDP de Ran e importando RanGDP para o núcleo (Ribbeck *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). Em *Arabidopsis*, dois genes codificam proteínas muito similares à NTF2, denominadas NTF2a e NTF2b, que são funcionais em leveduras (Zhao *et al.*, 2006). NTF2 é um exemplo de receptor de transporte nuclear que não pertence à família de importina beta. A presença do domínio NTF2-like confere interação com nucleoporinas contendo repetições de fenilalanina-glicina (NUPs; Bayliss *et al.*, 2002).

O genoma de *Arabidopsis* contém dois genes *RanGAP* que complementam o mutante de RanGAP em leveduras, *rna1* (Pay *et al.*, 2002). As proteínas RanGAP de *Arabidopsis* compartilham um domínio específico de plantas na extremidade N-terminal, denominado domínio WPP, necessário e suficiente para direcionar RanGAP1 para o complexo poro nuclear (Rose e Meier, 2001), pela interação com as proteínas WIPs (*WPP domain-interacting proteins*; Xu *et al.*, 2007) e WITs (*WPP domain-interacting tail-anchored proteins*; Zhao *et al.*, 2008), localizadas no envelope nuclear. Ambas as classes de proteínas são específicas de plantas e compartilham características em comum. Em vertebrados, diferentemente do que ocorre em plantas, parte de RanGAP1 é sumoilada e associada ao lado citoplasmático do complexo poro nuclear, em interação com RanBP2 (Matunis *et al.*, 1996; Saitoh *et al.*, 1997), que desempenha função semelhante à realizada por RanBP1 (Hutten *et al.*, 2008).

Proteínas GTPases com domínio ArfGAP

Pequenas GTPases, entre elas membros da família Arf (*ADP-ribosylation factors*), atuam como interruptores moleculares, alternando entre a conformação ativa (ligada à GTP) e inativa (ligada à GDP). Na sua forma ativa, interagem com proteínas efetoras específicas que modulam a organização do citoesqueleto, o brotamento e ancoramento de vesículas, e o tráfego de proteínas. A conversão da forma inativa para a ativa é facilitada pelos GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), ao passo que a inativação ocorre pela ação das GAPs (*GTPase-activating proteins*), que estimulam a hidrólise de GTP a GDP (Bos *et al.*, 2007). Com base no tipo de substrato, as GAPs podem ser divididas em vários grupos, tais como ArfGAP (*ADP-ribosylation factor GAP*), RabGAP e RhoGAP. GAPs desempenham um papel crucial sobre as proteínas Arf, as quais não possuem atividade GTPase intrínseca detectável e se ligam fortemente à GTP (Randazzo e Kahn, 1994). Além disso, devido ao fato de Arf se ligar à maioria dos seus efetores na forma ligada à GTP, ArfGAPs também desempenham uma função importante no encerramento da interação entre Arf e proteínas efetoras (Spang *et al.*, 2010).

ArfGAPs (*Arf GTPase activating protein*) constituem uma família de proteínas contendo um domínio característico (domínio ArfGAP), primeiramente identificado em ArfGAP1 de rato como um domínio responsável pela estimulação da hidrólise de Arf1 (Cukierman *et al.*, 1995). Domínios ArfGAP são antigos e altamente conservados desde os primeiros eucariotos. Cinco ArfGAPs têm sido identificadas em *Saccharomyces cerevisiae*. Células de mamífero expressam um arranjo de ArfGAPs, estendendo-se desde proteínas relativamente pequenas, semelhantes às encontradas em levedura, até proteínas maiores com multidomínios ArfGAP, desempenhando possível função de ancoramento para sinalização celular (Kahn *et al.*, 2008). Domínios ArfGAPs possuem

aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos e foram originalmente definidos como o fragmento mínimo possuindo atividade ArfGAP (Cukierman *et al.*, 1995). Sua principal característica é a presença do motivo dedo de zinco CX₂CX₁₆CX₂C e de um resíduo de arginina conservado dentro do domínio catalítico, requeridos para sua atividade (Cukierman *et al.*, 1995; Randazzo *et al.*, 2000).

Em leveduras e humanos, ArfGAPs têm sido descritas em detalhe e a sua função parece estar relacionada ao tráfego de membranas (Poon *et al.*, 1999; Lanoix *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2005; Spang *et al.*, 2010). No entanto, o papel de proteínas ArfGAP em células de planta ainda não é bem definido. Em *Arabidopsis*, são encontradas 15 proteínas com domínio ArfGAP, denominadas proteínas AGD (*ArfGAP domain*), que estão agrupadas em quatro classes distintas (Figura 3), de acordo com a análise filogenética e a organização geral dos domínios (Vernoud *et al.*, 2003). Assim como em animais, ArfGAPs de plantas diversificaram em uma grande família de proteínas. Várias classes de proteínas AtAGD contêm domínios adicionais que podem atuar coordenando temporalmente a atividade de ArfGAP dentro da célula (Vernoud *et al.*, 2003). Tem sido sugerido que AtAGD1, uma proteína da classe 1 de ArfGAPs, modula a direção do crescimento de pêlos radiculares, o tráfego de organelas e a organização do citoesqueleto, por meio da atividade de um substrato Arf, dependente de AGD1 (Yoo *et al.*, 2008). A proteína RPA (*Root and pollen ArfGAP*), uma ArfGAP da classe 2 (AGD10), desempenha um papel essencial no desenvolvimento de pêlos radiculares e na elongação do tubo polínico, mais provavelmente pela regulação da atividade de Arf1 e *Arf1-like protein* U5 em *Arabidopsis* (Song *et al.*, 2006). SCARFACE/VASCULAR NETWORK 3 (SFC/VAN3), uma ArfGAP da classe 1 (AGD3), está localizada na rede *trans*-Golgi (TGN) e parece desempenhar um papel importante no transporte de vesículas, responsável pela sinalização de auxina que é requerida para a

diferenciação vascular, conforme verificado em análise fenotípica dos mutantes *van3* (Koizumi *et al.*, 2005 e Sieburth *et al.*, 2006).

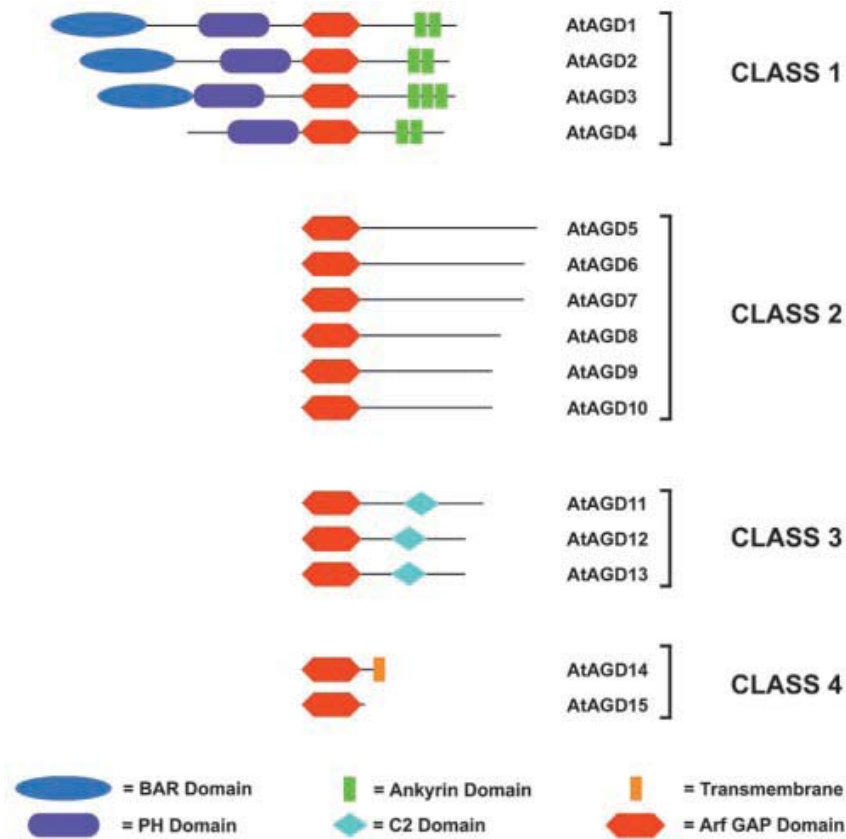


Figura 3: Proteínas ArfGAP de *Arabidopsis*. Proteínas AtAGD foram identificadas utilizando BLASTP com o domínio AGD de ASAP1 (número de acesso no GenBank: NP_060952). Os domínios presentes nas sequências AtAGD foram detectados utilizando o programa SMART. Números AGI (*Arabidopsis* genome initiative) de AtAGD1 a AtAGD15 são os seguintes: At5g61980 (AtAGD1), At1g60680 (AtAGD2), At4g13300 (AtAGD3), At1g10870 (AtAGD4), At5g54310 (AtAGD5), At3g53710 (AtAGD6), At2g37550 (AtAGD7), At4g17890 (AtAGD8), At5g46750 (AtAGD9), At2g35210 (AtAGD10), At3g07490 (AtAGD11), At4g21160 (AtAGD12), At4g05330 (AtAGD13), At1g08680 (AtAGD14), e At3g17660 (AtAGD15). Figura retirada de Vernoud *et al.*, 2003.

A proteína AGD5/NEVERSHED localiza-se na rede *trans*-Golgi (TGN), co-localizando com Arf1, uma importante GTPase envolvida no tráfego de vesículas. Estudos *in vitro* mostraram que esta ArfGAP interage indiscriminadamente com ArfB localizada na membrana plasmática, confirmando que a especificidade da interação AGD/Arf dentro do ambiente celular pode ser

regulada espacialmente (Stefano *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que AGD5 é requerida para a abscisão de órgãos florais, o que fornece uma ligação entre tráfego de membranas e separação celular em plantas (Liljegren *et al.*, 2009). A proteína AGD7 funciona como uma GAP para Arf1 no sistema de Golgi e desempenha um papel importante no tráfego de proteínas por controlar a atividade de Arf1 (Min *et al.*, 2007). Em arroz, a proteína OsAGAP possui papel específico na regulação da via de tráfego de vesículas, como a via de influxo de auxina, que por sua vez controla o crescimento de raiz auxina-dependente em plantas (Zhuang *et al.*, 2006).

Além do papel biológico da maioria das AGDs, pouco se sabe sobre o seu papel em relação à Arfs de plantas, principalmente no que diz respeito à razão Arf/AGD e à possibilidade de interações indiscriminadas entre as proteínas Arf e AGD. Proteínas Arf estão localizadas em vários compartimentos subcelulares, incluindo o sistema de Golgi, organelas pós-Golgi e membrana plasmática (Stefano *et al.*, 2006; Matheson *et al.*, 2007, 2008). Portanto, é plausível pressupor que várias AGDs estejam distribuídas sobre membranas distintas para ativar diferentes Arfs de forma específica. No entanto, a razão encontrada de proteínas Arf/Arf-like para proteínas AGDs no genoma de *Arabidopsis* é de 18:15 (Vernoud *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2007), sugerindo que interações entre AGDs e Arfs devem ser indiscriminadas, de forma a garantir a ativação destas GTPases em plantas. Este conceito torna-se ainda mais complicado pelo fato de que uma única Arf pode apresentar dupla localização, e que diferentes GAPs podem estar localizadas nos dois compartimentos. Isto é exemplificado por Arf1, uma das bem mais estudadas GTPases de plantas, que parece estar envolvida em várias rotas de tráfego, incluindo regulação de tráfego de proteínas na interface sistema de Golgi/retículo endoplasmático (Takeuchi *et al.*, 2002; Stefano *et al.*, 2006; Matheson *et al.*, 2007) e tráfego de proteína vacuolar (Pimpl *et al.*, 2003). Foi demonstrado que AGD7 está associada com

Arf1 no Golgi (Min *et al.*, 2007) e que AGD5 está envolvida com a atividade de Arf1 na rede *trans*-Golgi (Stefano *et al.*, 2010). Além disso, a interação entre Arf1 e várias ArfGAPs de plantas, como VAN3 (AGD3), RPA (AGD10) e AGD7, foi verificada *in vitro* (Koizumi *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2007). Recentemente, uma nova proteína ArfGAP-like de *Arabidopsis* foi isolada por sua capacidade de interagir com a proteína NSP de geminivirus. Entretanto, a sua função celular ainda não foi elucidada, o que constitui um dos objetivos da linha de pesquisa em que se insere esta investigação.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem de NIG e de seus domínios em vetores de expressão em levedura e planta

O cDNA de NIG e as regiões codificadoras dos domínios ArfGAP (aminoácidos 1 a 130) e Pro-Rich (aminoácidos 452 a 562), e de Frag1 (aminoácidos 1 a 300) e Frag2 (aminoácidos 301 a 602) foram isolados mediante amplificação via PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). O produto obtido foi submetido a uma segunda amplificação com oligonucleotídeos contendo extensões de recombinação (Tabela 1) para clonagem via sistema *Gateway* (Invitrogen). O produto da amplificação foi verificado em gel de agarose 1% (p/v), purificado com *Gel Extraction Kit* (Qiagen) e inserido no vetor de entrada, por recombinação, utilizando a enzima BP clonase (Invitrogen). O cDNA de NIG foi clonado nos vetores de entrada pDONR201 e pDONR207 (Invitrogen), sendo obtidos os clones pDN1-NIG (Carvalho *et al.*, 2008a), pDN7-NIG (pUFV 1083), contendo o códon de terminação, e pDN7-NIG-Ns (pUFV 1643), sem o códon de terminação. Da mesma forma, os domínios de NIG, bem como os seus fragmentos, foram clonados no vetor de entrada pDONR201, resultando nos clones pDN1-ArfGAP (pUFV 1144), pDN1-Pro-Rich (Carvalho *et al.*, 2008a), pDN1-Frag1 (pUFV 1192) e pDN1-Frag2 (pUFV 1145). Posteriormente, a região codificadora de NIG foi transferida para o vetor de expressão em levedura pDEST32 (Invitrogen), que permite a expressão da proteína de interesse fusionada ao domínio de ligação ao DNA (BD) do transfator GAL4. Esta clonagem foi feita por meio da reação de LR clonase (Invitrogen), gerando pBD-NIG (pUFV 1092). Além disso, NIG foi transferida do vetor de entrada para os

vetores de expressão em planta pK7FWG2, pK7WG2, 35S-YFP-casseteA-Nos-pCAMBIA1300, nEYFP/pUGW2 e cEYFP/pUGW2, originando os clones pK7F-NIG (Carvalho *et al.*, 2008a), pK7-NIG (Carvalho *et al.*, 2008a), YFP-NIG (pUFV 1085), NIG-NYPUGW2 (pUFV 1534) e NIG-CYPUGW2 (pUFV 1537), respectivamente. O vetor pK7FWG2 permite a expressão das proteínas de interesse fusionadas à proteína GFP (*green fluorescent protein*), em sua extremidade C-terminal. As construções em pK7WG2 são expressas de forma intacta em plantas. O vetor 35S-YFP-casseteA-Nos-pCAMBIA1300 propicia a expressão de proteínas quiméricas fusionadas, em sua extremidade N-terminal, à proteína YFP (*yellow fluorescent protein*). Por outro lado, os vetores nEYFP/pUGW2 e cEYFP/pUGW2 permitem a expressão das proteínas de interesse fusionadas a fragmentos não-fluorescentes de YFP, em sua extremidade C-terminal. No vetor nEYFP/pUGW2, o fragmento de YFP presente corresponde à sua porção N-terminal entre os aminoácidos 1 a 174, enquanto que no vetor cEYFP/PUGW2, o fragmento de YFP presente corresponde à sua porção C-terminal, abrangendo os aminoácidos de 175 a 239. Em todos estes vetores de expressão em planta, a expressão dos genes clonados está sob o controle do promotor 35S.

Os domínios e fragmentos de NIG, uma vez clonados no vetor de entrada, foram transferidos para os vetores de expressão em levedura pDEST32, gerando os clones pBD-ArfGAP (pUFV 1164), pBD-Pro-Rich (pUFV 1098), pBD-Frag1 (pUFV 1195) e pBD-Frag2 (pUFV 1196). O domínio Pro-Rich também foi transferido do vetor de entrada para pDEST22, resultando em pAD-Pro-Rich (pUFV 1484). O vetor pDEST22 permite a expressão de proteínas fusionadas ao domínio de ativação (AD) de GAL4.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados em reação de PCR

Sequência Alvo	Região Amplificada	Nome	Sequência (5'→3')
NIG	cDNA completo	4263 (Fwd)	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCGGGTCGAGTTAA
		4264 (Rvs-NS)	AGAAAGCTGGGTCTTACCCAAATGGGTTTCCTCC
		4265 (Rvs-ST)	AGAAAGCTGGGTCCCCAAATGGGTTTCCTCCTGA
CSN5A	cDNA completo	CSN5A-Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAAGGTTCTCGTC
		CSN5A-ST-Rvs	AGAAAGCTGGGTCTCACGATGTAATCATGGGCTC
		CSN5A-NS-Rvs	AGAAAGCTGGGTCCGATGTAATCATGGGCTC
At2G41020	cDNA completo	At2G41020-Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGAGAAGAGCTGCA
		At2G41020-ST-Rvs	AGAAAGCTGGGTCTCAATCTGCGTCTCCAAGACC
		At2G41020-NS-Rvs	AGAAAGCTGGGTCTGCGTCTCCAAGACC
ArfGAP (NIG)	1-390 nt	4263 (Fwd)	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCGGGTCGAGTTAA
		ArfGAPNIG-ST-Rvs	AGAAAGCTGGGTCTTACTTATCATCATTCTTCTC
Pro-Rich (NIG)	1353-1686 nt	4317 (Fwd)	AAAAAGCAGGCTTCACAATGCCTGGATGGCAAGC
		4318 (Rvs-ST)	AGAAAGCTGGGTCTTATGGGTTTACATTGCTAGG
Frag1 (NIG)	1-900 nt	4263 (Fwd)	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCGGGTCGAGTTAA
		300NIG-ST-Rvs	AGAAAGCTGGGTCTTAAATTGCAACAGATGGAGC
Frag2 (NIG)	901-1806 nt	301NIG-Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGCAAGCACCCTATC
		4264 (Rvs-ST)	AGAAAGCTGGGTCTTACCCAAATGGGTTTCCTCC
attB1		2942	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2		2943	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
pDONR201 e 207		3397 (Fwd)	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC
		3398 (Rvs)	TGTAACATCAGAGATTTTGGAGACAC
pEXP-AD502		PEXAD-Fwd	CGGTCCGAACCTCATAACAACCTC
		PEXAD-Rvs	GTAATTTCTGGCAAGGTAGAC
pDEST32 e 22		DEST32-Fwd	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG
		DEST22-Fwd	TATAACGCGTTTGAATCACT
		DEST22-Rvs	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
35S		MC36 (Fwd)	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
GFP		4799 (Rvs)	CGCCCTCGCCCTCGCCGGACAC

Os clones obtidos foram utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* estirpe DH5 α , pelo método do choque térmico ou de eletroporação (Sambrook *et al.*, 1989). Os transformantes foram

selecionados com o antibiótico apropriado e diagnosticados por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse, e quando possível, para o vetor correspondente (Tabela 1). As construções destinadas à expressão em plantas foram inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101, por eletroporação (Sambrook *et al.*, 1989). Da mesma forma, a seleção dos transformantes foi feita na presença do antibiótico apropriado e diagnosticada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1).

Transformação de levedura e avaliação da atividade de transativação

Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* estirpe AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *MEL1GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*) que é deficiente na produção de leucina, triptofano e uracila (Trp-, Leu-, Ura-) e que contém os genes repórteres *LacZ* e *HIS3*, foram crescidas em 5 mL de meio YPD-A por 16 horas (O.D._{600nm} = 0,5-1,0). Após esse tempo, procedeu-se à centrifugação a 3000 x g por 4 minutos. As células foram lavadas com 1 mL de água deionizada e novamente centrifugadas a 3000 x g por 4 minutos. Após a lavagem com 1 mL de acetato de lítio 100 mM, centrifugou-se a 16000 x g por 15 segundos, obtendo-se as células pré-lavadas para a inserção do DNA plasmidial, pelo método de transformação com acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG). Para cada transformação, foram adicionados às células 240 µL de polietilenoglicol 50% (p/v; PEG, MW 3350), 36 µL de acetato de lítio 1 M, 25 µL de ssDNA 2 µg/µL e 50 µL de solução contendo 2-5 µg da construção correspondente (pBD-NIG, pBD-ArfGAP, pBD-Pro-Rich, pBD-Frag1 e pBD-Frag2). As células foram homogeneizadas e incubadas, inicialmente a 30°C por 30 minutos, e, em seguida, a 42°C por 25 minutos. Após a centrifugação a 6000 x g por 15

segundos, as células foram lavadas com 1 mL de água deionizada e plaqueadas em meio seletivo com deficiência em leucina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu), sendo mantidas a 28°C por três dias. Os transformantes simples foram co-transformados com pEXP-AD502 (vetor vazio; Invitrogen) conforme descrito acima. Os duplos transformantes obtidos foram plaqueados em meio seletivo com deficiência em leucina e triptofano (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp) e crescidos por três dias a 28°C.

Para avaliar a capacidade de NIG e de seus domínios na transativação de genes repórteres de levedura, os duplos transformantes foram repicados sobre membrana de Nylon, adsorvida em meio seletivo com deficiência em leucina e triptofano, e crescidos a 28°C por 36 horas. A membrana foi mergulhada em nitrogênio líquido por 10 segundos e, após o descongelamento, foi colocada sobre papel de filtro embebido em tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16,1 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,5 g/L; KCl 0,75 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,246 g/L, com pH ajustado para 7,0) contendo β -mercaptoetanol e o substrato X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). Após a incubação a 28°C, por 4-8 horas, foi feita a avaliação qualitativa da atividade de β -galactosidase, pela presença de coloração azulada das colônias analisadas.

Triagem pelo sistema de duplo híbrido em leveduras utilizando o domínio Pro-Rich como isca

Leveduras da estirpe AH109 previamente transformadas com pBD-Pro-Rich foram crescidas em 50 mL de meio líquido seletivo com deficiência em leucina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu) até atingir uma O.D._{600nm} entre 0,4 e 0,6. Após a centrifugação a 1000 x g por 5 minutos, as células foram lavadas com 50 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5), centrifugadas novamente e

ressuspendidas em 1,5 mL de tampão contendo Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e acetato de lítio 100 mM, pH 7,5. Foram utilizados 600 µL desta suspensão de células, aos quais foram adicionados 25 µL de ssDNA (8 µg/µL) e 25 µL de biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana* (1 µg/µL), previamente construída pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, a partir de mRNA extraído de partes aéreas da planta, e clonada no vetor pEXP-AD502. Este vetor permite a expressão das proteínas fusionadas ao domínio de ativação (AD) de GAL4. Após a adição de 2,5 mL de solução PEG/acetato de lítio (40% (p/v) de polietilenoglicol MW 3350, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, acetato de lítio 100 mM, pH 7,5), as células foram misturadas cuidadosamente e incubadas a 30°C por 45 minutos, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Adicionou-se então 160 µL de DMSO (dimetilsulfóxido; Sigma), seguindo-se à incubação a 42°C por 20 minutos, com homogeneização a cada 10 minutos. A suspensão foi centrifugada a 700 x g por 5 minutos, ressuspendida em 3 mL de meio YPD-A e incubada a 30°C, sob agitação de 80 rpm durante 90 minutos. As células foram novamente centrifugadas a 700 x g por 5 minutos e ressuspendidas em 6 mL de NaCl 0,9% (p/v). A fim de verificar a interação entre as proteínas quiméricas, os duplos transformantes foram plaqueados em meio seletivo com deficiência em leucina, triptofano e histidina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp, -His) e incubados a 28°C por 7 dias. Os transformantes obtidos foram repicados em meio seletivo com deficiência nos aminoácidos leucina, triptofano e histidina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp, -His) e suplementado com 10 mM de 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole; Sigma). Os clones que apresentaram prototrofia a histidina foram avaliados quanto à sua capacidade em transativar o gene da β-galactosidase, conforme procedimento descrito anteriormente. As colônias positivas foram crescidas em meio seletivo líquido com deficiência em leucina e triptofano. O DNA plasmidial das colônias selecionadas foi extraído utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), seguindo recomendações do fabricante,

exceto pela adição de pérolas de vidro e vortex para rompimento das células de levedura.

O DNA plasmidial extraído de leveduras foi utilizado na transformação de *E. coli* DH5 α , por meio de eletroporação, sendo os transformantes selecionados em meio LB contendo 100 mg/L de ampicilina (Invitrogen). O DNA plasmidial foi extraído das colônias selecionadas, quantificado por espectrofotometria (*Evolution 60 Thermo Scientific*) e utilizado como molde em reação de PCR, com oligonucleotídeos específicos para o vetor pEXP-AD502 (Tabela 1). O DNA plasmidial isolado de *E. coli* foi utilizado para re-transformar leveduras (já transformadas com pBD-Pro-Rich), e os duplos transformantes avaliados novamente quanto à sua capacidade em transativar genes repórteres de levedura. Os clones que mantiveram tal capacidade foram sequenciados.

Clonagem dos genes que codificam as possíveis proteínas de interação com NIG em vetores de expressão em planta

Os cDNAs sequenciados foram analisados e comparados com o banco de dados do NCBI, utilizando o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Após a obtenção das sequências completas no banco de dados Tair (<http://www.arabidopsis.org>), procedeu-se ao desenho de oligonucleotídeos (Tabela 1) com extensões de recombinação para clonagem via sistema *Gateway* (Invitrogen), visando à amplificação dos cDNAs completos dos genes identificados pelo sistema de duplo híbrido em leveduras.

A região codificadora do gene *CSN5A* e de *At2G41020* foi amplificada com oligonucleotídeos específicos (Tabela1) e utilizada como molde para uma segunda reação de amplificação para inserção da extensão de recombinação completa. O produto da amplificação foi analisado em gel de agarose 1% (p/v) e

purificado utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Em seguida, os cDNAs de *CSN5A* e de *At2G41020* foram inseridos nos vetores de entrada pDONR201 e pDONR207, utilizando a BP clonase (Invitrogen), resultando nos clones pDN1-CSN5A (pUFV 1435) e pDN1-At2G41020 (pUFV 1427), ambos com o códon de terminação, e nos clones pDN1-CSN5A-Ns (pUFV 1436), pDN7-CSN5A-Ns (pUFV 1645), pDN1-At2G41020-Ns (pUFV 1434) e pDN7-At2G41010-Ns (pUFV 1644), sem o códon de terminação. As regiões codificadoras de *CSN5A* e de *At2G41020* foram transferidas, por recombinação por LR clonase, do vetor de entrada para os vetores de expressão em leveduras pDEST32, resultando em pBD-CSN5A (pUFV 1472) e pBD-At2G41020 (pUFV 1474), e pDEST22, gerando pAD-CSN5A (pUFV 1482) e pAD-At2G41020 (pUFV 1483). Também foram transferidos para os vetores de expressão em planta pK7FWG2, produzindo pK7F-CSN5A (pUFV 1447) e pK7F-At2G41020 (pUFV 1448), nEYFP/pUGW2, gerando CSN5A-NYPUGW2 (pUFV 1532) e At2G41020-NYPUGW2 (pUFV 1533) e cEYFP/pUGW2, resultando em CSN5A-CYPUGW2 (pUFV 1535) e At2G41020-CYPUGW2 (pUFV 1536).

Confirmação da interação entre NIG e CSN5A ou At2G41020, por meio do sistema de duplo híbrido, utilizando o cDNA completo de CSN5A e de At2G41020

Leveduras da estirpe AH109 transformadas com pBD-Pro-Rich foram co-transformadas com pAD-CSN5A ou com pAD-At2G41020 pelo método de transformação com acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG). Os duplos transformantes foram selecionados em meio deficiente em leucina e triptofano (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp) e então repicados em meio seletivo com deficiência em leucina, triptofano e histidina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp, -His) e em meio com deficiência dos mesmos aminoácidos, porém suplementado

com 10 mM de 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole; Sigma). A capacidade dos duplos transformantes em transativar o gene da β -galactosidase foi avaliada quantitativamente utilizando-se ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) como substrato, conforme descrito por Amberg *et al.* (2005). O mesmo procedimento foi realizado utilizando pBD-CSN5A e pBD-At2G41020 como isca e pAD-Pro-Rich como presa.

Expressão transiente em folhas de tabaco por agroinoculação

Culturas de *A. tumefaciens* estirpe GV3101 carreando as construções de DNA de interesse foram crescidas em meio Rhizo, contendo os antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2500 x g por 5 minutos e lavadas duas vezes com tampão de infiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, pH 5,6 e acetoseringona 100 μ M). Em seguida, as células foram diluídas em tampão de infiltração para uma O.D._{600nm} = 0,2 e infiltradas em folhas jovens de tabaco, com auxílio de seringas estéreis sem agulha, gentilmente pressionadas sobre a face abaxial da epiderme.

Microscopia confocal e processamento das imagens

Folhas de tabaco agroinoculadas com as construções YFP-NIG, pK7F-CSN5A e pK7F-At2G41020, bem como com combinações das mesmas, foram submetidas à análise por microscopia confocal, 72 horas após a agroinoculação. As imagens de confocal foram obtidas utilizando-se o sistema LSM 510 META invertido (ZEISS) com laser hélio neon e objetiva de imersão de óleo de 40X e 63X. O GFP foi excitado com comprimento de onda de 488 nm e sua emissão

coletada utilizando filtro de passagem de 500-530 nm. O YFP foi excitado com comprimento de onda 514 nm e sua emissão coletada utilizando filtro de passagem de 560-615 nm. Para obtenção de imagens de co-expressão de GFP e YFP, foram utilizados alternativamente os comprimentos de onda de 458 nm para o GFP e 514 nm para o YFP, com mudança de fase no modo de multi-trilha do microscópio. A fluorescência foi detectada utilizando comprimento de onda 458 nm/514 nm com filtro dicromático de 515 nm e filtro de passagem de 475-525 nm para o GFP e 535-590 nm para o YFP. O *pinhole* foi usualmente fixado, fornecendo uma faixa óptica de 1-1,5 μm . As imagens foram processadas com auxílio do *software* "LSM Image Browser 4" (ZEISS) e, posteriormente, editadas no programa *Adobe Photoshop*.

Ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC)

Para realizar este ensaio de interação *in vivo*, foi preparada uma combinação dos plasmídeos codificando NIG, CSN5A e At2G41020 (NIG-NYPUGW2, NIG-CYPUGW2, CSN5A-NYPUGW2, CSN5A-CYPUGW2, At2G41020-NYPUGW2 e At2G41010-CYPUGW2) na razão 1:1. No intuito de bombardear epiderme de cebola por meio de biobalística, 2,5 μg de cada uma das construções foram adsorvidos em micropartículas de tungstênio, na presença de CaCl_2 1 M e de espermidina 15 mM, seguindo-se à lavagem com etanol absoluto por duas vezes. As epidermes de cebola foram previamente destacadas com auxílio de uma pinça e mantidas sobre meio MS (Murashige e Skoog, 1962) $\frac{1}{2}$ força. O bombardeamento foi feito sob uma pressão de 500 psi gerada com gás hélio e vácuo de 500 mmHg. As imagens de confocal foram feitas 14-16 horas após o bombardeamento, sendo a fluorescência do YFP

avaliada com excitação a 514 nm, utilizando laser hélio neon, com emissão a 560-615 nm.

Co-imunoprecipitação

O ensaio de co-imunoprecipitação foi executado conforme descrito por Pedrazzini *et al.* (1994). O extrato protéico foi obtido a partir de folhas de tabaco agroinoculadas com pK7-NIG, pK7F-CSN5A e pK7-NIG + pK7F-CSN5A, utilizando o *P-PER Plant Protein Extraction kit* (Thermo Scientific). Após a incubação do extrato com soro anti-GFP (Invitrogen) e proteína A/agarose (Invitrogen), procedeu-se à análise das proteínas imunoprecipitadas, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, contendo dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* - SDS-PAGE 10%). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada em TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 140 mM) contendo 5% (p/v) de caseína, e então incubada com anti-GFP ou soro anti-NIG (produzido no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas/BIOAGRO/UFV) por quatorze horas à temperatura ambiente. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, ligado à fosfatase alcalina, em associação com o reagente de detecção NBT/BCIP (*nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*; Bio-Rad).

Técnicas de biologia molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular que não foram descritas detalhadamente na dissertação, incluindo preparação de géis de agarose, preparação de plasmídeos, transformação de bactérias, síntese de cDNA, dentre

outras, foram conduzidas exatamente segundo protocolos contidos em Sambrook *et al.*(1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação de proteínas que interagem com NIG (NSP-interacting GTPase)

A proteína NIG apresenta características estruturais e bioquímicas que a associam com o transporte nucleocitoplasmático do DNA viral, atuando como possível cofator celular para a função da proteína viral NSP (Carvalho *et al.*, 2008a). Uma vez que não há nenhuma vantagem para a célula vegetal em desenvolver uma função exclusiva para o transporte do DNA viral, é razoável pressupor que NIG esteja também envolvida com o tráfego de proteínas celulares. Deste modo, a fim de identificar alvos celulares para a proteína NIG, e assim verificar a sua participação neste mecanismo de transporte, foi realizada uma triagem de proteínas de *A. thaliana* que interagem com NIG, por meio do sistema de duplo híbrido em leveduras. Entretanto, a proteína NIG intacta não pôde ser utilizada como isca, uma vez que foi capaz de transativar os genes repórteres utilizados no ensaio de seleção (Figura 4). Diante disto, com a finalidade de mapear o domínio de transativação de NIG, fragmentos do seu cDNA possuindo diferentes extensões (Figura 4A) foram fusionados ao domínio de ligação ao DNA (BD) de GAL4, e a capacidade transativadora das proteínas truncadas avaliada pelo sistema de duplo híbrido. Leveduras transformadas com as proteínas truncadas fusionadas ao BD foram co-transformadas com o vetor vazio pEXP-AD502, e a capacidade de transativação do gene *LACZ* foi avaliada em membrana de nylon (Figura 4B). Os resultados demonstraram que a região contendo os resíduos de aminoácidos de 301 a 602 é responsável pela capacidade transativadora de NIG. Por outro lado, os domínios ArfGAP (N-terminal) ou Pro-Rich (C-terminal) por si só não conferem atividade

transativadora à proteína. O mesmo foi verificado com a proteína truncada contendo os 300 primeiros resíduos de aminoácidos (Figura 4B). Como controle negativo, foram utilizadas leveduras co-transformadas com pDEST32 e pEXP-AD502, ambos vazios.

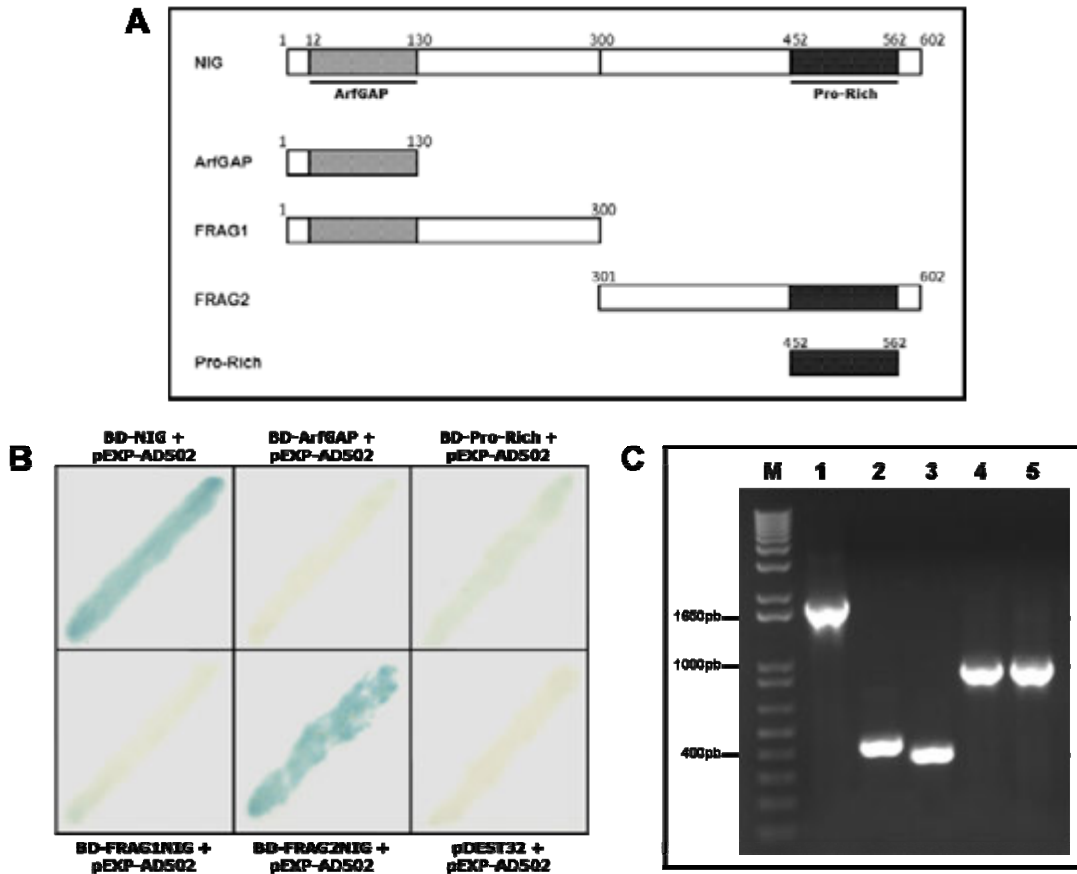


Figura 4: Mapeamento da região transativadora de NIG. A região codificadora de NIG e fragmentos do seu cDNA foram inseridos no vetor pDEST32, que permite a expressão das proteínas fusionadas ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 em leveduras transformadas. Células de levedura transformadas com as construções indicadas foram co-transformadas com pEXP-AD502, que possui o domínio de ativação de GAL4. (A) Representação esquemática de NIG e das proteínas truncadas obtidas. (B) Ensaio de transativação em membrana de nylon, utilizando as proteínas truncadas. (C) Diagnóstico por PCR dos clones utilizados no ensaio de transativação. M corresponde ao marcador de tamanho de DNA em pb, (1) BD-NIG, (2) BD-ArfGAP, (3) BD-Pro-Rich, (4) BD-FRAG1NIG e (5) BD-FRAG2NIG.

Embora a proteína NIG apresente a capacidade de transativar genes repórteres em leveduras, nenhum domínio de transativação foi detectado em sua

sequência por meio de análise de bioinformática. Mas em função da sua capacidade transativadora, NIG foi adotada como controle positivo nos ensaios de duplo híbrido.

A identificação de alvos celulares da proteína NIG foi realizada pelo ensaio de duplo híbrido, utilizando uma biblioteca de cDNA de *A. thaliana* (previamente preparada pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas), sintetizada a partir de mRNA extraído de partes aéreas. Como isca, foi utilizado o domínio Pro-Rich de NIG, que corresponde à região de interação com NSP (Carvalho *et al.*, 2008a). A interação entre Pro-Rich e as proteínas do hospedeiro foi detectada quando leveduras da estirpe AH109 foram co-transformadas com pBD-Pro-Rich e com a biblioteca de cDNA de *Arabidopsis* clonada no vetor pEXP-AD502. Os transformantes independentes (aproximadamente $5,5 \times 10^5$) foram avaliados quanto à sua prototrofia à histidina, sendo plaqueados em meio seletivo deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, para selecionar a interação entre as proteínas quiméricas. Os clones que apresentaram crescimento foram então repicados em meio deficiente dos aminoácidos citados acima e suplementado com 10 mM de 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole), para avaliar a força da interação. Além disso, clones que apresentaram prototrofia à histidina foram avaliados quanto à sua capacidade de transativar o gene da β -galactosidase.

Após o processo de triagem, nove clones foram identificados, codificando para cinco proteínas distintas, candidatas a interagir com o domínio Pro-Rich de NIG (Tabela 2). Dos nove clones selecionados, dois codificam uma proteína desconhecida localizada no *locus* At3G55760, quatro codificam a proteína CSN5A e as demais proteínas são codificadas por clones únicos. Para verificar se as proteínas codificadas pelos cDNAs interagem especificamente com o domínio Pro-Rich, os plasmídeos da biblioteca foram recuperados dos nove clones e utilizados para retransformar a estirpe de seleção original. Das cinco

proteínas candidatas a interagir com o domínio Pro-Rich, apenas aquela codificada pelo *locus* At3G05545 não manteve sua capacidade de crescer em meio deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, suplementado com 10 mM de 3AT (Figura 5A) e de transativar o gene da β -galactosidase (Figura 5B), sendo considerada como falso-positivo e, portanto, descartada. Como controles negativos, foram utilizados os dois vetores vazios (pDEST32 + pEXP-AD502) e a isca co-transformada com pEXP-AD502 vazio (Figura 5B). Das quatro proteínas restantes, foram selecionadas CSN5A e At2G41020 para análises mais detalhadas da interação com o domínio Pro-Rich.

Tabela 2: Identidade dos clones identificados pela interação com Pro-Rich pelo sistema de duplo híbrido.

Locus tag	E value	Identidade	Sequência correspondente no BLASTN
At3g55760	0.0	851/852 (99%)	Unknown protein
At3g05545	0.0	827/828 (99%)	Transcription factor, putative / zinc finger (C3HC4 type RING finger) family protein
At2g41020	0.0	840/840 (100%)	WW domain-containing protein
At1g22920	0.0	852/852 (100%)	CSN5A (COP9 SIGNALOSOME 5A)
At5g04460	0.0	850/850 (100%)	Protein binding / zinc ion binding

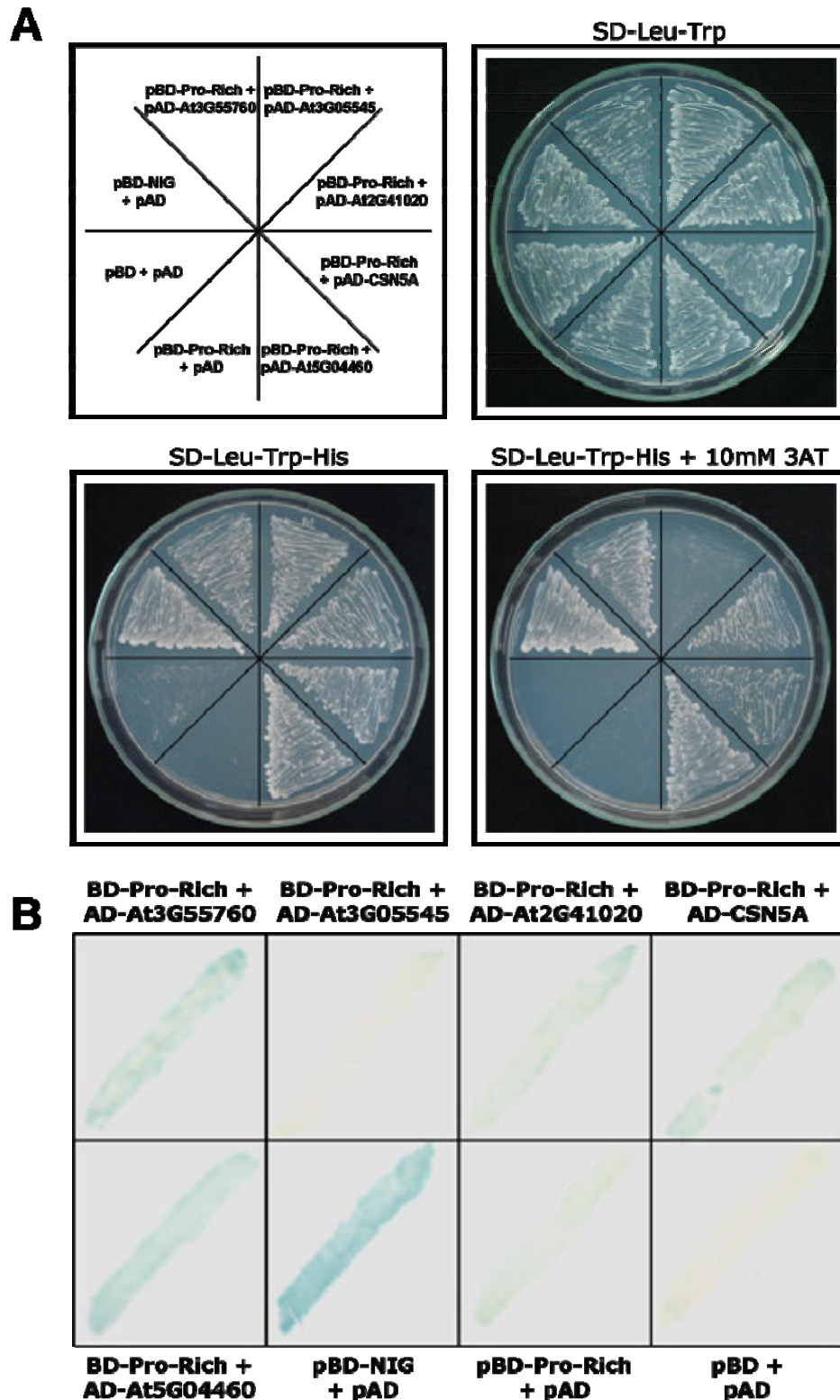


Figura 5: Análise da prototrofia à histidina e atividade de β -galactosidase dos clones isolados pela interação com o domínio Pro-Rich de NIG, por meio do sistema de duplo híbrido em leveduras. Leveduras transformadas com BD-Pro-Rich foram co-transformadas com o vetor pEXP-AD502 contendo os cDNAs encontrados na triagem pelo sistema de duplo híbrido. (A) Análise de crescimento dos co-transformantes em meio SD -Leu -Trp, SD -Leu -Trp -His e SD -Leu -Trp -His + 10 mM 3AT. (B) Análise da atividade de β -galactosidase dos co-transformantes em membrana de nylon, conforme indicado na figura.

Pro-Rich interage especificamente com CSN5A e com At2G41020

Para confirmar a interação entre Pro-Rich e as proteínas CSN5A e At2G41020, foram confeccionados oligonucleotídeos, tendo como molde os cDNAs completos de CSN5A e At2G41020, identificados por análise em bancos de dados (<http://www.arabidopsis.org/>). Os cDNAs intactos isolados foram fusionados ao domínio de ligação ao DNA, e ao domínio de ativação de GAL4.

A expressão da proteína quimérica AD-CSN5A em leveduras co-transformadas com BD-Pro-Rich permitiu o seu crescimento em meio deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, bem como no mesmo meio acrescido de 10 mM de 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole; Figura 6A). Os controles negativos utilizados (pBD-Pro-Rich + pAD e pBD + pAD) apresentaram crescimento apenas em meio deficiente dos aminoácidos leucina e triptofano, que seleciona somente os duplos transformantes (Figura 6A).

A co-expressão das duas proteínas quiméricas resultou na transativação do gene repórter *LacZ* (Figura 6B), verificada, quantitativamente, com o substrato ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside). Leveduras co-transformadas com pBD-Pro-Rich e com pAD-CSN5A apresentaram atividade da enzima β -galactosidase ($0,072 \pm 0,010$) significativamente superior (ao nível de 5% de significância pelo teste t) àquela apresentada pelos dois controles negativos, que correspondem à isca co-transformada com o vetor pDEST22 vazio ($0,015 \pm 0,002$), e aos duplos transformantes com BD e AD vazios ($0,019 \pm 0,010$; Figura 6B). Os valores de atividade de β -galactosidase estão representados como média \pm desvio padrão.

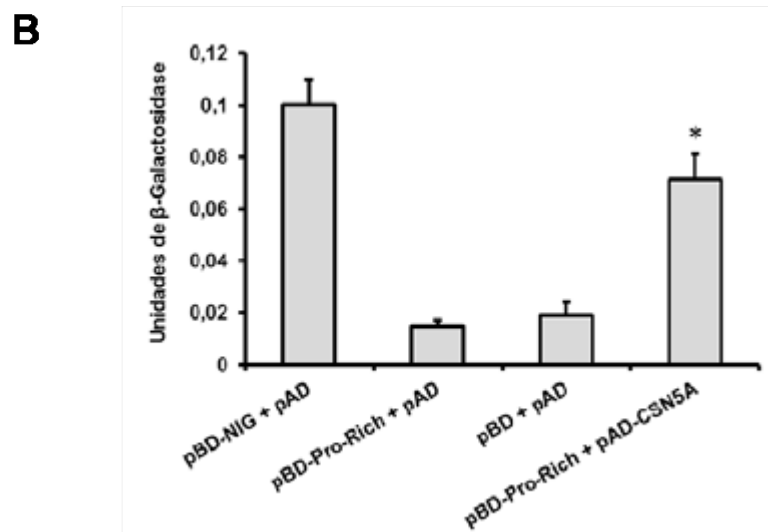
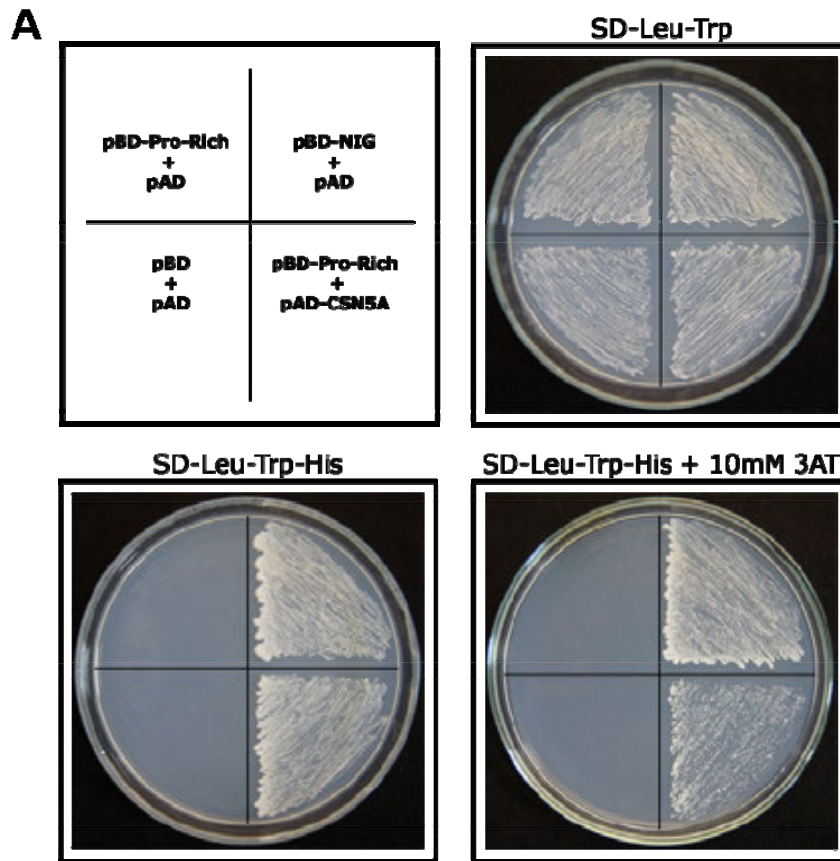


Figura 6: A proteína CSN5A intacta fusionada ao domínio de ativação do transfator GAL4 causa prototrofia à histidina em leveduras co-transformadas com BD-Pro-Rich e ativa a expressão de *LacZ*. (A) Células de levedura expressando as proteínas recombinantes indicadas foram avaliadas quanto à sua prototrofia à histidina, sendo plaquedas em meio seletivo deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, suplementado com 10 mM de 3AT. (B) A interação entre as proteínas indicadas foi confirmada pela quantificação da atividade da enzima β -galactosidase, expressa em $\text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. * Indica que a média de atividade de pBD-Pro-Rich + pAD-CSN5A é estatisticamente diferente daquela apresentada por pBD-Pro-Rich + pAD ($p=0,0006$) e por pBD + pAD ($p=0,0011$), ao nível de 5% de significância pelo teste t.

Similarmente, leveduras expressando as proteínas quiméricas BD-Pro-Rich e AD-At2G41020 apresentaram crescimento tanto em meio deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina quanto no mesmo meio, acrescido de 7,5 mM de 3AT. O mesmo resultado foi obtido quando o inverso foi feito, ou seja, quando a proteína quimérica BD-At2G41020 foi co-expressa com AD-Pro-Rich (Figura 7A). Os controles negativos (pBD-Pro-Rich + pAD; pBD + pAD-At2G41020 e pBD + pAD) apresentaram crescimento apenas em meio deficiente de leucina e triptofano, que seleciona os duplos transformantes.

A atividade da enzima β -galactosidase nos duplos transformantes expressando BD-At2G41020 e AD-Pro-Rich ($0,060 \pm 0,010$) foi significativamente superior aos controles negativos pDEST32 + pDEST22 ($0,012 \pm 0,002$), BD-Pro-Rich + pDEST22 ($0,014 \pm 0,003$) e pDEST32 + AD-At2G41020 ($0,013 \pm 0,004$). Os pares foram comparados pelo teste t e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos (Figura 7B). O mesmo resultado foi verificado para leveduras co-transformadas com BD-Pro-Rich e com AD-At2G41020, que apresentaram atividade de β -galactosidase ($0,021 \pm 0,002$) significativamente superior (ao nível de 5% de significância pelo teste t) aos controles negativos adotados neste ensaio, cujos valores de atividade já foram citados acima.

Estes resultados indicam que as proteínas CSN5A e At2G41020, ambas intactas, interagem de forma específica com o domínio Pro-Rich da proteína NIG em leveduras.

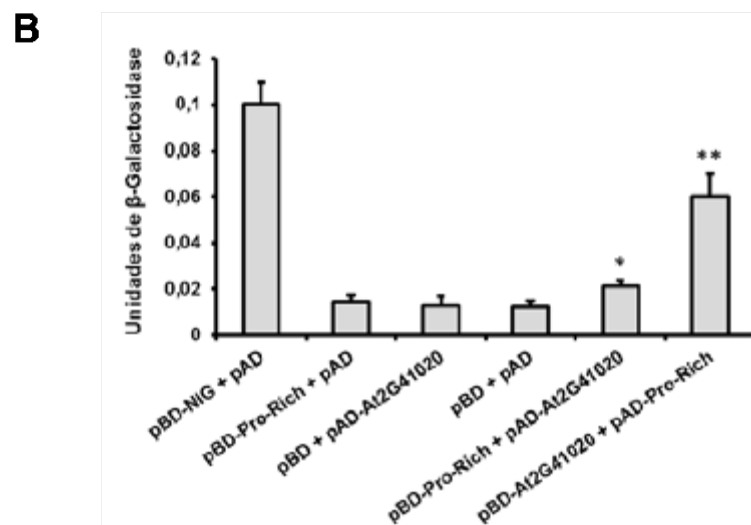
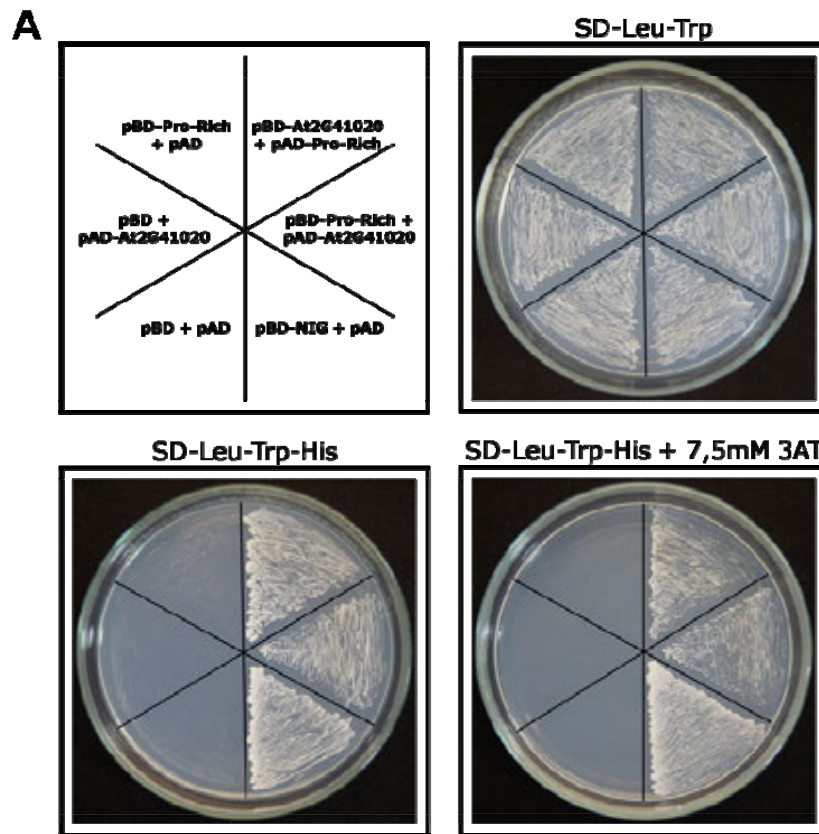


Figura 7: A proteína At2G41020 completa causa prototrofia à histidina em leveduras co-transformadas com Pro-Rich e ativa a expressão de *LacZ*. (A) Leveduras transformadas com as construções indicadas foram avaliadas quanto à sua prototrofia à histidina, sendo plaçadas em meio seletivo deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, suplementado com 7,5 mM de 3AT. (B) A quantificação da atividade da enzima β -galactosidase (representada em $\text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) foi utilizada para confirmar as interações. * Indica que a atividade de pBD-Pro-Rich + pAD-At2G41020 é estatisticamente diferente de pBD-Pro-Rich + pAD ($p=0,0262$), de pBD + pAD-At2G41020 ($p=0,0334$) e de pBD + pAD ($p=0,0078$). ** Indica que a atividade de pBD-At2G41020 + pAD-Pro-Rich é significativamente superior à de pBD-Pro-Rich + pAD ($p=0,0018$), de pBD + pAD-At2G41020 ($p=0,0019$) e de pBD + pAD ($p=0,0015$). Os pares foram comparados pelo teste t e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

A proteína CSN5A é um componente do COP9 signalossomo

A proteína CSN5A (*COP9 Signalosome 5A*) foi identificada em *Arabidopsis* como um componente do COP9 signalossomo (CSN; Kwok *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2000) e, por apresentar homologia com a proteína JAB1 (*Jun activating binding protein1*) de humanos, tem sido também nomeada AJH1 (*Arabidopsis JAB1 Homolog 1*). A proteína JAB1 estabiliza complexos de fatores de transcrição c-Jun ou JunD em seu sítio de ligação ao fator de transcrição AP-1 específico, aumentando a especificidade da ativação do gene alvo por proteínas AP-1 (Chamovitz e Segal, 2001). O CSN consiste em um complexo protéico evolutivamente conservado, identificado inicialmente em *Arabidopsis* como um repressor do desenvolvimento regulado pela luz (Wei *et al.*, 1994). Este complexo é composto por oito subunidades (CSN1-CSN8; Deng *et al.*, 2000) e apresenta papel central na via ubiquitina-proteassomo (Schwechheimer, 2004). Entre as oito subunidades, seis possuem o domínio PCI (*Proteasome, COP9, Initiation factor 3*) e duas (CSN5 e CSN6) apresentam o domínio MPN/MOV34 (*Mpr1p, Pad1p N-terminal*; Hofmann e Bucher, 1998; Wei *et al.*, 1998). O principal papel bioquímico atribuído ao complexo CSN consiste em uma atividade de isopeptidase que remove a proteína Rub, uma ubiquitina-like (também denominada Nedd8), da subunidade culina de culina-RING E3 ubiquitina ligase (CRL). A conjugação ou remoção de Rub, denominadas rubilação ou derrubilação, respectivamente, representa um mecanismo importante de regulação da atividade de CRL (Lyapina *et al.*, 2001; Cope e Deshaies, 2003). A atividade de derrubilação reside no motivo JAMM (*JAB1/MPN/Mov34*), também denominado motivo MPN+, que está localizado no domínio MPN de CSN5 (Cope *et al.*, 2002). CSN6 apresenta o domínio MPN, mas não possui o motivo JAMM que funciona como centro catalítico para a atividade de isopeptidase de CSN. Por outro lado, embora CSN5 contenha o

motivo JAMM, a atividade de derrubilação consiste em uma propriedade do complexo CSN intacto e não apenas de CSN5 (Cope *et al.*, 2002).

Em *Arabidopsis*, CSN5 constitui uma família gênica com dois membros, CSN5A e CSN5B (Kwok *et al.*, 1998), incorporados em complexos CSN distintos, com apenas uma cópia da subunidade 5 em cada complexo (Gusmaroli *et al.*, 2004). O estudo com mutantes defectivos para as duas isoformas mostrou que CSN5A e CSN5B desempenham papéis distintos no desenvolvimento da planta, com CSN5A exercendo maior destaque (Gusmaroli *et al.*, 2004). Além de possuir a atividade de isopeptidase, necessária para a derrubilação de culina, CSN5 é completamente estável e detectável como um monômero ou em subcomplexos menores (Kwok *et al.*, 1998; Gusmaroli *et al.*, 2007). Enquanto que a forma associada a CSN é predominantemente nuclear, a forma livre parece ser nuclear e citoplasmática (Kwok *et al.* 1998; Tomoda *et al.* 2002). Além disto, Tomoda *et al.* (2002) mostraram que complexos CSN menores contendo CSN5 estão localizados principalmente no citoplasma. Diante disso, foi proposto que a forma monomérica de CSN5 em plantas pode exercer função independente de CSN e da derrubilação de culina, como verificado por estudos em sistema de cultura celular animal (Stuttman *et al.*, 2009).

A proteína CSN5A é uma proteína solúvel de aproximadamente 40 kDa e, assim como outras subunidades de CSN, é altamente conservada entre os reinos animal e vegetal com as proteínas homólogas de humanos e de *Arabidopsis* compartilhando mais que 60% de identidade de aminoácidos (Chamovitz e Segal, 2001). Além disso, a avaliação dos níveis de CSN5A em diferentes órgãos, em determinado estágio de desenvolvimento, mostrou a sua expressão em todos eles, e em níveis muito superiores aos de CSN5B (Gusmaroli *et al.*, 2004).

A proteína At2G41020 é homóloga a proteínas que ligam a poliglutaminas (PQBP1/Npw38) de humanos

O locus At2G41020 codifica uma proteína de função desconhecida, de 463 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 49814.4 Da e valor de ponto isoelétrico de 6.9501 (At2G41020.1). Este gene apresenta também uma forma variante de *splicing*, originando uma proteína de 382 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 41525.4 Da e valor de ponto isoelétrico de 6.8375 (At2G41020.2). A proteína At2G41020 apresenta em sua sequência dois domínios WW / Rsp5 / WWP (resíduos de 193 a 226 e de 238 a 271; banco de dados InterPro IPR001202). O domínio WW corresponde a uma pequena região conservada entre proteínas não-relacionadas, possuindo aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos, que se repete até quatro vezes na mesma proteína (Bork e Sudol, 1994; Hofmann e Bucher, 1995; Sudol *et al.*, 1995). O nome WW ou WWP deve-se à presença de dois resíduos de triptofano, espaçados um do outro por 20-23 resíduos de aminoácidos, que estão presentes na maioria dos domínios WW conhecidos, e à presença de um resíduo de prolina conservado. No entanto, em alguns casos, o primeiro ou o segundo resíduo de triptofano conservado é substituído por outro resíduo aromático (Bork e Sudol, 1994; Sudol *et al.*, 1995). O domínio WW medeia a interação proteína-proteína por meio do reconhecimento de motivos ricos em prolina, bem como sítios prolina-serina/treonina fosforilada em seus ligantes. Proteínas contendo o domínio WW estão envolvidas em uma variedade de processos celulares, incluindo transcrição, processamento de RNA, tráfego de proteínas, sinalização de receptores e controle do citoesqueleto (Ilsley *et al.*, 2002; Ingham *et al.*, 2004; Sudol *et al.*, 2001).

Estudos, baseados em comparação de sequências com proteínas de animais e plantas, têm relacionado a proteína codificada pelo locus At2G41020

ao processamento do pré-mRNA, devido à sua homologia com a proteína PQBP1 (*polyglutamine binding protein 1*)/Npw38 de humanos, envolvida com o processo de *splicing* de pré-mRNA (Wang e Brendel, 2004). Ensaios de cromatografia de imunoafinidade mostraram que as proteínas PQBP1/Npw38 e Npw38BP (*Npw38 binding protein*) apresentam afinidade por um ou mais componentes do complexo Prp19/CDS5, sugerindo uma possível função no recrutamento deste complexo para o spliceossomo (Makarova *et al.*, 2004). De fato, as proteínas Npw38 e Npw38BP estão associadas estavelmente com o spliceossomo BΔU1 (spliceossomo não ativado cataliticamente, que contém U2, U4, U5 e U6, mas que não possui U1 snRNP) e poderiam, assim, funcionar como um sítio de ancoragem para o complexo Prp19/CDC5, requerido para o primeiro passo de *splicing*. Entretanto, Npw38 não se encontra associada com o spliceossomo ativado (Makarova *et al.*, 2004).

A proteína At2G41020 compartilha 18% de identidade de sequência com a proteína PQBP1/Npw38 de humanos (Figura 8), mas essa identidade alcança 50% quando apenas a porção C-terminal (70 a 90 resíduos de aminoácidos) é utilizada como base de comparação, revelando um domínio conservado nas proteínas dos reinos vegetal e animal. Estendendo a análise para outras espécies animais, verifica-se que At2G41020 compartilha 17% de identidade com a proteína PQBP1 de *Canis familiaris* e com sua homóloga de *Equus caballus*. A identidade entre as proteínas se eleva para 50%, em ambos os casos, quando apenas a porção C-terminal é comparada. A conservação de sequência alcança valores maiores quando apenas proteínas de espécies vegetais são comparadas. Assim, a identidade de sequência entre At2G41020 e seus homólogos em *Vitis vinifera*, *Orisa sativa* e *Zea mays* varia entre 45 a 49%, elevando-se para 84 a 86% quando apenas o domínio C-terminal é comparado.

At2g41020.1MGEELQYQQNGSSVTSNYGYGSSSL	24
Vitis vinifera	MQSHPESSNGSLLHGGHQTAADGIGLRISINQITGTAEAIVPMHHYDQIPQETSASFQWGNRV	60
Oryza sativaMDNSHEQLPLPPGVGAWPE.....PPSIHEAKFQPNQPYATFYGATPNN	44
Zea maysMDNSQNQPPPPGVGTWPC.....APPSHFQCHADPQSYHPQFAARPDN	44
Homo sapiens	0
Equus caballus	0
Canis familiares	0
At2g41020.1	A.....YIQSQ.DIESAANTALLREQEI	46
Vitis vinifera	SG.....NIRSMGDIETAACDAVIREQEI	84
Oryza sativa	GSNHNAASYSAAAQPTMPFNMMDAGGAQSNQTAHEVSNHNDSSAADIESAVQEAVLREQDI	104
Zea mays	AS.....ANNSGSSANIESAVQEAVLHAQDI	70
Homo sapiens	0
Equus caballus	0
Canis familiares	0
At2g41020.1	ETQKIIQQREAGTSVAGDSKHNTDILRLR.ADPNALKEHLLKFTANHRAEAMAKRGGSV	105
Vitis vinifera	ATQRIIHSQRQA.KGESEPSMDNTDILSGRRHDPNALKEHLLKMTIEHRAEMALRKGKST	143
Oryza sativa	ETQQVIQNQRQA.KATIEPTQYGEDLLSNR.RNPNALKEHLLKMTAEHRAEMANKRKGKPL	162
Zea mays	ETQQVIQNQRHA.NTTSEPTKYGEDLLSNR.RDPNALKEHLLKMTADHRAEMASKRKGKPL	128
Homo sapiens	0
Equus caballus	0
Canis familiares	0
At2g41020.1	STCGEGNVDVNGYGIFFGGVAYAGHS...ELSGKPE.....PTNASNNLEFYDKQRL	154
Vitis vinifera	LRE.EGNIEIGNGYGVFEGGAYYGASRSNIAMPSPKEEYHIESEEKSESELLEFYDKQRL	202
Oryza sativa	HAD.NGNVEIGNGYGVFEGGAYYAAN.MSS...DKPKD...IADKAKGADLLEFLRQRL	214
Zea mays	HPN.NGNCEIGNGYGVFEGGAYYAAN.LESPQMNKPRD...ETDKAKCANDLEDLQRL	183
Homo sapiensMLEFVALQTRL	11
Equus caballusMLEFVALQTRL	11
Canis familiaresMLEFVALQTRL	11
At2g41020.1	KARGILRDGAGAVTSNEEDTSAVSWNRQATLPFQANASTIEELGWVDADKDPASCATYYNQ	214
Vitis vinifera	RARGILRDDTAKGDPHINTFKAMKLEAQSTQTTAP..AKIETGWVEAKDPASCASYYNQ	260
Oryza sativa	RARGILRDEAT...NNSFTIKQNVDSFVCQIKSA..QELITCWVEAKDITSCASYYNQ	268
Zea mays	RARGILRDETT...NKNYTSQTQVDSQEIENKSA..QELIEPGWIEVKDPTTCAPYYNQ	237
Homo sapiens	AKRGILRHLEPE...PEEEIIAEDYDDDFVDYEATRLEGIEPSWYKVFDPSCGLFYNQ	68
Equus caballus	AKRGILRHLEPE...PEEEIIAEDYDDDFVDYEATRLEGIEPS.....CGLFYNQ	60
Canis familiares	AKRGILRHLEPE...PEEEIIAEDYDDDFVDYEATRLEGIEP.....	50
At2g41020.1	HNGTCQWERE.VELSYATSSAPP.VLSKEEWETTFEASCHKYFYNTRTHVSCWEPP... 269	
Vitis vinifera	HNGMSQWERE.VETSFSSQPPSP.LSLPEDWEBALVTTGQKYYNKRKTQASCWEPPNTV 318	
Oryza sativa	SHGMTQNDREAGAPLNTMQHQPSSSLPENWEBALDQSTGQKYYNNTQATCWEPP... 325	
Zea mays	SHGVSQNDREDSVVNMQHQVSP...SLPENWEBALDRTSTGHKYYNNTKTQTTQWEPP... 292	
Homo sapiens	DDDLVSWLSLHDPNSVVTKSAKLLRSSNADAEKLLRSHIKSDRSHEKLDRGHDKSD... 125	
Equus caballus	DDDLVSWLSLHDPNSVVTKSAKLLRSSNADAEKLLRSHIKSLRGHEKSDRGHEKSD... 117	
Canis familiaresSWYKVFDP...WSNNADAEKLLRSHIKSDRNGHEKSDRNGHEKSD... 92	
At2g41020.1	...ASLQKPAATNSNNAVITQSTANGEGEHPFSQLERCSGCGGWGVGLVQRWGYCVHCTR 325	
Vitis vinifera	QQVFNIVQQVASGHSGMVFSNAVNGNQLRSAMLRGMCGGWGVGLVQMWGYCNHCTR 378	
Oryza sativa	...TAVNPGVAPHAPINAAVEMAAQNTIIWNSQMQRCLCGGWGVGLVQPWGYCNHCTR 381	
Zea mays	...TSVNTNVTTPASINTAVEPVAQAALIWNSQMQRCLCGGWGVGLVQPWGYCNHCTR 348	
Homo sapiensRGHDKSDR.....DREBQY.....DKVDR 144	
Equus caballusRGHEKSDRGHEKLDRGHEKSDRDRBQY.....DKVDR 150	
Canis familiaresRSEKSDR.....SHEKSDRDRBQY.....LKVDR 118	
At2g41020.1	VFNLEKQFLPAHLNHFTN....AGDSGQKDFNCRSSSEEMKRVIGK...KRAHABDD 377	
Vitis vinifera	VLNLPQSQYLASSLQQCSRNVNVIKGDSEKPKSKQBSNLLEFIEGKSKRDRRFRAYTEDD 438	
Oryza sativa	VQNLPFQQYPSYPMNTIHSSSN...KNPGNVAAKLRSSAKLFFGRANKKDHRRNRPEDD 438	
Zea mays	VQNEPFQQYPSYTNNTMHASGNNAFKTQGNVSAKNRGSSEFELGKPNRKDHRNRPEDD 408	
Homo sapiens	EREEDRDRDRGDKADR.....EEGKERRHREELAEYFK.....SKFAVSRKDE 192	
Equus caballus	EREEDRDRDRDRGDKADR.....EEGKERRHREELAEYFK.....SKFAVSRKDE 198	
Canis familiares	EREEDRDRDRDRGDKADR.....EEGKERRHREELAEYFK.....SKFAVSRKDE 166	

At2g41020.1	ELDPMDPSSYS DAPRGWVVLKGLG..VQERRADTTAAGPIFQQRPYSPGAVIRNADVA	435
Vitis vinifera	ELDPMDPSSYS DAPRGWVVLKGLG..VQERRADTTAAGPIFQQRPYSPGAVIRNADVA	496
Oryza sativa	ELDPMDPSSYS DAPRGWVVLKGLG..VQERRADTTAAGPIFQQRPYSPGAVIRNADVA	496
Zea mays	ELDPMDPSSYS DAPRGWVVLKGLG..VQERRADTTAAGPIFQQRPYSPGAVIRNADVA	466
Homo sapiens	ELDPMDPSSYS DAPRGWVVLKGLG..VQERRADTTAAGPIFQQRPYSPGAVIRNADVA	252
Equus caballus	ELDPMDPSSYS DAPRGWVVLKGLG..VQERRADTTAAGPIFQQRPYSPGAVIRNADVA	258
Canis familiares	ELDPMDPSSYS DAPRGWVVLKGLG..VQERRADTTAAGPIFQQRPYSPGAVIRNADVA	226
At2g41020.1	SSQKKKENSQFTEITFRGIGSDGLGDA	462
Vitis vinifera	S.QSKKPGSHYAPISKKGIGSDGLGDA	522
Oryza sativa	S.HGKRRG..MAPITFRGIGSDGLGEA	520
Zea mays	T.HGKRRGG.MAPITFRGIGSDGLGEA	491
Homo sapiens	R.....TKQQD.....	258
Equus caballus	R.....TKQQD.....	264
Canis familiares	R.....TKQQD.....	232

Figura 8: Alinhamento múltiplo de At2G41020 com homólogos de espécies vegetais e animais. As proteínas homólogas foram obtidas utilizando o programa BLASTp e utilizadas para realização de um alinhamento múltiplo utilizando o programa DNAMAN. As proteínas utilizadas possuem os seguintes números de acesso: XP_002278437.1 (*Vitis vinifera*); EEC72028.1 (*Oryza sativa*); ACG25308.1 (*Zea mays*); CAJ00538.1 (*Homo sapiens*); XP_538029.2 (*Canis familiaris*) e XP_003365832.1 (*Equus caballus*). Em preto, são demarcados os resíduos de aminoácidos que apresentam homologia em todas as proteínas, em cinza escuro os que apresentam homologia $\geq 75\%$, e em cinza claro $\geq 50\%$.

A proteína NIG interage in vivo com as proteínas CSN5A e At2G41020

A fim de verificar se as interações identificadas pelo sistema de duplo híbrido em leveduras ocorrem também na planta, foi realizado o ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC). Além de detectar a interação *in vivo* entre proteínas candidatas, esta técnica permite identificar o compartimento celular onde a interação ocorre. Inicialmente, as proteínas NIG, CSN5A e At2G41020 foram fusionadas a fragmentos não-fluorescentes (NY e CY) da proteína amarela fluorescente (YFP). As construções obtidas foram utilizadas para bombardear epiderme de cebola, que foi então analisada por microscopia confocal 14-16 horas após o bombardeamento. A fluorescência emitida por YFP foi reconstituída no núcleo e em agregados citoplasmáticos de células de cebola co-bombardeadas com CSN5A-CY + NIG-NY (Figura 9A) e em células co-bombardeadas com At2G41020-CY + NIG-NY (Figura 9C).

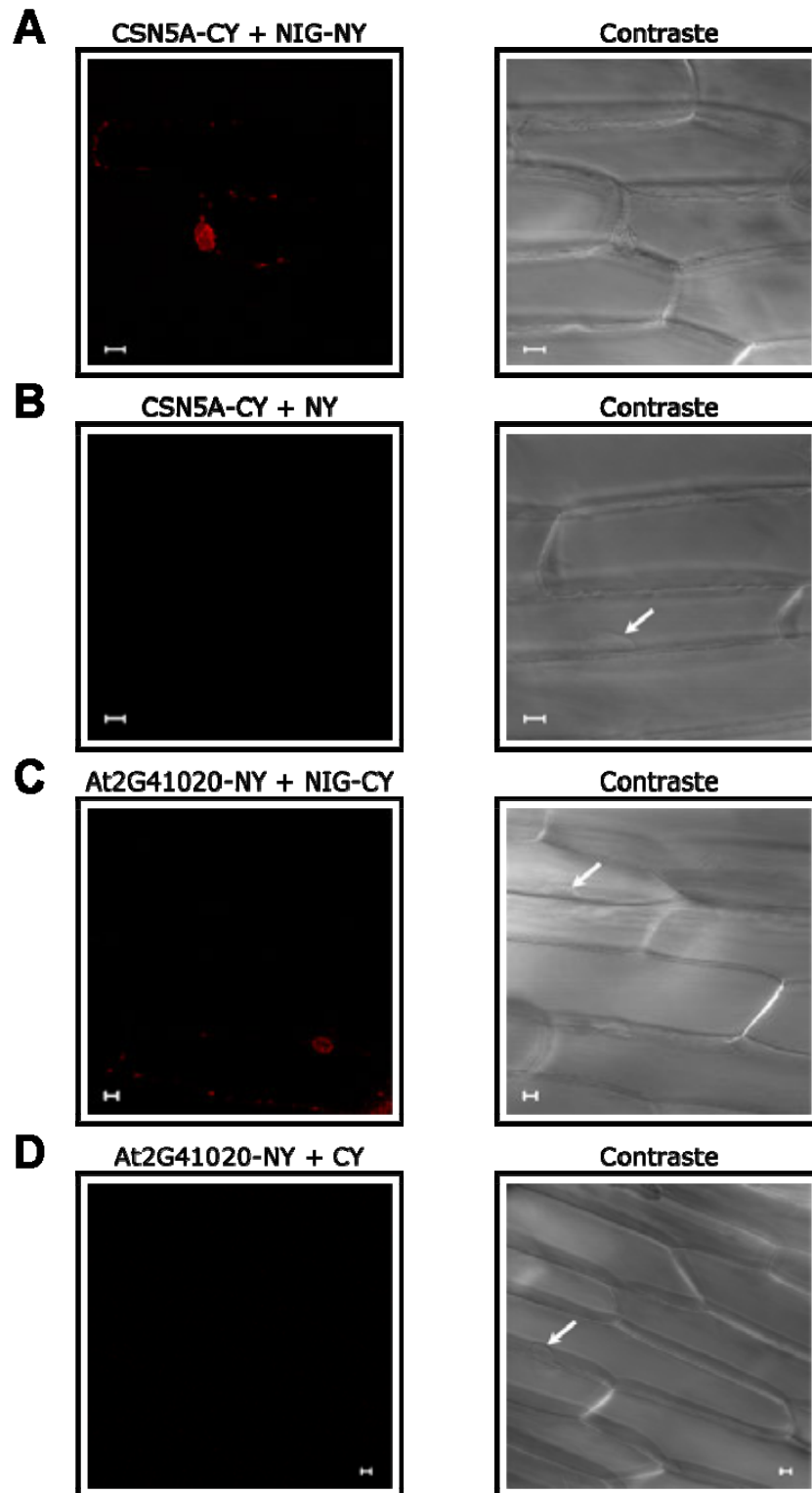


Figura 9: Visualização da interação entre NIG e CSN5A e entre NIG e At2G41020 em células de cebola, no ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC). Fragmentos não-fluorescentes da proteína amarela fluorescente (YFP), NY e CY, foram fusionados à NIG, CSN5A e At2G41020, e diferentes combinações das proteínas foram co-bombardeadas em células de epiderme de cebola. A fluorescência de YFP foi detectada quando NIG e CSN5A (A) ou At2G41020 (C) foram co-expressas, e nenhum sinal foi detectado nos controles negativos (B e D). As setas indicam o núcleo de células que não apresentaram fluorescência. As barras correspondem a 10 μ m.

Nenhuma fluorescência foi detectada quando CSN5A-CY e At2G41020-CY foram co-bombardadas com o vetor complementar vazio (Figura 9B,D). Estes resultados demonstram que a interação detectada entre NIG e CSN5A ou At2G41020 pelo sistema de duplo híbrido em leveduras ocorre também na planta. Além disso, foi possível verificar que a interação entre NIG e CSN5A ou At2G41020 parece ocorrer no núcleo e em agregados citoplasmáticos (Figura 9A,C). Considerando que NIG é uma proteína citoplasmática (Carvalho *et al.*, 2008a), pode-se pressupor que sua interação com CSN5A e com At2G41020 ocorre primeiramente no citoplasma, sendo posteriormente direcionada para o núcleo.

A interação *in vivo* entre NIG e CSN5A foi também avaliada por co-imunoprecipitação (Figura 10), utilizando extrato protéico de folhas de tabaco expressando transientemente NIG e CSN5A-GFP. Na canaleta 3, CSN5A fusionada à GFP foi imunoprecipitada utilizando anti-GFP, e detectada por *western blotting* com o mesmo anticorpo. A presença de uma banda de aproximadamente 66 kDa (CSN5A-GFP) mostra que a proteína recombinante acumula-se em níveis detectáveis. Na canaleta 2, NIG foi imunoprecipitada com anti-GFP e detectada com soro anti-NIG. A ausência de uma banda de aproximadamente 65 kDa (NIG) comprova que o anticorpo anti-GFP não reconhece a proteína NIG. A interação entre NIG e CSN5A fusionada à GFP foi avaliada na primeira canaleta, na qual o anticorpo anti-GFP foi utilizado para isolar imunocomplexos formados entre CSN5A-GFP e NIG, e o soro anti-NIG utilizado para verificar a presença de NIG por *western blotting*. A presença de NIG (aproximadamente 65 kDa) indica que esta GTPase interage *in vivo* com CSN5A. Em todas as três canaletas, a banda de maior intensidade corresponde à cadeia pesada do anticorpo utilizado na imunoprecipitação. Uma banda não-específica, localizada entre a banda correspondente à NIG e à cadeia pesada do

anticorpo, na canaleta 1, persistiu em todos os ensaios de co-immunoprecipitação realizados.

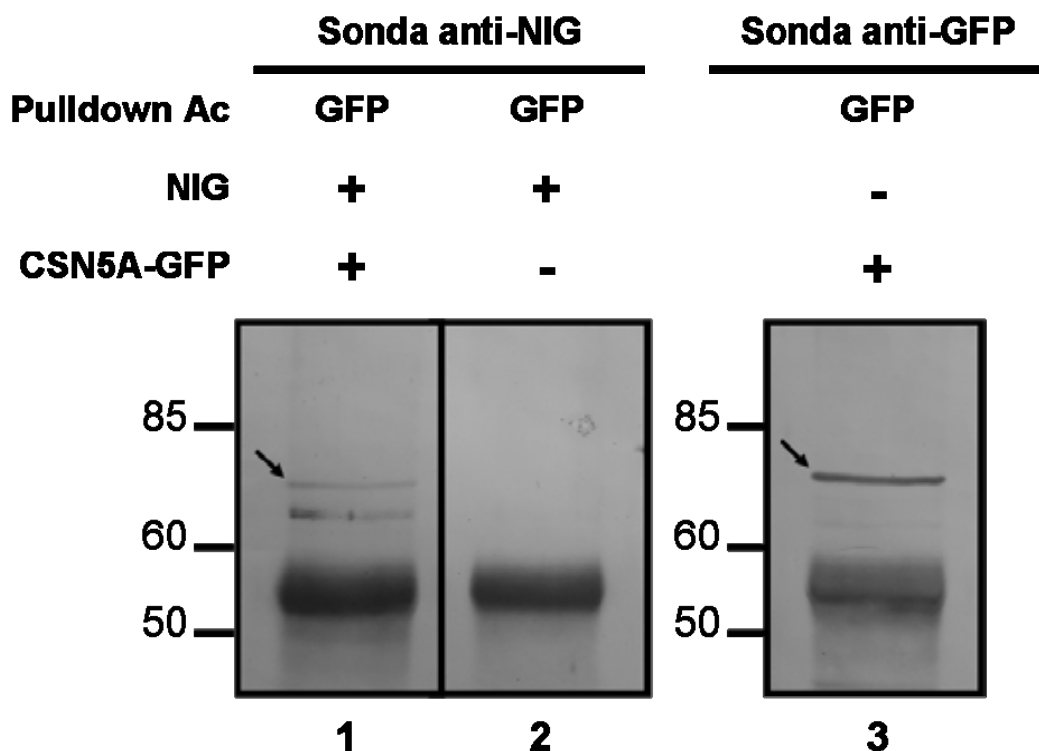


Figura 10: Análise da interação *in vivo* entre NIG e CSN5A por co-immunoprecipitação. Folhas de tabaco foram agroinoculadas com NIG + CSN5A-GFP (canaleta 1), NIG (canaleta 2) ou CSN5A-GFP (canaleta 3). Extratos protéicos foram obtidos a partir das folhas agroinoculadas 72 horas após a transfecção e o isolamento de complexos protéicos realizado mediante o uso de soro anti-GFP e ProteínaA/agarose. O anticorpo “pulldown” corresponde ao anticorpo utilizado para co-immunoprecipitação, enquanto que “sonda” refere-se ao anticorpo utilizado na *western blotting*. A banda de maior intensidade representa a cadeia pesada do anticorpo utilizado na imunoprecipitação. As setas indicam a posição correspondente a NIG (canaleta 1) e a CSN5A-GFP (canaleta 3).

Localização subcelular das proteínas CSN5A e At2G41020

A fim de determinar a localização subcelular de CSN5A e de At2G41020, bem como a sua co-localização com a proteína NIG, foi realizado o ensaio de expressão transiente, mediado por agrobactéria, em células epidérmicas de folha de tabaco. As proteínas CSN5A e At2G41020 foram fusionadas à GFP, e a

proteína NIG fusionada à YFP, e a localização subcelular das proteínas quiméricas analisada por microscopia confocal, mediante fluorescência emitida pelo GFP ou YFP. A proteína NIG é uma proteína citoplasmática, que se acumula ao redor do envelope nuclear de células vegetais (Carvalho *et al.*, 2008a; Figura 11A). A localização nuclear e citoplasmática de CSN5A verificada na Figura 11B é similar àquela encontrada por Kwok *et al.* (1998). Este estudo, realizado com mutantes nos quais CSN5 acumulava-se apenas como monômero ou como complexo, sugeriu que a forma monomérica de CSN5A (como também de CSN5B) seria principalmente citoplasmática, enquanto o complexo COP9 estaria predominantemente localizado no núcleo, como mostrado em trabalhos anteriores (Chamovitz *et al.*, 1996).

Conforme verificado na Figura 11C, a proteína At2G41020 localiza-se no núcleo de células vegetais. Este resultado de localização subcelular foi confirmado pela co-localização de At2G41020-GFP com o fator de transcrição YFP-NAC6 de soja (Pinheiro *et al.*, 2009), utilizado como marcador nuclear (Figura 11D). A localização nuclear de At2G41020 é similar à encontrada para a proteína Npw38 (Komuro *et al.*, 1999), sua homóloga em humanos, e condizente com uma possível associação com o spliceossomo (Wang e Brendel, 2004). Entretanto, quando a proteína YFP-NIG é co-expressa com CSN5A-GFP (Figura 12A) ou com At2G41020-GFP (Figura 12B), o que se verifica é um redirecionamento de NIG do citoplasma para o núcleo. Como a proteína NIG está localizada no citoplasma (Figura 11A), torna-se evidente que a sua realocação para o núcleo é dependente da presença de CSN5A ou de At2G41020. Este redirecionamento nuclear de NIG na presença de CSN5A e de At2G41020 é condizente com os resultados obtidos no ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (Figura 9) que mostrou a interação entre as proteínas no núcleo, e com a capacidade de NIG em transativar genes repórteres em leveduras (Figura 4).

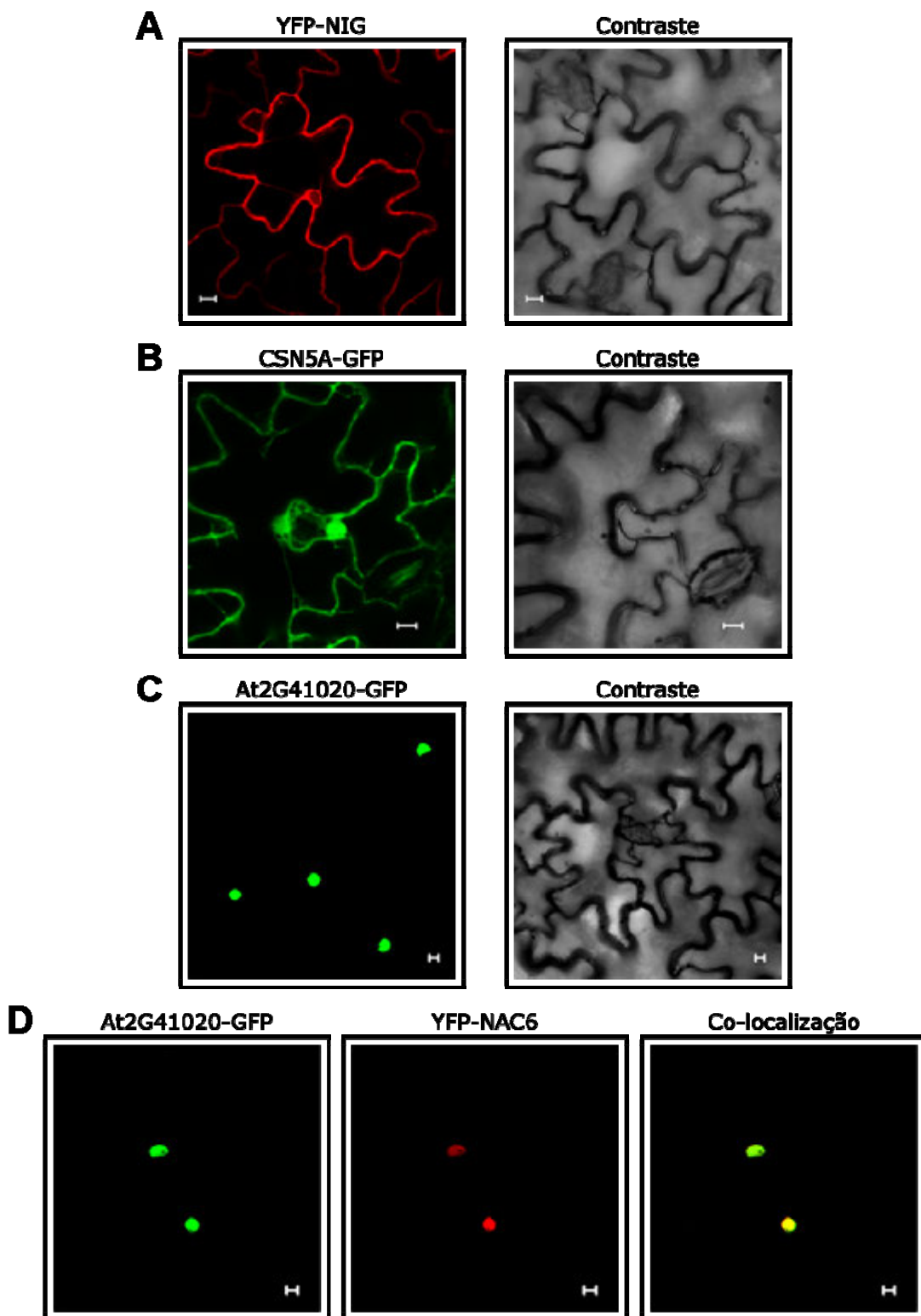


Figura 11: Localização subcelular de NIG, CSN5A e At2G41020. Folhas de tabaco foram infiltradas com *A. tumefaciens* carregando as construções de DNA indicadas. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, 72 horas após a transfecção. (A, B e C) Localização subcelular de NIG fusionada à YFP, e de CSN5A e At2G41020 fusionadas à GFP, respectivamente. (D) Confirmação da localização nuclear de At2G41020-GFP pela sua co-expressão com YFP-NAC6. As barras equivalem a 10μm.

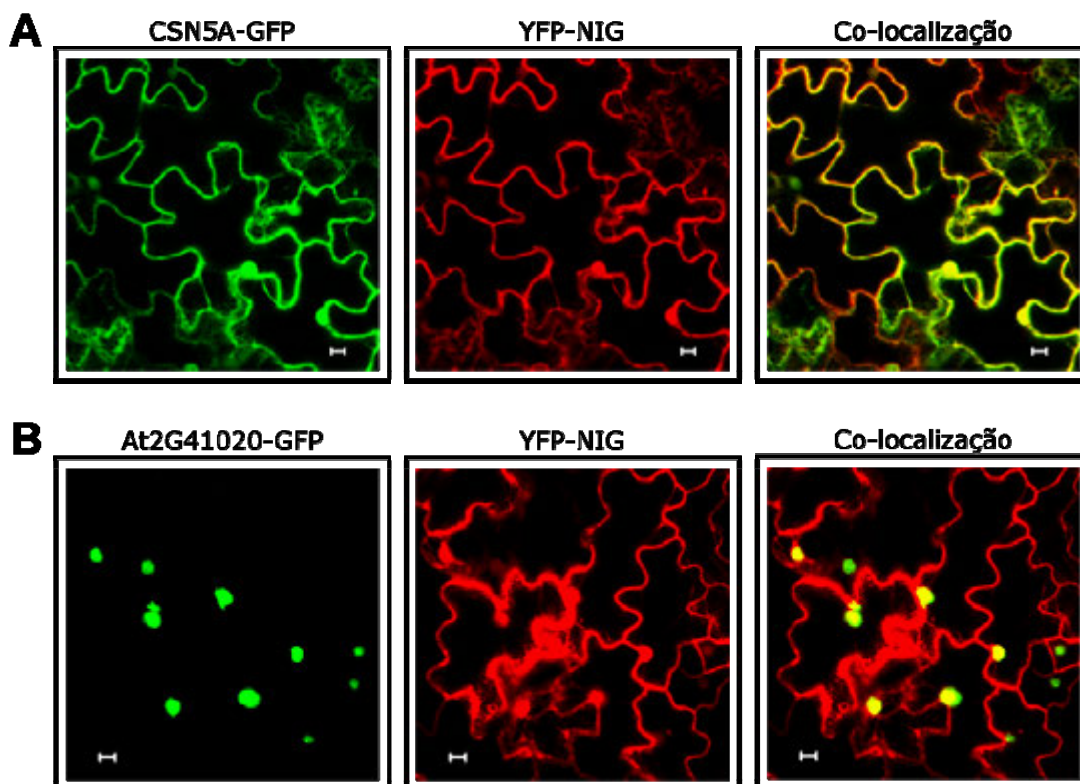


Figura 12: NIG é redirecionada para o núcleo quando co-expressa com CSN5A ou com At2G41020. Folhas de tabaco foram agroinoculadas com CSN5A-GFP + YFP-NIG (A) ou AT2G41020-GFP + YFP-NIG (B) e as imagens de microscopia confocal obtidas após 72 horas da agroinoculação. As barras correspondem a 10 μ m.

Baseando-se nas propriedades estruturais e bioquímicas de NIG, bem como na sua localização subcelular e na sua capacidade de redirecionar a proteína NSP de geminivírus do núcleo para o citoplasma, foi proposto que esta GTPase esteja envolvida no transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas (Carvalho *et al.*, 2008a,b). Os resultados do ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC), que demonstraram a interação de NIG com CSN5A ou com At2G41020 ocorrendo no núcleo (Figura 9), somado ao redirecionamento de NIG para o núcleo quando co-expressa transientemente com CSN5A ou com At2G41020 em células epidérmicas de folha de tabaco (Figura 12), sugerem um envolvimento de NIG no transporte de macromoléculas, não apenas do núcleo para o citoplasma, mas também do citoplasma para o

núcleo. Além disso, a direcionalidade da participação de NIG neste mecanismo de transporte parece ser dependente do seu parceiro celular (Figura 13).

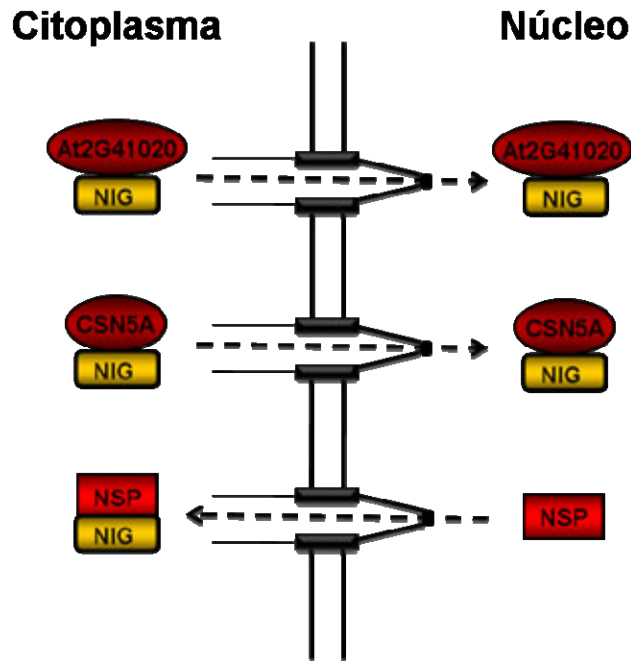


Figura 13: Representação esquemática da participação de NIG no transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas. A proteína NIG realoca a proteína NSP de geminivírus do núcleo para o citoplasma. Entretanto, é translocada para o núcleo quando co-expressa com CSN5A ou At2G41020.

De fato, a participação de proteínas no transporte de conjuntos distintos de moléculas-cargo em direções opostas, através do complexo poro nuclear, tem sido descrita em eucariotos superiores e em *S. cerevisiae* (Mingot *et al.*, 2001; Lipowsky *et al.*, 2000; Kurisaki *et al.*, 2006; Gontan *et al.*, 2009; Yoshida e Blobel, 2001). Em humanos, a importina 13 medeia a importação nuclear do complexo RBM8 – MGN e de hUBC9 (uma enzima de conjugação de SUMO-1). Por outro lado, importina 13 desempenha atividade de exportação para o fator de iniciação da tradução eIF1A (Mingot *et al.*, 2001). Por sua vez, a exportina 4 consiste em um receptor de exportação nuclear para eIF5A e para o fator de transcrição SMAD3 (Lipowsky *et al.*, 2000; Kurisaki *et al.*, 2006), além de atuar

como receptor de importação nuclear para os fatores de transcrição SRY e Sox2 em camundongos (Gontan *et al.*, 2009). Em leveduras, a proteína Msn5 (referida também como Kap142p), envolvida na exportação nuclear de várias proteínas, parece participar na importação da proteína RPA (*replication protein A*; Yoshida e Blobel, 2001), uma proteína necessária para múltiplos aspectos do metabolismo do DNA.

O modelo descrito na Figura 13 preconiza que NIG facilita o transporte nucleocitoplasmático de proteínas em ambas as direções. Foi demonstrado previamente que NIG promove o transporte da proteína viral NSP do núcleo para o citoplasma (Carvalho *et al.*, 2008a). Os resultados da presente investigação demonstram que NIG é redirecionada para o núcleo quando co-expressa com os parceiros celulares CSN5A e At2G41020. Entretanto, os resultados da presente investigação não permitem inferir se o transporte das proteínas celulares para o núcleo é facilitado por NIG ou se NIG é carregada para o núcleo simplesmente como resultado de interações estáveis com as proteínas nucleares. Independente da alternativa, a presença de NIG no núcleo possibilita que sua atividade transativadora, detectada em leveduras, possa ter relevância biológica *in planta*. A capacidade de NIG em interagir com fatores transcricionais (Tabela 2) deve ser explorada em estudos futuros para examinar se NIG pode funcionar em complexos de transativação de genes. Além disso, estudos para definir se NIG participa ativamente de transporte nuclear de proteínas celulares devem ser delineados. A expressão estável de CSN5A-GFP e At2G41020-GFP em *nig* alelos nulos e o uso de inibidores de importação e exportação nuclear deverão auxiliar a resolver estas questões. Naturalmente, a presença de homólogos de NIG (At1G08680, 43% de identidade e At4G32630, 40% de identidade) em *Arabidopsis* pode indicar a necessidade de se obterem mutantes triplos para os estudos de perda de função. Finalmente, como perspectiva, seria relevante

examinar se a atividade de GTPase de NIG está envolvida no controle da direcionalidade do transporte.

CONCLUSÃO

A proteína NIG (*NSP-Interacting GTPase*), identificada por interagir *in vivo* e *in vitro* com a proteína NSP (*nuclear shuttle protein*) de geminivírus, apresenta características estruturais e bioquímicas condizentes com um possível papel no transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas (Carvalho *et al.*, 2008a,b). A identificação de alvos celulares para a proteína NIG corresponde à primeira etapa para o entendimento da sua função celular e do seu possível envolvimento neste mecanismo de transporte. Neste trabalho, foram identificadas as proteínas CSN5A (*COP9 Signalosome 5A*) e At2G41020 (uma proteína de ligação a poliglutaminas), capazes de interagir com o domínio Pro-Rich da proteína NIG, pelo sistema de duplo híbrido em leveduras. Esta interação foi posteriormente confirmada utilizando as sequências completas de ambas as proteínas. A proteína CSN5A representa a subunidade catalítica do complexo CSN, apresentando a atividade de isopeptidase responsável pela remoção da proteína Rub/Nedd8 da subunidade culina do complexo CRL (Cope *et al.*, 2002). A proteína At2G41020 possui dois domínios WW, que medeiam a interação proteína-proteína, por meio do reconhecimento de motivos ricos em prolina e de sítios prolina-serina/treonina fosforilada em seus ligantes, estando relacionada como um componente do spliceossomo, devido à similaridade de sequência com a proteína PQBP1/Npw38 de humanos (Wang e Brendel, 2004).

Os resultados obtidos mostraram que a interação entre NIG e CSN5A ou At2G41020, identificada pelo sistema de duplo híbrido, ocorre também na planta. Inicialmente, foi verificado pelo ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) para ambas as proteínas, que a interação entre NIG e CSN5A ou At2G41020 parece ocorrer no núcleo e em agregados citoplasmáticos. Além disso, ensaios de co-imunoprecipitação foram eficientes

para confirmar a interação entre NIG e CSN5A. Ensaios de localização subcelular mostraram que a proteína CSN5A está localizada no núcleo e no citoplasma, enquanto que a proteína At2G41020 é uma proteína nuclear, condizente com sua possível participação na formação do spliceossomo. Embora estudos anteriores tenham mostrado que NIG está localizada no citosol, a co-expressão de YFP-NIG com CSN5A-GFP ou At2g41020-GFP promoveu a sua realocação para o núcleo. Estes resultados sugerem um envolvimento de NIG no transporte de macromoléculas do citoplasma para o núcleo e colocam ambos os parceiros de NIG como alvos potenciais para a elucidação do seu papel no transporte de complexos protéicos em células de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACH, R.A., GRUISSEM, W. (1994) A small nuclear GTP-binding protein from tomato suppresses a *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 5863–5867.
- AMBERG, D.C., BURKE, D.J., STRATHERN, J.N. (2005) Assay of β -Galactosidase in Yeast: Assay of Crude Extracts. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- BAYLISS, R., LEUNG, S.W., BAKER, R.P., QUIMBY, B.B., CORBETT, A.H., STEWART, M. (2002) Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *EMBO J*. 21, 2843–2853.
- BISCHOFF, F.R., GÖRLICH, D. (1997) RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin b-related nuclear transport factors. *FEBS Lett*. 419, 249–254.
- BISCHOFF, F.R., KREBBER, H., SMIRNOVA, E., DONG, W., PONSTINGL, H. (1995) Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J*. 14, 705–715.
- BISCHOFF, F.R., PONSTINGL, H. (1991a) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*. 354, 80–82.
- BISCHOFF, F.R., PONSTINGL, H. (1991b) Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88, 10830–10834.
- BORK, P., E SUDOL, M. (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem. Sci*. 19 (12), 531-533.
- BOS, J.L., REHMANN, H., WITTINGHOFER, A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129, 865–877.
- BRIDDON, R.W., BROWN, J., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, M., ZHOU, X., FAUQUET, C. (2008) Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA- β satellites of begomoviruses. *Arch. Virol*. 153, 763–781.
- BRIDDON, R.W., STANLEY, J. (2006) Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology* 344, 198–210.
- BROUGH, C.L., HAYES, R.J., MORGAN, A.J., COUTTS, R.H.A., BUCK, K.W. (1988) Effects of mutagenesis in vitro on the ability of cloned tomato golden mosaic virus DNA to infect *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of General Virology*. 69, 503-514.
- CARVALHO, C.M., FONTENELLE, M.R., FLORENTINO, L.H., SANTOS, A.A., ZERBINI, F.M., FONTES, E.P.B. (2008a). A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant J*. 5, 869-80.

- CARVALHO, C.M., MACHADO, J.P.B., ZERBINI, F.M., FONTES, E.P.B. (2008b) NSP-interacting GTPase: A cytosolic protein as cofactor for nuclear shuttle proteins. *Plant Signaling & Behavior*. 3:9, 752-754.
- CARVALHO, C.M., SANTOS, A.A., PIRES, S.R., ROCHA, C.S., SARAIVA, D.I., MACHADO, J.P.B., MATTOS, E.C., FIETTO, L.G., FONTES, E.P.B. (2008c). Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. *PLoS Pathog* 4(12): e1000247
- CARVALHO, M.F., TURGEON, R., LAZAROWITZ, S.G. (2006) The Geminivirus Nuclear Shuttle Protein NSP Inhibits the Activity of AtNSI, a Vascular-Expressed Arabidopsis Acetyltransferase Regulated with the Sink-to-Source Transition. *Plant Physiology*. 140, 1317-1330.
- CHAMOVITZ, D.A., SEGAL, D. (2001) JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome: A complex situation. *EMBO reports*. 2, 96–101.
- CHAMOVITZ, D.A., WEI, N., OSTERLUND, M.T., VON ARNIM, A.G., STAUB, J.M., MATSUI, M., AND DENG, X.-W. (1996). The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell*. 86, 115–121.
- CHELLAPPAN, P., VANITHARANI, R., FAUQUET, C.M. (2005) MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 10381–10386.
- COPE, G.A., DESHAIES, R.J. (2003) COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell*. 114, 663–671.
- COPE, G.A., SUH, G.S., ARAVIND, L., SCHWARZ, S.E., ZIPURSKY, S.L., KOONIN, E.V., DESHAIES, R.J. (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/CSN5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*. 298, 606–611.
- CUKIERMAN, E., HUBER, I., ROTMAN, M., CASSEL, D. (1995) The ARF1 GTPase activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science*. 270, 1999–2002.
- DENG, X.W., DUBIEL, W., WEI, N., HOFMANN, K., MUNDT, K., COLICELLI, J., KATO, J., NAUMANN, M., SEGAL, D., SEEGER, M., CARR, A., GLICKMAN, M., CHAMOVITZ, D.A. (2000) Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet*. 16, 202–203.
- ELMER, J.S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W., BISARO, D.M., ROGERS, S.G. (1998) Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Resort*. 16, 7043–7060.
- ENGLMEIER, L., FORNEROD, M., BISCHOFF, F.R., PETOSA, C., MATTAJ, I.W., KUTAY, U. (2001) RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBP Rep*. 2, 926–932.

- ETESSAMI, P., CALLIS, R., ELLWOOD, S., STANLEY, J. (1988) Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. *Nucleic Acids Research*. 16, 4811-4829.
- FAHRENKROG, B., STOFFLER, D., AEBI, U. (2001) Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol*. 259, 95–117.
- FAUQUET, C.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, M., ZHOU, X. (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol*. 153, 783–821.
- FLORENTINO, L.H., SANTOS, A.A., FONTENELLE, M.R., PINHEIRO, G.L., ZERBINI, F.M., BARACAT-PEREIRA, M.C., FONTES, E.P.B. (2006) A PERK-Like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *Journal of Virology*. 80, 6648-6656.
- FONTES, E.P.B., EAGLE, P.A., SIPE, P.S., LUCKOW, V.A., HANLEY-BOWDOIN, L. (1994) Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J Biol Chem*. 269, 8459-8465.
- FONTES, E.P.B., SANTOS, A.A., LUZ, D.F., WACLAWOVSKY, A.J., CHORY, J. (2004) The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & Development*. 18, 2545-2556.
- FREY, S., GÖRLICH, D. (2009) FG/FxFG as well as GLFG repeats form a selective permeability barrier with self-healing properties. *EMBO J*. 28, 2554–2567.
- FRITZ, C.C., ZAPP, M.L., GREEN, M.R. (1995) A human nucleoporin like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature*. 376, 530–533.
- GONTAN, C., GÜTTLER, T., ENGELEN, E., DEMMERS, J., FORNEROD, M., GROSVELD, F.G., TIBBOEL, D., GÖRLICH, D., POOT, R.A., ROTTIER, R.J. (2009) Exportin 4 mediates a novel nuclear import pathway for Sox family transcription factors. *J. Cell Biol*. 185, 27–34.
- GÖRLICH, D., DABROWSKI, M., BISCHOFF, F.R., KUTAY, U., BORK, P., HARTMANN, E., PREHN, S., IZAURRALDE, E. (1997) A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol*. 138, 65–80.
- GÖRLICH, D., HENKLEIN, P., LASKEY, R.A., HARTMANN, E. (1996a) A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus. *EMBO J*. 15, 1810–1817.
- GÖRLICH, D., KOSTKA, S., KRAFT, R., DINGWALL, C., LASKEY, R.A., HARTMANN, E., PREHN, S. (1995a) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol*. 5, 383–392.
- GÖRLICH, D., KUTAY, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15, 607–660.

- GÖRLICH, D., PREHN, S., LASKEY, R.A., HARTMANN, E. (1994) Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*. 79, 767–778.
- GÖRLICH, D., VOGEL, F., MILLS, A.D., HARTMANN, E., LASKEY, R.A. (1995b) Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*. 377, 246–248.
- GUSMAROLI, G., FENG, S., DENG, X.W. (2004). Arabidopsis CSN5A and CSN5B subunits are present in distinct COP9 signalosome complexes, and mutations in their JAMM domains exhibit differential dominant negative effects on development. *Plant Cell*. 16, 2984–3001.
- GUSMAROLI, G., FIGUEROA, P., SERINO, G., DENG, X.W. (2007) Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with Arabidopsis Cullin3-based E3 ligases. *Plant Cell*. 19, 564–81.
- GUTIERREZ, C. (2002) Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiol Mol Plant Pathol*. 60, 219–230.
- HAASEN, D., KÖHLER, C., NEUHAUS, G., MERKLE, T. (1999) Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in Arabidopsis thaliana. *Plant J*. 20, 695–705.
- HAASEN, D., MERKLE, T. (2002) Characterization of an Arabidopsis homologue of the nuclear export receptor CAS by its interaction with Importin alpha. *Plant Biol*. 4, 432–439.
- HAIZEL, T., MERKLE, T., PAY, A., FEJES, E., NAGY, F. (1997) Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in *Arabidopsis*. *Plant J*. 11, 93–103.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S., ROBERTSON, D. (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Plant Sci*. 35(2), 105–140.
- HEHNLE, S., WEGE, C., JESKE, H. (2004) Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *J. Virol*. 78, 7698–7706.
- HOFMANN, K., BUCHER, P. (1995) The rsp5-domain is shared by proteins of diverse functions. *FEBS Lett*. 358 (2), 153–157.
- HOFMANN, K., BUCHER, P. (1998). The PCI domain: A common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem. Sci*. 23, 204–205.
- HUTTEN S., FLOTHO, A., MELCHIOR, F., KEHLENBACH, R.H. (2008) The Nup358–RanGAP complex is required for efficient importin alpha/beta-dependent nuclear import. *Mol Biol Cell*. 19, 2300–2310.
- ILSLEY, J.L., SUDOL, M., WINDER, S.J. (2002) The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cell Signal*. 14, 183–189.

- INGHAM, D.J., PASCAL, E., LAZAROWITZ, S.G. (1995) Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology*. 207, 191-204.
- INGHAM, R.J., GISH, G., PAWSON, T. (2004) The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23, 1972–1984.
- IZAURRALDE, E., KUTAY, U., VON KOBBE, C., MATTAJ, I.W., GÖRLICH, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* 16, 6535–6547.
- JEONG, S.Y., ROSE, A., JOSEPH, J., DASSO, M., MEIER, I. (2005) Plant-specific mitotic targeting of RanGAP requires a functional WPP domain. *Plant J.* 42:270–282.
- KAHN, R.A., BRUFORD, E., INOUE, H., LOGSDON, J.M., NIE, Z., PREMONT, R.T., RANDAZZO, P.A., SATAKE, M., THEIBERT, A., ZAPP, M.L., CASSEL, D. (2008) Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. *The Journal of Cell Biology*. 182, 1039-1044.
- KALAB, P., PRALLE, A., ISACOFF, E.Y., HEALD, R., WEIS, K. (2006) Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature*. 440, 697–701.
- KIM, S.H., ROUX, S.J. (2003) An Arabidopsis Ran-binding protein, AtRanBP1c, is a co-activator of Ran GTPase-activating protein and requires the C-terminus for its cytoplasmic localization. *Planta*. 216, 1047–1052.
- KOIZUMI, K., NARAMOTO, S., SAWA, S., YAHARA, N., UEDA, T., NAKANO, A., SUGIYAMA, M., FUKUDA, H. (2005) VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. *Development*. 132, 1699–1711.
- KOMURO, A., SAEKI, M., KATO, S. (1999) Npw38, a novel nuclear protein possessing a WW domain capable of activating basal transcription. *Nucleic Acids Research*. 27,1957–1965.
- KRENZ, B., WINDEISEN, V., WEGE, C., JESKE, H., KLEINOW, T. (2010) A plastid-targeted heat shock cognate 70 kDa protein interacts with the *Abutilon* mosaic virus movement protein. *Virology*. 401, 6-17.
- KURISAKI, A., KURISAKI, K., KOWANETZ, M., SUGINO, H., YONEDA, Y., HELDIN, C.H., MOUSTAKAS, A. (2006) The mechanism of nuclear export of Smad3 involves exportin 4 and Ran. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1318–1332.
- KUTAY, U., BISCHOFF, F.R., KOSTKA, S., KRAFT, R., GÖRLICH, D. (1997) Export of importin- α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*. 90, 1061–1071.
- KWOK, S.F., SOLANO, R., TSUGE, T., CHAMOVITZ, D.A., ECKER, J.R., MATSUI, M., DENG, X.W. (1998) *Arabidopsis* homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations. *Plant Cell*. 10, 1779–1790.

- LANOIX, J., OUWENDIJK, J., STARK, A., SZAFER, E., CASSEL, D., DEJGAARD, K., WEISS, M., NILSSON, T. (2001) Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *J. Cell Biol.* 155, 1199–1212.
- LAZAROWITZ, S.G. (1992) Geminiviruses: genomes structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Science.* 11, 327-349.
- LAZAROWITZ, S.G., BEACHY, R.N. (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell.* 11, 535–548.
- LEE, J. Y. (2008) Phosphorylation of movement proteins by the plasmodesmal-associated protein kinase. *Methods Mol. Biol.* 451, 625–639.
- LEWIS, J.D., LAZAROWITZ, S.G. (2010) *Arabidopsis* synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *PNAS.* 107(6), 2491-2496.
- LILJEGREN, S. J., LESLIE, M. E., DARNIELLE, L., LEWIS, M. W., TAYLOR, S. M., LUO, R., GELDNER, N., CHORY, J., RANDAZZO, P. A., YANOFSKY, M. F., ECKER, J. R. (2009) Regulation of membrane trafficking and organ separation by the NEVERSHED ARF-GAP protein. *Development.* 136, 1909-1918.
- LINDSAY, M.E., HOLASKA, J.M., WELCH, K., PASCHAL, B.M., MACARA, I.G. (2001) Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J Cell Biol* 153, 1391–1402.
- LINDSAY, M.E., PLAFKER, K., SMITH, A.E., CLURMAN, B.E., MACARA, I.G. (2002) Npap60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates Importin alpha: beta-mediated nuclear protein import. *Cell.* 110, 349–360.
- LIPOWSKY, G., BISCHOFF, F.R., SCHWARZMAIER, P., KRAFT, R., KOSTKA, S., HARTMANN, E., KUTAY, U., GÖRLICH, D. (2000) Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J.* 19, 4362–4371.
- LUCAS, W.J. (2006) Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology.* 344, 169-184.
- LYAPINA, S., COPE, G., SHEVCHENKO, A., SERINO, G., TSUGE, T., ZHOU, C., WOLF, D.A., WEI, N., SHEVCHENKO, A., DESHAIES, R.J. (2001) Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science,* 292, 1382–1385.
- MAKAROVA, O.V., MAKAROV, E.M., URLAUB, H., WILL, C.L., GENTZEL, M., WILM, M., LÜHRMANN, R. (2004) A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *The EMBO Journal.* 23, 2381–2391.
- MARIANO, A.C., ANDRADE, M.O., SANTOS, A.A., CAROLINO, S.M.B., OLIVEIRA, M.L., BARACAT-PEREIRA, M.C., BROMMONSHENKEL, S.H., FONTES, E.P.B. (2004) Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology.* 318, 24-31.

- MATHESON, L. A., HANTON, S. L., ROSSI, M., LATIJNHOUWERS, M., STEFANO, G., RENNA, L., BRANDIZZI, F. (2007) Multiple roles of ADP-ribosylation factor 1 in plant cells include spatially regulated recruitment of coatmer and elements of the Golgi matrix. *Plant Physiol.* 143, 1615–1627.
- MATHESON, L. A., SURI, S. S., HANTON, S. L., CHATRE, L., BRANDIZZI, F. (2008) Correct targeting of plant ARF GTPases relies on distinct protein domains. *Traffic*, 9, 103–120.
- MATSUURA, Y., STEWART, M. (2005) Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J.* 24, 3681–3689.
- MATUNIS, M.J., COUTAVAS, E., BLOBEL, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 135, 1457–1470.
- MCGARRY, R.C., BARRON, Y.D., CARVALHO, M.F., HILL, J.E., GOLD, D., CHEUNG, E., KRAUS, W.L., LAZAROWITZ, S.G. (2003) A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell.* 15, 1605–1618.
- MEIER, I. (2007) Composition of the plant nuclear envelope: theme and variations. *J. Exp. Bot.* 58, 27–34.
- MERKLE, T. (2001) Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta.* 213, 499–517.
- MERKLE, T. (2004) Nucleo-cytoplasmic partitioning of proteins in plants: implications for the regulation of environmental and developmental signaling. *Curr Genet.* 44, 231–260.
- MERKLE, T. (2011) Nucleo-cytoplasmic transport of proteins and RNA in plants. *Plant Cell Rep.* 30, 153–176.
- MERKLE, T., HAIZEL, T., MATSUMOTO, T., HARTER, K., DALLMANN, G., NAGY, F. (1994) Phenotype of the fission yeast cell cycle regulatory mutant *pim1–46* is suppressed by a tobacco cDNA encoding a small, Ran-like GTP-binding protein. *Plant J.* 6, 555–565.
- MIN, M. K., KIM, S. J., MIAO, Y., SHIN, J., JIANG, L., HWANG, I. (2007) Overexpression of Arabidopsis AGD7 Causes Relocation of Golgi-Localized Proteins to the Endoplasmic Reticulum and Inhibits Protein Trafficking in Plant Cells. *Plant Physiology.* 143, 1601–1614.
- MINGOT, J.M., KOSTKA, S., KRAFT, R., HARTMANN, E., GÖRLICH, D. (2001) Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* 20, 3685–3694.
- MOORE, M.S., BLOBEL, G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature.* 365, 661–663.

- MUGDIL, Y., SHIU, S.-H., STONE, S.L., SALT, J.N., GORING, D.R. (2004) A large complement of the predicted Arabidopsis ARM repeat proteins are members of the U-box E3 ubiquitin ligase family. *Plant Physiol.* 134, 59–66.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- NACHURY, M.V., WEIS, K. (1999) The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 9622–9627.
- NELSON, R.S., CITOVSKY, V. (2005) Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways. *Plant Physiology.* 138, 1809–1814.
- NEMERGUT, M.E., LINDSAY, M.E., BROWNAWELL, A.M., MACARA, I.G. (2002) Ran-binding protein 3 links Crm1 to the Ran guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem.* 277, 17385–17388.
- NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. (1994) Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. *Cell.* 76, 925–932.
- OPARKA, K.J. (2004) Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Sci.* 9, 33–41.
- PAPROTKA, T., METZLER, V., JESKE, H. (2010) The first DNA 1-like α satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology.* 404, 148–157
- PASCAL, E., GOODLOVE, P.E., WU, L.C., LAZAROWITZ, S.G. (1993) Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *The Plant Cell.* 5, 795–807.
- PASCAL, E., SANDERFOOT, A.A., WARD, B.M., MEDVILLE, R., TURGEON, R., LAZAROWITZ, S.G. (1994) The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *The Plant Cell.* 6, 995–1006.
- PAY, A., RESCH, K., FROHNMEYER, H., FEJES, E., NAGY, F., NICK, P. (2002) Plant RanGAPs are localized at the nuclear envelope in interphase and associated with microtubules in mitotic cells. *Plant J.* 30, 699–709.
- PEDRAZZINI, E., GIOVINAZZO, G., BOLLINI, R., CERIOTTI, A., VITALE, A. (1994) Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cells. *Plant J.* 5, 103–110.
- PEMBERTON, L.F., PASCHAL, B.M. (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic.* 6, 187–198.
- PIMPL, P., HANTON, S. L., TAYLOR, J. P., PINTO-DASILVA, L. L., DENECKE, J. (2003) The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell,* 15, 1242–1256.
- PINHEIRO, G.L., MARQUES, C.S., COSTA, M.D.L, REIS, P.A.B., ALVES, M.S., CARVALHO, C.M., FIETTO, L.G., FONTES, E.P.B. (2009) Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and

- expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene*. 444, 10-23.
- POON, P. P., CASSEL, D., SPANG, A., ROTMAN, M., PICK, E., SINGER, R. A., JOHNSTON, G. C. (1999) Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *EMBO J.* 18, 555–564.
- RANDAZZO, P.A., ANDRADE, J., MIURA, K., BROWN, M.T., LONG, Y.Q., STAUFFER, S., ROLLER, P., COOPER, J.A. (2000) The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97, 4011–4016.
- RANDAZZO, P. A., KAHN, R. A. (1994) GTP hydrolysis by ADP-ribosylation factor is dependent on both an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein and acid phospholipids. *J. Biol. Chem.* 269, 10758–10763.
- RIBBECK, K., GÖRLICH, D. (2002) The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.* 21, 2664–2671.
- RIBBECK, K., LIPOWSKY, G., KENT, H.M., STEWART, M., GÖRLICH, D. (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* 17, 6587–6598.
- RIBEIRO, S.G., AMBROZEVICIUS, L.P., AVILA, A.C., BEZERRA, I.C., CALEGARIO, R.F., FERNANDES, J.J., LIMA, M.F., DE MELLO, R.N., ROCHA, H., ZERBINI, F.M. (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch. Virol.* 148, 281–295.
- RICHARDS, S.A., LLOUNSBURY, K.M., CAREY, K.L., MACARA, I.G. (1996) A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of Ran binding protein RanBP1. *J Cell Biol.* 134, 1157–1168.
- ROJAS, M.R., HAGEN, C., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 361–394.
- ROJAS, M.R., JIANG, H., SALATI, R., XOCONOSTLE-CAZARES, B., SUDARSHANA, M.R., LUCAS, W.J. AND GILBERTSON, R.L. (2001) Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*. 291, 110–125.
- ROJAS, M.R., NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. (1998). Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size specific manner. *Cell*. 95, 105–113.
- ROMAY, G., CHIRINOS, D., GERAUD-POUEY, F., DESBIEZ, C. (2010) Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Arch Virol.* 155:1843–1847.
- ROSE, A., MEIER, I. (2001) A domain unique to plant RanGAP is responsible for its targeting to the plant nuclear rim. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 15377–15382.

- SABE, H., ONODERA, Y., MAZAKI, Y., HASHIMOTO, S. (2006) ArfGAP family proteins in cell adhesion, migration and tumor invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 558–564.
- SAITOH, H., PU, R., CAVENAGH, M., DASSO, M. (1997) RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 3736–3741.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning - A Laboratory Manual*, Ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- SÁNCHEZ-VELAR, N., UDOFIA, E.B., YU, Z., ZAPP, M.L. (2004) hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes Dev.* 18, 23–34.
- SANDERFOOT, A.A., LAZAROWITZ, S.G. (1995) Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *The Plant Cell.* 7, 1185–1194.
- SANDERFOOT, A.A., LAZAROWITZ, S.G. (1996) Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol.* 6, 353–358.
- SANTOS, A.A., CARVALHO, C.M., FLORENTINO, L.H., RAMOS, H.J.O., FONTES, E.P.B. (2009) Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. *PLoS ONE.* 4(6), e5781.
- SCHWECHHEIMER, C. (2004) The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 45–54.
- SETTLAGE, S.B., MILLER, A.B., GRUISSEM, W., HANLEY-BOWDOIN, L. (2001) Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology.* 279, 570–576.
- SIEBURTH, L. E., MUDAY, G. K., KING, E. J., BENTON, G., KIM, S., METCALF, K. E., MEYERS, L., SEAMEN, E., VAN NORMAN, J. M. (2006) *SCARFACE* Encodes an ARF-GAP That Is Required for Normal Auxin Efflux and Vein Patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 18, 1396–1411.
- SMITH, A., BROWNAWELL, A., MACARA, I.G. (1998) Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol.* 8, 1403–1406.
- SONG, X., YANG, C., LIU, J., YANG, W. (2006) RPA, a Class II ARFGAP Protein, Activates ARF1 and U5 and Plays a Role in Root Hair Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 141, 966–976.
- SPANG, A., SHIBA, Y., RANDAZZO, P. A. (2010) Arf GAPs: gatekeepers of vesicle generation. *FEBS Lett.* 584, 2646–2651.
- STEFANO, G., RENNA, L., CHATRE, L., HANTON, S. L., MOREAU, P., HAWES, C., BRANDIZZI, F. (2006) In tobacco leaf epidermal cells, the

- integrity of protein export from the endoplasmic reticulum and of ER export sites depends on active COPI machinery. *Plant J.* 46, 95–110.
- STEFANO, G., RENNA, L., ROSSI, M., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S., BRANDIZZI, F., BALUSKA, F., MANCUSO, S. (2010) AGD5 is a GTPase-activating protein at the trans-Golgi network. *The Plant Journal.* 64, 790–799.
- STUTTMANN, J., PARKER, J.E., NOËL, L.D. (2009) Novel aspects of COP9 signalosome functions revealed through analysis of hypomorphic *csn* mutants. *Plant Signaling & Behavior.* 4, 896–898.
- SUDOL, M., CHEN, H.I., BOUGERET, C., EINBOND, A., BORK, P. (1995) Characterization of a novel protein-binding module - the WW domain. *FEBS Lett.* 369 (1) 67–71.
- SUDOL, M., SLIWA, K., RUSSO, T. (2001) Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.* 490, 190–195.
- TAKEUCHI, M., UEDA, T., YAHARA, N., NAKANO, A. (2002) Arf1 GTPase plays roles in the protein traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in tobacco and Arabidopsis cultured cells. *Plant J.* 31, 499–515.
- TANABE, K., TORII, T., NATSUME, W., BRAESCH-ANDERSEN, S., WATANABE, T., SATAKE, M. (2005) A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Mol. Biol. Cell,* 16, 1617–1628.
- TOMODA, K., KUBOTA, Y., ARATA, Y., MORI, S., MAEDA, M., TANAKA, T., YOSHIDA, M., YONEDA-KATO, N., KATO, J. (2002) The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J. Biol. Chem.* 277, 2302–10.
- TRINKS, D., RAJESWARAN, R., SHIVAPRASAD, P.V., AKBERGENOV, R., OAKELEY, E.J., VELUTHAMBI, K., HOHN, T., POOGGIN, M.M. (2005) Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* 79, 2517–2527.
- TURNER, C.E., WEST, K.A., BROWN, M.C. (2001) Paxillin-ARF GAP signaling and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Bio.* 13, 593–599.
- VANITHARANI, R., CHELLAPPAN, P., PITA, J.S., FAUQUET, C.M. (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol.* 78, 9487–9498.
- VERNOUD, V., HORTON, A.C., YANG, Z., NIELSEN, E. (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 131, 1191–1208.
- WAIGMANN, E., CHEN, M. H., BACHMAIER, R., GHOSHROY, S., CITOVSKY, V. (2000) Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J.* 19, 4875–4884.

- WANG, B., BRENDDEL, V. (2004) The ASRG database: identification and survey of *Arabidopsis thaliana* genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biology*. 5, 12.
- WEI, N., CHAMOVITZ, D.A., DENG, X.W. (1994). *Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*. 78, 117–124.
- WEI, N., TSUGE, T., SERINO, G., DOHMAE, N., TAKIO, K., MATSUI, M., DENG, X.W. (1998). The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr. Biol*. 8, 919–922.
- XU, X.M., MEULIA, T., MEIER, I. (2007) Anchorage of plant RanGAP to the nuclear envelope involves novel nuclear-pore-associated proteins. *Curr Biol*. 17, 1157–1163.
- YOO, C., WEN, J., MOTES, C.M., SPARKS, J.A., BLANCAFLOR, E.B. (2008) A Class I ADP-Ribosylation Factor GTPase-Activating Protein Is Critical for Maintaining Directional Root Hair Growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 147, 1659-1674.
- YOSHIDA, K., BLOBEL, G. (2001) The Karyopherin Kap142p/Msn5p Mediates Nuclear Import and Nuclear Export of Different Cargo Proteins. *J. Cell Biol*. 152, 729–740.
- ZHANG, Y., LINDBLOM, T., CHANG, A., SUDOL, M., SLUDER, A.E., GOLEMIS, E.A. (2000) Evidence that dim1 associates with proteins involved in pre-mRNA splicing, and delineation of residues essential for dim1 interactions with hnRNP F and Npw38/PQBP-1. *Gene* 257, 33-43.
- ZHANG, S.C., WEGE, C., JESKE, H. (2001) Movement proteins (BC1 and BV1) of *Abutilon* mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. *Virology*. 290, 249–260.
- ZHAO, Q., BRKLJACIC, J., MEIER, I. (2008) Two distinct interacting classes of nuclear envelope-associated coiled-coil proteins are required for the tissue-specific nuclear envelope targeting of *Arabidopsis* RanGAP. *Plant Cell*. 20, 1639–1651.
- ZHAO, Q., LEUNG, S., CORBETT, A. H., MEIER, I. (2006) Identification and characterization of the *Arabidopsis* orthologs of nuclear transport factor 2, the nuclear import factor of Ran1. *Plant Physiol*. 140, 869–878.
- ZHOU, Y.C., GARRIDO-RAMIREZ, E.R., SUDARSHANA, M.R., YENDLURI, S., GILBERTSON, R.L. (2007) The N-terminus of the begomovirus nuclear shuttle protein (BV1) determines virulence or avirulence in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 20, 1523–1534.
- ZHUANG, X., JIANG, J., LI, L., MA, Q., XU, Y., XUE, Y., XU, Z., CHONG, K. (2006) Over-expression of OsAGAP, an ARF-GAP, interferes with auxin influx, vesicle trafficking and root development. *The Plant Journal*. 48, 581–591.

ZIEMIENOWICZ, A., HAASEN, D., STAIGER, D., MERKLE, T. (2003)
Arabidopsis Transportin is the nuclear import receptor for the circadian clock-
regulated RNA-binding protein AtGRP7. *Plant Mol Biol.* 53, 201–212.