

MARIANA RODRIGUES FONTENELLE

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA PROVÁVEL NUCLEOPORINA
QUE INTERAGE COM A PROTEÍNA NSP DE GEMINIVÍRUS.**

Tese 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
2006

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

T

F683c

Fontenelle, Mariana Rodrigues, 1981-
Carcterização funcional de um provável nucleoporina 2006
que interage com a proteína NSP de geminivírus /
Mariana Rodrigues Fontenelle. – Viçosa : UFV, 2006.
ix, 68f. : il. ; 29cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 56-68.

1. Ácido desoxirribonucléico - Transporte fisiológico.
2. Proteínas - Análise. 3. Vírus de plantas. 4. Engenharia
genética vegetal. 5. Plantas transgênicas. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.86

MARIANA RODRIGUES FONTENELLE

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA PROVÁVEL NUCLEOPORINA
QUE INTERAGE COM A PROTEÍNA NSP DE GEMINIVÍRUS.**

Tese 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: 22 de fevereiro de 2006.

Maria Cristina Baracat-Pereira
(Conselheira)

Marcelo Ehlers Loureiro
(Conselheiro)

Juliana Lopes Rangel Fietto

Francisco Murilo Zerbini Júnior

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Martha que, como toda mãe, sempre se preocupou comigo, me ajudou nos momentos ruins e foi presente nos bons momentos.

Ao meu pai Hylton que ficaria muito feliz em compartilhar comigo esse momento, no entanto sempre esteve presente em espírito.

Aos meus irmãos, Fernando, Cristina e Júlio por me incentivarem com suas palavras de carinho. Ao Júlio, um agradecimento especial por realizar as análises estatísticas desse trabalho, por me aconselhar profissionalmente e por ser um grande exemplo, o qual quis seguir.

Aos meus afilhados Hylton e Fernanda por me propiciarem tantos momentos de alegria.

Aos meus familiares se alegrarem com as minhas vitórias.

Ao meu grande amor Carlos Eduardo por ser meu companheiro de todas as horas, me fazer tão feliz, me passar segurança e confiança.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Bioquímica Agrícola pela oportunidade de realizar esse curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pelos ensinamentos, ajuda e orientação durante todo tempo que trabalhei com ela.

Aos meus amigos por estarem por perto, mesmo às vezes estando longe.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Proteômica por auxiliarem na realização dos experimentos e pelo companheirismo.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Características gerais dos geminivírus.....	4
2.2. Taxonomia.....	5
2.3. Gênero <i>Begomovirus</i>	6
2.4. Caracterização gênica de begomovírus.....	7
2.5. Interação da proteína NSP com proteínas do hospedeiro.....	9
2.6. Transporte nuclear de moléculas.....	10
2.7. Características das nucleoporinas.....	11
2.8. Requerimentos para o transporte nuclear.....	12
2.9. Seqüência sinal e receptores de transporte nuclear.....	12
2.10. Processo de translocação através do NPC e regulação.....	14
2.11. Transporte intracelular viral.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Material vegetal.....	18
3.2. Identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com a proteína NSP de geminivírus.....	18
3.3. Clonagem do gene <i>NAP</i> em vetores de expressão em bactérias e em plantas....	19
3.4. Verificação da interação <i>NAP-NSP in vitro</i>	20

3.4.1. Obtenção dos clones pHIS-NAP, pHIS-PRNAP e pGST-PRNAP e pGST-NSP.....	20
3.4.2. Preparo de células competentes e transformação de <i>Escherichia coli</i> BL21:DE3 e BL21:DE3 (pLYSs)	21
3.4.3. Reação de Polimerase em Cadeia PCR (“Polimerase Chain Reaction”).	21
3.4.4. Expressão heteróloga em <i>Escherichia. coli</i>	23
3.4.5. Obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis.....	23
3.4.6. Purificação das proteínas recombinantes.....	24
3.4.7. Ensaio de interação de NAP-NSP <i>in vitro</i>	24
3.5. Obtenção de plantas transgênicas.....	25
3.5.1. Obtenção de construções de DNA em vetores binários de transformação de plantas.....	25
3.5.2. Transformação de <i>Agrobacterium</i> e <i>Arabidopsis</i>	26
3.6. Diagnóstico molecular das plantas transgênicas.....	27
3.6.1. Extração do DNA de plantas transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> (miniprep) para PCR.....	27
3.6.2. Extração de RNA total de plantas transgênicas.....	27
3.6.3. Análise da expressão do transgene por RT-PCR.....	28
3.7. Obtenção de plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes para o gene <i>NAP</i>	29
3.7.1. Obtenção de mutantes <i>nap</i> em homocigose.....	29
3.7.2. Análise da expressão de plantas mutantes <i>nap</i> por RT-PCR.....	29
3.8. Ensaio de infectividade de <i>Arabidopsis thaliana</i> com CaLCuV.....	30
3.8.1. Infecção de <i>Arabidopsis thaliana</i> com CaLCuV por biobalística.....	30
3.8.2. Diagnóstico molecular da infecção viral.....	32
3.8.3- Análises estatísticas.....	32
3.9. Análise do padrão de expressão do gene <i>NAP</i> nos diferentes órgãos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Identificação de proteínas de <i>Arabidopsis</i> que interagem com a proteína NSP do CaLCuV.....	34
4.2. Caracterização estrutural da proteína NAP.....	36
4.3. Interação <i>in vitro</i> de HIS-NAP com GST-NSP.....	38
4.4. Padrão de expressão do gene <i>NAP</i> nos diferentes órgãos da planta.....	41

4.5. Obtenção de plantas <i>nap</i> em homozigose e plantas superexpressando <i>NAP</i>	42
4.6. Ensaio de infectividade de CaLCuV em <i>Arabidopsis thaliana</i> transgênicas....	44
5. DISCUSSÕES.....	49
6. APÊNDICES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

RESUMO

FONTENELLE, Mariana Rodrigues, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Caracterização funcional de uma provável nucleoporina que interage com a proteína NSP de geminivírus.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Maria Cristina Baracat-Pereira e Marcelo Ehlers Loureiro.

A família Geminiviridae é uma diversa família de vírus de planta. O *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) do gênero *Begomovirus* possui dois componentes genômicos de DNA fita simples, DNA-A e DNA-B. O DNA-A é requerido para a replicação, ativação transcricional e encapsidação do vírus. O DNA-B é requerido para movimento, sendo que a proteína NSP, codificada pelo mesmo, transporta o DNA viral do núcleo para o citoplasma. Já foi demonstrado que NSP interage com proteínas do hospedeiro, como uma proteína receptora Ser/Tre quinase, denominada NIK (“NSP-interacting kinase”). Nesse estudo foi realizado uma triagem de proteínas que interagem com NSP de CaLCuV, através de um sistema duplo híbrido em leveduras, utilizando uma biblioteca de cDNA de *Arabidopsis*, e foi isolada uma nucleoporina-like, referida como NAP (“NSP-Associated Protein”). Além disso, foi comprovado que a interação NAP-NSP também ocorre *in vitro*. A proteína completa, codificada pelo gene At4g13350 possui dois homólogos em *Arabidopsis* com funções ainda desconhecidas, o At1g08680 e At4g32630. Foi identificado um homólogo em humanos, a proteína hRip, que interage com a proteína Rev de HIV. Para se entender a importância da interação de NAP-NSP, foi identificado um mutante para o gene NAP e foram selecionadas linhagens mutantes homozigotas de *Arabidopsis* por PCR. A inativação do gene *NAP* foi confirmada por

um RT-PCR, comprovando ser um alelo nulo. Plantas de *Arabidopsis* selvagens da linhagem Col-0 e mutantes *nap* foram inoculadas com CaLCuV DNA-A e DNA-B. Ambas as linhagens Col-0 e *nap* desenvolveram os sintomas típicos de CaLCuV com intensidades semelhantes. A inativação do gene *NAP* parece não influenciar na infecção do vírus CaLCuV em *Arabidopsis*, talvez pela presença de homólogos que possam estar desempenhando o papel de *NAP* ou talvez pela interação *NAP*-*NSP* não ser essencial na infecção viral. Estudos em plantas superexpressando o gene *NAP* foram realizados, constatando que essas plantas apresentaram um discreto aumento na susceptibilidade ao vírus, mostrando sintomas mais severos e maior número de plantas infectadas, comparadas às plantas selvagens.

ABSTRACT

FONTENELLE, Mariana Rodrigues, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2006. **Functional characterization of a putative nucleoporin-like protein interacting with the geminivirus protein NSP.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee Members: Maria Cristina Baracat-Pereira and Marcelo Ehlers Loureiro.

The family Geminiviridae is a diverse family of plant virus. The *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) of *Begomovirus* genus possess two genomic components of single-stranded DNA, DNA-A and DNA-B. The DNA-A is required for replication, transactivation and encapsidation of the viral genome. The DNA-B is required for the virus movement, in which NSP is coded. NSP transports the viral DNA from the nucleus to the cytoplasm and has been demonstrated to interact with a plasma membrane receptor-like kinase, designated NIK (NSP-interacting kinase). In this study, we performed a two-hybrid screening for CaLCuV NSP-interacting proteins, using a cDNA library from *Arabidopsis* and we isolated a nucleoporin-like protein, designated NAP (NSP-Associated Protein). Further more, it was proved *in vitro* assays that these proteins interact with each other. The full-length protein, which is encoded by the At4g13350 gene, possess two NAP homologues of unknown functions, At1g08680 and At4g32630 (33% and 31% sequence identity, respectively), in the *Arabidopsis* genome. Other homologue is human Rip protein that interacts with the HIV Rev protein. To assess directly the significance of NAP-NSP interaction, we identified a mutant in the *NAP* gene and selected for homozygous *Arabidopsis* mutant line by PCR. The inactivation of this gene was confirmed by RT-PCR, confirming it is null allele. Wild

type Col-0 plants and *nap* mutant lines were inoculated with CaLCuV DNA-A and DNA-B. Both Col-0 and *nap* lines developed typical symptoms of CaLCuV infection at similar intensity. Inactivation of the *NAP* gene does not seem to affect CaLCuV infection in *Arabidopsis*. These results indicate that either the NAP-NSP interaction is not required for NSP function or the NAP homologs are functionally analogs that are capable to replace the NAP role in the null allele mutant. Over expressing *NAP* plants were also inoculated with the virus CaLCuV, and presented a discrete increase in plant susceptibility, showing more severe symptoms and higher percentage of infected plants compared with wild type.

1. INTRODUÇÃO

Os geminivírus são vírus que infectam plantas, sendo um dos maiores e mais importantes grupos de vírus. Representantes da família *Geminiviridae* apresentam capsídeos icosaédricos geminados constituídos de DNA circular fita simples, que se replicam no núcleo de células infectadas por meio do mecanismo do círculo rolante, via um DNA fita dupla, também circular (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). O gênero *Begomovirus* possui o maior número de espécies e sua organização genômica pode ser mono ou bissegmentada. Os componentes genômicos dos begomovírus bissegmentados são denominados DNA-A, responsável pela replicação e transcrição do DNA viral e é constituído dos genes *AC1*, *AC2*, *AC3* e *AVI*, e DNA-B, responsável pelo movimento do vírus na planta (Lazarowitz, 1992), constituído dos genes *BC1* (MP) e *BV1* (NSP).

Os begomovírus são transmitidos para a planta através de um inseto vetor denominado mosca-branca (*Bemisia tabaci*). A população desse inseto tem aumentado, se tornando uma ameaça para culturas de importância econômica no mundo inteiro. No Brasil, os tomateiros têm sido muito afetados, em função do aparecimento de um biótipo de *Bemisia* com alta capacidade de colonização em tomateiros (Ribeiro *et al.*, 1998). Os geminivírus em tomateiros têm apresentado uma grande diversidade, provavelmente originados de populações nativas de geminivírus de plantas silvestres, que se adaptaram à cultura de tomate introduzida no local após terem sido transmitidos pelo inseto vetor (Ribeiro *et al.*, 1998; Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*,

2003). Além disso, a diversidade e o surgimento de novos patógenos também são associados à ocorrência de eventos de recombinação entre as espécies, surgindo espécies mais patogênicas (Deng *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997; Fondong *et al.*, 2000; Galvão *et al.*, 2003). Ainda se conhece pouco sobre os mecanismos de infecção dos geminivírus e o controle de doenças é basicamente com o controle do inseto vetor, utilizando-se inseticidas. O uso de inseticidas, além de nocivo para o meio ambiente e para a saúde humana, é dispendioso. Por isso, há um grande interesse de pesquisadores em desenvolver plantas geneticamente modificadas e mais resistentes a diversos geminivírus. Baseado nas características moleculares dos geminivírus, algumas estratégias de controle já foram propostas, mas o máximo que se conseguiu foi a atenuação dos sintomas ou retardamento da infecção.

Os geminivírus, assim como todos os vírus, utilizam a maquinaria celular para replicação de seu DNA, para a transcrição dos genes virais e para o movimento sistêmico na planta durante o processo de infecção. Além disso, o vírus interage com a maquinaria de transporte intracelular, uma vez que o DNA do geminivírus tem que ser transportado para o núcleo, onde ocorre a replicação, e depois transportado novamente para o citoplasma (Lazarowitz & Beachy, 1999; Gafni *et al.*, 2002). O ciclo de infecção viral depende dessas interações para que haja uma compatibilidade básica entre hospedeiro e patógeno e uma otimização do processo de infecção viral via inativação de respostas de defesa da planta (Ach *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 2000; Settlage *et al.*, 2001; Kong & Hanley-Bowdoin, 2002; Luque *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2003; McGarry *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Bagewadi *et al.*, 2004; Carvalho & Lazarowitz, 2004; Fontes *et al.*, 2004; Mariano *et al.*, 2004; Selth *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Uma estratégia de controle dos geminivírus que tem sido investigada se refere à identificação de fatores do hospedeiro que interagem com o vírus auxiliando ou impedindo o estabelecimento da infecção viral. A caracterização molecular de proteínas do hospedeiro que interagem durante o ciclo da infecção, pode auxiliar na elucidação do mecanismo de infecção viral e na compreensão da interação planta-patógeno. A interação dos geminivírus com o hospedeiro em relação aos mecanismos de transporte na planta ainda é pouco conhecida (Rojas *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001a), pois as bases moleculares ainda não foram bem determinadas.

Com o objetivo de identificar proteínas de *Arabidopsis thaliana*, que interagem com a proteína NSP de geminivírus, responsável pelo movimento do vírus do núcleo para o citoplasma, foi realizado um ensaio de sistema de duplo híbrido, utilizando NSP

como isca. Foi identificada uma proteína de *Arabidopsis* designada NAP (“NSP-Associated Protein”), uma nucleoporina-like, que reconhece a proteína viral NSP e pode estar fortemente relacionada ao transporte do genoma viral do núcleo para o citoplasma. Foi identificado um homólogo em humanos que interage com a proteína Rev do vírus HIV, que facilita o transporte do vírus do núcleo para o citoplasma. Dada a importância que essa proteína do hospedeiro pode ter no processo de infecção, os objetivos desse trabalho foram caracterizar funcionalmente a interação de NSP de geminivírus com a proteína NAP do hospedeiro. Para isso propôs-se, inicialmente, confirmar a formação do complexo NAP-NSP *in vitro* e avaliar a importância da proteína NAP no movimento e na infecção do vírus na planta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características gerais dos geminivírus.

Os geminivírus constituem um grupo de vírus de plantas de grande importância econômica por infectar diversas culturas relevantes em todos os continentes. A família *Geminiviridae* é caracterizada por partículas icosaédricas geminadas incompletas (Rojas *et al.*, 2005), com tamanho de 18x30 nm, em que, cada qual envolve uma molécula de DNA circular fita simples com 2.500 a 3.000 nucleotídeos, encapsidado por uma única proteína estrutural (CP). De 10 a 100 monômeros de CP são arranjados em 22 capsômeros para gerar uma partícula geminada, conferindo-lhe a aparência de dois icosaedros incompletos (Figura 1) (Lazarowitz *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2001b; Bottcher *et al.*, 2004).

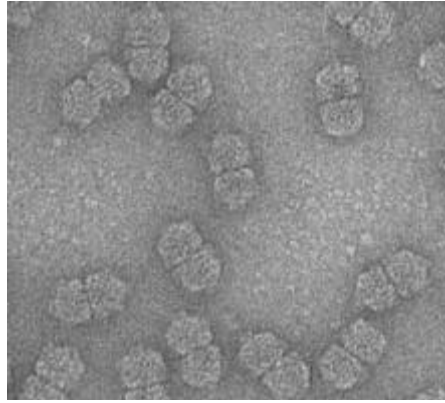


Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica das partículas icosaédricas de geminivírus (Zhang *et al.*, 2001b).

Os geminivírus se replicam no núcleo das células infectadas por círculo rolante formando um intermediário de fita dupla circular, que também serve como molde para a transcrição bidirecional (Gutierrez *et al.*, 2000). A transmissão do DNA circular fita simples do vírus se dá por insetos vetores específicos e é dependente do tipo de capa protéica, que interage com os diferentes receptores de cada inseto (Höhnle *et al.*, 2001).

2.2. Taxonomia.

A família *Geminiviridae* possui quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, que podem ser diferenciados baseado no tipo de inseto vetor do vírus, na gama de hospedeiros que ele infecta (monocotiledôneas ou dicotiledôneas), na organização genômica, podendo apresentar um ou dois componentes de DNA, e no relacionamento filogenético (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1995; Rybicki *et al.*, 2000; Van Regenmortel *et al.*, 2000).

O gênero *Mastrevirus*, como exemplo, os vírus *Chloris striate mosaic virus* (CSMV), *Maize streak virus* (MSV) e *Wheat dwarf virus* (WDV), compreende espécies de vírus de genoma monossegmentado que infectam principalmente monocotiledôneas e possuem como vetores diferentes espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) (Rybick *et al.*, 2000). O genoma de *Mastrevirus* codifica quatro proteínas: a proteína RepA, exclusiva do gênero; a proteína Rep, na fita complementar; a proteína de movimento (MP) e a proteína do capsídeo (CP), na fita viral.

Os vírus pertencentes ao gênero *Curtovirus*, como exemplo, o *Beet curly top virus* (BCTV), possui espécies com genoma monopartido e são transmitidos por cigarrinhas que infectam dicotiledôneas. A fita viral codifica as proteínas V2, MP e CP, e a fita complementar possui quatro ORFs (“open reading frames”) que codificam Rep, C2, Ren (“Replication enhancer”) e C4.

O gênero *Topocuvirus* possui uma única espécie como representante, o *Tomato pseudo curly top virus* (TPCTV), com genoma monopartido que infecta dicotiledôneas e é transmitido pelo inseto vetor *Micrutalis malleifera* (Membracidae), uma cigarrinha. A organização genômica é similar à do *Curtovirus* (Gutierrez, 2002).

O gênero *Begomovirus*, como por exemplo, o vírus *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *Bean golden mosaic virus* (BGMV), possui espécies que infectam dicotiledôneas e são transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae).

2.3. Gênero *Begomovirus*.

Dentre os gêneros de geminivírus, o *Begomovirus* possui o maior número de representantes e sua organização genômica pode ser mono ou bissegmentada. A maioria dos begomovírus encontrados no Brasil são bissegmentados (Faria *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003). Seus componentes genômicos são o DNA-A, que é responsável pela replicação e transcrição do DNA viral e encapsidação da progênie viral, e o DNA-B, que é o responsável pelo movimento do vírus célula-a-célula, do núcleo para o citoplasma e pelo movimento sistêmico do vírus na planta (Lazarowitz *et al.*, 1992). Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas.

Diversas espécies de geminivírus têm sido detectadas nos estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro. A nomenclatura dos vírus recém-descobertos é dada de acordo com o hospedeiro original e o tipo de sintomas causados. Um deles foi o *Tomato crinkle leaf yellow virus* (TCLYV), descoberto em Campos de Goytacases-RJ (Ribeiro *et al.*, 1998). Outro vírus, o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV), foi identificado na região de Betim-MG (Galvão *et al.*, 2003).

2.4. Caracterização gênica de begomovírus.

Os componentes A e B de begomovírus possuem o mesmo tamanho e não possuem homologia de seqüência, exceto por uma estrutura em forma de grampo e uma seqüência denominada região comum (CR), que contém a origem de replicação dos geminivírus (Fontes *et al.*, 1994 a, 1994 b, Figura 2). Uma exceção é o *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), que apresenta 80% de homologia entre as seqüências das regiões comum do DNA-A e DNA-B (Hill *et al.*, 1998). A região comum possui uma seqüência invariável de 9 nucleotídeos (TAATATT↓AC), que é clivada pela proteína viral de iniciação da replicação, Rep, também chamada de AC1 ou AL1 (Raghavan *et al.*, 2004).

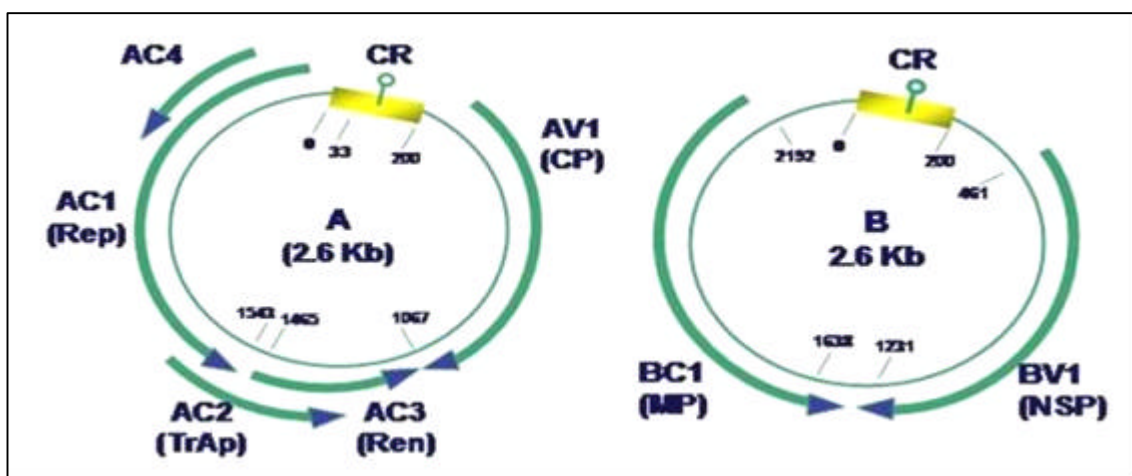


Figura 2. Componentes genômicos de *Begomovirus*. CR é a região comum entre o componente A e o componente B. No componente A, AC1 e AC3 são associadas à replicação, AC2 codifica uma proteína transativadora, AC4 é de função desconhecida e AV1 codifica a proteína do capsídeo. No componente B, BC1 ou MP codifica a proteína de movimento célula-célula e BV1 ou NSP codifica a proteína de transporte do núcleo para o citoplasma.

Na fita de sentido viral, o DNA-A contém o gene AV1 ou CP (“coat protein”), que codifica a proteína da capa, responsável pela formação de partículas virais. Na fita de sentido complementar, encontra-se o gene AC1 ou Rep (“Replication associated protein”). A proteína Rep se liga ao DNA-A e DNA-B de uma maneira seqüência-específica, sendo essencial para a replicação. (Elmer *et al.*, 1988; Fontes *et al.*, 1992; 1994a, 1994b). Também no sentido complementar estão os genes AC2 ou TrAP (“Trans activating protein”), AC3 ou REn (“Replication enhancer protein”) (Settlage *et al.*,

2001) e *AC4*. A proteína TrAP é necessária para a expressão dos genes *AVI* e *NSP* (Sunter & Bisaro, 1992). A proteína REn parece estar envolvida na replicação viral auxiliando na iniciação da replicação. Na replicação de *Tomato leaf curl virus* (TLCV) REn promove acúmulo de DNA viral fita simples quando interage com a proteína de tomate SINAC (Selth *et al.*, 2005).

No DNA-B, estão localizados os genes *BVI* ou *NSP* (“nuclear shuttle protein”) na fita viral e o gene *BCI* ou *MP* (“Movement protein”) na fita complementar (Palmer *et al.*, 1998). As proteínas codificadas pelo componente B estão envolvidas com o movimento do vírus durante a infecção. Em geminivírus, as proteínas NSP e MP são as únicas consideradas proteínas de movimento, que atuam de maneira cooperativa no transporte intra e intercelular do DNA viral (Lazarowitz & Beachy, 1999; Gafni & Epel, 2002). Entretanto, NSP e MP possuem funções distintas e independentes, e diferem quanto à sua compartimentalização e à afinidade de ligação a DNA fita simples (Pascal *et al.*, 1993; 1994). A proteína NSP se liga a DNA fita simples com alta afinidade, enquanto a proteína MP, parece ter baixa afinidade por ácidos nucleicos (Pascal *et al.*, 1994).

As propriedades bioquímicas e localização subcelular dessas proteínas sugerem que, enquanto NSP participa do movimento do genoma viral do núcleo para o citoplasma, MP age na membrana plasmática e parede celular como uma proteína de movimento clássica, promovendo a translocação do genoma viral para as células adjacentes através de túbulos derivados do retículo endoplasmático induzidos pela infecção viral (Sanderfoot & Lazarowitz, 1996; Gafni & Epel, 2002). No caso do vírus *Squash leaf curl virus* (SqLCV), o transporte celular do DNA viral do núcleo para o citoplasma, mediado por NSP, é facilitado por MP. A proteína MP ainda promove o movimento do DNA viral associado à NSP para células adjacentes (Hehnle *et al.*, 2004). Foi proposto que a proteína MP funciona como uma âncora na membrana plasmática, facilitando o transporte de complexos ao longo dessa membrana (Zhang *et al.*, 2002). Mutações que inativam estes genes bloqueiam a capacidade do vírus mutante de infectar as plantas, mas não alteram a eficiência de replicação do genoma viral (Lazarowitz, 1992).

2.5. Interação da proteína NSP com proteínas do hospedeiro.

De acordo com 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. Foi isolado, um receptor transmembrana serina/treonina quinase, designado LeNIK (“*Lycopersicum esculatum* NSP-Interacting Kinase”), capaz de interagir com NSP (Mariano *et al.*, 2004). Também foi comprovado que os homólogos de NIK em soja (GmNIK) e em *Arabidopsis thaliana* (AtNIK) interagem com NSP (Fontes *et al.*, 2004). Em *Arabidopsis*, NIK atua como receptor de sinalização. A interação de NSP com NIK1, NIK2 ou NIK3, através de seus domínios de quinase localizados no citosol, inibe a atividade de quinase dos receptores, sugerindo envolvimento na resposta de defesa antiviral (Fontes *et al.*, 2004). A proteína NIK possui domínios característicos de proteínas receptoras de membranas, envolvidas no desenvolvimento da planta ou em resistência a patógenos. Os três homólogos de *Arabidopsis thaliana* desses receptores quinases contêm 3-5 repetições ricas em leucina (LRR–“leucine-rich repeat”). A interação de NIK é específica, não interagindo com nenhuma outra proteína viral, nem com outras proteínas controles. Foi também demonstrado que a proteína NIK é autofosforilada, e que esta fosforilação antecede sua oligomerização. Porém experimentos adicionais descartaram a proteína viral NSP como seu substrato, pelo contrário, demonstraram que a proteína viral inibe a autofosforilação deste receptor (Fontes *et al.*, 2004).

Outra proteína caracterizada por interagir com NSP de geminivírus é uma acetiltransferase nuclear, pertencente a uma família de acetiltransferase de histonas nucleares, designada AtNSI (“Nuclear shuttle protein interactor”), altamente conservada entre as plantas (McGarry *et al.*, 2003). NSP também não é substrato para a enzima acetiltransferase. A proteína AtNSI acetila a proteína da capa, auxiliando a interação do DNA fita simples com a proteína NSP durante a replicação por círculo rolante (McGarry *et al.*, 2003). Em experimentos de superexpressão de AtNSI foi demonstrado que a infecção do CaLCuV é potencializada. Em vírus mutantes, cuja NSP é incapaz de interagir com AtNSI, ocorre uma infecção deficiente (McGarry *et al.*, 2003; Carvalho & Lazarowitz, 2004).

2.6. Transporte nuclear de moléculas.

Para obter uma infecção viral com sucesso, o vírus necessita de proteínas da maquinaria de replicação, transcrição e transporte do hospedeiro. 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. O transporte nuclear se dá através de poros formados pela dupla membrana do envelope nuclear. Esse poro é composto por um complexo de várias proteínas, sendo denominado de complexo do poro nuclear (NPC) (Figura 3). O NPC é uma estrutura em forma de anel que circunda um poro central, facilitando o transporte bidirecional de RNAs, proteínas, ribonucleoproteínas e complexos maiores (Fahrenkrog *et al.*, 2004). Há em torno de 3000 poros em uma célula animal, e esse número varia de acordo com a função de cada célula. O NPC é um poro aquoso, por onde passam livremente, por difusão, moléculas pequenas como água, íons, metabólitos e pequenas moléculas com menos de 40 kDa. No entanto, moléculas maiores, de RNAs e de proteínas, são transportadas ativamente e necessitam sinais específicos de importação e exportação, que permitem seu acesso à maquinaria de transporte nucleoplasmático da célula (Mattaj *et al.*, 1998).

A estrutura tridimensional do poro nuclear parece ser conservada desde leveduras até mamíferos. Ela é composta de um centro cilíndrico simétrico, com massa molecular de aproximadamente 125 MDa, e com numerosos filamentos se estendendo em direção ao núcleo e ao citoplasma (Allen *et al.*, 2000). O NPC é constituído de oito multidomínios (raios), que são flanqueados por dois anéis, um nuclear e um citoplasmático que rodeiam um canal central. Do anel citoplasmático saem oito longas fibrilas de 35 a 50 nm. Do anel nuclear, se estendem oito filamentos finos de 50 a 100 nm que se unem em uma estrutura em forma de cesta. Em torno de 50-100 proteínas diferentes denominadas nucleoporinas estão presentes no NPC (Stoffler *et al.*, 1999; Rout *et al.*, 2000; Figura 3). Acredita-se que a maioria das nucleoporinas possui distribuição simétrica nos lados citoplasmático e nuclear do NPC (Zhang & Lia, 2005).

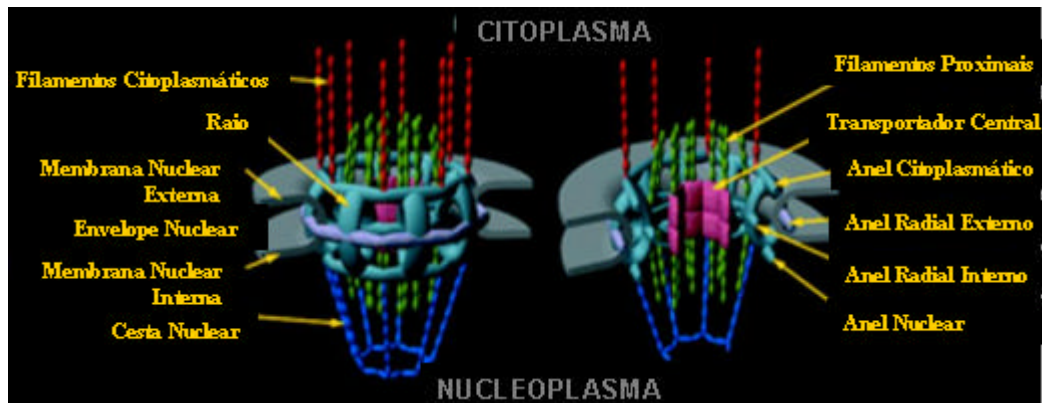


Figura 3. Estrutura do Complexo do Poro Nuclear (NPC) (Rout *et al.*, 2000).

2.7. Características das nucleoporinas.

O processo de transporte nuclear envolve ligação sequencial de complexos de transporte a diferentes nucleoporinas (Ben-Efraim *et al.*, 2001). Em leveduras, a remoção de nucleoporinas componentes do centro diminui a seletividade de macromoléculas no NPC (Shulga *et al.*, 2000). Isso sugere que as nucleoporinas estejam envolvidas no controle do transporte pelo NPC, fazendo parte diretamente do transportador ou ancorando proteínas que são transportadas. As nucleoporinas apresentam características típicas dependendo de sua localização no poro nuclear. A maioria delas possui repetições de fenilalanina e glicina (FG). As nucleoporinas voltadas para o núcleo possuem basicamente repetições de FG, como a Nup98 (Radu *et al.*, 1995), a Nup93 (Grandi *et al.*, 1997) e a Nup153 (Sukegawa & Blobel, 1993; Panté *et al.*, 1994). Elas compõem filamentos que se unem na região terminal por um pequeno anel, formando a estrutura em forma de cesta no núcleo. As nucleoporinas voltadas para o citoplasma possuem, além de repetições de FG, repetições de Prolina e Serina (PS), como a Nup42p e Nup159p. As nucleoporinas Nup62/58/54/45 encontram-se na região central do complexo do poro e possuem repetições de Glicina e Lisina (GL), além das repetições FG (Guan *et al.*, 1995). As interações do receptor de importação com nucleoporinas voltadas para o citoplasma geralmente são mediadas por nucleoporinas com regiões repetidas de resíduos de aminoácidos FG.

A Nup153, uma nucleoporina voltada para o núcleo, que atua no transporte de mRNA, interage com receptores de exportação em uma região da nucleoporina

desprovida de repetições FG, sendo esse transporte independente do referido domínio. Além disso, foi identificado em Nup153 um domínio de ligação a pequena GTPase Ran, que contém motivo dedo-de-zinco e se liga a Ran-GDP (Nakielny *et al.*, 1999). Foram descritas outras pequenas GTPases que interagem com seus efetores através do motivo dedo-de-zinco. O motivo dedo-de-zinco de Nup153 também interage com DNA *in vitro* (Sukegawa & Blobel, 1993).

2.8. Requerimentos para o transporte nuclear.

Existem quatro fatores essenciais para que ocorra o transporte de macromoléculas através do poro nuclear:

1. As macromoléculas necessitam de uma seqüência sinalizadora de localização nuclear (NLS) ou de um sinal de exportação nuclear (NES).
2. As seqüências específicas têm que ser reconhecidas por receptores de transporte.
3. Nucleoporinas devem reconhecer os receptores de transporte.
4. Deve haver um fornecimento de energia para que ocorra o transporte ativo através de um sistema Ran-GTP/Ran-GDP.

2.9. Seqüências-sinal e receptores de transporte nuclear.

As proteínas e outras macromoléculas que são transportadas através do poro nuclear devem possuir uma seqüência de sinal nuclear, direcionando a molécula para a importação nuclear ou para a exportação nuclear. As proteínas com essas seqüências são reconhecidas por uma família de receptores de transporte solúveis denominados carioferinas (também conhecidos como importinas, exportinas e transportinas) (Mattaj *et al.*, 1998; Wozniak *et al.*, 1998). As seqüências-sinal também podem ser reconhecidas e ligadas a proteínas adaptadoras que interagem com os receptores, e, combinados entre si, reconhecem uma gama grande de diferentes sinais de transporte nuclear. Moléculas diferentes são reconhecidas por receptores diferentes (Ryan *et al.*, 2000), que ancoram no poro nuclear e interagem com as nucleoporinas, facilitando o movimento do receptor de transporte com sua carga através do NPC.

O sinal de localização nuclear (NLS) direciona a proteína para o núcleo. NLS é uma seqüência não conservada, constituída de 3-5 resíduos de aminoácidos básicos, geralmente Lys e Arg, sendo alguns sinais bisegmentados, separados por uma região hidrofóbica (Kalderon *et al.*, 1984; Robbins *et al.*, 1991). Eles são reconhecidos por receptores de importação ou proteínas adaptadoras, que se ligam tanto ao NLS quanto ao receptor de importação em si (Alberts *et al.*, 2004). O heterodímero importina- α/β é um receptor de importação, no qual a importina- α fornece o sítio de ligação ao NLS, enquanto a importina- β permite a interação subsequente com o NPC, direcionando a translocação. O complexo NLS/ importina- α/β é translocado através do NPC, seguido de muitos passos que envolvem a ligação seqüencial do receptor de transporte às nucleoporinas em regiões diferentes do NPC. Logo após a terminação da translocação, o complexo se desmonta e as duas subunidades de importadores retornam ao citoplasma, separados (Izaurralde *et al.*, 1997; Ben-Efraim *et al.*, 2001). Os sinais de exportação presentes nas proteínas ou nos RNAs também são reconhecidos diretamente por receptores de transporte (exportinas) ou indiretamente por proteínas adaptadoras que se ligam a receptores.

A interação das seqüências-sinal com receptores de importação ou de exportação requer energia e é controlada por pequenas RanGTPases (Cole *et al.*, 1998; Moore, 1998). A RanGTPase parece desempenhar pelo menos duas funções distintas no processo de transporte: fornecer a energia requerida para o processo de translocação (Melchior *et al.*, 1993; Moore & Blobel, 1993; Weis *et al.*, 1996), que envolve troca do nucleotídeo guanosina e hidrólise de GTP, e regular a interação entre importina- α e importina- β . A ligação direta de Ran-GTP à importina- β dissocia o heterodímero de importina (Rexach & Blobel, 1995; Chi *et al.*, 1996; Görlich *et al.*, 1996). A translocação em si não requer hidrólise de GTP, mas sim a direcionalidade da importação nuclear de uma proteína. No núcleo, Ran-GTP interage com importadores, fazendo com que a carga seja liberada, enquanto exportadores se ligam a Ran-GTP promovendo a ligação à sua carga. No citoplasma, com a hidrólise de GTP, os importadores se ligam à sua carga, mas os exportadores a liberam.

Durante a exportação, a ligação de receptores à Ran-GTP é requerida para a interação do receptor com sua carga no núcleo (Fornerod *et al.*, 1997; Kutay *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997), aumentando a afinidade por sua carga específica. Ran-GTP também regula a interação da nucleoporina Nup153 com receptores impedindo a

interação de receptores de importação e promovendo a interação de fatores de exportação (Nakielny *et al.*, 1999). A proteína carga se liga ao receptor de exportação e esse complexo se liga às nucleoporinas na superfície nuclear do NPC e ao longo do poro por meio de interações hidrofóbicas (Ribbeck & Görlich, 2001). Como as interações são fracas, o transporte pode ser rápido. Moléculas que possuem maior afinidade de interação e moléculas com tamanhos maiores passam pelo poro com maior dificuldade. Moléculas maiores que o tamanho limite são excluídas. No citoplasma, a proteína ativadora de GTPase promove a hidrólise de GTP e liberação de Ran-GDP, diminuindo a afinidade entre a exportina e a carga, que é liberada no citoplasma. A exportina e Ran-GDP retornam ao núcleo.

2.10. Processo de translocação através do NPC e regulação.

A proteína Ran é solúvel no núcleo e no citoplasma, mas é retida no NPC devido a dois domínios diferentes característicos de nucleoporinas. O primeiro domínio é homólogo a RanBP1 citoplasmática (“Ran binding protein”), que se liga tanto a Ran-GTP quanto a Ran-GDP e é encontrado principalmente em nucleoporinas FG citoplasmáticas (com motivos repetidos do dipeptídeo Phe-Gly) (Wu *et al.*, 1995). O outro domínio de ligação a Ran é caracterizado por motivo dedo-de-zinco, que se liga a Ran-GTP e estimula a atividade de GTPases. Esse domínio está presente em uma das nucleoporinas voltadas para o núcleo (Nakielny *et al.*, 1999). Outras pequenas GTPases também interagem com seus efetores através do domínio dedo-de-zinco (Nakielny *et al.*, 1999). As nucleoporinas voltadas para o núcleo se ligam à Ran-GTP em um sítio de ligação que não interfere na hidrólise e nem na troca de nucleotídeo guanosina em Ran. O domínio RanBP1 (Coutavas *et al.*, 1993; Beddow *et al.*, 1995; Bischoff *et al.*, 1995b) possui aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos e é encontrado em diversas nucleoporinas, por exemplo, RanBP2/Nup358 (em vertebrados) (Wu *et al.*, 1995; Yokoyama *et al.*, 1995) e Nup2p (em leveduras) (Dingwall *et al.*, 1995; Hartmann & Görlich, 1995). Esse domínio inibe a troca de nucleotídeos guanosina, mas não a hidrólise de GTP (Lounsbury *et al.*, 1994; Bischoff *et al.*, 1995b). A ligação de Ran aos componentes do NPC nucleares e citoplasmáticos pode garantir a alta concentração de Ran nas proximidades do poro nuclear, aumentando a eficiência da terminação do transporte. Em células de leveduras, a única proteína que se liga a Ran e que está no

NPC, a Nup2p, não é essencial, sugerindo que a presença de domínios RanBP no NPC não é um requerimento para o transporte (Dingwall *et al.*, 1995).

A direcionalidade do transporte é ditada pelo fornecimento de energia, pela atuação das nucleoporinas, pela assimetria estrutural do poro nuclear em si, e, principalmente, pela compartimentalização de duas proteínas regulatórias que modulam o estado de ligação ao nucleotídeo (Ben-Efraim *et al.*, 2001).

A proteína ativadora de RanGTPase (RanGAP1), presente no citoplasma, estimula a atividade intrínseca de GTPase de Ran, convertendo Ran-GTP em Ran-GDP (Bischoff *et al.*, 1994; 1995a). Uma nucleoporina voltada para as duas faces (nuclear e citoplasmática), Nup358p, interage com RanGAP, estimulando a atividade de GTPase no NPC (Delphin *et al.*, 1997; Matunis *et al.*, 1998). A atividade de RanGAP é estimulada por RanBP1 (“Ran binding protein”) no fator de 10 vezes (Coutavas *et al.*, 1993; Bischoff *et al.*, 1995b). No núcleo, o fator de troca de nucleotídeo guanina (RanGEF) promove a troca de GDP por GTP (Ohtsubo *et al.*, 1989; Bischoff & Ponstingl, 1991). Ran nuclear encontra-se ligada a GTP em maior quantidade do que ligada a GDP, ao contrário do que ocorre no citoplasma. Um ensaio de medição direta de fluorescência de Ran indicou a razão de 500:1 de Ran-GTP no núcleo em relação ao citoplasma. A separação física de RanGEF e RanGAP, a primeira no núcleo e a segunda no citoplasma (Hopper *et al.*, 1990; Melchior *et al.*, 1993; Bischoff *et al.*, 1995a; Richards *et al.*, 1996), permite uma concentração relativamente alta de Ran-GTP no núcleo e de Ran-GDP no citoplasma. Esse desequilíbrio de concentração permite a difusão contínua de Ran-GDP para o núcleo e de Ran-GTP para o citoplasma (Smith *et al.*, 2002).

2.11. Transporte intracelular viral.

A maioria dos vírus necessitam de fatores nucleares do hospedeiro para sua replicação e transcrição, assim, em algum momento, o genoma viral deve entrar no núcleo (Whittaker & Helenius, 1998). Os vírus desenvolveram estratégias que permitem o transporte ativo do seu genoma através do poro nuclear. Uma vez que o tamanho da maioria dos capsídeos virais excedem o diâmetro limite funcional do poro, o genoma viral deve ser liberado do capsídeo antes de ser importado para o núcleo (Izaurralde & Adam, 1998). Para transportar seu genoma através do poro nuclear, eles utilizam toda

maquinaria de transporte da célula, explicado anteriormente, além de algumas proteínas virais responsáveis por interagir com essa maquinaria.

O vírus *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) desmonta seu capsídeo antes de ser transportado e se ancora no poro nuclear (Leclerc *et al.*, 1999) através do NLS composto de resíduos de aminoácidos básicos na superfície do capsídeo. O NLS também é reconhecido pela importina- α e importina- β . Da mesma forma, o vírus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) apresenta uma seqüência NLS bipartida próxima à porção N-terminal da proteína da capa (Kunik *et al.*, 1998). Experimentos realizados sugerem que outros vírus ancoram seus capsídeos no NPC, podendo interagir através de alguma proteína viral, como o vírus da hepatite B (HBV) e o vírus da herpes simplex (HSV). Analisando células infectadas pelo vírus HSV por microscopia eletrônica, foram detectados capsídeos vazios no poro nuclear, concluindo que o DNA viral é transportado através do poro sem o capsídeo (Sodeik *et al.*, 1997).

Uma vez que o vírus tenha entrado no núcleo da célula hospedeira e realizado sua replicação e transcrição, ele precisa retornar ao citoplasma para ser montado em capsídeos ou ser transportado para outras células hospedeiras. A exportação nuclear de genomas virais ocorre de diferentes maneiras de acordo com o vírus. Por exemplo, o vírus influenza é exportado do núcleo com auxílio de duas proteínas virais que possuem seqüência de exportação nuclear (NES). Essas proteínas interagem com uma exportina designada Crm1 que, por sua vez, interage com uma nucleoporina hRip (Izaurralde *et al.*, 1999). Um mecanismo de exportação viral muito bem caracterizado é o do vírus HIV. A proteína Rev promove a exportação do RNA viral se ligando ao elemento *cis*, RRE (“Rev Response Element”) e à exportina-1 (hCrm1) através de um sinal de exportação nuclear (Cullen & Malim, 1991). O complexo formado por Crm1 e o vírus conjugado a Rev é formado na presença de GTP que, assim, interage com a nucleoporina com repetições FG, Rip1p. A nucleoporina Rip não é essencial sob temperaturas normais, mas sob choque térmico sim, pois está envolvida na exportação de RNAs de choque térmico (Saavedra *et al.*, 1997). Esse complexo é transportado pelo NPC e, ao chegar ao citoplasma, RanGAP e RanBP1 promovem a hidrólise de GTP, liberando o vírus.

A proteína Rev atua da mesma forma que NSP de geminivírus transportando o genoma viral do núcleo para o citoplasma. Um ensaio de duplo híbrido usando Rev como isca e, como presa, uma biblioteca de cDNA de humanos ou leveduras, levou ao isolamento da proteína hRip/Rab, yRip (Bogerd *et al.*, 1995; Fritz *et al.*, 1995; Stutz *et*

al., 1995). A proteína Rip humana ou de leveduras contém motivos repetidos presentes em muitas nucleoporinas e ambas estão localizadas no poro nuclear, embora também seja observada a localização citoplasmática da proteína humana. Rip não é uma proteína essencial e linhagens de leveduras possuindo uma mutação nesse gene apresentaram uma redução parcial da exportação mediado pela proteína Rev (Stutz *et al.*, 1995).

O sinal de exportação nuclear (NES) de Rev é composto de uma pequena região C-terminal, rica em resíduos de aminoácidos Leu com a seqüência consenso: Leu-X2-3-Y-X2-3-Leu-X-Leu/Ile, onde X representa qualquer aminoácido e Y representa Leu/Ile/Phe/Val ou Met (Bogerd *et al.*, 1996). O NES rico em Leu está presente em várias proteínas como o fator de transcrição TFIIIA (Fischer *et al.*, 1995; Fridell *et al.*, 1996), envolvido no transporte do rRNA 5S e na associação com duas proteínas do poro nuclear de leveduras (Murphy & Went, 1996; Segref *et al.*, 1997). Outro NES rico em Leu está presente na proteína NSP de geminivírus. A proteína NSP interage com o DNA viral fita simples com alta afinidade, facilitando o seu transporte do núcleo para o citoplasma. Ela apresenta dois sinais de localização nuclear entre os 100 primeiros resíduos de aminoácidos N-terminais (Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1996; Sanderfoot & Lazarowitz, 1996) e um sinal de exportação nuclear (Ward & Lazarowitz, 1999). A proteína NSP tem que ser reconhecida no poro nuclear, através da seqüência NES presente entre os resíduos de aminoácidos 177 a 199. Essa seqüência é essencial para a exportação, como descrito em experimentos de protoplastos de tabaco, e também é essencial na infectividade de *Squash leaf curl virus* (SqLCV).

Dada a importância da proteína NSP para o transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma, essencial para uma infecção viral com sucesso, foram identificadas pela nossa equipe proteínas do hospedeiro que interagem com a proteína viral. Essas proteínas possivelmente possuem ação na resposta de defesa do hospedeiro ou atuam auxiliando o vírus no processo de infecção. Dentre essas proteínas, foi detectada uma nucleoporina-like de *Arabidopsis*, que apresenta homologia com uma nucleoporina-like de humanos (hRip), citada anteriormente, que interage com a proteína Rev, funcionalmente semelhante à proteína NSP. Devido à importância de se entender como ocorre o transporte do vírus dentro das células vegetais, tornou-se de grande interesse determinar o papel dessa nucleoporina-like e sua importância na infecção por geminivírus.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1– Material vegetal.

Plantas de *Arabidopsis* da linhagem Col-0 (Columbia) foram cultivadas em câmara de crescimento a 22° C, com fotoperíodo de 16 horas. As sementes de *Arabidopsis* foram semeadas em terra/substrato na proporção de 1:1. O mutante *nap* foi originado por mutagênese insercional por T-DNA no “Salk Institute for Biological Studies” e as sementes foram obtidas do ABRC (“Arabidopsis Biological Resource Center”).

3.2. Identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com a proteína NSP de geminivírus.

Foi construída uma biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, preparada de mRNA total isolado de tecidos aéreos. O mRNA foi fusionado ao domínio de ativação GAL4 do vetor Leu^r pEXAD502 (Invitrogen Life Technologies, Inc.). O clone pBD-NSPCLCV, que contém o domínio de ligação ao DNA de GAL4 fusionado à seqüência de NSP, foi descrito por Fontes *et al.*, 2004. A levedura repórter MaV203 (*MAT*⁺, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3200*, *ade2-101*, *gal4*, *gal80*, *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*,

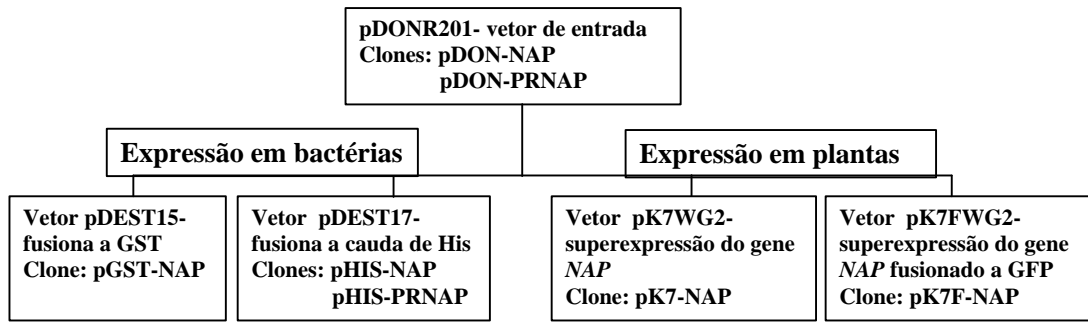
HIS3UAS GAL1::HIS3LYS2, can1R, cyh2R) é deficiente na produção de triptofano, leucina e uracila (Trp⁻, Leu⁻, Ura⁻). Linhagens competentes de levedura MaV203 foram co-transformadas sequencialmente com pBD-NSPCLCV e 25 µg de uma biblioteca de cDNA em pEXAD502 juntamente com 3 mg de DNA carreador de esperma de salmão, usando o método de acetato de lítio/polietilenoglicol. Para verificar a interação das proteínas quiméricas, os transformantes foram plaqueados no meio SD (Synthetic Dropout), isento de Trp, Leu, Ura e His, mas suplementado com 25 mM de 3-aminotriazol e incubado por 3-4 dias a 30° C. A interação foi posteriormente confirmada medindo a atividade de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactosidase de extratos de levedura com *o*-nitrophenyl β-D-galactopiranosídeo (Uhrig *et al.*, 1999). Aproximadamente 5 x 10⁶ transformantes foram obtidos, conforme estimativa baseada no número de transformantes que cresceram em placa com meio seletivo SD-Trp⁻Leu⁻Ura⁻His⁻. O DNA plasmidial foi recuperado de levedura e transformado em *Escherichia coli* da estirpe XL-1-Blue (Stratagene) por eletroporação.

Os plasmídeos recombinantes pBD-NSPTGMV, pBD-NSPTCrYLV e pBD-NSPCLCV, contendo o domínio de ligação ao DNA de GAL4 foram construídos fusionando às seqüências de NSP de TGMV (Fontes *et al.*, 1994b), de TCrYLV (Galvão *et al.*, 2003) e de CaLCuV (Hill *et al.*, 1998), respectivamente, descritos em Fontes *et al.*, 2004.

Células transformadas com o vetor vazio pBD foram usadas como controle negativo e leveduras transformadas com pGAL4, que expressa o transativador completo de GAL4, foram usadas como controle positivo.

3.3- Clonagem do gene *NAP* em vetores de expressão em bactérias e em plantas.

O esquema abaixo resume as clonagens realizadas para superexpressão do gene *NAP* em bactérias e para superexpressão em plantas. A metodologia de obtenção de cada um dos clones será descrita posteriormente.



3.4. Verificação da interação NAP-NSP *in vitro*.

3.4.1. Obtenção dos clones pHIS-NAP, pHIS-PRNAP e pGST-PRNAP e pGST-NSP.

O cDNA completo que codifica a proteína NAP foi obtido do ABRC (“*Arabidopsis* Biological Resource Center”). Foram desenhados oligonucleotídeos para amplificar o gene e inserir sítios específicos de recombinação para clonagem via sistema Gateway (Invitrogen Life Technologies, Inc.). O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1% e inserido por recombinação no vetor de entrada pDONR201, utilizando a BP clonase. Foi realizada também a amplificação da porção C-terminal rica em prolina do gene *NAP* (PRNAP) (aminoácidos 460 a 602) e clonagem no vetor de entrada. Os clones resultantes pDON-NAP e pDON-PRNAP foram usados para transferir seu respectivo fragmento em vetores de expressão. O gene *NAP* e o fragmento do gene, PRNAP foram transferidos para o vetor de expressão bacteriana pDEST17 por meio da LR clonase, que por recombinação homóloga transfere o gene do vetor de entrada para o vetor pDEST17. A expressão nesse vetor permite a síntese da proteína NAP e do fragmento PRNAP fusionados a uma cauda de histidina. As construções resultantes foram pHIS-NAP e pHIS-PRNAP. O fragmento PRNAP também foi inserido por recombinação homóloga com o uso da enzima LR clonase no vetor pDEST15, que promove a fusão da proteína sintetizada à enzima GST (Glutathione S-transferase). O clone obtido foi pGST-PRNAP. Todos os clones foram utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α pelo método

do choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). Os transformantes foram confirmados por PCR com oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene de interesse.

O clone pGST-NSP, foi obtido e descrito anteriormente em Fontes *et al.* (2004), nele a proteína NSP está fusionada à proteína GST.

3.4.2. Preparo de células competentes e transformação de *Escherichia coli* BL21:DE3 e BL21:DE3 (pLYSs).

As colônias individuais da estirpe de *Escherichia coli*, DH5 α , transformada com os clones descritos acima, foram incubadas em 2 mL de meio LB seletivo com ampicilina 100 mg.L⁻¹, a 37° C, a 180 rpm, por 16 horas, e delas foi feita extração de DNA plasmidial (miniprep) utilizando o “Plasmid Midi Kit” (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* da estirpe BL21:DE3 e da estirpe BL21:DE3 (pLYSs). As células competentes foram preparadas em CaCl₂ 0,1 M de acordo com Sambrook et al. (1989). Cerca de 75 μ L de células competentes foram transformadas por choque térmico com o plasmídeo de interesse e selecionadas em meio suplementado com o antibiótico apropriado. Os transformantes foram confirmados via PCR com oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene de interesse e o produto amplificado separado por eletroforese em gel de agarose (1%). As colônias recombinantes foram armazenadas em glicerol 30% (v/v) a -80° C.

3.4.3. Reação de Polimerase em Cadeia PCR (“Polimerase Chain Reaction”).

A reação de PCR foi realizada utilizando diretamente a colônia de bactéria transformada. A colônia foi diluída em 25 μ L de água mili-Q estéril, sendo 20 μ L inoculados em 2mL de meio seletivo líquido LB (Luturia Bertani), contendo ampicilina 100 mg.L⁻¹, que foi mantido em incubador a 37° C, a 180 rpm para posterior estocagem em glicerol a -80° C. Os 5 μ L restantes da diluição foram utilizados na reação de PCR com 0,1 mM de dNTPs, 0,4 μ M de cada um dos oligonucleotídeos correspondentes indicados no Quadro 1, 1X de tampão para a Taq DNA polimerase (MgCl₂ 2,0 mM,

Tris-HCl 2,0 mM pH 8,4, KCl 50 mM) 1 µL de Taq DNA polimerase em um volume final de 50 µL. As condições de reação foram: 10 min a 94° C, seguidos de 40 ciclos (45 s a 94° C, 1 min e 30 s a 55° C e 2 min a 72° C), seguindo 10 min a 72° C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler PTC 2000 e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo 0,1 mg.L⁻¹.

Quadro 1. Oligonucleotídeos usados em reações de PCR

Plasmídeos	Oligonucleotídeos	Seqüência
Recombinantes		
pDON-NAP	AtNAPG-4263 (senso)	aaaaagcaggcttcacaatggcgggctcgagtaa
pHIS-NAP	AtNAPStG 4264 (anti-senso)	agaaagctgggtcttaccctaatgggttctctcc
pDON-PRNAP	4317-PRONAPF-GA (senso)	aaaaagcaggcttcacaatgcctggatggcaagc
pGST-PRNAP	4318-PRONAPR-GA (anti-senso)	agaaagctgggtcttatgggtttacattgctagg
pHIS-PRNAP		
<i>nap</i>	LB1-18 (senso)	
	4967 (senso)	
	4968 (anti-senso)	
35S-NAP	MC36 (senso)	
	AtNAPStG 4264 (anti-senso)	agaaagctgggtcttaccctaatgggttctctcc
35S-NAP-GFP	4317-PRONAPF-GA (senso)	aaaaagcaggcttcacaatgcctggatggcaagc
	4799-pK7FGFPRvs (anti-senso)	cgccctgcctcgccggacac
35S-NAP-TAP	4317-PRONAPF-GA (senso)	aaaaagcaggcttcacaatgcctggatggcaagc
	5250 (anti-senso)	
CaLCuV-B	PCRC1 (senso)*	ctagctgcagcatatttacrarwatgcca
	PBL1V2040 (anti-senso)*	gcctctgcagcartgrtckatcttcataca

*Rojas *et al.*, 1993.

3.4.4. Expressão heteróloga em *Escherichia coli*.

Os clones pHIS-PRNAP, pGST-PRNAP em bactéria *Escherichia coli* BL21:DE3 e pHIS-NAP em bactéria *Escherichia coli* BL21:DE3 (pLYSs) cresceram separadamente em 1 L de meio líquido seletivo LB, contendo ampicilina 100 mg.L⁻¹, até A₆₀₀= 0,6, quando foram induzidos com isopropilil-β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) 0,4 mM. Após incubação a 28° C, a 200 rpm por 16 horas, foram obtidos os extratos protéicos total, solúvel e insolúvel.

3.4.5. Obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis.

Para a obtenção da fração total, 1 mL de cada cultura foi centrifugado a 10.000 x g por 1 min, a 4° C, e o pellet bacteriano ressuspendido em 100 μL de 1X-PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM; pH 7,4), seguindo-se a adição de 100 μL de tampão de amostra SDS-2X (glicerol 30% (v/v), SDS 9,2% , azul de bromofenol 1%, β-mercaptoetanol 20% (v/v), Tris-HCl 250 mM pH 6,8). Posteriormente, as amostras foram sonicadas em Ultrasonic Homogenizer 4710 Series (Cole Parmer), no gelo, com amplitude entre 60 e 80; timer 0, pulser 6, por quatro tempos, e aquecidas por 3 minutos a 70° C, para desnaturação das proteínas.

Para as frações solúvel e insolúvel, foram centrifugados 4 mL das células de cada cultura a 6.500 x g por 15 minutos, a 4° C, e o pellet ressuspendido em 500 μL de Tampão de Extração (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 2 mM), contendo 1 mg.mL⁻¹ de lisozima e Triton X-100 0,1% (v/v). As amostras foram incubadas a 30° C por 15 minutos e posteriormente transferidas para o gelo, para sonicação. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos, a 4° C, e o sobrenadante retirado e transferido para outro microtubo (Fração Solúvel). O pellet foi ressuspendido em 100 μL de tampão de amostra SDS-1X (Fração Insolúvel). Todas as frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE em presença de β-mercaptoetanol, como descrito por Laemmli *et al.* (1970). No gel SDS-PAGE foram avaliadas se as proteínas induzidas estavam fracionadas na fração solúvel ou insolúvel.

3.4.6. Purificação das proteínas recombinantes.

As proteínas recombinantes PRNAP e NAP fusionadas a resíduos de histidina foram purificadas por cromatografia de afinidade com resina de Ni⁺. Para purificação em grande escala, 1 litro de células induzidas foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 minutos e ressuspendidas em tampão de ligação (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10mM, Imidazol 10 mM, e uréia 8 M pH 8,0), para o domínio PRNAP da proteína NAP, que se encontra na fração insolúvel e (NaH₂PO₄ 50 mM, imidazol 10 mM, NaCl 300 mM pH 8,0), para a proteína NAP que se encontra na fração solúvel, juntamente com PMSF 1 mM e lisozima 1 mM. O rompimento das células ocorreu mecanicamente por ultrasonicação em Ultrasonic Homogenizer 4710 Series (Cole Parmer), com os padrões de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos seguida de centrifugação a 39.000 x g por 20 minutos, para a remoção de debris celulares e obtenção do sobrenadante. Esse foi filtrado em membrana de 0,45 µm e ligado a uma resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) ativada com Ni⁺², previamente equilibrada com o tampão de ligação. A purificação foi realizada pelo método Batch, segundo o protocolo do fabricante.

O domínio PRNAP da proteína NAP foi utilizado para a produção de anticorpos, descrito no Apêndice 1. A proteína NAP completa, purificada na forma nativa, foi utilizada no ensaio de interação *in vitro*.

3.4.7. Ensaio de interação de NAP-NSP *in vitro*.

Os clones pGST-NSP e pGST foram crescidos em 500mL de meio seletivo LB até atingir A₆₀₀=0,6 e foram induzidos com IPTG a 28° C, 200 rpm, por 16 horas. O meio foi centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos a 4° C e o pellet ressuspendido em PBS 1X com lisozima 1 mg/mL. O rompimento das células foi realizado por ultra-sonicação, seguida de centrifugação a 14.000 x g por 20 minutos à 4° C. O sobrenadante foi coletado e incubado com a resina Glutathione Sepharose 4B (Amersham) pré-equilibrada com tampão de ligação [Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 120 mM, Nonidet P-40 0,1% (v/v)] e incubada sob agitação à 4° C por 2 horas. A proteína ligada à resina foi centrifugada a 500 x g por 2 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado, a resina

foi lavada três vezes com o tampão de ligação e, depois de centrifugada a 500 x g por 2 minutos a 4° C, foi ressuspensa em 100 µL de tampão de ligação. Em seguida, 40 µL da proteína HIS-NAP purificada foi incubada com 20 µL de suspensão GST-NSP-Glutathione Sepharose ou 20 µL de GST-Glutathione Sepharose em 500 µL de tampão de ligação. As misturas foram mantidas por 2 horas a 4° C, centrifugadas a 500 x g por 2 minutos a 4° C, lavadas três vezes com tampão de ligação, e ressuspensas em 60 µL tampão de amostra SDS-1X.

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE com concentração de acrilamida/ bis 10% (Laemmli *et al.*, 1970), no tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, EDTA 1 mM e SDS 3,5 mM) e voltagem constante de 100V.

Após eletroforese, o gel foi revelado com solução corante [metanol 45% (v/v), eEtanol 9% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue R250 0,01%] por 2 horas e, em seguida, descorado em solução descorante [metanol 25% (v/v) e ácido acético glacial 7,5% (v/v)].

3.5. Obtenção de plantas transgênicas.

3.5.1. Obtenção de construções de DNA em vetores binários de transformação de plantas.

A região codificadora do gene *NAP* foi transferida do vetor de entrada pDONR207 para o vetor binário pK7WG2. O clone resultante, pK7-NAP, contém o cDNA de NAP, sob o controle do promotor CaMV 35S. Similarmente, o cDNA de NAP foi transferido de pDONR201 para o vetor binário pK7FWG2, resultando em pK7F-NAP. O clone pK7F-NAP contém o cDNA de NAP fusionado a GFP na região carboxiterminal. O gene quimérico está sob o controle do promotor 35S. O gene NAP também foi transferido para o vetor CTAPi, que promove a fusão do cDNA a uma cauda de proteína A, C-terminal (TAP), também estando sob o controle do promotor 35S, resultando no clone pCTAP-NAP.

3.5.2. Transformação de *Agrobacterium* e *Arabidopsis*.

As construções pK7-NAP, pK7F-NAP e pCTAP-NAP foram utilizadas na transformação de *Agrobacterium tumefaciens* da estirpe GV3101 por eletroporação. Aproximadamente 50 µg de plasmídeo foram utilizadas na transformação de 40 µL de células competentes e eletroporadas a 2500 V durante 4 a 5 milissegundos. Os transformantes foram selecionados em meio Rhizo sólido contendo 40 mg.L⁻¹ de gentamicina e 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina. As placas foram incubadas durante três dias a 28° C e as colônias positivas diagnosticadas no final dessa etapa, por meio de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene *NAP*. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹. O tamanho das bandas foi comparado com o padrão de tamanho molecular.

As colônias de *Agrobacterium tumefaciens* contendo as construções pK7-NAP, pK7F-NAP e pCTAP-NAP foram separadamente inoculadas em 4 mL de meio LB líquido seletivo (40 mg.L⁻¹ de gentamicina e 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina) por 24 h a 28° C. Em seguida, os 4 mL foram inoculados em 200 mL de LB seletivo, que foram incubados por 24 h a 28° C. Após o período de incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação, a 8.000 x g e ressuspensas em 250 mL de sacarose 5%, contendo Silwett L-77 3% (v/v). A solução foi usada para transformar *Arabidopsis thaliana* Col-0 pelo método de mergulhia de escapes florais (Fontes *et al.*, 2004). As plantas recém transformadas foram mantidas em casa-de-vegetação até a obtenção de sementes. As sementes transgênicas contendo as construções pK7-NAP, pK7F-NAP e pCTAP-NAP foram designadas 35S-NAP, 35S-NAP-GFP e 35S-NAP-TAP, respectivamente. As sementes de 35S-NAP e 35S-NAP-GFP foram esterilizadas com solução contendo etanol 70% (v/v), e Triton X-100 0,05% (v/v) por 5 minutos, seguido de etanol absoluto por 1 minuto, e foram plaqueadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) meia força seletivo, contendo canamicina 50 mg.L⁻¹ para a seleção dos transformantes independentes. A marca de seleção nas construções utilizadas para a transformação é fornecida pelo gene *nptII*, presente no T-DNA dos vetores, que confere resistência à canamicina. As placas contendo as sementes foram incubadas por 2 dias a 4° C para quebrar a dormência e depois transferidas para uma incubadora a 22° C com fotoperíodo de 16 h para o crescimento das plantas. Após um mês de germinação, os transformantes independentes foram transplantados para vasos e mantidos em casa de

vegetação na temperatura de 22° C e com fotoperíodo de 16 h. As sementes de 35S-NAP-TAP foram semeadas em terra e selecionadas após duas semanas de germinação com 3 aplicações do herbicida fosfinotricina, em um intervalo de 2 dias. As plantas transformadas foram confirmadas por PCR de DNA genômico extraído de folhas jovens com oligonucleotídeos específicos para NAP. Além disso, procedeu-se à análise de segregação do transgene na geração T₂.

As plantas foram plaqueadas por três gerações para selecionar, em canamicina, plantas em homozigose que obedecessem à proporção mendeliana de 3:1 (3 positivas :1 negativa). As plantas não transformadas exibem o fenótipo albino, enquanto que plantas transformadas são resistentes à canamicina. Foi feito um teste X² dessas plantas, onde foram aceitas as plantas com X² ≤ 3,8 com α=5% (Apêndice 2).

3.6. Diagnóstico molecular das plantas transgênicas.

3.6.1. Extração do DNA de plantas transformantes de *Arabidopsis thaliana* (miniprep) para PCR.

Uma folha de cada planta transformada foi macerada em nitrogênio líquido em microtubos com pistilos. Adicionaram-se 200 µL de tampão de extração de DNA (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 250 mM, SDS 0,5% e EDTA 25 mM) e agitou-se por 5 s. Após centrifugação a 16.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente, os ácidos nucléicos foram precipitados do sobrenadante com isopropanol 50% (v/v) por 10 minutos e recuperados por centrifugação a 16.000 x g por 6 minutos. O pellet foi lavado com 150 µL de etanol 75% (v/v), seco em Automatic Environmental SpeedVac System AES1010 (Savant) por 5 minutos e ressuspendido em 30 µL de água mili-Q autoclavada. Foram utilizados 4 µL do DNA extraído das plantas para a reação de PCR, que foi descrita no item 3.4.3.

3.6.2. Extração de RNA total de plantas transgênicas.

Para isolamento de RNA total, plântulas de *Arabidopsis thaliana* foram maceradas em nitrogênio líquido e aproximadamente 200 mg do tecido vegetal foram homogeneizados com o reagente TRIzol (Gibco). Incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos e foram adicionados 200 μ L de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada manualmente por 15 s, incubada à temperatura ambiente por 3 minutos e submetida à centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, livre de RNase, e foram adicionados 500 μ L de isopropanol. Em seguida foi incubado à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) (preparado com água livre de RNase) e centrifugado a 7.500 x g por 10 minutos. Em seguida, os microtubos foram secos à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e os pellets ressuspensos em 30 μ L de água livre de RNase e estocado a -80° C. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1X (Tris Base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 50 mM pH 8,0), corado com brometo de etídeo 0,1 μ g.mL⁻¹.

3.6.3. Análise da expressão do transgene por RT-PCR.

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria em espectrofotômetro DU 650 BECKMAN a 260 nm e a concentração do RNA total foi expressa em μ g. L⁻¹. A expressão do gene foi avaliada por RT-PCR, usando-se 2 μ g do RNA total como molde, que juntamente com 5 μ M de oligonucleotídeos oligodT e 0,5 mM de dNTPs, no volume final de 15 μ L, foram aquecidos a 70° C por 5 minutos e depois imediatamente colocados no gelo. A essa mistura, foram adicionados tampão 1X da enzima transcriptase reversa (Invitrogen Life Technologies, Inc.) (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), e 10 mM DTT, no volume final de 20 μ L e mantidos a 37° C por 2 minutos, seguido por 1 μ L de M-MLV RT Transcriptase Reversa (Invitrogen Life Technologies, Inc.) e incubou-se por 37° C por 4 horas. Depois de sintetizado o cDNA, a mistura foi colocada a 70° C por 15 minutos para inativação da enzima.

Para a reação de PCR, 1 μ L de cDNA foi adicionado a 0,1 mM de dNTPs, 0,4 μ M de cada um dos oligonucleotídeos específicos para a região de prolina do gene *NAP* (Quadro 1), 1X de tampão para a Taq DNA polimerase (MgCl₂ 2,0 mM, Tris-HCl 2,0

mM pH 8,4, KCl 50 mM), 1 µL de Taq DNA polimerase em um volume final de 25 µL. As condições de reação adotadas foram de 3 minutos a 94° C, seguido de 20, 30 e 40 ciclos (45 s a 94° C, 1 minutos e 30 s a 55° C e 2 minutos a 72° C), seguindo 10 minutos a 72° C. A reação de PCR foi saturada com 40 ciclos, sendo então utilizados 30 ciclos. A mesma reação de PCR foi realizada com oligonucleotídeos para actina, como controle de expressão, no entanto com temperatura de anelamento de 49° C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler PTC 2000 e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹.

3.7. Obtenção de plantas *Arabidopsis thaliana* mutantes para o gene *NAP*.

3.7.1. Obtenção de mutantes *nap* em homozigose.

As plantas *Arabidopsis thaliana* mutantes knock-out para o gene *NAP* foram obtidas na biblioteca de mutantes insercionais, do "Salk Institute for Biological Studies". As sementes obtidas de mutantes *nap* foram esterilizadas, plaqueadas em meio MS meia força, incubadas a 4° C por 2 dias e a 22° C por 15 dias, com fotoperíodo de 16 horas, e depois transplantadas para vaso. Quando as plantas começaram a emitir um escape floral, foram coletadas folhas de cada uma delas separadamente, extraído o DNA conforme citado no item 3.6.1 e, para genotipagem, foi feita uma reação de PCR com oligonucleotídeos específicos para o gene *NAP* (4967 e 4968) e um oligonucleotídeo senso específico para o T-DNA (LB1-18) (Quadro 1).

3.7.2. Análise da expressão de plantas mutantes *nap* por RT-PCR.

O RNA total de plântulas foi extraído como descrito no item 3.6.2. A expressão do gene foi avaliada por RT-PCR, como descrito previamente no item 3.6.3, no entanto, usando oligonucleotídeos específicos para o gene *NAP* para a síntese de cDNA.

A linhagem contendo alelos nulos *nap* em homozigose e linhagem selvagem Col-0 foram inoculadas com o CaLCuV por meio de biobalística.

3.8. Ensaios de infectividade de *Arabidopsis thaliana* com CaLCuV.

3.8.1. Infecção de *Arabidopsis thaliana* com CaLCuV por biobalística.

As sementes de plantas selvagem Col-0, *nap*, 35S-NAP e 35S-NAP-GFP foram esterilizadas e plaqueadas em meio MS meia força, as duas primeiras em meio sem antibiótico e as duas últimas em meio seletivo com canamicina 50 mg.L⁻¹. Após 2 semanas, 12 plantas de cada linhagem foram transplantadas para vasos individuais contendo terra: substrato, 1:1. Quando atingiram o estágio de 5-7 folhas, as plantas foram inoculadas com o CaLCuV. Foram realizadas 3 repetições desse experimento.

Os componentes A e B do geminivírus CaLCuV estão na forma de repetições parciais em tandem, cada um dos componentes possui 1 cópia e meia do material genético, para que ocorra recombinação *in vivo* e seja liberado o vírus de forma circular dentro da célula vegetal. O DNA plasmidial dos clones CaLCuV-A, com mutação no gene *AVI* e CaLCuV-B (Figura 4 A) foram extraídos utilizando o “Plasmid Midi Kit” (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. O componente A utilizado apresenta uma mutação na ordem de leitura no gene que codifica a proteína da capa, tornando-o menos virulento. O vírus selvagem é muito severo, podendo matar as plantas infectadas rapidamente. Dessa forma, o vírus atenuado é utilizado para que se possa acompanhar lentamente todo o curso da infecção. A qualidade e integridade do DNA foram analisadas em gel de agarose 1% e a concentração foi avaliada por espectrofotometria a 260 nm. As linhagens de *Arabidopsis thaliana* selvagem Col-0, mutantes nulos *nap* e as plantas superexpressando o gene *NAP* (35S-NAP e 35S-NAP-GFP) foram inoculadas, por meio de biobalística (Schaffer *et al.* 1995), com os DNAs de CaLCuV-A e CaLCuV-B aderidos a partículas de tungstênio. Como controle negativo, duas plantas de cada linhagem foram inoculadas somente com tungstênio.

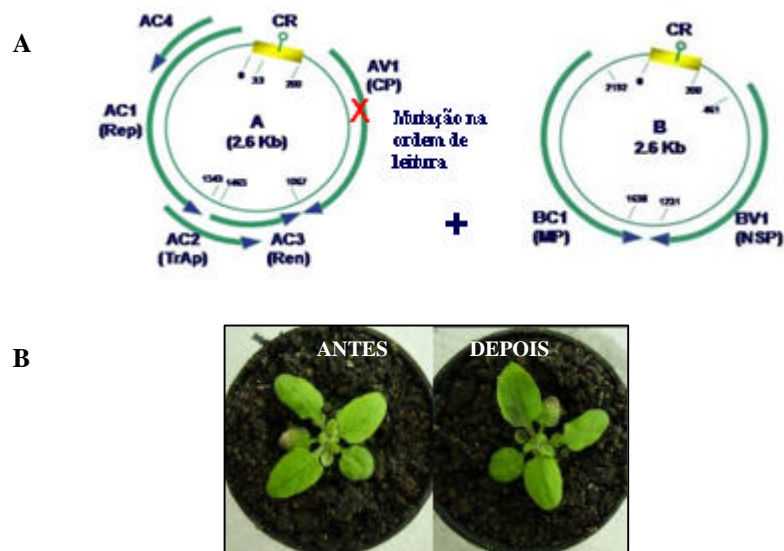


Figura 4. Inoculação do vírus CaLCuV em *Arabidopsis thaliana*. (A) Esquema do componente A e do componente B de geminivírus, indicando seus respectivos genes. O componente A apresenta uma mutação no gene *AV1* (que codifica a proteína da capa), tornando o vírus menos patogênico. O vírus utilizado nesse experimento possui 1 cópia e meia de cada um dos componentes (não mostrado). (B) Plantas de *Arabidopsis thaliana* antes e logo após inoculação com vírus associado a tungstênio (planta com folha mais escura).

Aproximadamente 10 μ g de cada componente de DNA foram precipitados com micropartículas de tungstênio, na presença de CaCl_2 1 M, espermidina 15 mM e lavadas com etanol absoluto. Cada preparação foi distribuída em 5 membranas carreadoras. As membranas preparadas foram devidamente encaixadas no acelerador de partículas e lançadas, sob vácuo formado com gás hélio, com aceleração de 160 psi, contra as linhagens de *Arabidopsis thaliana* citadas acima. O tungstênio pode ser observado sob a folha logo após o bombardeamento (Figura 4 B). As plantas foram, então, transferidas para câmara de crescimento a 22° C com fotoperíodo de 16 horas e observadas quanto ao aparecimento de sintomas até 18 dias após a inoculação.

Para a análise dos sintomas, as plantas foram observadas em intervalos de dois dias e fotodocumentadas no 14° dia. Foram analisados sintomas como: necrose foliar, clorose foliar, epinastia, enrolamento de folhas jovens e morte de folhas jovens.

3.8.2. Diagnóstico molecular da infecção viral

Uma folha de cada planta inoculada com vírus foi coletada com 7, 14 e 20 dias após a inoculação. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido em microtubos com pistilos, seguindo-se o protocolo descrito em 3.6.1. Como molde para a reação de PCR, 5 μ L de DNA foram usados juntamente com 0,4 μ M de cada um dos oligonucleotídeos degenerados, que amplificam um fragmento específico do CaLCuV-B (Quadro 1). A reação de PCR foi desenvolvida como descrito no item 3.4.3. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,1 μ g.mL⁻¹.

3.8.3. Análises estatísticas.

A percentagem de plantas infectadas foi avaliada de dois em dois dias quanto à sintomatologia e ao acúmulo de DNA viral. Os dados foram plotados em um gráfico (percentagem de plantas infectadas X dias pós-infecção), juntamente com o desvio padrão entre as repetições. Foi realizada uma análise de variância de dois fatores (ANOVA) e de Kruskal-Wallis com medidas repetidas, para testar se o tipo de planta e os dias após a infecção tiveram efeito significativo na percentagem de plantas infectadas, de acordo com Zar (1996). A variável independente é o tipo de planta, a variável dependente é a percentagem de plantas infectadas, e os dias são as medidas repetidas. Os dados de percentagem de plantas infectadas foram transformados, calculando o arco seno da raiz quadrada, para que os resíduos da análise tivessem distribuição normal. O valor de p considerado significativo foi 0,05.

3.9. Análise do padrão de expressão do gene *NAP* nos diferentes órgãos de *Arabidopsis thaliana*.

Os diferentes órgãos de *Arabidopsis thaliana* da planta selvagem Col-0 (plântulas, flores, folhas e raízes) foram coletadas separadamente. Aproximadamente 200 mg de tecido vegetal foram macerados e o RNA total de cada órgão foi extraído como descrito

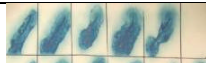
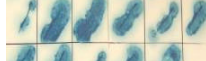

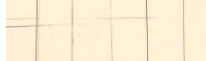
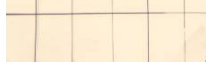
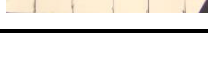
item 3.6.2. A reação de RT-PCR foi desenvolvida da maneira descrita em 3.6.3, utilizando 2 µg do RNA total como molde e oligo dT. Para a reação de PCR, foi utilizado 1 µL de cDNA e os oligonucleotídeos 4317 e 4318, específicos para a região de prolina do gene *NAP* (Quadro 1).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de proteínas de *Arabidopsis* que interagem com a proteína NSP do CaLCuV.

Foi utilizado o sistema de duplo-híbrido em levedura para detectar proteínas que se ligam a NSP de geminivírus. A construção de DNA pBD-NSPCLCV contém a proteína NSP do CaLCuV fusionada ao domínio de GAL4 pBD de ligação ao DNA (isca). As outras construções foram obtidas a partir de cDNA de *Arabidopsis* fusionados ao domínio de GAL4 pAD de ativação (presas). A interação entre a proteína NSP e as proteínas do hospedeiro foram detectadas quando linhagens de leveduras MaV203 foram co-transformadas com ambas as construções de pBD-NSPCLCV e aquelas derivadas do vetor pAD-GAL4. Os transformantes independentes (5×10^6) foram plaqueados em meio seletivo e avaliados quanto à auxotrofia por histidina e uracila e ativação do gene de β -galactosidase. As colônias que apresentam proteínas que interagiram são capazes de crescer em meio sem histidina, sem uracila e apresentam atividade de β -galactosidase. Foram detectadas três proteínas que interagem com NSP: PERK-like quinase, nucleoporina-like e peroxidase (Quadro 2). Como controle negativo, foi demonstrado que o vetor vazio pBD (isca) não interagiu com nenhuma das referidas proteínas.

Quadro 2. Interação de NSP com proteínas do hospedeiro

ISCA	PRESA	HIS -	URA -	b-GAL
NSP	PERK-LIKE QUINASE	+	+	
NSP	NUCLEOPORINA-LIKE	+	+	
NSP	PEROXIDASE	+	+	
VETOR	PERK-LIKE QUINASE	-	-	
VETOR	NUCLEOPORINA-LIKE	-	-	
VETOR	PEROXIDASE	-	-	

Nesse trabalho é descrita a caracterização da nucleoporina-like, designada NAP (“NSP-Associated Protein”). O referido cDNA isolado codifica o carboxiterminal (aminoácidos 460 a 602) da nucleoporina-like, que corresponde a um domínio rico em prolina. Experimentos adicionais, utilizando NSP de outros geminivírus como isca, demonstraram que o C-terminal da nucleoporina-like também interage com NSP de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e de *Tomato crinkle leaf yellows virus* (TCrLYV) (Quadro 3). Estes resultados indicam que a interação de NSP com a proteína do hospedeiro NAP é conservada entre NSPs de outros geminivírus. Uma proteína não relacionada com NAP, a SBP, proteína de soja que se liga a sacarose, não interagiu com NSP, confirmando a especificidade da formação do complexo NSP-NAP em leveduras.

Quadro 3. Interação de NSP de geminivírus com a nucleoporina-like (NAP) em leveduras

Presa	pAD-PRNAP				pAD-SBP			
	+U +H	-H +3AT	-U	+β-Gal ^a	+U +H	-H +3AT	-U	+β-Gal
Isca								
pBD-NSPCLCV	+	+	+	0.633 ± 0.121	+	-	-	0.0
pBD-NSPTGMV	+	+	+	0.473 ± 0.076	+	-	-	0.0
pBD-NSPTCrYLV	+	+	+	0.551 ± 0.102	+	-	-	0.0
pBD-Leu	+	-	-	0.0	+	-	-	0.0

^aValores de atividade correspondem à média ± o desvio padrão de quatro repetições. (U) Uracila; (H) Histidina; (3AT) 25 mM 3-aminotriazol; (β-Gal) atividade de β-galactosidase.

4.2. Caracterização estrutural da proteína NAP.

A nucleoporina-like, designada NAP (“NSP-Associated Protein”), é codificada pelo gene At4g13350 de acordo com a homologia da seqüência de *NAP* de 100% com o gene de *Arabidopsis thaliana* no banco de dados NCBI (Figura 5). Esse gene se encontra no cromossomo 4 do genoma.

```

Query 173  GCAAACTGATTCAACAAAGAAGAATCAAAATCTC CAGAAAATTCGATCGTC GTTGAAGA 232
Sbjct 173  GCAAACTGATTCAACAAAGAAGAATCAAAATCTC CAGAAAATTCGATCGTC GTTGAAGA 232

Query 233  TTCGTCTCAGTTTCTAGCTTAGTGTTTTGGAATCGAAAATGGCGGGTC GAGTTAAAGAAG 292
Sbjct 233  TTCGTCTCAGTTTCTAGCTTAGTGTTTTGGAATCGAAAATGGCGGGTC GAGTTAAAGAAG 292

Query 293  ACGAGAAGAAC GAGAAGATTATTAGGAGTCTTCTTAAACTTC CTGAGAATAAGAGGTGTA 352
Sbjct 293  ACGAGAAGAAC GAGAAGATTATTAGGAGTCTTCTTAAACTTC CTGAGAATAAGAGGTGTA 352

Query 353  TAAACTGTAAACAGCCTTGGAC CACAATATGTTTTGCACTACTTCTGGACTTTTGTGTTGTA 412
Sbjct 353  TAAACTGTAAACAGCCTTGGAC CACAATATGTTTTGCACTACTTCTGGACTTTTGTGTTGTA 412

Query 413  CCAACTGCAGTGGAAATACATC GTGAGTTTACACATC GTGTTAAATCGATATCAATGGC GA 472
Sbjct 413  CCAACTGCAGTGGAAATACATC GTGAGTTTACACATC GTGTTAAATCGATATCAATGGC GA 472

Query 473  AATTTACCTCA CAAGAAGTTA CTGCTTTGAAA GAAGGTGAAATCAGCATGC TAAGGATA 532
Sbjct 473  AATTTACCTCA CAAGAAGTTA CTGCTTTGAAA GAAGGTGAAATCAGCATGC TAAGGATA 532

Query 533  TTTATTTAAA GGATTGGATCAACAGCGGCAAT CAGTGCCTGACGGAA GTAATGTTGAGC 592
Sbjct 533  TTTATTTAAA GGATTGGATCAACAGCGGCAAT CAGTGCCTGACGGAA GTAATGTTGAGC 592

Query 593  GGTTAAGGCATTCATCAGAC ATGTGTATGTAAATAAAAAGGTATACGAATGAGAAGAATG 652
Sbjct 593  GGTTAAGGCATTCATCAGAC ATGTGTATGTAAATAAAAAGGTATACGAATGAGAAGAATG 652

Query 653  ATGATAAGTCTCCAAGTGAGACACGTA GTTCTAGTGTTCTC GGAGTC CACCTTATGAAG 712
Sbjct 653  ATGATAAGTCTCCAAGTGAGACACGTA GTTCTAGTGTTCTC GGAGTC CACCTTATGAAG 712

Query 713  ATGGATATGACCGTC GTTACGGCGACAGATCAAATC CTGGTGGGAGAA GTCCAGGGTTCCG 772
Sbjct 713  ATGGATATGACCGTC GTTACGGCGACAGATCAAATC CTGGTGGGAGAA GTCCAGGGTTCCG 772

Query 773  AGACGGTAGTAGGAATGCTGTTAATAACAGAAAAAGCCCTGCTCCTGCTCAGATCCTGA 832
Sbjct 773  AGACGGTAGTAGGAATGCTGTTAATAACAGAAAAAGCCCTGCTCCTGCTCAGATCCTGA 832

Query 833  ATGATTGGCGCAGAGAGGATA GGTTTGGGGTAGAAAAACATCAGAAGAGGGCTCCCACT 892
Sbjct 833  ATGATTGGCGCAGAGAGGATA GGTTTGGGGTAGAAAAACATCAGAAGAGGGCTCCCACT 892

Query 893  CACCTGAGCAA GTAAAAGACTTGGGTT CAGCTAGCC CTCCTGTAGCTC GACCTGTTAGGG 952
Sbjct 893  CACCTGAGCAA GTAAAAGACTTGGGTT CAGCTAGCC CTCCTGTAGCTC GACCTGTTAGGG 952

Query 953  AAAATTTGGGTGACAGTGTATTCCCTCTTCGTGTGGGAGAGCCTCCAAAACC CCCTGTCA 1012
Sbjct 953  AAAATTTGGGTGACAGTGTATTCCCTCTTCGTGTGGGAGAGCCTCCAAAACC CCCTGTCA 1012

Query 1013  GTAGAAATACC GATGCTTCAGCACATGCAAAATCAGGTACATCATTGAGTAGTTTAAATGT 1072
Sbjct 1013  GTAGAAATACC GATGCTTCAGCACATGCAAAATCAGGTACATCATTGAGTAGTTTAAATGT 1072

Query 1073  CCACAAATGAGAAGC CACCAGAAGTGAAGCTGGAGACTGCTTTAAGCCTGATTGATTTG 1132
Sbjct 1073  CCACAAATGAGAAGC CACCAGAAGTGAAGCTGGAGACTGCTTTAAGCCTGATTGATTTG 1132

Query 1133  ATACTGATTTT GAAACTCCTGCTCCATCTGTTGCAATTC AAGCACCCTATCGACCACAT 1192
Sbjct 1133  ATACTGATTTT GAAACTCCTGCTCCATCTGTTGCAATTC AAGCACCCTATCGACCACAT 1192

```

Figura 5. Alinhamento da seqüência do gene *NAP* no banco de dados NCBI. A homologia da seqüência de *NAP* (Query) foi de 100% com a seqüência do gene At4g13350 de *Arabidopsis thaliana* (Sbjct).

Em *Arabidopsis*, foram detectados dois genes homólogos a *NAP*, o gene At1g08680, com 33% de identidade de seqüência e o gene At4g32630, com 31% de identidade de seqüência e, que possivelmente codificam proteínas, mas suas funções ainda não são conhecidas. O gene At1g08680 codifica uma proteína com domínio ARF-GAP com dedo-de-zinco, similar à proteína de interação à Rev humana, a nucleoporina-like hRIP ("Rev Interacting Protein"). A homologia da porção N-terminal, que apresenta o domínio ARF-GAP é de 75% entre os genes At1g08680 e At4g13350, como indicado na Figura 6. Em *Homo sapiens* foi identificada homologia de 23% do gene *NAP* com o gene da nucleoporina-like hRIP. Essa nucleoporina interage com a proteína do vírus HIV, Rev, que atua no transporte do vírus do núcleo para o citoplasma, exercendo a mesma função de NSP dos geminivírus.

```

Query  288  AGAAGACGAGAAGAACGAGAAGATTATTAGGAGTCTTCTTAAACTTCCTGAGAATAAGAG  347
      |||||  |||  ||||||||||||||||  |  |  |||  |  ||  |||||  |||  |
Sbjct  232  AGAAGAAGAGAGGAACGAGAAGATTATTCGTGGGCTTATGAAGCTTCCACCGAATCGTCG  291

Query  348  GTGTATAAACTGTAACAGCCTTGGACCACAATATGTTTGCCTACTTTCTGGACTTTTGT  407
      |||||  |||||  ||  ||||||||  ||  ||||||||||||||||  ||||||||||||  ||  ||
Sbjct  292  TTGTATCAACTGCAATAGCCTTGGCCCTCAATATGTTTGCACAACCTTCTGGACCTTCGT  351

Query  408  TTGTACCAACTGCAGTGAATACATCGTGAGTTTACACATCGTGTTAAATCGATATCAAT  467
      ||  |  ||  ||  ||  |||||  ||  ||  ||  ||  ||||||||  |||||  |  |||||
Sbjct  352  ATGCATGGCTTGTAGCGGGATACACCGGAATTCACCTCATCGTGTGAAATCTGTGTCAAT  411

Query  468  GGCGAAATTTACCTCACAAGAAGTT  492
      |  |  ||  |||||  ||  ||||||||
Sbjct  412  GTCAAAGTTTACTTCTAAAGAAGTT  436

```

Figura 6. Análise de homologia de seqüência no banco de dados NCBI de um fragmento N-terminal do gene *NAP* (Query) com o gene At1g08680 de *Arabidopsis thaliana* (Sbjct) com 75% de homologia de seqüência.

A partir da seqüência primária da proteína *NAP* ($M_r=65030$ e $pI=6,91$), de 602 resíduos de aminoácidos foram identificadas algumas seqüências importantes na sua estrutura primária (Figura 7).

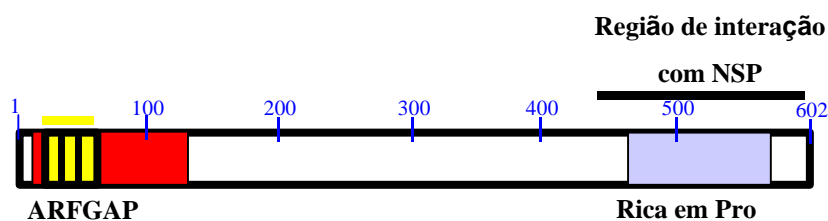


Figura 7. Esquema da proteína NAP de *Arabidopsis thaliana* em escala. Através da seqüência primária de resíduos de aminoácidos foram detectadas regiões importantes: como um domínio dedo-de-zinco ZF-BBOX (amarelo) característico de proteínas ativadoras de GTPase de Arf (ARF-GAP, em vermelho) e uma região de interação com NSP (lilás), rica em resíduos de aminoácidos Prolina (aminoácidos 460 a 602).

4.3. Interação *in vitro* de HIS-NAP com GST-NSP.

Com a finalidade de confirmar a interação específica entre NAP e NSP foi realizado um ensaio de ligação direta de proteínas. Para isso, a proteína viral NSP e a proteína NAP foram induzidas e purificadas de *Escherichia coli* BL21:DE3 (pLYSs) com etiquetas diferentes (Figura 8) para ser possível purificar GST-NSP com coluna de afinidade e verificar se HIS-NAP se ligou à NSP. Os clones pGST-PRNAP (Figura 8 A), pHIS-NAP (Figura 8 B) e pHIS-PRNAP (Figura 8 D) foram induzidos, produzindo, respectivamente, as proteínas PRNAP (fragmento de região rica em prolina da proteína NAP, aminoácidos 460-602) fusionada a GST, NAP fusionada à cauda de His e PRNAP fusionada à cauda de His.

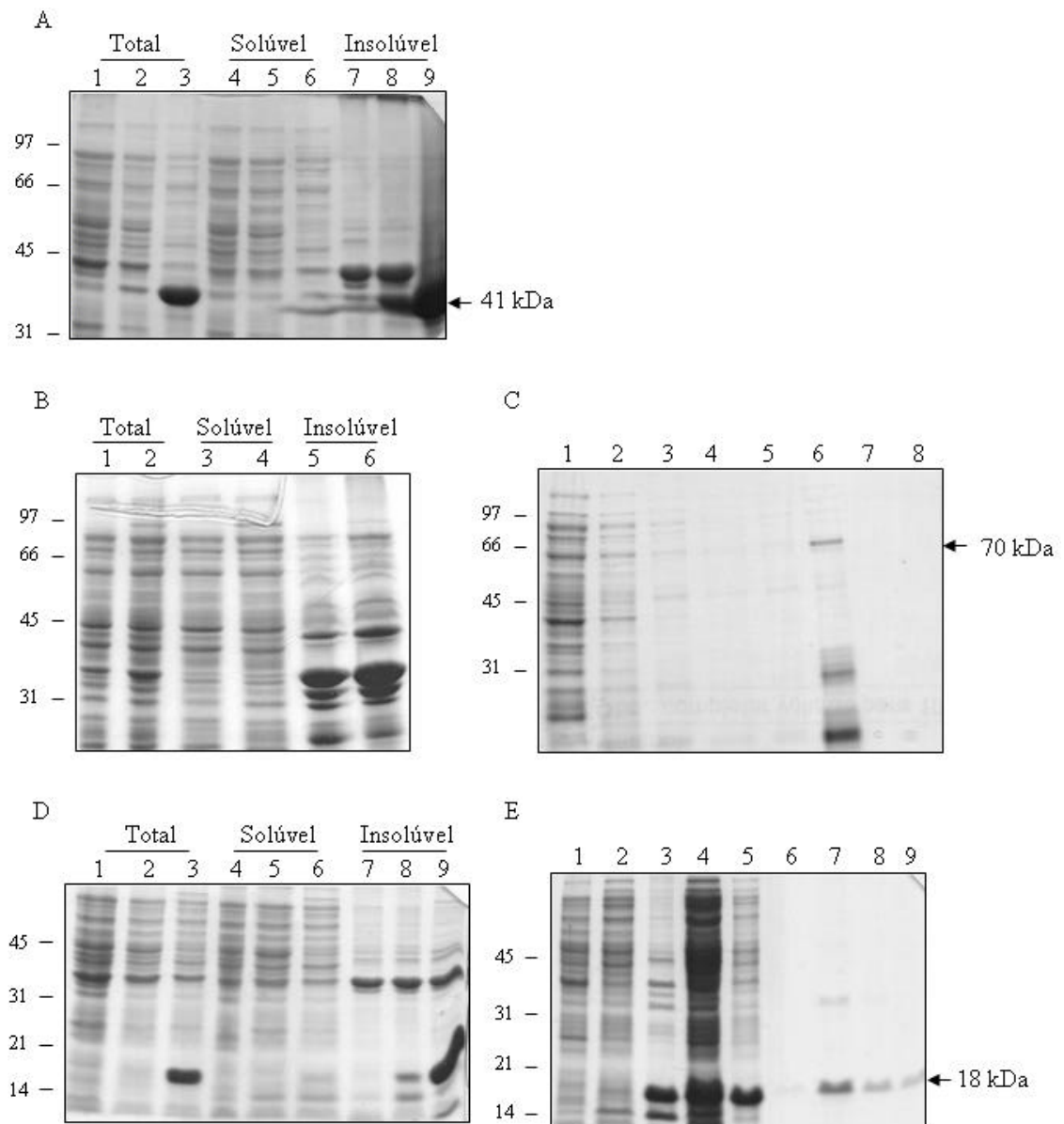


Figura 8. Indução e purificação de proteínas heterólogas. Os valores de massa molecular estão indicados à esquerda em kDa. (A) Indução da proteína pGST-PRNAP em *E. coli*. Extratos de proteína total obtidas de células não transformadas (colunas 1, 4 e 7) e de células transformadas, não induzidas (colunas 2, 5 e 8) e induzidas com IPTG (colunas 3, 6 e 9) foram separadas por SDS-PAGE. (B) Indução da proteína pHIS-NAP. 1 e 2-Correspondem à Fração Total. 3 e 4- Correspondem à Fração Solúvel e 5 e 6-Correspondem à Fração Insolúvel de bactéria transformada induzida e não induzida de cada fração respectivamente. (C) Purificação de pHIS-NAP. Os números de 1 a 5 são as lavagens feitas na resina de Ni-NTA. 6, 7 e 8 são as primeira, segunda e terceira eluições, respectivamente. (D) Indução da proteína pHIS-PRNAP na mesma ordem que em A. (E) Purificação de pHIS-PRNAP. 1- é a fração não ligante na resina, 2 a 6 são as lavagens feitas na resina de Ni-NTA. 7, 8 e 9- são primeira, segunda e terceira eluições.

A proteína GST-PRNAP, com massa molecular de 41 kDa (Figura 8 A), foi eficientemente expressa em bactéria, porém acumulou na fração insolúvel (coluna 9), o

que inviabilizou sua purificação em resina de afinidade, pois a interação de GST com a glutationa da resina necessita da cauda GST na conformação nativa. Similarmente, a proteína recombinante pHIS-PRNAP (Mr 18.000) foi eficientemente induzida (Figura 8 D) com acúmulo predominante na fração insolúvel (coluna 9). A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de Níquel (Ni-NTA) em condições desnaturantes (Figura 8 E). O contaminante de alto peso molecular persistiu, sendo, possivelmente uma proteína bacteriana com uma seqüência de His ou um dímero formado pela associação de duas moléculas de HIS-PRNAP. A proteína recombinante HIS-PRNAP parcialmente purificada foi utilizada na produção de anticorpos (Apêndice 1).

O clone pHIS-NAP foi induzido com IPTG produzindo uma proteína recombinante de massa molecular de 70 kDa (Figura 8 B, coluna 2) e a proteína HIS-NAP foi purificada (Figura 8 C) com resina Ni-NTA. Algumas proteínas contaminantes de massa molecular na faixa de 20-30 kDa persistiram na eluição da proteína e provavelmente representam produtos de degradação da proteína recombinante e/ou proteínas de bactérias associadas à proteína HIS-NAP. A proteína parcialmente purificada, com sua seqüência completa e na forma nativa foi utilizada no ensaio de interação *in vitro*.

Como a proteína do hospedeiro purificada foi com sintetizada com a etiquetagem de HIS, a proteína NSP foi obtida com outra etiquetagem (GST), tornando possível sua purificação em resina de afinidade de glutaciona, onde a cauda de GST se liga (Figura 9, coluna 2). A proteína HIS-NAP somente foi retida pela resina Sepharose-GST que havia sido ligada à proteína GST-NSP, comprovando a interação entre as proteínas HIS-NAP (70 kDa) e GST-NSP (52 kDa) *in vitro* (Figura 9, coluna 4). Nessa interação aparecem outras proteínas que possivelmente estavam previamente associadas à proteína NAP (Figura 9, coluna 1). A interação de NAP demonstrou ser específica com NSP, pois HIS-NAP não interagiu com a cauda de GST sozinha (Figura 9, coluna 5).

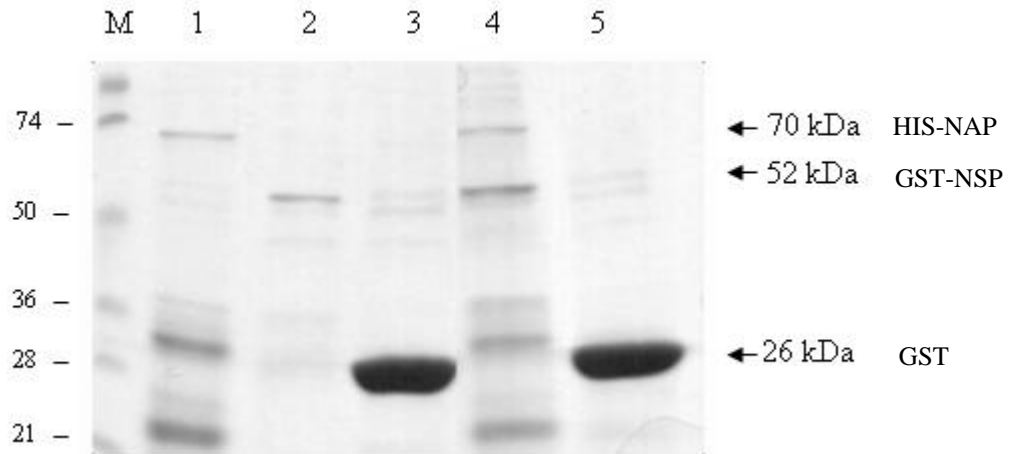


Figura 9. Interação *in vitro* de NSP e NAP. A proteína recombinante HIS-NAP purificada (coluna 1) foi incubada com GST-NSP (coluna 2) ou GST (coluna 3) e adsorvidas em glutationa-Sepharose. 4- Interação de HIS-NAP com GST-NSP e 5- Mistura de HIS-NAP com GST. M- Marcador de massa molecular em kDa, cujos valores estão indicados à esquerda.

4.4. Padrão de expressão do gene *NAP* nos diferentes órgãos da planta.

Por meio de um RT-PCR semi-quantitativo, foi analisado o padrão de expressão da proteína NAP nos diferentes órgãos da planta selvagem Col-0, indicando uma expressão constitutiva do gene em todos os órgãos da planta, como flor, folha, raiz, inclusive em plântulas (Figura 10 A). A quantidade de RNA total utilizada para a reação de RT-PCR foi similar em todas as amostras de tecidos, indicada pela expressão constitutiva do gene da actina de *Arabidopsis* (Figura 10 B).

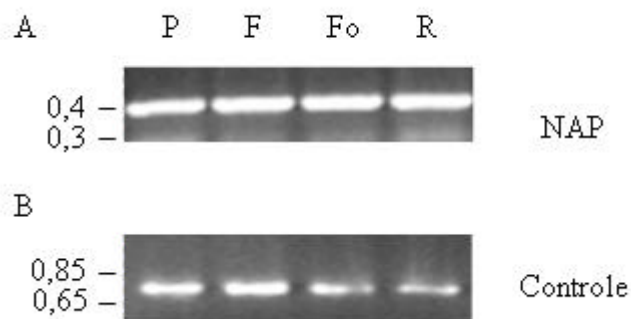


Figura 10. Expressão de *NAP* nos diferentes órgãos da planta (P) Plântulas, (F) Flor, (Fo) Folha e (R) Raiz. (A) RT-PCR semi-quantitativo das amostras de tecidos usando oligonucleotídeos específicos para o gene *NAP*. O tamanho molecular do

produto da reação é de 0,4 kb. (B) RT-PCR semi-quantitativo das mesmas amostras citadas acima com oligonucleotídeos para o gene da actina.

4.5. Obtenção de plantas *nap* em homozigose e plantas superexpressando *NAP*.

Para determinar a relevância biológica da interação NAP-NSP, foi identificado um mutante por inserção de T-DNA para o gene *NAP* (Figura 11 A). O gene *NAP* (At4g13350) possui 12 éxons e 11 íntrons, sendo que o T-DNA interrompe o gene no 8º éxon. As plantas *nap*, obtidas no Instituto Salk, em homozigose para o locus do T-DNA, foram selecionadas por meio de PCR, utilizando um conjunto de dois oligonucleotídeos senso e anti-senso, específico para o gene *NAP*, além de um oligonucleotídeo senso que anela no T-DNA. A amplificação de um fragmento de 1000 pb demonstra a presença de alelos selvagens (Figura 11 B, coluna Wt), enquanto que a presença de uma única banda de 500 pb confirma a inserção do T-DNA nos dois alelos de At4g13350 (Figura 11 B, *nap*). A banda amplificada corresponde ao tamanho entre o T-DNA e a extremidade 3' do gene. Um RT-PCR de amostra de RNA de plântulas selvagem Col-0 e *nap* foi desenvolvido para analisar se não havia expressão do gene nos mutantes e certificar que o mutante *nap* selecionado era de fato alelo nulo.

Para o RT-PCR, foram utilizados oligonucleotídeos específicos que anelam em éxons adjacentes do gene *NAP* e conseqüentemente são capazes de distinguir entre os produtos de amplificação do cDNA (Figura 11 C, coluna 1) e DNA genômico (Figura 11 C, coluna 3). Dessa forma, confirmou-se que o mutante knock-out não expressava o gene *NAP* (Figura 11 C, coluna 2), ao contrário de plantas selvagens Col-0, nas quais a presença de transcritos do gene *NAP* foi detectada (Figura 11 C, coluna 1).

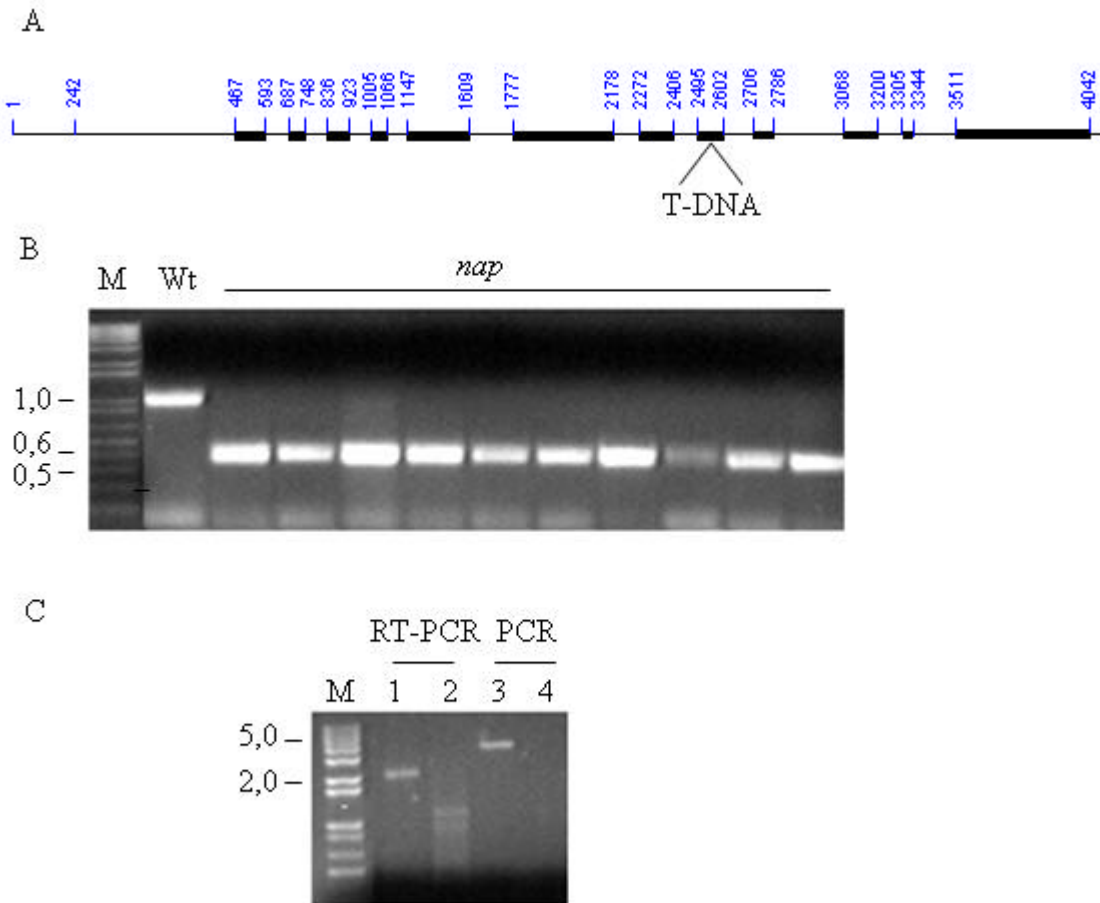


Figura 11. Linhagens de mutante em homozigose nulos, *nap*. (A) Esquema do gene At4g13350 em escala de pares de base, indicando os íntrons (linhas) e éxons (caixas pretas). O local de inserção do T-DNA está indicado no 8º éxon e não é apresentado em escala. O mutante *nap* é designado SALK 014974. (B) PCR de plantas *nap* em homozigose. Wt indica a planta selvagem Col-0. (C) RT-PCR confirmando a ausência de transcritos de NAP nas plantas *nap* (coluna 2) e a presença dos mesmos na linhagem selvagem Col-0 (coluna 1). Como comparação, é mostrada a reação de PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos e DNA genômico de planta selvagem Col-0 e *nap* como molde (colunas 3 e 4, respectivamente). M é o marcador de tamanho molecular. Os tamanhos correspondentes estão indicados ao lado em kb.

Para o mesmo propósito de obtenção de plantas mutantes para o gene *NAP*, foram obtidas também plantas transgênicas com as construções 35S-NAP (Figura 12 A), 35S-NAP-GFP (Figura 12 B) e 35S-NAP-TAP (Figura 12 C). O acúmulo de transcrito foi maior nas plantas superexpressando NAP: 35S-NAP, 35S-NAP-GFP e 35S-NAP-TAP (Figura 12 D, *NAP*, colunas 2, 3 e 4, respectivamente), comparado ao acúmulo de transcrito em Col-0 (Figura 12 D, *NAP*, coluna 1). A mesma quantidade de RNA foi utilizada em todas as amostras, demonstrado pela reação com os oligonucleotídeos para a actina, gene constitutivo (Figura 12 D, Controle).

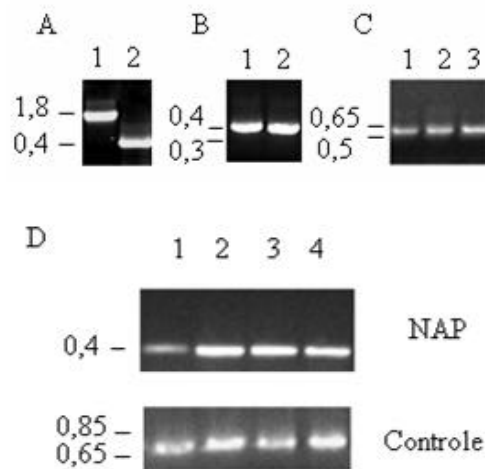


Figura 12. Diagnóstico molecular de plantas transformadas. (A) PCR diagnóstico das linhagens 35S-NAP. 1- com oligonucleotídeos MC36 (senso) e 4264, específico para o gene *NAP* (anti-senso) e 2- com oligonucleotídeos específicos para o gene *NPT*, que confere resistência a canamicina. (B) PCR diagnóstico das linhagens 35S-NAP-GFP 1- com oligonucleotídeo 4317 (senso), para a região de prolina do gene *NAP* e oligonucleotídeo 4799 (anti-senso) para o gene *GFP* e 2- com oligonucleotídeos específicos para o gene *NPT*. (C) PCR diagnóstico das linhagens 35S-NAP-TAP (1, 2 e 3) com oligonucleotídeo para o gene *NAP* na região de prolina (senso) e oligonucleotídeo 5250 para cauda TAP (anti-senso). (D) *NAP*- Análise da expressão dos transgenes. O acúmulo do transcrito de *NAP* foi analisado por RT-PCR semi-quantitativo usando oligonucleotídeos específicos para a região de prolina do gene *NAP*. 1-transcrito de Col-0; 2- transcrito de 35S-NAP; 3- transcrito de 35S-NAP-GFP; 4- transcrito de 35S-NAP-TAP. Controle- as mesmas amostras foram usadas em um RT-PCR semi-quantitativo com oligonucleotídeos para actina. Os valores do tamanho molecular estão indicados à esquerda em kb.

As plantas *nap*, 35S-NAP e 35S-NAP-GFP foram utilizadas em ensaios de infectividade com o vírus CaLCuV.

4.6. Ensaios de infectividade de CaLCuV em *Arabidopsis thaliana* transgênicas.

As plantas Col-0, *nap*, 35S-NAP e 35S-NAP-GFP foram inoculadas com 1 cópia e meia do componente A e componente B do vírus CaLCuV, associados a partículas de tungstênio. Através da análise dos sintomas das plantas e do acúmulo do DNA viral por

PCR, foi avaliada a percentagem de plantas infectadas ao longo do tempo após a infecção. Plantas inoculadas somente com tungstênio foram usadas como controle negativo.

As plantas Col-0 e *nap* inoculadas com o vírus CaLCuV A e CaLCuV B apresentaram sintomas característicos de geminivírus desde clorose foliar severa com retardamento no crescimento e no florescimento, a clorose branda e enrugamentos. Os sintomas de enrugamento foram também observados nas plantas inoculadas somente com tungstênio, devido à resposta ao próprio ferimento mecânico, causada pelo bombardeamento. Nesse experimento, esperava-se que as plantas mutantes *nap* fossem mais tolerantes ao vírus, visto que na ausência da nucleoporina que interage com a proteína de exportação nuclear do CaLCuV, o transporte intracelular do DNA viral seria dificultado e a infecção não seria eficiente. No entanto, isso não foi observado. Não houve diferença entre as plantas selvagens Col-0 e as plantas mutantes *nap* quanto ao número de plantas infectadas nem quanto à severidade dos sintomas (Figura 13 A). O acúmulo do DNA viral foi detectado nas plantas inoculadas com o vírus (Figura 13 B). Nas amostras de plantas em que não foram detectadas DNA viral, indica a ocorrência de escape do mesmo após o bombardeamento. Portanto, para a análise da percentagem de plantas infectadas só foram consideradas as plantas positivas na reação de PCR. Através das análises estatísticas desses dados, verificou-se que não houve diferença significativa entre a percentagem de plantas infectadas selvagens Col-0 e mutantes *nap* ($F=1,51$ e $p=0,34$) (Figura 13 C).

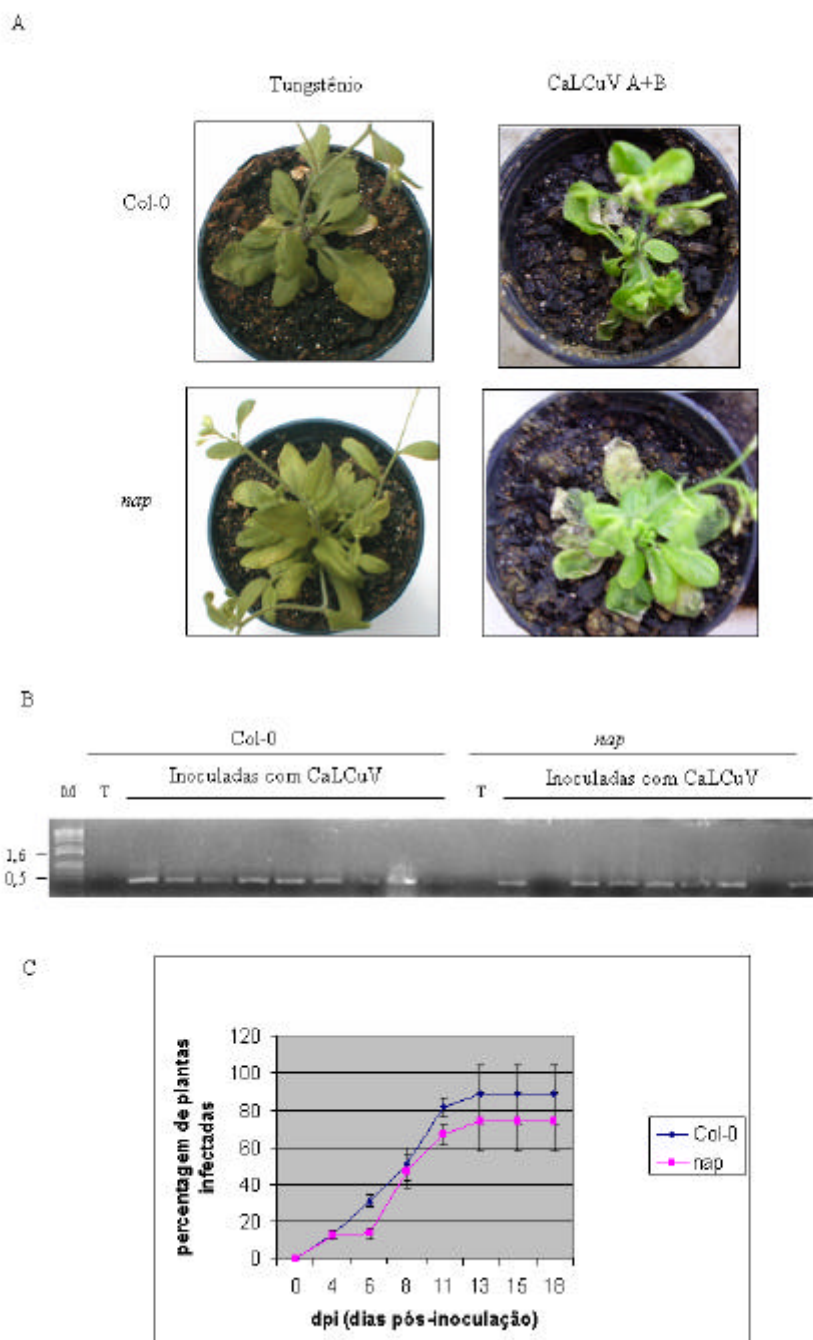


Figura 13. Inativação do gene *NAP* não causou efeito aparente na eficiência do processo de infecção. (A) Ensaio de infectividade em *Arabidopsis*, indicando as plantas selvagens Col-0 e as mutantes *nap* bombardeadas com uma cópia e meia do DNA-A e DNA-B de CaLCuV aderidos a partículas de tungstênio. Como controle, plantas foram inoculadas somente com tungstênio. (B) PCR diagnóstico do acúmulo de DNA viral nas plantas bombardeadas com vírus CaLCuV. Col-0 são plantas selvagens e *nap* são plantas mutantes. M- Marcador de peso molecular, cujos valores estão indicados em kb à esquerda. T- são plantas inoculadas somente com tungstênio. (C) Gráfico indicando percentagem de plantas infectadas em relação aos dias pós-inoculação (dpi).

As plantas superexpressando o gene *NAP* inoculadas com o vírus CaLCuV A e CaLCuV B apresentaram sintomas mais severos, como clorose foliar intensa, enrugamento, enrolamento foliar e epinastia severa, comparados aos sintomas de Col-0 (Figura 14 A). Apesar de a ausência do gene *NAP* não ter causado efeito significativo na infecção viral, a superexpressão do mesmo causou maior susceptibilidade da planta ao geminivírus, ocorrendo maior taxa de infecção e severidade nos sintomas. O acúmulo do DNA viral foi detectado nas plantas inoculadas com o vírus (Figura 14 B). As plantas superexpressando *NAP* (35S-*NAP* e 35S-*NAP*-GFP) atingem uma taxa de 50% de infecção em tempo menor, comparada às plantas selvagens Col-0 (Figura 14 C). Esses dados foram comprovados estatisticamente com $p=0,0183$.

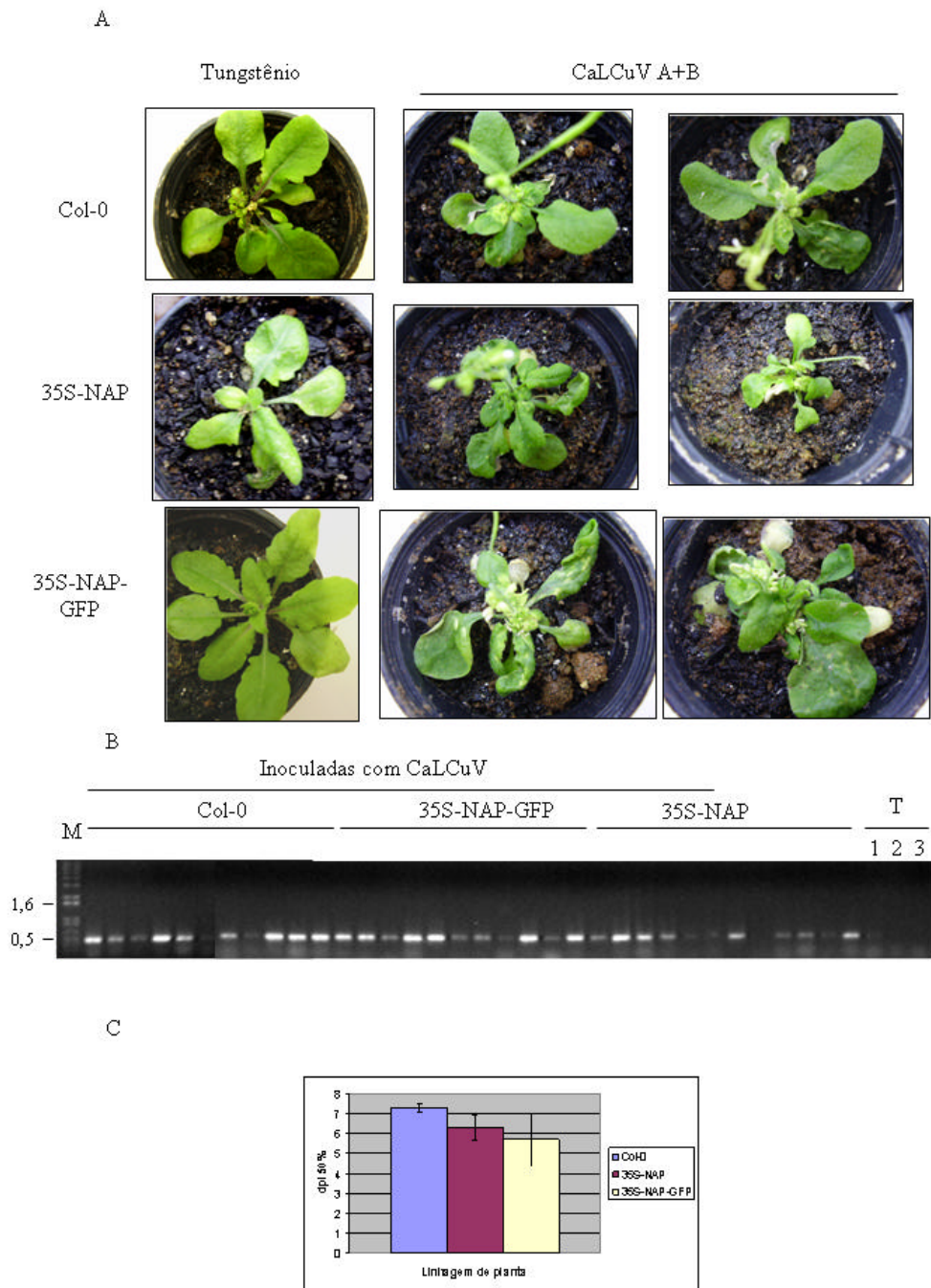


Figura 14. A superexpressão do gene *NAP* causou efeito aparente na eficiência do processo de infecção. (A) Ensaio de infectividade em *Arabidopsis*, indicando as plantas selvagens Col-0, 35S-NAP e 35S-NAP-GFP bombardeadas com uma cópia e meia do DNA-A e DNA-B de CaLCuV aderidos a partículas de tungstênio. Como controle, plantas foram inoculadas somente com tungstênio. (B) PCR diagnóstico do acúmulo de DNA viral nas plantas bombardeadas com vírus CaLCuV. Col-0 são plantas selvagens, 35S-NAP e 35S-NAP-GFP são plantas superexpressando *NAP*. M- Marcador de peso molecular, cujos valores estão indicados à esquerda. T- são plantas inoculadas somente com tungstênio, sendo as colunas 1, 2 e 3, as linhagens Col-0, 35S-NAP e 35S-NAP-GFP, respectivamente. (C) Gráfico indicando porcentagem de plantas infectadas dias pós-inoculação quando houve infecção de 50% das plantas (dpi 50%).

5. DISCUSSÃO

As pesquisas moleculares e bioquímicas dos geminivírus e sua interação com o hospedeiro têm contribuído muito para se entender o mecanismo de infecção viral e de defesa do hospedeiro, tornando possível o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, que sejam resistentes ou pelo menos mais tolerantes a esses vírus. A investigação de proteínas do hospedeiro que interagem com proteínas virais é de fundamental importância para a elucidação desses processos. A proteína NSP auxilia o transporte do genoma viral do núcleo para o citoplasma, essencial para que o vírus estabeleça uma infecção eficiente (Sanderfoot & Lazarowitz, 1996). Nesse trabalho, foi identificada uma nova proteína celular, designada NAP (“NSP-Associated Protein”) que interage com NSP do CaLCuV através da triagem de uma biblioteca de *Arabidopsis thaliana* usando NSP como isca. Baseado em homologia de seqüências, NAP foi classificada como uma nucleoporina-like. Embora a função de NAP seja desconhecida, diversas linhas de evidências indicam que a interação NAP-NSP é biologicamente relevante durante o processo de infecção viral. A interação específica entre NAP e NSP é conservada entre outros geminivírus, uma vez que NSPs de TGMV e de TCrLYV também interagem com NAP. Além disso, usando proteínas recombinantes, foi demonstrado que NSP interage com NAP *in vitro*, indicando que a interação entre as duas proteínas é específica e direta. Finalmente, interações específicas entre NSP e nucleoporinas de células infectadas podem ocorrer *in vivo*, uma vez que NSP facilita o

movimento intracelular do DNA viral entre o núcleo e citoplasma, através do poro nuclear.

A nucleoporina-like NAP (“NSP-Associated Protein”) é codificada pelo gene At4g13350, situado no cromossomo 4 de *Arabidopsis thaliana*, sendo expresso constitutivamente em todos os órgãos da planta, flor, folha, raiz e em plântulas. Este padrão de expressão constitutivo é típico de proteínas envolvidas em processos celulares básicos e essenciais. Pela predição da estrutura da proteína NAP, foi identificado um domínio de dedo-de-zinco, presente também em nucleoporinas voltadas para o núcleo (Nakielny *et al.*, 1999), característico de proteínas ativadoras da GTPase Arf. De forma semelhante, foi identificado na nucleoporina Nup153, um motivo dedo-de-zinco, no domínio de ligação a Ran, onde pequenas GTPases interagem (Nakielny *et al.*, 1999). Outra região identificada em NAP foi a região de interação com NSP, rica em resíduos de aminoácidos prolina.

A proteína Rev do vírus HIV atua de forma similar à proteína NSP de geminivírus no transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma (Ward & Lazarowitz, 1999). Em ensaios de duplo híbrido usando Rev como isca, foram isoladas as proteínas hRip e yRip da biblioteca de cDNA de humanos e leveduras, respectivamente (Bogerd *et al.*, 1995; Fritz *et al.*, 1995; Stutz *et al.*, 1995). Por análise de seqüência de aminoácidos, foi verificado que a proteína NAP possui homologia de 23% com a nucleoporina-like hRip de humanos. A proteína Rip em leveduras não é uma proteína essencial, entretanto, mutantes para esse gene revelaram possuir uma redução parcial na exportação mediada por Rev (Stutz *et al.*, 1995). Estas observações sugerem que a interação NSP-NAP pode ser funcionalmente análoga à interação hRip-Rev no processo de infecção viral.

Apesar de todas as evidências indicarem que a interação NSP-NAP é biologicamente relevante, a inativação do gene *NAP* não alterou significativamente a eficiência da infecção. Entretanto, estes resultados não foram totalmente inesperados uma vez que o genoma de *Arabidopsis* codifica dois genes homólogos do gene *NAP* que podem estar substituindo sua função na planta. Os homólogos At1g08680 e At4g32630 em *Arabidopsis*, cujas funções ainda são desconhecidas, apesar de apresentarem baixa homologia (33% e 31%, respectivamente) com *NAP*, possuem os domínios responsáveis pela ativação de pequenas GTPases (Arf GAP), que devem atuar no transporte da NSP ligada ao DNA viral. Baixa homologia de seqüências é uma característica comum de nucleoporinas funcionalmente análogas em mamíferos e leveduras (Vasu & Forbes, 2001; Nehrbass *et al.*, 1990; Carmo-Fonseca *et al.*, 1991). Visto que a função de NSP no

transporte intracelular do DNA viral é fundamental para a infecção viral, essa proteína deve interagir com outras nucleoporinas, substituindo a função de NAP nas plantas mutantes, similarmente em leveduras, onde ocorre o transporte na ausência da nucleoporina-like Rip, que não é uma proteína essencial (Stutz *et al.*, 1995). Além do mais, as plantas mutantes *nap* são fenotipicamente normais em relação às selvagens Col-0, indicando que NAP não é uma proteína essencial para o crescimento normal e desenvolvimento da planta, sugerindo que outras proteínas podem estar substituindo sua função em plantas não infectadas. Alternativamente, a interação NAP-NSP não é biologicamente relevante para o ciclo de infecção viral, constituindo um artefato de nossos experimentos *in vitro*.

A fim de distinguir entre essas duas possibilidades, foram realizados ensaios de infecção viral com plantas superexpressando o gene *NAP*. Essas plantas transgênicas, quando infectadas com CaLCuV, desenvolveram os sintomas típicos de geminivírus. No entanto, a intensidade desses sintomas, caracterizado por clorose foliar severa, enrolamento e epinastia, foi superior a dos sintomas em plantas selvagens. Isso indica que a superexpressão do gene pode estar aumentando a susceptibilidade da planta ao vírus, sugerindo que o excesso dessa proteína provoca maior taxa de transporte do DNA viral e conseqüente aumento na eficiência da infecção. As plantas superexpressando NAP atingem uma taxa de 50% de infecção em tempo menor, comparada às plantas selvagens Col-0. Em suporte a esta conclusão, análises estatísticas comprovaram a diferença significativa entre os tipos de plantas superexpressando NAP (35S-NAP e 35S-NAP-GFP) e Col-0 inoculadas com o vírus.

O vírus CaLCuV utilizado na infecção possui uma mutação na proteína da capa, apresentando sintomas atenuados na planta. O vírus selvagem causa sintomas muito severos, promovendo morte rápida do hospedeiro susceptível, dessa forma, usando o vírus atenuado é possível acompanhar todo o curso da infecção. Isso não causa nenhuma alteração no processo de infecção em si, pois a ausência da capa proteica do vírus não interfere no transporte do DNA viral de célula-a-célula. A capa proteica só é necessária para a passagem para o inseto vetor.

Estudos de análise funcional de poros nucleares, de nucleoporinas e do fenômeno de transporte intracelular núcleo-citoplasma em células de plantas são escassos na literatura. Recentemente, um gene que codifica a nucleoporina Nup133 de plantas foi identificado por clonagem posicional (Kanamori *et al.*, 2006). Foi demonstrado que Nup133 é essencial no processo de simbiose da bactéria *Rhizobium* e de fungos

micorrízicos em leguminosas. A presente investigação descreve a identificação de uma segunda nucleoporina-like em plantas que participa potencialmente do processo de infecção de geminivírus. Estes resultados poderão servir como fundamentos para investigações posteriores sobre o particionamento complexo e tráfico de macromoléculas do núcleo para o citoplasma em células de plantas.

6. APÊNDICES

Apêndice 1. Produção de anticorpos contra a proteína PRNAP e avaliação do soro imune.

A proteína truncada purificada a partir das células bacterianas, foi dialisada em tampão PBS 1X (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), liofilizada em Liofilizador Edwards Pirani 501 (Super Mudulyo) por 4 horas, a -60°C , a 10^{-1} atm e ressuspensa em água mili-Q. A proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976), em espectrofotômetro DU 650 BECKMAN com comprimento de onda de 595nm.

O anticorpo foi produzido em coelhos brancos, da raça Nova Zelândia, com 60 dias de idade, nos quais foram feitas três inoculações da proteína, sendo a 1ª com 50 μg de proteína em PBS 1X com adjuvante de Freund completo (Gibco) por via intravenosa na veia principal da orelha, e as duas subsequentes com 100 μg de proteína com adjuvante de Freund incompleto (Gibco) por via intramuscular com 15 dias de intervalo entre elas. Previamente às inoculações, foi coletado o sangue obtendo o anti-soro normal (pré-imune). As coletas de sangue foram feitas em veias periféricas da orelha com auxílio de um bisturi e usando-se xilol como dilatador de veias. A primeira coleta foi feita uma semana após a 1ª inoculação, totalizando três coletas com intervalo de uma semana entre elas. Em torno de 10 mL de sangue foi coletado em um béquer embalsamado de vaselina. O béquer foi deixado em banho-maria a 37°C por 2 horas, depois a 4°C durante 16 horas. O soro separado foi coletado em microtubos no gelo e

centrifugado a 8.000 x g a 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo e etiquetado.

A qualidade do anti-soro foi avaliada utilizando quatro concentrações diferentes da proteína purificada HIS-PRNAP 10 ng, 50 ng, 100 ng e 200 ng, diluídas em PBS 1X e fixadas em membrana de nitrocelulose por meio do BIO-DOT APPARATUS (Biorad), em três replicatas. Assim, três diluições do anti-soro em TBS-T 1X [Tris 10 mM, NaCl 1,5 mM, Tween 0,1% (v/v)] 1:500, 1:2000 e 1:5000 (Figura 15) foram testadas. As membranas foram mantidas sob agitação com os anti-soros por 16 h. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T 1X e incubados com o segundo anticorpo monoclonal anti-rabbit, imunoglobulinas Clone RG-16 conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma), diluído 1:5000. As membranas foram reveladas com os substratos da fosfatase alcalina NBT (8,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e BCIP (4,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Promega) com o tampão apropriado (Tris-HCl 100 mM pH 9,8, NaCl 100 mM, MgCl_2 50 mM).

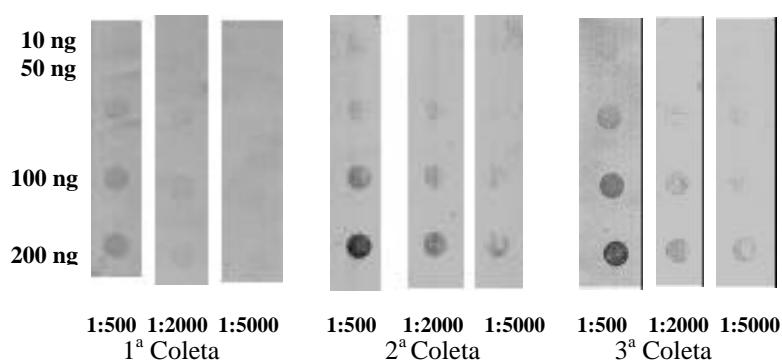


Figura 15. Dot-Blott do soro imune anti-NAP. Foram testadas 4 concentrações da proteína purificada HIS-PRNAP (10, 50, 100 e 200 ng) com 3 diluições diferentes do antisoro (1:500, 1:2000 e 1:5000). As três coletas foram analisadas para identificar a melhor coleta e melhor diluição do antisoro.

Apêndice 2. Seleção de plantas 35S-NAP e 35S-NAP-GFP em homozigose

Linhagens	Germinadas	Positivas	Negativas	X² ^a
35S-NAP 1.1	20	16	4	0,27
35S-NAP 1.4	33	30	3	4,45
35S-NAP 1.8	31	24	7	0,10
35S-NAP1.22	26	15	11	4,15
35S-NAP 1.25	23	14	9	2,45
35S-NAP 1.26	24	15	9	2,00
35S-NAP 1.27	16	10	6	1,33
35S-NAP 3.10	26	14	12	6,20
35S-NAP 3.12	14	4	10	16,19
35S-NAP 3.13	15	6	9	9,80
35S-NAP 3.14	31	23	8	0,01
35S-NAP 3.14	16	13	3	0,33
35S-NAP 3.15	31	15	16	11,71
35S-NAP 3.18	14	3	11	21,43
35S-NAP 7.23	26	25	1	6,20
35S-NAP 7.23	24	15	9	2,00
35S-NAP 7.23	13	9	4	0,23
35S-NAP 7.24	22	15	7	0,54
35S-NAP 7.25	35	29	6	1,15
35S-NAP 7.25	25	21	4	1,08
35S-NAP 7.25	21	16	5	0,02
35S-NAP 7.26	25	11	14	12,81
35S-NAP 7.31	22	15	7	0,54
35S-NAP 9.10	19	9	10	7,73
35S-NAP 9.11	31	13	18	18,07
35S-NAP 9.16	31	14	17	14,72
35S-NAP 9.18	38	8	30	20,99
35S-NAP 9.20	16	7	9	8,33
35S-NAP-GFP 54	39	18	21	17,31
35S-NAP-GFP 56	36	32	4	3,71
35S-NAP-GFP 57	24	18	6	0,00
35S-NAP-GFP 60	26	25	1	6,20

^a Os valores de X² aceitos foram de X² ≤ 3,8 com α=5%.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACH, R. A., DURFEE, T., MILLER, A. B., TARANTO, P., HANLEY-BOWDOIN, L., ZAMBRYSKI, P. C., GRUISSEM, W. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. **Molecular Cell Biology**, v.17, p.5077–5086, 1997.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, N., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. São Paulo: ArtMed, 2004. 1464 p.
- ALLEN, T. D., CRONSHAW, J. M., BAGLEY, S., KISELEVA, E., GOLDBERG, M.W. The nuclear pore complex. **Journal of Cell Science**, v.113, p.1651–1659, 2000.
- AMBROZEVICIUS, L. P., CALEGARIO, R. F., FONTES, E. P. B., CARVALHO, M. G., ZERBINI, F. M. Molecular detection and phylogenetic analysis of tomato- and weed infecting geminiviruses in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. v.27, p.372-377, 2002.
- BAGEWADI, B., CHEN, S., LAL, S. K., CHOUDHURY, N. R., MUKHERJEE, S. K. PCNA interacts with *Indian Mung Bean Yellow Mosaic Virus* Rep and downregulates Rep activity. **Journal of Virology**, v.78, p.11890–11903, 2004.
- BEDDOW, A. L., RICHARDS, S. A., OREM, N. R., MACARA, I. G. The Ran/TC4 GTPase-binding domain: identification by expression cloning and characterization

- of a conserved sequence motif. **Proc. Natl. Academic Science USA**, v.92, p.3328–3332, 1995.
- BEN-EFRAIM, I., GERACE, L. Gradient of Increasing Affinity of Importin β for Nucleoporins along the Pathway of Nuclear Import. **The Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 2, p. 411–417, 2001.
- BISCHOFF, F. R., KLEBE, C., KRETSCHMER, J., WITTINGHOFER, A., PONSTINGL, H. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear ras-related Ran. **Proc Natl. Academic Science USA**, v.91, p.2587–2591, 1994.
- BISCHOFF, F. R., KREBBER, H., KEMPF, T., HERMES, I., PONSTINGL, H. Human RanGTPase activating protein RanGAP1 is a homolog of yeast RNA1p involved in messenger RNA processing and transport. **Proc Natl Academic Science USA**, v.92, p.1749–1753, 1995a.
- BISCHOFF, F. R., KREBBER, H., SMIRNOVA, E., DONG, W. H., PONSTINGL, H. Coactivation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran GTP binding protein RanBP1. **The EMBO Journal**, v.14, p.705–715, 1995b.
- BISCHOFF, F. R., PONSTINGL, H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. **Nature**, v.354, p.480–482, 1991.
- BOGERD, H. P., FRIDELL, R. A., BENSON, R. E., HUA, J., CULLEN, B. R.. Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type I Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. **Molecular Cell Biology**, v.16, p.4207–4214, 1996.
- BOGERD, H. P., FRIDELL, R. A., MADORE, S., CULLEN, B. R. Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. **Cell**, v.82, p.485–494, 1995.
- BOTTCHER, B., UNSELD, S., CEULEMANS, H., RUSSELL, R. B., JESKE, H. Geminate structures of *African cassava mosaic virus*. **Journal of Virology**, v.78, p.6758–6765, 2004.
- CARMO-FONSECA, M., KERN, H., HURT, E.C. Human nucleoporin p62 and the essential yeast nuclear pore protein NSP1 show sequence homology and a similar domain organization. **European Journal of Cell Biology**, v.55, p.17-30, 1991.
- CARVALHO, M. F., LAZAROWITZ, S. G. Interaction of the movement protein NSP and the *Arabidopsis* acetyltransferase AtNSI is necessary for *Cabbage leaf curl geminivirus* infection and pathogenicity. **Journal of Virology**, v.78, p.11161–11171, 2004.

- CASTILLO, A. G., COLLINET, D., DERET, S., KASHOGGI, A., BEJARANO, E. R. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). **Virology**, v.312, p.381–394, 2003.
- CHI, N.C., ADAM, E. J. H., VISSER, G. D., ADAM, S. A. RanBP1 stabilises the interaction of Ran with p97 in nuclear protein import. **Journal of Cell Biology**, v.135, p. 559–569, 1996.
- COLE, C. N., HAMMELL, C. M. Nucleocytoplasmic transport: Driving and directing transport. **Current Biology**, v.8, p. R368–R372, 1998.
- COUTAVAS, E., REN, M., OPPENHEIM, J. D., D'EUSTACHIO, P., RUSH, M. G. Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. **Nature**, v.366, p.585–587, 1993.
- CULLEN, B. R., MALIM, M. H. The HIV-1 Rev protein: Prototype of a novel class of eukaryotic post-transcriptional regulators. **Trends in Biochemical Science**, v.16, p.346–350, 1991.
- DELPHIN, C., GUAN, T., MELCHIOR, F., GERACE, L. RanGTP Targets p97 to RanBP2, a Filamentous Protein Localized at the Cytoplasmic Periphery of the Nuclear Pore Complex. **Molecular Biology of the Cell**, v.8, p.2379–2390, 1997.
- DENG, D., OTIM-NAPE, W.G., SANGARE, A., OGWAL, S., BEACHY, R.N., FAUQUET, C.M. Presence of a new virus closely related to east *African cassava mosaic* geminivirus, associated with cassava mosaic outbreak in Uganda. **African Journal of Root Tuber Crops**, v.2, p.23-28, 1997.
- DINGWALL, C., KANDELS-LEWIS, S., SERAPHIN, B. A family of Ran binding proteins that includes nucleoporins. **Proc. Natl Academic Science USA**, v.92, p.7525–7529, 1995.
- ELMER, J. S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W., BISARO, D. M., ROGERS, S. G. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.7043–7060, 1988.
- FAHRENKROG, B., KOSER, J., AEBI, U. The nuclear pore complex: A jack of all trades? **Trends in Biochemical Science**, v.29, p.175–182, 2004.
- FARIA, J. C., ZERBINI, F. M. Família Geminiviridae-taxonomia, replicação e movimento. **RAPP**, v.8, p.27-57, 2000.

- FISCHER, U., HUBER, J., BOELEN, W. C., MATTAJ, I. W., LÜHRMANN, R. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. **Cell**, v.82, p.475–483, 1995.
- FONDONG, V.N., PITA, J.S., REY, M.E.C., De KOCHKO, A., BEACHY, R.N., FAUQUET, C.M. Evidence of synergism between *African cassava mosaic virus* and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, v.81, p.287-297, 2000.
- FONTES, E. P. B., EAGLE, P. A., SIPE, P. S., LUCKOW, V. A., HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.8459-8465, 1994a.
- FONTES, E. P. B., LUCKOW, V. A., HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **The Plant Cell**, v.4, p.597–608, 1992.
- FONTES, E. P. B., GLADFELTER, H. J., SCHAFFER, R. L., PETTY, I. T. D., HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **The Plant Cell**, v.6, p.405-416, 1994b.
- FONTES, E. P. B., SANTOS, A. A., LUZ, D. F., WACLAWOVSKY, A. J., CHORY, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. **Genes & Development**, v.18, p.2545–2556, 2004.
- FORNEROD, M., OHNO, M., YOSHIDA, M., MATTAJ, I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. **Cell**, v.90, p.1051–1060, 1997.
- FRIDELL, R. A., FISCHER, U., LÜHRMANN, R., MEYER, B. E., MEINKOTH, J., MALIM, M. H., CULLEN, B. R. Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1. **Proc Natl Academic Science USA**, v.93, p.2936–2940, 1996.
- FRITZ, C. C., ZAPP, M. L., GREEN, M. R. A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV. **Rev. Nature**, v.376, p.530–533, 1995.
- GAFNI, Y., EPEL, B. L. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.60, p.231-241, 2002.

- GALVÃO, R. M., MARIANO, A. C., LUZ, D. F., ALFENAS, P. F., ANDRADE, E. C., ZERBINI, F. M., ALMEIDA, M. R., FONTES, E. P. B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. **Journal of General Virology**, v.84, p.715–726, 2003.
- GÖRLICH, D., PANTÉ, N., KUTAY, U., AEBI, U., BISCHOFF, F. R. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. **The EMBO Journal**, v.15, p.5584–5594, 1996.
- GRANDI, P., DANG, T., PANE, N., SHEVCHENKO, A., MANN, M., FORBES, D. HURT, E. Nup93, a vertebrate homologue of yeast Nic96p, forms a complex with a novel 205-kDa protein and is required for correct nuclear pore assembly. **Molecular Biology of the Cell**, v.8, p.2017–2038, 1997.
- GUAN, T., MÜLLER, S., KLIER, G., PANTÉ, N., BLEVITT, J. M., HANER, M., PASCHAL, B., AEBI, U., GERACE, L. Structural analysis of the p62 complex, an assembly of *O*-linked glycoproteins that localizes near the central gated channel of the nuclear pore complex. **Molecular Biology of the Cell**, v.6, p.1591–1603, 1995.
- GUTIERREZ, C. Strategies for geminivirus DNA Replication and cell cycle interference. **Biological and Molecular Plant Pathology**, v.60, p.219-230, 2002.
- GUTIERREZ, C. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. **The EMBO Journal**, v.19, p.792–799, 2000.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR S., ROBERTSON, D. Geminiviruses models for plant DNA replication trascription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.1, p.71-106, 1999.
- HAO, L., WANG, H., SUNTER, G., BISARO, D. M. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. **The Plant Cell**, v.15, p.1034–1048, 2003.
- HARTMANN, E., GÖRLICH, D. A Ran-binding motif in nuclear pore proteins. **Trends in Cellular Biology**, v.5, p.192–193, 1995.
- HEHNLE, S., WEGE, C., JESKE, H. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. **Journal of Virology**, v.78, p.7698–7706, 2004.
- HILL, J. E., STRANDBERG, J. O., HIEBERT, E., LAZAROWITZ, S. G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of *Cabbage leaf curl virus* and *Squash leaf curl virus*: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. **Virology**, v.250, p.283-292, 1998.

- HÖHNLE, M., HÖFER, P., BEDFORD, I. D., BRIDDON, R. W., MARKHAM, P. G., FRISCHMUTH, T. Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible *Abutilon mosaic virus* isolate. **Virology**, v.290, p.164–171, 2001.
- HOPPER, A. K., TRAGLIA, H. M., DUNST, R. W. The yeast RNA1 gene product necessary for RNA processing is located in the cytosol and apparently excluded from the nucleus. **Journal of Cell Biology**, v.111, p.309–321, 1990.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- IZAURRALDE, E., KANN, M., PANTE, N., SODEIK, B., HOHN, T. Viruses, microorganisms and scientists meet the nuclear pore. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 2, p.289–296, 1999.
- IZAURRALDE, E., ADAM, S. Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. **RNA**, v.4, p.351–364, 1998.
- IZAURRALDE, E., KUTAY, U., VON KOBBE, C., MATTAJ, I. W., GÖRLICH, D. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. **The EMBO Journal**, v.16, p.6535–6547, 1997.
- KALDERON, D., ROBERTS, B. L., RICHARDSON, W. D., SMITH, A. E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. **Cell**, v.39, p.499-509, 1984.
- KANAMORI, N., MADSEN, L. H., RADUTOIU, S., FRANTESCU, M., QUISTGAARD, E. M. H., MIWA, H., DOWNIE, J. A., JAMES, E. K., FELLE, H. H., HAANING, L. L., JENSEN, T. H., SATO, S., NAKAMURA, Y., TABATA, S., SANDAL, N., STOUGAARD, J. From The Cover: A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. **Proc Natl Academic Science USA**, v.103, p.359-364, 2006.
- KONG, L. J., HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. **The Plant Cell**, v.14, p.1817–1832, 2002.
- KONG, L. J., OROZCO, B. M., ROE, J. L., NAGAR, S., OU, S., FEILER, H. S., DURFEE, T., MILLER, A. B., GRUISSEM, W., ROBERTSON, D., HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. **The EMBO Journal**, v.19, p.3485–3495, 2000.

- KUNIK, T., PALANICHELVAN, K., CZOSNEK, H., CITOVSKY, V., GAFNI, Y. Nuclear import of the capsid protein of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in plant and insect cells. **The Plant Journal**, v.13, p.393, 1998.
- KUTAY, U., BISCHOFF, F. R., KOSTKA, S., KRAFT, R., GÖRLICH, D. Export of Importin- α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. **Cell**, v.90, p.1061–1071, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAZAROWITZ, S. G, BEACHY, R. N. Viral movement proteins as probes or intracellular and intercellular trafficking in plants. **The Plant Cell**, v.11, p.535-548, 1999.
- LAZAROWITZ, S. G.. Geminivirus: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Science**, v.11, p.327-349, 1992.
- LECLERC, D., MERKLE, T., CHAPDELAIN, Y., HOHN, T. CaMV Gag is implicated in targeting the virion to the nucleus. **Journal of Virology**, v.73, 1999.
- LOUNSBURY, K. M., BEDDOW, A. L., MACARA, I. G. A family of proteins that stabilize the Ran/TC4 GTPase in its GTP-bound conformation. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.11285–11290, 1994.
- LUQUE, A., SANZ-BURGOS, A. P., RAMIREZ-PARRA, E., CASTELLANO, M. M., GUTIERREZ, C. Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. **Virology**, v.302, p.83–94, 2002.
- 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. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology**, v. 318, p. 24-31, 2004.
- MATTAJ, I. W., ENGLMEIER, L. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 265–306, 1998.
- MATUNIS, M. J., WU, J., BLOBEL, G. SUMO-1 Modification and Its Role in Targeting the Ran GTPase-activating Protein, RanGAP1, to the Nuclear Pore Complex. **Journal of Cell Biology**, v. 140, p. 499–509, 1998.
- MCGARRY, R. C., BARRON, Y. D., CARVALHO, M. F., HILL, J. E., GOLD, D., CHEUNG, E., KRAUS, W. L., LAZAROWITZ, S. G. A novel Arabidopsis

- acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. **The Plant Cell**, v.15, p.1605–1618, 2003.
- MELCHIOR, F., PASCHAL, B., EVANS, E., GERACE, L. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogs of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. **Journal of Cell Biology**, v.123, p.1649–1659, 1993.
- MOORE, M. S. Ran and Nuclear Transport. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.22857–22860, 1998.
- MOORE, M. S., BLOBEL, G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. **Nature**, v.365, p.661–663, 1993.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURPHY, R., WENTE, S. R. An RNA-export mediator with an essential nuclear export signal. **Nature**, v.383, p.357–360, 1996.
- NAKIELNY, S., SHAIKH, S., BURKE, B., DREYFUSS, G. Nup153 is an M9-containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain. **The EMBO Journal**, v.18, p. 982–1995, 1999.
- NEHRBASS, U., KERN, H., MUTVEI, A., HORSTMANN, H., MARSHALLSAY, B., HURT, E.C. NSP1: a yeast nuclear envelope protein localized at the nuclear pores exerts its essential function by its carboxy-terminal domain. **Cell**, v.61, p.979-990, 1990.
- OHTSUBO, M., OKAZAKI, H., NISHIMOTO, T. The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. **Journal of Cell Biology**, v.109, p.1389–1397, 1989.
- PADIDAM, M., BEACHY, R.N., FAUQUET, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. **Journal of General Virology**, v.76, p.249-263, 1995.
- PALMER, K.E., RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. **Advances in Virus Research**, v. 50, p. 183-234, 1998.
- PANTÉ, N., BASTOS, R., MCMORROW, I., BURKE, B., AEBI, U. Interactions and three-dimensional localization of a group of nuclear pore complex proteins. **Journal of Cell Biology**, v.126, p.603–617, 1994.

- PASCAL, E., SANDERFOOT, A. A., WARD, B. M., MEDVILLE, R., TURGEON, R., LAZAROWITZ, S. G. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. **The Plant Cell**, v.6, p.995-1006, 1994.
- PASCAL, E., GOODLOVE, P. E., WU, L. C., LAZAROWITZ, S. G. Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. **The Plant Cell**, v.5, p.795-807, 1993.
- RADU, A., MOORE, M. S., BLOBEL, G. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. **Cell**, v.81, p.215–222, 1995.
- RAGHAVAN, V., MALIK, P. S., CHOUDHURY, N. R., MUKHERJEE, S. K. The DNA-A Component of a Plant Geminivirus (*Indian Mung Bean Yellow Mosaic Virus*) Replicates in Budding Yeast Cells. **Journal of Virology**, v.78, p.2405–2413, 2004.
- REXACH, M., BLOBEL, G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. **Cell**, v.83, p.683–692, 1995.
- RIBBECK, K., GÖRLICH, D. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. **The EMBO Journal**, v.20, p.1320-1330, 2001.
- 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. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v.148, p.281–95, 2003.
- RIBEIRO, S. G., ÁVILA, A. C., BEZERRA, I. C., FERNANDES, J., FARIA, J. C., LIMA, M. F., GILBERTSON, R. L., ZAMBOLIM, E. M., ZERBINI, F. M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v.82, p.830, 1998.
- RICHARDS, S. A., LOUNSBURY, K. M., CAREY, K. L., MACARA, I. G. A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of the Ran binding protein, RanBP1. **Journal of Cell Biology**, v.134, p.1157–1168, 1996.
- ROBBINS, J., DILWORTH, S. M., LASKEY, R. A., DINGWALL, C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence:

- Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. **Cell**, v.64, p.615-623, 1991.
- ROJAS, M. R., HAGEN, C., LUCAS, W. J., GILBERTSON, R. L. Exploiting Chinks In The Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.361-394, 2005.
- ROJAS, M. R., GILBERTSON, R. L., MAXWELL, D. P. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses. **Plant Disease**, v.77, p.340-347, 1993.
- ROJAS, M. R., JIANG, H., SALATI, R., ZARES, B. X, SUDARSHANA, M. R., LUCAS, W. J., GILBERTSON, R. L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite *Begomovirus*, *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*. **Virology**, v. 291, p.110-125, 2001.
- ROUT, M. P., AITCHISON, J. D., SUPRAPTO, A., HJERTAAS, K., ZHAO, Y., CHAIT, B.T. The Yeast Nuclear Pore Complex: Composition, Architecture, and Transport Mechanism. **Journal of Cell Biology**, v.148, p.635–651, 2000.
- RYAN, K.J., WENTE, S.R. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. **Current Opinion in Cell Biology**, v.12, p.361–371, 2000.
- RYBICKI, E. P., BRIDDON, R. W., BROWN, J. K., FAUQUET, C. M., MAXWELL, D. P, HARRISON, B. D., MARKHAM, P. G., BISARO, D. M., ROBINSON, D., STANLEY, J. Geminiviridae. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., CARSTENS, E., ESTES, M. K., LEMON, S., MANILOFF, J., MAYO, J. A., McGEOCH, D. J., PRINGLE, C. R., WICKNER, R. (Eds.) **Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Nova York: Academic Press, 2000. p. 285-297.
- RYBICKI, E. P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of geminiviridae. **Archives of Virology**, v.139, p.49-77, 1994.
- SAAVEDRA, C., HAMMELL, C. M., HEATH, C. V., COLE, C. N. Export of heat shock mRNAs following stress in *Saccharomyces cerevisiae* employs a distinct pathway defined by Rip1p and also requires a subset of factors essential for export of poly(A)¹ mRNA. **Genes & Development**, v.11, p.2845–2856, 1997.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring harbor, 1989.

- SANDERFOOT, A. A., INGHAM, D. J., LAZAROWITZ, S. G. A Viral Movement Protein as a Nuclear Shuttle (The Geminivirus BR1 Movement Protein Contains Domains Essential for Interaction with BL1 and Nuclear Localization). **Plant Physiology**, v.110, p.23, 1996.
- SANDERFOOT, A. A., LAZAROWITZ, S. G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 6, p. 353-358, 1996.
- SCHAFFER, R. L., MILLER, C. G., PETTY, I. T. D. Virus and hostspecific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. **Virology**, v.214, p.330–338, 1995.
- SEGREF, A., SHARMA, K., DOYE, V., HELLWIG, A., HUBER, J., LÜHRMANN, R., HURT, E. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA reexport binds to both poly(A)1RNA and nuclear pores. **The EMBO Journal**, v.16, p.3256–3271, 1997.
- SELTH, L. A., DOGRA, S. C., RASHEED, M. S., HEALY, H., RANGLES, J. W., REZAIAN, M. A. A NAC domain protein interacts with *Tomato leaf curl virus* replication accessory protein and enhances viral replication. **The Plant Cell**, v.17, p.311–325, 2005.
- SETTLAGE, S. B., MILLER, A. B., GRUISSEM, W., HANLEY-BOWDOIN, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. **Virology**, v.279, p.570–576, 2001.
- SHULGA, N., MOSAMMAPARAST, N., WOZNIAK, R., GOLDFARB, D.S. Yeast Nucleoporins Involved in Passive Nuclear Envelope Permeability. **Journal of Cell Biology**, v. 149, p. 1027–1038, 2000.
- SMITH, A. E., SLEPCHENKO, B. M., SCHAFF, J. C., LOEW, L. M., MACARA, I. G. Systems analysis of Ran Transport. **Science**, v.295, p.488-491, 2002.
- SODEIK, B., EBERSOLD, M. W., HELENIUS, A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. **Journal of Cell Biology**, v.136, p.1007–1021, 1997.
- STADE, K., FORD, C. S., GUTHRIE, C., WEIS, K. Exportin 1(Crm1p) is an essential nuclear export factor. **Cell**, v.90, p.1041–1050, 1997.
- STOFFLER, D., FAHRENKROG, B., AEBI, U. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. **Current Opinion in Cell Biology**, v.11, p.391–401, 1999.

- STUTZ, F., NEVILLE, M., ROSBASH, M. Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. **Cell**, v.82, p.495–506, 1995.
- SUKEGAWA, J., BLOBEL, G. A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA and faces the nucleoplasm. **Cell**, v.72, p.29–38, 1993.
- SUNTER, G., BISARO, D. M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **The Plant Cell**, v.4, p.1321–1331, 1992.
- UHRIG, J. F., SOELICK T. R., MINKE, C. J., PHILIPP, C., KELLMANN, J. W., SCHREIER, P. H. Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: Identification and characterization of two interacting domains. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.96, p.55-60, 1999.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., CASTENS, E., ESTES, M. K., LEMON, S., MANILOFF, J., MAYO, J. A., McGEOCH, D. J., PRINGLE, C. R., WICKNER, R. **Virus Taxonomy: Seventh report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. Academic Press – New York, 1121 p. 2000.
- VASU, S. K.; FORBES, D. J. Nuclear pores and nuclear assembly. **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, p.363–375, 2001.
- WANG, H., HAO, L., SHUNG, C. Y., SUNTERAND, G., BISARO, D. M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. **The Plant Cell**, v.15, p. 3020–3032, 2003.
- WANG, H., BUCKLEY, K. J., YANG, X., BUCHMANN, R. C., BISARO, D. M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal of Virology**, v.79, p.7410–7418, 2005.
- WARD, B. M.; LAZAROWITZ, S. G. Nuclear Export in Plants: Use of Geminivirus Movement Proteins for a Cell-Based Export Assay. **The Plant Cell**, v.11, p.1267–1276, 1999.
- WEIS, K., DINGWALL, C., LAMOND, A. I. Characterization of the nuclear protein import mechanism using Ran mutants with altered nucleotide binding specificities. **The EMBO Journal**, v.15, p.7120–7128, 1996.
- WHITTAKER, G. R., HELENIUS, A. Nuclear import and export of viruses and virus genomes. **Virology**, v.246, p.1–23, 1998.

- WOZNIAK, R. W., ROUT, M. P., AITCHISON, J. D. Karyopherins and kissing cousins. **Trends in Cell Biology**, v.8, p.184–188, 1998.
- WU, J., MATUNIS, M. J., KRAEMER, D., BLOBEL, G., COUTAVAS, E. Nup358, a Cytoplasmically Exposed Nucleoporin with Peptide Repeats, Ran-GTP Binding Sites, Zinc Fingers, a Cyclophilin A Homologous Domain, and a Leucine-rich Region. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.14209–14213, 1995.
- YOKOYAMA, N. *et al.* A giant nucleopore protein that binds Ran/ TC4. **Nature**, v.376, p.184–188, 1995.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**, 3 ed. New Jersey:Prentice Hall, 1996. 662 p.
- ZHANG, S. C., GHOSH, R., JESKE, H. Subcellular targeting domains of Abutilon mosaic geminivirus movement protein BC1. **Archives of Virology**, v.147, p.2349-2363, 2002.
- ZHANG, S. C., WEGE, C., JESKE, H. Movement proteins (BC1 and BV1) of Abutilon Mosaic geminivirus are co-transported in and between cells of sink ut not of source leafs as detected by green fluorescent protein tagging. **Virology**, v.290, p.249-260, 2001a.
- ZHANG, W., OLSON, N. H., BAKER, T. S., FAULKNER, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., BOULTON, M. I., DAVIES, J. W., MCKENNA, R. Structure of the maize streak virus geminate particle. **Virology**, v.279, p.471–477, 2001b.
- ZHANG, Y., LIA, X. A Putative Nucleoporin 96 Is Required for Both Basal Defense and Constitutive Resistance Responses Mediated by suppressor of npr1-1, constitutive 1. **The Plant Cell**, v.17, p.1306–1316, 2005.
- ZHOU, X., LIU, Y., CALVERT, L., MUNOZ, C., OTIM-NAPE, G.W., ROBINSON, D.J. HARRISON, B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General Virology**, v.78, p.2101-2111, 1997.