

IARA PINHEIRO CALIL

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA AtWWP1,
COMPONENTE DE UMA INTERCONEXÃO DE FATORES DA
INTERAÇÃO GEMINIVIRUS-HOSPEDEIRO ENVOLVIDO NA
FORMAÇÃO DE CORPOS SUBNUCLEARES**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

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

T

C153c
2013

Calil, Iara Pinheiro, 1987-

Caracterização funcional da proteína AtWWP1, componente de uma interconexão de fatores da interação geminivirus-hospedeiro envolvido na formação de corpos subnucleares / Iara Pinheiro Calil. – Viçosa, MG, 2013.
xi, 56 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 49-56.

1. Biologia molecular. 2. Proteínas. 3. Vírus de plantas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8

IARA PINHEIRO CALIL

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA AtWWP1,
COMPONENTE DE UMA INTERCONEXÃO DE FATORES DA
INTERAÇÃO GEMINIVIRUS-HOSPEDEIRO ENVOLVIDO NA
FORMAÇÃO DE CORPOS SUBNUCLEARES**

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

APROVADA: 07 de março de 2013.

Gustavo Costa Bressan
(Coorientador)

Anésia Aparecida dos Santos

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

*Aos meus pais César e
Cássia,*

DEDICO

“The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.”

Sir William Bragg

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa pelo suporte técnico e científico a meu aprendizado e contribuição para minha formação.

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

À professora Elizabeth Fontes pela oportunidade de estagiar em seu laboratório desde a iniciação científica, pela orientação, paciência, pelo exemplo de profissionalismo e, principalmente, de dedicação por aquilo que faz.

A todos os professores e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação. À Marlene, pela dedicação ao LBMP e ao professor Gustavo Bressan, pelo aconselhamento científico.

À Joanne Chory, pela oportunidade de aprendizado e experiência científica, durante quatro meses, no SALK. À Eirine Kaiserli, pela amizade e pelos conselhos em microscopia confocal.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pelo trabalho em equipe e pela amizade. À Giselle, por ser quem sempre me entende; à Cris, minha gratidão pelo carinho e minha admiração pelo grande exemplo de força e fé; à Maiana, por sempre me receber com um sorriso; ao Humbertinho, por estar sempre disposto a ajudar; à Priscila, pela amizade verdadeira; ao Welison, pela ajuda nas questões “pessoais”; à Anésia, por ensinar e dividir sempre sua experiência científica; ao Michi pelo convívio harmonioso; ao Lucas, por sempre estar disposto a barganhar favores laboratorianos; ao Pedro que sempre me ajudou nos momentos em que mais precisei. Ao Max, por todo o apoio durante o período que estive no SALK. À Monica e Fábria, pela dedicação e boa vontade em ajudar. A todos que já deixaram o LBMP, em especial, ao Pato, Eliza, Marcos e Kênia que já deixam saudades; e aos novatos Virgílio, Bianca, Janaína e Cleysinho.

Ao meu “profe” João Paulo pelo conhecimento compartilhado, pela paciência, pelo exemplo e pelo envolvimento científico. Acima de tudo, obrigada por ser um grande amigo!

Agradeço também aos meus amigos e colegas de curso pelo apoio. À minha “irmã” Chris que SEMPRE me deu um abraço na hora em que mais precisei e sempre me cedeu seu ombro amigo e ouvidos. Aos membros do quarteto, Ju,

Luis Felipe e David, companheiros inseparáveis. Ao Lucas, Haroldinho, Érica e Thaís, por tornarem minha vida mais alegre.

A meus pais Cezar e Rita por considerarem seus: meus sonhos, minhas tristezas, meus momentos difíceis, minhas conquistas e alegrias. Obrigada por tudo! Aos meus irmãos pelos conselhos e incentivos.

Ao Leonardo, pelo carinho, companheirismo e amizade. Obrigada por estar sempre do meu lado quando preciso.

Agradeço sobremaneira a Deus porque d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
.	i
ABSTRACT.....	x
1.0INTRODUÇÃO.....	1
2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	5
2.1 Obtenção das construções de DNA.....	5
2.2 Ensaio de Duplo-Híbrido em leveduras.....	8
2.3 Ensaio de detecção da atividade de β -Galactosidase	10
2.4 Expressão transiente em <i>N. benthamiana</i> por agroinfiltração.....	10
2.5 Localização Subcelular e Microscopia confocal.....	11
2.6 Ensaio de Ligação a RNA <i>in vitro</i>	11
2.7 Ensaio de Ligação a DNA <i>in vitro</i>	12
2.8 Ensaio de Coimunoprecipitação.....	13
2.9 Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular.....	13
2.10 Técnicas de Biologia Molecular.....	14
3.0 RESULTADOS.....	15
3.1 A proteína At2G41020 (AtWWP1), que interage com NIG, é membro de uma família de proteínas de <i>Arabidopsis</i> contendo dois domínios WW.	15
3.2 AtWWP1 é uma proteína nuclear com a capacidade de formar corpos nucleares, via seu domínio conservado no carboxi terminal.....	16
3.3 AtWWP1 redireciona a proteína citoplasmática NIG para os corpos nucleares.....	20
3.4 AtWWP1 interage com NIG <i>in vivo</i> e no núcleo de células transfectadas.....	20
.	.

3.5 A proteína AtWWP1 também interage com AtMBD2, proteína que contém um domínio de ligação a CG metilado.....	23
3.6 A proteína AtWWP1 interage <i>in vivo</i> com AtMBD2.....	25
3.7 Co-localização de AtWWP1 com a proteína AtMBD2 em corpos nucleares.....	29
3.8 Interação de AtWWP1 com AtMBD2 ocorre via seu domínio C-terminal conservado.....	29
3.9 A porção C-terminal de AtWWP1 é suficiente para relocar AtMBD2 para os corpos nucleares.....	31
3.10 Natureza dos corpos nucleares formados por AtWWP1.....	31
3.11 Avaliação da capacidade de AtWWP1 de ligação a ácidos nucléicos <i>in vitro</i>	34
4.0 DISCUSSÃO.....	39
4.1 Papel biológico de AtWWP1 como proteína formadora de corpos nucleares.....	39
4.2 Integração de AtWWP1 no <i>hub</i> que converge para CNS5A do sistema imune de plantas.....	44
5.0 CONCLUSÃO.....	46
Figura Suplementar.....	47
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RESUMO

CALIL, Iara Pinheiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Caracterização funcional da proteína AtWWP1, componente de uma interconexão de fatores da interação geminivirus-hospedeiro envolvido na formação de corpos subnucleares.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Gustavo Costa Bressan e Humberto Josué de Oliveira Ramos.

Estudos moleculares envolvendo o sistema imune de plantas e a infecção por patógenos revelaram um panorama integrado de interações planta-patógeno em que as interações dos efetores de virulência convergem para subconjuntos de proteínas do hospedeiro altamente interconectadas e designadas *hubs*. Um *hub* funcional e bem definido do sistema imune de plantas corresponde a interconexões convergentes para a proteína CNS5A que constitui a subunidade catalítica do complexo COP9 *signalosome*, um regulador chave de diversos processos celulares básicos. Consistente com a previsão de que efetores de diferentes patógenos devem alvejar similares conexões na rede de interações planta-patógeno, foi demonstrado, independentemente, que a proteína C2 de geminivírus, um vírus de DNA que infecta uma grande variedade de culturas agrônomicas, interage com a proteína CNS5A. Além disso, foi também demonstrado que tanto a proteína NIG, quanto o receptor imune NIK, ambos alvos da proteína NSP de geminivírus, também interagem com CNS5A. Baseado nestas informações, prevê-se que a interconexão (*hub*) representada por CNS5A seja um elemento funcional na interação geminivírus-hospedeiro. Recentemente, foi identificado que, além de interagir com CNS5A, a proteína NIG também interage com uma proteína de função desconhecida codificada pelo *locus* AT2G41020, em leveduras. Como possível componente da rede de interações geminivírus-hospedeiro que converge em CNS5A, AT2G41020 pode interagir direta ou indiretamente com fatores de virulência em resposta de defesa ou de compatibilidade. Sendo assim, os objetivos principais dessa investigação envolveram caracterização bioquímica da proteína codificada pelo *locus* AT2G41020 e identificação de possíveis interações com proteínas virais e fatores do hospedeiro. Análise *in silico* da estrutura predita da proteína codificada pelo *locus* At2G41020, designada AtWWP1, revelou a presença de

dois domínios WW e um domínio C-terminal altamente conservado entre proteínas homólogas de espécies vegetais e animais. Além disso, foi demonstrado que a proteína AtWWP1 é uma proteína nuclear capaz de formar corpos subnucleares via o domínio C-terminal conservado. Ensaios de co-precipitação e BiFC demonstraram que AtWWP1 interage *in vivo* com a proteína citoplasmática NIG promovendo o seu redirecionamento para corpos nucleares. Com a finalidade de explorar a atividade formadora de corpos nucleares de AtWWP1, a interação entre AtWWP1 e uma segunda proteína parceira AtMBD2 (proteína contendo um domínio de interação com CG metilado) foi caracterizada *in vivo*. Tanto a capacidade de formar corpos nucleares quanto a interação com AtMBD2 foram mapeadas em AtWWP1 e ocorrem via seu domínio C-terminal conservado, substanciando o argumento de que esta região de AtWWP1 é responsável pela formação de corpos subnucleares. Ensaios de co-localização demonstraram que os corpos nucleares contidos em AtWWP1 são distintos daqueles formados por proteínas envolvidas em *splicing* do RNA; porém co-localizam com corpos nucleares contendo CDKC2. Além disso, foi demonstrado que AtWWP1 não liga a RNA, mas exibe uma atividade de ligação ao DNA. Estas características implicam que AtWWP1 deve estar envolvida com funções nucleares básicas. Como componente de um *hub* funcional na interação geminivírus-hospedeiro, torna-se relevante avaliar se a infecção viral afetaria os corpos nucleares formados por AtWWP1.

ABSTRACT

CALIL, Iara Pinheiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013.

Funcional characterization of AtWWP1, a interconnected component from geminivirus-host interactome, involved in nuclear bodies formation.

Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Gustavo Costa Bressan and Humberto Josué de Oliveira Ramos.

Plants are engaged in a continuous co-evolutionary struggle for dominance with their pathogens and the outcomes of these interactions are of particular importance to human activities, as they can have dramatic effects on agricultural systems (Dodds & Rathjen, 2010). Recently, the convergence of molecular studies of plant immunity and pathogen infection strategies is revealing an integrated picture of the plant–pathogen interaction (Mukhtar *et al.*, 2011) in which the pathogen effectors interaction converge onto highly connected subgroups of proteins, named hubs. A well-defined hub from plant immune system network corresponds to CSN5A protein, a catalytic subunit of the COP9 signalosome acting as a key regulator in several basic cellular processes. Consistent with the prediction that different effectors from different pathogens target similar connections in plant-pathogen interaction network, it has been shown, independently, that the protein C2 from geminivirus, a DNA virus that infects a wide variety of agronomic crops, interacts to CSN5A (Lozano-Duran *et al.*, 2011). Additionally, it was shown that NIG and the immune receptor NIK, both targets of geminivirus NSP, interact to CSN5A (Machado, 2011; Mukhtar *et al.*, 2011). Based on this information, it is expected that the hub CSN5A is a functional element in the geminivirus-host interaction network. Recently, it was reported that NIG, a cellular partner of CSN5A, also interacts with a unknown function protein, encoded by the locus AT2G41020 in yeast (Machado, 2011). As a possible component from geminivirus-host interaction network converging to CSN5A, AT2G41020 may interact directly or indirectly with virulence factors in defense response or compatibility. The objectives of this research involved biochemical characterization of the protein encoded by the locus AT2G4102, designated AtWWP1, and identification of its possible interactions with viral proteins and host factors. *In silico* analysis of tWWP1

predicted structure revealed the presence of two WW domains, and a C-terminal domain highly conserved between homologous in plant and animals. Furthermore, it has been shown that AtWWP1 is a nuclear protein capable of forming nuclear bodies via the conserved C-terminal domain. Coimmunoprecipitation and BiFC assays demonstrated that AtWWP1 interacts *in vivo* with the cytoplasmic protein NIG, redirecting it to nuclear bodies. In order to explore the formative activity of nuclear bodies AtWWP1, the interaction between AtWWP1 and a second protein partner AtMBD2 (methyl CG binding domain-containing protein) was characterized *in vivo*. The ability to form nuclear bodies as interaction with AtMBD2 were mapped AtWWP1 occurring via its domain and C-terminal conserved, substantiating the argument that this region of AtWWP1 is responsible for the formation of nuclear bodies. Colocalization assays have shown that nuclear bodies contained in AtWWP1 are distinct from those formed by proteins involved in RNA splicing, but colocalized with nuclear bodies containing CDKC2. Furthermore, it was demonstrated that AtWWP1 does not bind to RNA, but exhibits a binding activity to DNA. These characteristics imply that AtWWP1 should be involved with basic nuclear functions. As a component of a functional hub in geminivirus-host interaction network, it is important to assess whether the viral infection would affect the nuclear bodies formed by AtWWP1

1.0 INTRODUÇÃO

A percepção do patógeno pela planta é crucial para ativação de mecanismos de defesa durante ataque de patógenos e, por outro lado, o reconhecimento da planta hospedeira capacita o patógeno a ativar estratégias de virulência. As plantas reconhecem a maioria dos patógenos através de duas classes funcionalmente distintas de receptores imunes (Boller & He, 2009; Dodds & Rathejen, 2010). A primeira classe refere-se aos receptores transmembranas que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e são designados PRRs (“Pattern Recognition Receptors”). Este evento de reconhecimento ou interação planta-patógeno ocorre na superfície celular e aciona o que se denomina PTI (Pamp-Triggered Immunity), sendo suficiente para combater a maioria dos patógenos. Com a finalidade de superar este mecanismo de defesa basal, alguns patógenos desenvolveram evolutivamente mecanismos para injetar no interior da célula hospedeira efetores de virulência que inativam PTI (Chisholm *et al.*; 2006; Jones & Dangl, 2006). A célula hospedeira por sua vez co-evoluiu e desenvolveu mecanismos de resistência adicionais com o aparecimento de proteínas de resistência intracelulares do tipo NBS-LRR (*nucleotide binding site-leucine rich repeats*) que correspondem à segunda classe de receptores imunes. Estas proteínas de resistência reconhecem direta ou indiretamente os efetores de virulência para acionar um tipo de imunidade, designada ETI (“Effector-Triggered Immunity”) que é frequentemente associada com a resposta hipersensitiva, um tipo de morte celular programada (Lukasik & Takken, 2009; Dodds & Rathejen, 2010). Recentemente, uma rede de interações planta-patógeno foi decifrada mapeando interações entre os efetores da bactéria *Pseudomonas syringae* (Psy) e do oomycete *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa) e três classes de proteínas do sistema imune (RLKs, proteínas de defesa e proteínas de resistência) além de 8000 proteínas adicionais de *Arabidopsis* (Mukhtar *et al.*, 2011). Um tema principal que emergiu desses estudos de amplitude genômica foi que as interações dos efetores convergem para subconjuntos de proteínas altamente interconectadas e designadas *hubs*. Estas conexões convergentes de interações proteína-proteína representam um conjunto de funções associadas à maquinaria celular do hospedeiro, cujo distúrbio deve favorecer a melhor adaptação do patógeno ao hospedeiro. Com a evolução,

pressões seletivas promoveram a integração de respostas imunes a estas conexões convergentes, *hubs* para contrapor respostas adaptativas do patógeno, resultando em interações indiretas ou diretas entre efetores e os receptores imunes de plantas.

No caso de interações planta-vírus, o silenciamento do RNA é um dos mecanismos predominantes pelo qual a planta resistente reconhece e se defende contra a infecção viral (Voinnet, 2005). Em contrapartida, os vírus de plantas contribuem com fatores de virulência que agem como supressores de componentes da maquinaria de silenciamento do RNA, inativando a resposta de defesa e aumentando a patogenicidade do vírus em plantas hospedeiras e suscetíveis (Bisaro, 2006; Díaz-Pendón & Dig, 2008; Raja *et al.*, 2010). Para restringir a gama de hospedeiro desses vírus, tem sido evidenciado que as plantas também usam as proteínas de resistência que reconhecem efetores virais seguindo o mesmo mecanismo ETI contra bactérias e fungos (Whitham *et al.*, 1994; Tameling & Takken, 2007). Mais recentemente, tem sido demonstrado que o mecanismo de imunidade basal PTI também pode ser utilizado pela planta para limitar infecções virais (Carvalho *et al.*, 2008a). Particularmente no caso de geminivírus, que, coletivamente como um grupo, infectam uma ampla gama de hospedeiros, o sucesso da infecção se deve a proteínas virais supressoras de silenciamento (Bisaro, 2006; Díaz-Pendón & Dig, 2008), bem como inibidoras de receptores imunes transmembranas, como NIK (NSP-interacting kinase; Santos *et al.*, 2010). Além disso, como vírus de DNA (genoma circular de DNA fita simples), os geminivírus usam extensivamente a maquinaria de replicação do hospedeiro para replicar seu genoma no núcleo de células infectadas e interagem dinamicamente com a maquinaria de transcrição e de transporte intra e intercelular de células vegetais (Rojas *et al.*, 2005, Raja *et al.*, 2010). Sendo assim, evidências compiladas da literatura têm demonstrado que as interações entre geminivírus patogênicos e hospedeiros são complexas e dinâmicas.

A família *Geminiviridae* constitui um grande e diverso grupo de vírus de plantas, capazes de infectar uma ampla gama de espécies, incluindo diversas culturas agronomicamente relevantes (Fauquet *et al.*, 2008). Além de sua importância econômica, os geminivírus têm sido utilizados como modelo em estudos de replicação do DNA, controle do ciclo celular e transporte intra e intercelular de proteínas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2008b). A família *Geminiviridae* engloba quatro gêneros que se agrupam de acordo com o inseto vector, organização genômica e gama de

hospedeiros. Os *Begomovirus* constituem o maior gênero e inclui espécies virais com genoma mono ou bissegmentado que são transmitidas para plantas dicotiledôneas pela mosca branca *Bemisia tabaci* (Fauquet *et al.*, 2008). Tipicamente, os begomovirus encontrados no território brasileiro possuem dois componentes genômicos, DNA-A e DNA-B. O DNA-A codifica as proteínas que são requeridas para replicação (Rep e RE_n), ativação transcricional dos genes virais (TrAP), encapsidação (CP) e supressão de silenciamento do RNA (TrAP e AC4). Os genes codificados pelo DNA-B são requeridos para o movimento intracelular (NSP) e intercelular (MP) do DNA-A e DNA-B, bem como modulação de sintomas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Settlage *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2005). NSP também funciona com fator de virulência, suprimindo defesas inatas da planta (Fontes *et al.*, 2004, Carvalho *et al.*, 2008a, Santos *et al.*, 2009).

A proteína NSP facilita o transporte intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma e age em concerto com MP na translocação do vírus para as células adjacentes não infectadas (Gafni & Epel, 2002, Carvalho *et al.*, 2008b). O modelo para o mecanismo do transporte intracelular do genoma viral em células infectadas preconiza que NSP liga ao DNA viral fita simples, recém replicado no núcleo de células infectadas, e usa a maquinaria de exportação nuclear e de transporte nucleocitoplasmático para facilitar o transporte do DNA viral para o citoplasma através dos poros nucleares (Noueiry *et al.*, 1994; Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995, 1996; Lazarowitz & Beachy, 1999; Hehne *et al.*, 2004). Do lado do citoplasma, a proteína NIG (NSP-Interacting GTPase) interage com NSP para facilitar a liberação do complexo DNA-proteína no citoplasma (Carvalho *et al.*, 2008b). Na periferia celular, NIG é substituída pela proteína viral MP que interage com NSP e promove o transporte do complexo NSP-DNA viral para as células adjacentes através do plasmosdesmata (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995). A proteína NIG possui atividade GTPase intrínseca, uma característica comum de proteínas regulatórias envolvidas no tráfego de proteínas (Carvalho *et al.*, 2008b). A co-expressão transiente de NIG e NSP em folhas de tabaco resulta em um redirecionamento da proteína viral do núcleo para o citoplasma e, plantas transgênicas superexpressando NIG apresentam suscetibilidade aumentada à infecção por geminivírus, como esperado para um regulador positivo do ciclo de infecção (Carvalho *et al.*, 2008b). NSP também interage com o receptor imune NIK (NSP-Interacting Kinase), com uma kinase PERK-like, NsAK (NSP- Associated Kinase) na

membrana plasmática e com uma proteína nuclear, acetil transferase (Mariano et al., 2004; Forentino et al., 2006; Carvalho & Lazarowitz, 2004). Devido a sua função no transporte intracelular do DNA viral, prevê-se que NSP associe extensivamente com a maquinaria de transporte intracelular de células hospedeiras com sítios de reconhecimento em todos os compartimentos celulares. Além disso, como fator de virulência, possivelmente as interações proteína-proteína baseadas em NSP convergem para conexões centralizadas (*hubs*) do sistema imune de plantas que são conservadas para distintos efetores de diferentes patógenos.

Um *hub* funcional e bem definido do sistema imune da planta corresponde a interconexões convergentes para a proteína CNS5A que constitui a subunidade catalítica do complexo COP9 *signalosome*, um regulador chave de diversos processos celulares básicos. Consistente com a previsão de que efetores de diferentes patógenos devem alvejar similares conexões na rede de interações planta-patógeno, foi demonstrado independentemente que a proteína C2 de begomovírus interage com a proteína CNS5A (Lozano-Durán & Bejarano, 2011). Além disso, foi também demonstrado que tanto a proteína NIG quanto o receptor imune NIK, ambos alvos da proteína NSP de begomovírus, também interagem com CNS5A (Machado, 2011; Mukhtar *et al.*, 2011). Esta rede de interações altamente interconectadas entre proteínas virais e proteínas do hospedeiro e que convergem em um alvo comum sugere que a interconexão (*hub*) representada por CNS5A pode ser um elemento funcional na interação geminivírus-hospedeiro. Assim sendo, a caracterização dos componentes dessa rede de interações convergentes que ocorrem entre geminivírus e hospedeiro deve facilitar o nosso entendimento com relação a estratégia de virulência de geminivírus bem como mecanismos de defesa da planta para contrapor a infecção viral.

Recentemente, foi demonstrado que, além de interagir com CNS5A, a proteína NIG também interage com uma proteína de função desconhecida codificada pelo *locus* AT2G41020, em leveduras (Machado, 2011). Como possível componente da rede de interações geminivírus-hospedeiro que converge em CNS5A, AT2G41020 pode interagir direta ou indiretamente com fatores de virulência em resposta de defesa ou de compatibilidade. Sendo assim, os objetivos principais dessa investigação foram caracterizar bioquimicamente a proteína codificada pelo *locus* AT2G41020, designada AtWWP1 e identificar possíveis interações com proteínas virais e fatores do

hospedeiro. Os resultados dessa investigação associados a dados da literatura permitiram uma avaliação sobre a possível função da proteína AtWWP1 em processos celulares básicos e no processo de infecção viral.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das construções de DNA

2.1.1 Clonagem de NIG e ATWWP1 em vetores de expressão em levedura e planta

Os clones pDONR201-NIG, pDONR207-NIG (pUFV 1083), pDONR201-AT2G41020-St (pUFV 1427), pDONR201- AT2G41020-Ns (pUFV 1434) e pDONR207- AT2G41020-Ns (pUFV 1644), contendo a região codificadora de NIG ou AT2G41020, com (St) ou sem (Ns) codon de terminação foram previamente descritos (Carvalho *et al.*, 2008b; Machado, 2011). Para expressão *in vitro* de proteínas, as regiões codificantes de NIG e AT2G41020, designada AtWWP1, foram transferidas, por recombinação, para os vetores pTNT-GSTGW e pIXHAGW os quais permitem a expressão de proteínas fusionadas a GST (Glutathione-S-transferase) e HA (Hemaglutinina), respectivamente, resultando nos clones pIXHA-NIG (pUFV2178), pIXHA-AtWWP1 (pUFV2174) e pTNT-GST- AtWWP1 (pUFV2175). Para expressão transiente em plantas de *Nicotiana benthamiana*, os cDNAs de NIG e AtWWP1 foram inseridos, pelo sistema triplo Gateway (Invitrogen), no vetor de destino pK7M34GW juntamente com o promotor 2x35S e, com a cauda HA para experimentos de coimunoprecipitação *in vivo*, ou com a cauda mCherry, para experimentos de localização subcelular, obtendo-se os clones 2x35-6HA-NIG (pUFV1946), 2x35-6HA- AtWWP1 (pUFV1948), 2x35-mCherry-NIG (pUFV2181) e 2x35-mCherry- AtWWP1 (pUFV2179).

2.1.2 Isolamento e clonagem de AtMBD2 em diferentes vetores de expressão

A proteína de *locus* AT5G35330, conhecida com AtMBD2, inicialmente identificada por sua possível interação com AtWWP1 (<http://signal.salk.edu/interactome/AI1.html>), teve sua região codificante isolada a partir do cDNA de *Arabidopsis thaliana*, mediante amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Tabela1). O produto obtido foi submetido a uma segunda reação

de PCR com oligonucleotídeos contendo extensões de recombinação (Tabela 1) para clonagem via sistema *Gateway*. Os produtos das amplificações foram purificados de gel de agarose 1% com *kit Gel Extraction* (Qiagen) e inseridos nos vetores de entrada pDONR201 e pDONR207 (Invitrogen), por recombinação, utilizando a enzima BP clonase (Invitrogen). Os clones obtidos foram: pDONR201-St-AtMBD2 (pUFV1987-1), contendo o codon de terminação; pDONR201-Ns-AtMBD2 (pUFV1988.1) e pDONR207Ns-AtMBD2 (pUFV2054), ambos sem o códon de terminação. Posteriormente o cDNA de AtMBD2 foi transferido do vetor de entrada para diferentes vetores de expressão (pDEST22, pDEST32, pK7FWG2, pSPYCEGW, pSPYNEGW, pIXHAGW, pTNTGSTGW, pK7M34GW), por recombinação, utilizando a enzima LR clonase, gerando-se os clones listados abaixo.

Para expressão em leveduras, o cDNA de AtMBD2 foi transferido do vetor de entrada para os vetores pDEST32 e pDEST22 os quais permitem a expressão de proteínas fusionadas ao domínio de ligação ao DNA (BD) e ao domínio de ativação (AD) do transfator GAL4, respectivamente, gerando os clones pBD-AtMBD2 (pUFV2172) e pAD-AtMBD2 (pUFV2173). Para transcrição e tradução *in vitro*, AtMBD2 foi fusionado aos epitopos GST e HA resultando nos clones pTNT-GST- AtMBD2 (pUFV2177) e pIXHA- AtMBD2 (pUFV2176), respectivamente. Para a realização de ensaios de expressão transiente em *Nicotiana benthamiana*, a região codificante de AtMBD2 foi fusionada às caudas de green fluorescent protein (GFP) no vetor pK7FWG2 gerando o clone pK7F-AtMBD2 (pUFV1997). Alternativamente, AtMBD2 foi fusionada a mCherry, e, neste caso, o cDNA de AtMBD2 foi clonado no vetor de destino pK7M34GW, juntamente com o promotor 2x35S e a cauda de mCherry, via triplo *gateway*, gerando o clone 2x35-mCherry- AtMBD2 (pUFV2180). Para o ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BIFC), o cDNA de AtMBD2 foi transferido por recombinação do vetor de entrada para os vetores contendo as porções N-terminal (SPY-NE) e C-terminal (SPY-CE) de *yellow fluorescent protein* (YFP), produzindo-se os clones pSPYNE-AtMBD2 (pUFV2055) e pSPYCE- AtMBD2 (pUFV2056), respectivamente.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados em reação de PCR

Sequência Alvo	Região Amplificada	Nome	Sequência (5'→3')
NIG	cDNA completo	4263 (Fwd)	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCGGGTCGAGTTAA
		4264 (Rvs-NS)	AGAAAGCTGGGTCTTACCCAAATGGGTTTCCTCC
		4265 (Rvs-ST)	AGAAAGCTGGGTCCCCAAATGGGTTTCCTCCTGA
AtMBD2	cDNA completo	AtMBD2-Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAGTATGTGCGCAGTC
		AtMBD2-ST-Rvs	AGAAAGCTGGGTCTTATCTATCAGCAAGTTCGTC
		AtMBD2-NS-Rvs	AGAAAGCTGGGTCTCTATCAGCAAGTTCGTC
AtWWP1	cDNA completo	At2G41020-Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGAGAAGAGCTGCA
		At2G41020-ST-Rvs	AGAAAGCTGGGTCTCAATCTGCGTCTCCAAGACC
		At2G41020-NS-Rvs	AGAAAGCTGGGTCTCTGCGTCTCCAAGACC
AtWWP1 ⁷⁷⁻¹⁹²	Aa ⁷⁷⁻¹⁹²	Nt-At2G41020-Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGCGTGCTGACCCCAA
		Nt-At2G41020-ST-Rvs	AGAAAGCTGGGTC TCAGCTTGCAATTAGCCTGAAA
		Nt-At2G41020-NS-Rvs	AGAAAGCTGGGTGCGCTTGCAATTAGCCTGAAAAGG
AtWWP1 ¹⁹³⁻²⁷¹	Aa ¹⁹³⁻²⁷¹	WW- At2G41020-Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGACCTTACCATTAGG
		WW- At2G41020-ST-Rvs	AGAAAGCTGGGTC TCAAGAAGCTGGAGGTTCCCA
		WW- At2G41020-NS-Rvs	AGAAAGCTGG GTCAGAAGCTGGAGGTTCCCACTG
AtWWP1 ³⁶⁰⁻⁴⁶³	Aa ³⁶⁰⁻⁴⁶³	Ct- At2G41020-Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAAACCTCCCATGAA
attB1		2942	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2		2943	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
pDONR201 e 207		3397 (Fwd)	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC
		3398 (Rvs)	TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
pDEST32 e 22		DEST32-Fwd	AACCGAAGTGCGCCAAGTGCTCG
		DEST22-Fwd	TATAACGCGTTTGAATCACT
		DEST22-Rvs	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
35S		MC36 (Fwd)	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
GFP		4799 (Rvs)	CGCCCTCGCCCTCGCCGGACAC

2.1.3 Obtenção dos mutantes de deleção de *AtWWP1*

A partir da sequência de aminoácidos de *AtWWP1*, foram construídas três formas truncadas da proteína, delimitadas com base nas regiões conservadas de sua estrutura (Figura 1). A primeira forma truncada corresponde à região N-terminal da proteína, que foi delimitada do aminoácido 77 ao aminoácido 192. A segunda forma delimita os dois domínios WW de *AtWWP1*, situados na região correspondente ao aminoácido 193 até o aminoácido 271. A terceira forma truncada corresponde à porção C-terminal de *AtWWP1*, a qual se estende do aminoácido 360 ao aminoácido 463.

As formas truncadas acima descritas foram isoladas utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) e clonadas em vetores de entrada de acordo com a metodologia anteriormente descrita, obtendo-se os clones pDONR201-St-*AtWWP1*⁷⁷⁻¹⁹² (pUFV2058; Aa⁷⁷⁻¹⁹²), pDONR201-St-*AtWWP1*¹⁹³⁻²⁷¹ (pUFV2060, Aa¹⁹³⁻²⁷¹) e pDONR201-St-*AtWWP1*³⁶⁰⁻⁴⁶³ (pUFV2062, Aa³⁶⁰⁻⁴⁶³). Adicionalmente, foram gerados os clones pDONR201-Ns-*AtWWP1*⁷⁷⁻¹⁹² (pUFV2057), pDONR201-NS-*AtWWP1*¹⁹³⁻²⁷¹ (pUFV2059) e pDONR201-Ns-*AtWWP1*³⁶⁰⁻⁴⁶³ (pUFV2061), que contêm as regiões acima definidas, respectivamente, sem o códon de terminação. Posteriormente, os cDNAs das porções isoladas de *AtWWP1* foram transferidas, por recombinação, do vetor de entrada para os vetores de expressão em leveduras, pDEST32 e pDEST22, gerando-se os clones pBD-*AtWWP1*⁷⁷⁻¹⁹² (pUFV2166), pBD-*AtWWP1* *AtWWP1*¹⁹³⁻²⁷¹ (pUFV2168), pBD-*AtWWP1*³⁶⁰⁻⁴⁶³ (pUFV2170); pAD-*AtWWP1*⁷⁷⁻¹⁹² (pUFV2167), pAD-*AtWWP1*¹⁹³⁻²⁷¹ (pUFV2169) e pAD-*AtWWP1*³⁶⁰⁻⁴⁶³ (pUFV2171). Para expressão em plantas, as regiões truncadas de *AtWWP1* foram transferidas para pK7FWG2. Os clones resultantes pK7F-*AtWWP1*⁷⁷⁻¹⁹² (pUFV2163), pK7F-*AtWWP1*¹⁹³⁻²⁷¹ (pUFV2164) e pK7F- *AtWWP1*³⁶⁰⁻⁴⁶³ (pUFV2165) contêm as respectivas regiões truncadas fusionadas a GFP, sob o controle do promotor 35S de CaMV.

2.2 Ensaio de Duplo-Híbrido em leveduras

Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, LYS2::GAL1UAS-

GAL1TATAHIS3, MEL1 GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ) que é deficiente na produção de triptofano, leucina e uracila e que contem os genes repórteres LacZ e HIS3, foram crescidas em 5mL de meio YPD-A por 16 horas (O.D._{600nm}= 0.5-1.0).

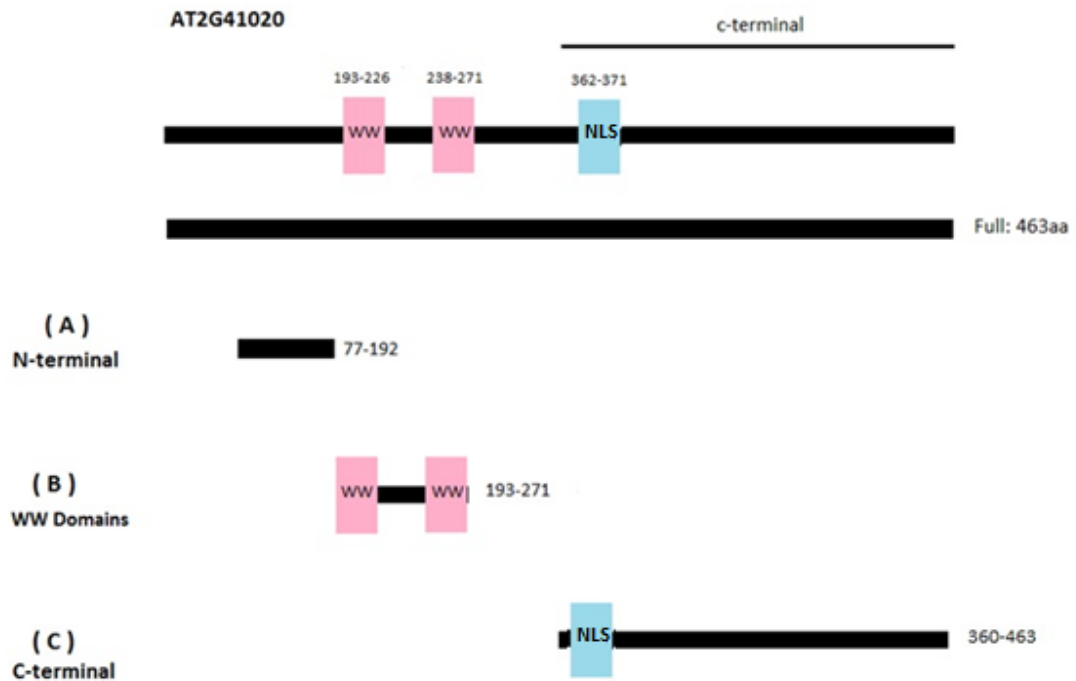


Figura 1 – Representação esquemática da construção dos mutantes de deleção de AtWWP1. Os fragmentos foram gerados por PCR e inseridos em vetores de entrada. (A) **Porção N-terminal**, delimitada pelos aminoácidos positivos 77 a 192; (B) **Domínio WW**, situado entre o 193º e o 271º aminoácido; (C) **Porção C-terminal**, a qual se estende do 360º aminoácido ao 463º aminoácido.

As células foram então centrifugadas a 3000x g por 4 minutos e lavadas com 1mL de água deionizada e, em seguida, ressuspensas em 1mL de Acetato de lítio 100 mM. Após nova centrifugação, procedeu-se à cotransformação das células com os DNAs plasmidiais utilizando-se o método de transformação com acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG). Para cada transformação, foram adicionados às células 240 µL de polietilenoglicol 50% (p/v; PEG, MW 3350), 36 µL de acetato de lítio 1 M, 25 µL de ssDNA 2 µg/µL e 50 µL de solução contendo entre 2-5 µg de cada uma das construções de interesse. Com a finalidade de verificar a interação entre AtWWP1 e AtMBD2, as leveduras repórteres foram cotransformadas com as construções pAD-AtWWP1 + pBD- AtMBD2 ou pBD-AtWWP1 + pAD-

AtMBD2, além de seus devidos controles. Para a identificação da região da proteína AtWWP1 responsável pela interação com AtMBD2, as leveduras repórteres foram cotransformadas com as construções: pBD-AtMBD2 + pAD-AtWWP1⁷⁷⁻¹⁹², pAD-AtMBD2 + pBD-AtWWP1⁷⁷⁻¹⁹², pBD-AtMBD2 + pAD-AtWWP1¹⁹³⁻²⁷¹, pAD-AtMBD2 + pBD-AtWWP1¹⁹³⁻²⁷¹, pBD-AtMBD2 + pAD-AtWWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³, pAD-AtMBD2 + pBD-AtWWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³, além de seus devidos controles. As células foram então homogeneizadas e incubadas, inicialmente a 30°C por 30 minutos, e, em seguida, a 42°C por 25 minutos. Após a centrifugação a 6000 x g por 15 segundos, as células foram lavadas com 1 mL de água deionizada, plaqueadas em meio seletivo e mantidas a 28°C por três dias. Para a seleção dos duplo-transformantes, as células foram plaqueadas em meio deficiente em leucina e triptofano (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp). Para a detecção da interação entre proteínas, as células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo com deficiência em leucina, triptofano e histidina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -Trp, -His) e em meio com deficiência dos mesmos aminoácidos, porém suplementado com 10 mM de 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole; Sigma).

2.3 Ensaio de detecção da atividade da β -galactosidase

A capacidade destes duplos transformantes em transativar o gene da β -galactosidase foi avaliada quantitativamente utilizando-se ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside), como substrato. Células de levedura, previamente transformadas com as construções pAD-AtWWP1 + pBD-AtMBD2 ou pBD-AtWWP1 + pAD-AtMBD2, foram crescidas e coletadas a uma $O.D_{600} = 0.8$ a 1.0 . A cultura foi então centrifugada a $375 \times g$ por 5 minutos e ressuspensa em 1mL do tampão Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 60 mM; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 40 mM ; KCl 10 mM ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM). Posteriormente, foram adicionadas às amostras 3 gotas de clorofórmio e 2 gotas de SDS 0,1%, seguido por um período de incubação de 5 minutos a 28°C. Em seguida, foram adicionados 200 μ L do substrato ONPG 4 mg/mL. Após 65 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 0.5 mL de Na_2CO_3 (1M). Os restos celulares foram removidos após centrifugação a $375 \times g$ por 10 minutos. A leitura das amostras foi realizada em OD_{420} e os resultados foram expressos em unidades de β -galactosidase, conforme descrito por Amberg (2005).

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

Culturas de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV3101, carreando as construções de interesse foram crescidas em meio Rhizo, contendo os antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2500 x g por 5 minutos e lavadas duas vezes com tampão de agroinfiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10mM pH 5,6 e acetoseringona 100 µM). Em seguida, as células foram diluídas em tampão de agroinfiltração para O.D₆₀₀=0.3 e infiltradas em folhas jovens de *N. benthamiana*, utilizando-se seringas estéreis, gentilmente pressionadas sobre a face abaxial da epiderme foliar.

2.5 Localização subcelular e Microscopia confocal

Folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções pGFP-AtWWP1, pGFP-AtMBD2, pmCherry-NIG, pmCherry-AtMBD2, pGFP-Nt-AtWWP1, pGFP-WW-AtWWP1 e pGFP-Ct-AtWWP1, bem como suas combinações, foram submetidas à análise por microscopia confocal, 72 horas após a agroinfiltração. Para o ensaio de colocalização subnuclear, cDNAs de proteínas potencialmente formadoras de corpos nucleares fusionadas ao epitopo mCherry foram cedidos pelo Laboratório de Biologia de Plantas, pertencente ao Instituto SALK, Califórnia/EUA. As proteínas utilizadas como marcadores de corpos nucleares neste trabalho foram: Fibrilarina (AT4G25630), Coilina (AT1G63780), CCR2 (AT2G21660), CypRS64 (AT3G63400), CDKC2 (AT5G64960), SCL33 (AT1G55310) e SR34 (AT1G02840). Pequenos fragmentos de folhas agroinfiltradas com as construções de interesse foram montados em lâminas com água e analisados no microscópio confocal Leica SP2. O GFP foi excitado com comprimento de onda de 488 nm do laser de argônio, e sua emissão coletada utilizando filtro de passagem de 500-530 nm. O YFP foi excitado com comprimento de onda 514 nm do laser de argônio, e sua emissão coletada utilizando filtro de passagem de 560-615 nm. O mCherry foi excitado com comprimento de onda

de 554 nm do laser de Hélio-Neônio e sua emissão foi coletada com utilizando o filtro de passagem de 560-615 nm. O *pinhole* foi usualmente fixado, fornecendo uma faixa óptica de 1-1,5 μm . As imagens foram processadas com auxílio do *software ImajeJ*.

2.6 Ensaio de ligação a RNA *in vitro*

O RNA total de folhas de *Arabidopsis thaliana* Colombia-0 foi extraído e posteriormente marcado com biotina utilizando-se os *kits Spectrum™ Plant Total RNA* e *BrightStar®Psoralen-Biotin* (Ambion), respectivamente, de acordo com as instruções dos fabricantes. As construções pTNT-GST-AtWWP1, pTNT-GST-AtMBD2, pTNT-GST-CCR2 (utilizada como controle positivo do experimento; Heintzen et al., 1997), bem como o vetor vazio foram transcritas e traduzidas *in vitro*, utilizando-se o sistema *TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression* (Promega). Para isso, adicionaram-se 2 μg do DNA plasmidial de cada construção juntamente com 15 μL de *Wheat Germ Master Mix*, para um volume final de 25 μL . As amostras foram então mantidas a 25°C por 2 horas. Uma alíquota de 15 μL foi utilizada para o ensaio de ligação e outra de 5 μL foi utilizada como *input*.

O ensaio de ligação a RNA foi realizado, conforme descrito por Vert & Chory (2006). Para o *pull down* RNA-proteína, o RNA biotilado foi inicialmente incubado com *beads* magnéticos de streptavidina (Invitrogen) em tampão IP [Glutamato de Potássio 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH7.6, MgCl_2 2 mM, Nonidet NP40 0.05% (v/v)] por 2 horas a 4°C, sob agitação, e então lavado 3 vezes com o mesmo tampão. As proteínas foram então adicionadas ao complexo RNA-*Beads* juntamente com o tampão IP e a mistura foi incubada a 4°C por duas horas, sob agitação. Após lavagem das *beads* peletizadas por 3 vezes com o tampão IP, as proteínas foram eluídas com 2XSDS tampão de amostra [Tris-Cl 100 mM (pH 6.8), SDS 4%, Glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 200 mM, EDTA 25 mM, azul de bromofenol 0,2%), aquecidas a 100°C por 5 minutos. Posteriormente as amostras foram analisadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, contendo dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* - SDS-PAGE) e detectadas por *Western blotting*, utilizando anticorpos anti-GST (MACS/ Miltenyi Biotec). A ligação do anticorpo foi detectada utilizando o anticorpo secundário anti-IgG de coelho

conjugado a HRP, em associação com o sistema de detecção SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

2.7 Ensaio de ligação a DNA *in vitro*

O ensaio de ligação a DNA *in vitro* foi realizado conforme descrito por Li *et al.* (2001). Para isso, foram utilizados *beads* de celulose conjugados a DNA de timo de bezerro, fita simples (ssDNA) e fita dupla (dsDNA) (Sigma). As construções pIXHA-AtWWP1, pIXHA-ATMBD2, pIXHA-NIG e pIXHA-PIF4 (utilizado como controle positivo; Sun *et al.*, 2012), bem como o vetor vazio foram transcritas e traduzidas *in vitro* utilizando-se o sistema TNT® SP6 *High-Yield Wheat Germ Protein Expression* (Promega) conforme descrito acima.

Inicialmente os *beads* de ssDNA e dsDNA foram lavados 3 vezes com o tampão de ligação (Tris-HCl 10mM pH7.4, MgCl₂ 2.5mM, NaCl 125mM e de TritonX-100 0.5%) e ressuspensas a uma concentração final de 10mg/mL. Em seguida, uma alíquota de 15 µL de cada proteína foi incubada com 20 µL dos *beads* (ssDNA e dsDNA) e 100 µL do tampão de ligação por 2 horas a 4°C, sob agitação. Após lavagem dos *beads* peletizados por 3 vezes com o tampão de ligação, as proteínas ligadas ao DNA foram eluídas com 2XSDS tampão de amostra e aquecimento a 100°C por 5 minutos, analisadas por meio de SDS-PAGE) e detectadas por *Western blotting*, utilizando anticorpos anti-HÁ (MACS/ Miltenyi Biotec). A ligação do anticorpo foi detectada utilizando o anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado a HRP, em associação com o sistema de detecção SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

2.8 Coimunoprecipitação *in vivo*

A fim de verificar a interação *in vivo* entre NIG e AtWWP1; e entre AtWWP1 e AtMBD2, foi realizado o ensaio de coimunoprecipitação utilizando-se o kit *µMACS™ Epitope tag Protein Isolation* (MACS/ Miltenyi Biotec). Folhas de plantas jovens foram agroinfiltradas com as construções AtWWP1-GFP e NIG-6HA + AtWWP1-GFP; AtMBD2-GFP e AtMBD2-GFP + AtWWP1-6HA. Após 72 horas, as folhas foram maceradas em 1mL do

tampão de lise [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, Nonidet P-40 1% (v/v)] para obtenção do extrato proteico, o qual foi normalizado para 1.5 mg/mL (Bradford_BIO-RAD) e incubado por 2 horas com *beads* anti-GFP (MACS/Miltenyi Biotec) a 4°C, sob agitação. As *beads* foram recolhidas em coluna magnética, conforme instruções do fabricante. Após a lavagem da coluna, as proteínas foram eluídas com 50 µL do tampão de eluição previamente aquecido a 95°C, analisadas por SDS-page e detectadas por *Western blotting*, utilizando anticorpos anti-HA e anti-GFP. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando-se o anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado a HRP, em associação com o sistema de detecção SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

2.9 Ensaio de Complementação de Fluorescência Bimolecular (BiFC)

Com a finalidade de verificar a interação entre AtWWP1 e NIG, folhas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas com as combinações do plasmídeos: pSPYNE-AtWWP1 + pSPYCE-NIG; pSPYCE-AtWWP1 + pSPYNE-NIG; pSPYCE-AtWWP1 + pSPYNE, pSPYNE-AtWWP1 + pSPYCE, pSPYCE-NIG + pSPYNE, pSPYNE-NIG + pSPYCE. Para verificar a interação entre ATWWP1 e ATMBD2, as construções agroinfiltradas foram: SPYNE-AtWWP1 + pSPYCE-AtMBD2; pSPYCE-AtWWP1 + pSPYNE-AtMBD2; pSPYCE-AtWWP1 + pSPYNE, pSPYNE-AtWWP1 + pSPYCE, pSPYCE-AtMBD2 + pSPYNE, pSPYNE-AtMBD2 + pSPYCE. Após 72 horas, fragmentos das folhas foram analisados em microscopia confocal, sendo a fluorescência do YFP avaliada com excitação a 514nm, utilizando laser de argônio com emissão a 560-615nm.

2.10 Técnicas de Biologia Molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular, incluindo preparação de plasmídeos, extração de RNA, DNA genômico, DNA plasmidial, transformação de bactérias, digestão de DNA por enzimas de restrição, síntese de cDNA, dentre outras, foram conduzidas segundo protocolos fornecidos pelos fabricantes ou contidos em Sambrook *et al.* (1989).

3.0 RESULTADOS

3.1 A proteína At2G41020 (AtWWP1), que interage com NIG, é membro de uma família de proteínas de Arabidopsis contendo dois domínios WW.

Como componente de uma rede de interações proteína-proteína que converge para o *hub* CNS5A do sistema imune de plantas e como alvo da proteína NSP de geminivírus, é provável que NIG participe de processos celulares básicos influenciados pela infecção viral (Carvalho *et al.*, 2008b, Machado, 2011). De fato, expressão ectópica de NIG em *Arabidopsis* aumenta a suscetibilidade a geminivírus (Carvalho *et al.*, 2008b). Com a finalidade de identificar alvos celulares para a proteína NIG, foi realizada uma triagem de proteínas candidatas, utilizando uma biblioteca de cDNA de *A. thaliana*, por meio do sistema de duplo híbrido em leveduras (Machado, 2011). Dentre as possíveis interações, foi identificada a proteína codificada pelo *locus* At2G41020, cuja interação com NIG foi confirmada posteriormente, pelo ensaio de duplo híbrido em levedura e detecção de atividade da enzima β -galactosidase (Machado, 2011).

O *locus* At2G41020 codifica uma proteína de função desconhecida, de 463 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 49814.4 Da. Este gene apresenta também uma forma variante de *splicing*, originando uma proteína de 382 aminoácidos, de massa molecular de 41525.4 Da. A proteína At2G41020 apresenta em sua sequência dois domínios WW / Rsp5 / WWP (resíduos de 193 a 226 e de 238 a 271; banco de dados InterPro IPR001202), sendo designada AtWWP1 (*WW domain-containing protein 1* de *Arabidopsis thaliana*). O domínio WW é um módulo de interação proteína-proteína encontrado em uma grande variedade de proteínas de sinalização. Ele interage com ligantes através de sequências ricas em prolina que frequentemente contém um resíduo de tirosina (Sudol *et al.*, 2001).

Com objetivo de entender a relação evolutiva de AtWWP1 com outras proteínas contendo o domínio WW em plantas, foi realizada uma análise filogenética de AtWWP1 com as sequências mais próximas de plantas selecionadas no banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>), de modo a reunir informações que facilitem a predição de sua função. Conforme

observado na Figura 2, a análise filogenética de AtWWP1 (Q67ZZ1) revelou a presença de proteínas homólogas com domínios WW conservados em 24 espécies no reino vegetal. AtWWP1 é mais próxima evolutivamente de D7LG15, uma proteína de função desconhecida de *Arabidopsis lyrata*, seguida pelas proteínas das espécies *Glycine Max* (IJFQ4) *Lotus corniculatus* var. *japonicus* (I3T943), *Populus trichocarpa* (B9HDT9), *Ricinus communis* (B9SEY2) e *Vitis vinifera* (D7TQ37), todas codificando proteínas preditas ainda não caracterizadas. Considerando a espécie *Arabidopsis thaliana*, foram identificados 10 homólogos de AtWWP1, sendo Q9SVQ1 (AT3G06480), Q9LYJ9 (AT5G14610) e Q8H136 (AT3G01540), membros da família de helicases de RNA dependentes de ATP cujo papel biológico ainda não foi completamente elucidado; Q6AWW6 (AT2G47310) e O04425 (AT4G16280) são proteínas cujas funções estão relacionadas ao controle do tempo de floração (FCA) em *Arabidopsis* e silenciamento gênico (Baurle *et al.*, 2007); Q9LHL0 (AT3G13225) e Q0WUS3 (AT3G59770) codificam proteínas funcionalmente desconhecidas, sendo que a última pode ter seu papel relacionado ao metabolismo do fosfatidilinositol (Vollmer *et al.*, 2011); Q9LT25 (AT3G19840), B6EUA9 (AT1G44910) e F4JCC1 (AT3G19670) representam três membros da família ATPRP40 (*Arabidopsis thaliana* pre-mRNA processing protein 40) capazes de interagir com o domínio C-terminal da subunidade maior da RNA polymerase II, e cuja função provável envolve o processamento do pre-mRNA durante o *splicing* (Kang *et al.*, 2009). Dentre os homólogos em *Arabidopsis*, AtWWP1 é mais relacionada filogeneticamente com a proteína Q6AWW6 (36,04% de identidade de sequência), seguida por O04425 (24% de identidade de sequência) e mais distante em filogenia da proteína F4JCC1. Ao incluir na análise sequência de proteínas contendo domínio WW de espécies animais, verificou-se que AtWWP1 compartilha com a proteína PQPB1 (Npw38) de humanos 17,02% de identidade de sequência (Figura S1). Entretanto, a identidade de sequência entre as duas proteínas se eleva para 50% quando apenas o carboxi-terminal (70 aminoácidos) é usado como base de comparação, delimitando um domínio conservado nas proteínas de diferentes reinos. Em PQPB1, este domínio carboxi-terminal é responsável por interação com a proteína U5 do spliceossomo, enquanto que o domínio WW interage com o carboxi-terminal da subunidade maior da RNA polimerase II (Komuro *et al.*, 1999; Waragai *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2010).

3.2 AtWWP1 é uma proteína nuclear com a capacidade de formar corpos nucleares, via seu domínio conservado no carboxi terminal.

A presença de domínios similares a PQPB1 (domínio WW e carboxi-terminal conservado) na estrutura predita de AtWWP1 é um possível indicativo de que estas proteínas também compartilhem funções similares. Se este for o caso, espera-se que AtWWP1 se localize no núcleo e forme corpos intranucleares de inclusão (Okazawa *et. al.*; 2001).

A fim de determinar a localização subcelular de AtWWP1, foi realizado o ensaio de expressão transiente, mediado por *A. tumefaciens*, em células epidérmicas de folha de tabaco. A proteína AtWWP1 foi fusionada às caudas GFP e mCherry, e sua localização subcelular foi analisada por microscopia confocal (Figura 3). Uma intensa fluorescência, emitida tanto por GFP ou mCherry, foi observada na região nuclear, concentrando-se em agregados subnucleares, também conhecidos como corpos nucleares. A presença de corpos nucleares foi observada em 100% das células analisadas, quando AtWWP1 foi expressa com a epitopo GFP, sendo que o tamanho e número de corpos nucleares variaram nos núcleos analisados (Figura 3A e 3B). A Figura 3C representa a expressão de AtWWP1 fusionada à *etiqueta* mCherry que também exibiu a capacidade de formar corpos nucleares, embora em menor frequência. Análise de comparação de sequências entre AtWWP1 e PQBP1 revela uma região altamente conservada de 56 aminoácidos (posições 405 a 461 em AtWWP1) no domínio C terminal das proteínas (50% identidade de sequência, Figure S1). Com a finalidade de identificar se este domínio conservado poderia conter um sinal de localização subnuclear, responsável pela formação dos corpos nucleares, três versões truncadas de AtWW1 foram geradas (Figura 1) e independentemente fusionadas a GFP. Baseado nos experimentos de duplo híbrido em leveduras (Machado, 2011), os resíduos de aminoácidos posições 1-76 não participam na formação do complexo NIG-AtWWP1 e, portanto, não foram considerados no desenho das versões truncadas.

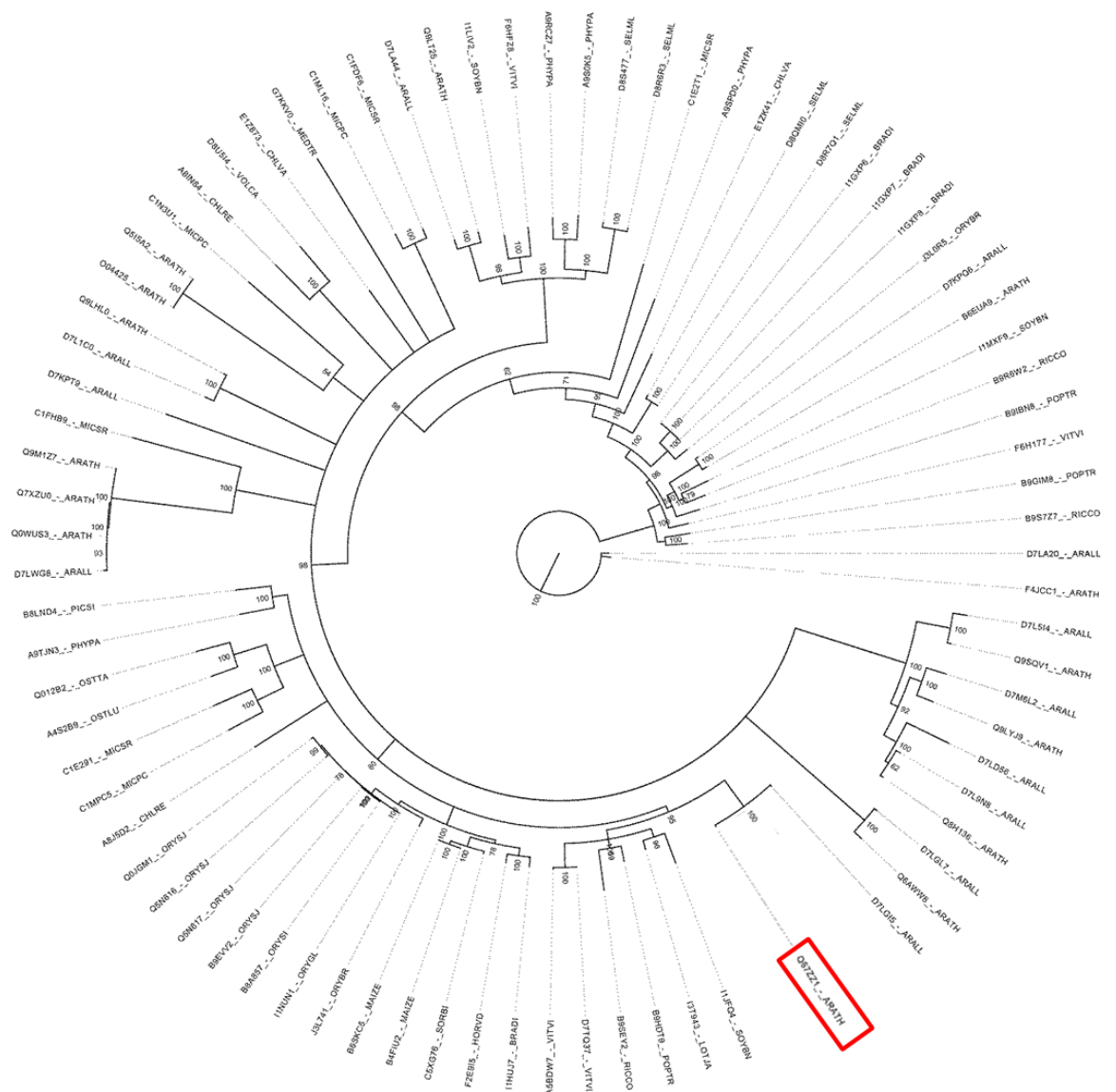


Figura 2: Árvore filogenética dos homólogos de AtWWP-1(Q67ZZ1) em plantas. As sequências mais próximas de AtWWP-1 foram selecionadas no banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>) e alinhadas no programa Mega, utilizando o algoritmo muscle. A árvore filogenética foi gerada pelo programa Mrbayes (<http:// mrbayes.sourceforge.net/>). A análise filogenética de AtWWP1 (retângulo vermelho) revelou a presença de homólogos em 24 espécies no reino vegetal. Considerando a espécie *Arabidopsis thaliana*, foram identificadas 10 homólogos, sendo eles: Q9SVQ1, Q9LYJ9 Q8H136, Q6AWW6, O04425, Q9LHL0, Q0WUS3, Q9LT25, B6EUA9 e F4JCC1.

Além do carboxi-terminal conservado, uma versão truncada contendo o domínio WW (posições 193-271) de interação proteína-proteína foi incluída na análise. Todas as versões truncadas de AtWWP1 fusionadas a GFP, ou seja WWP1⁷⁷⁻¹⁹², WWP1¹⁹³⁻²⁷¹ e WWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³, quando ectopicamente expressas em folhas de tabaco, dirigiram intensa fluorescência para o núcleo de células transfectadas (Figuras 4B, 4C e 4D), embora um sinal de localização nuclear predito é encontrado apenas na versão carboxi-terminal (posições 362-371). A concentração de fluorescência no núcleo foi direcionada pelas sequências de AtWWP1, porque o sinal de fluorescência, quando GFP é expressa sozinho em células transfectadas, é particionado entre o núcleo e o citoplasma (Figura 4A). Embora, as três versões truncadas de AtWWP1 sejam localizadas no núcleo, apenas o carboxi terminal conservado (WWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³) foi capaz de formar agregados subnucleares, na forma de corpos nucleares (Figura 4C). Estes resultados mapeiam a região formadora de corpos nucleares em AtWWP1 para o domínio carboxi-terminal. Provavelmente, a região altamente conservada no domínio C terminal seja a responsável pela formação de corpos nucleares por ambas as proteínas de planta (AtWWP1) e humano (PQBP1).

3.3 AtWWP1 redireciona a proteína citoplasmática NIG para os corpos nucleares

Uma vez que AtWWP1 foi identificada pela sua capacidade de interagir com NIG em leveduras e que NIG exibe propriedades de proteínas de transporte nucleocitoplasmático (Carvalho et al., 2008b, Machado 2011), foi de interesse examinar se NIG pudesse ser um alvo de AtWWP1 na compartimentalização de corpos nucleares. A proteína NIG é uma proteína citoplasmática, que se acumula ao redor do envelope nuclear de células vegetais (Carvalho et al., 2008b; Figura 5A). Entretanto, co-expressão ectópica da proteína NIG-mCherry com AtWWP1-GFP resulta no redirecionamento de NIG do citoplasma para o núcleo, onde NIG aparentemente passa a fazer parte dos corpos nucleares formados por AtWWP1 (Figura 5B e 5C). Estes resultados indicam que AtWWP1 tem a capacidade de relocar proteínas para corpos nucleares. Trata-se de uma propriedade inerente de AtWWP1 porque NIG interage *in vitro* e *in vivo* com a proteína NSP de begomovírus, e não é redirecionada para o núcleo.

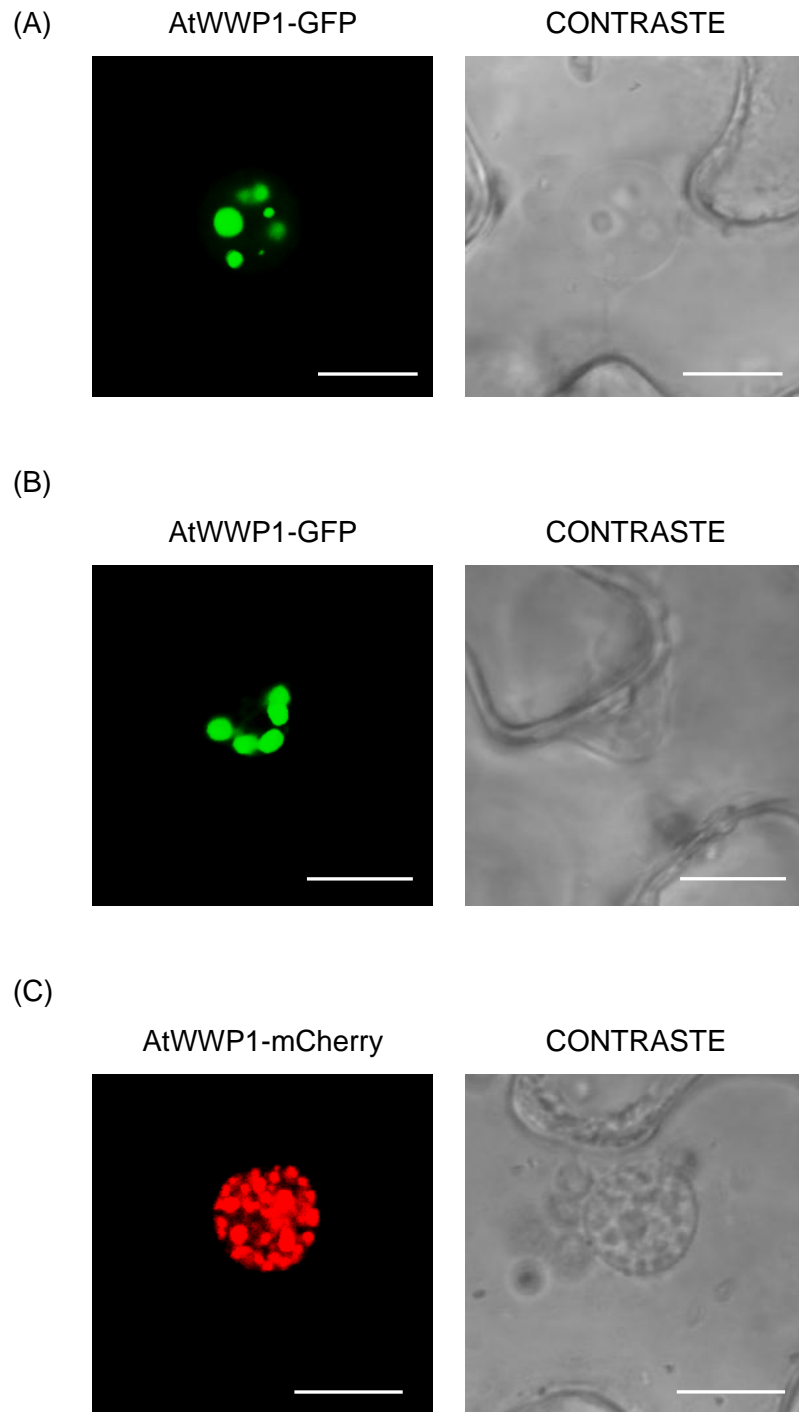


Figura 3: Localização subcelular de AtWWP1. Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *A. tumefaciens* carregando as construções de AtWWP1-GFP (A e B) e AtWWP1-mCherry (C). As imagens foram obtidas por microscopia confocal, 72 horas após a agroinfiltração. As barras equivalem a 10 μ m.

3.4 AtWWP1 interage com NIG *in vivo* e no núcleo de células transfectadas.

Embora AtWWP1 tenha sido identificada pela sua capacidade de interagir com NIG em leveduras, a formação do complexo AtWWP1-NIG *in vivo* não foi demonstrada. Com o objetivo de substanciar o argumento de que AtWWP1 intermedia a localização de NIG para os corpos nucleares, ensaios de coimunoprecipitação foram inicialmente conduzidos para confirmar se NIG interage com AtWWP1 *in planta*. Para isto, foram utilizados extratos proteicos de folhas de *N. benthamiana* expressando transientemente NIG-6HA e AtWWP1-GFP (Figura 6). O extrato proteico de folhas expressando apenas AtWWP1-GFP foi imunoprecipitado utilizando *beads* anti-GFP, e o imunoprecipitado detectado por *western blotting* com o anticorpo anti-HA (canaleta 1) ou anti-GFP (canaleta 4). A ausência de bandas na canaleta 1 comprova que o anticorpo anti-HA não reconhece a proteína AtWWP1-GFP, sendo, portanto, específico para o epítipo HA. Expressão transiente da proteína AtWWP1-GFP em folhas de tabaco resultou em duas bandas de mobilidade eletroforética correspondente a ~75kDa, massa molecular predita para a proteína recombinante, e ~80 KDa, provavelmente uma forma pós-traducionalmente modificada de AtWWP1 (canaleta 4).

A interação entre NIG e ATWWP1 foi avaliada na canaleta 2 em que o extrato protéico de folhas expressando transientemente AtWWP1-GFP + NIG-6HA foi imunoprecipitado utilizando *beads* anti-GFP, e detectada por *western blotting* com o anticorpo anti-HA, sendo que a banda única de aproximadamente 70 kDa representa a proteína NIG. *Immunoblotting* de uma fração do extrato protéico de folhas coinfiltradas com AtWWP1-GFP + NIG-6HA com o anticorpo anti-HA revelou o nível de expressão de NIG no extrato que foi utilizado para a co-imunoprecipitação com anti-GFP (canaleta 3). A canaleta 5 (input) representa uma alíquota correspondente a 12,5% do total aplicado na canaleta 2, revelada com o anticorpo anti-GFP, indicando o nível de expressão da proteína AtWWP1-GFP, no ensaio de co-imunoprecipitação.

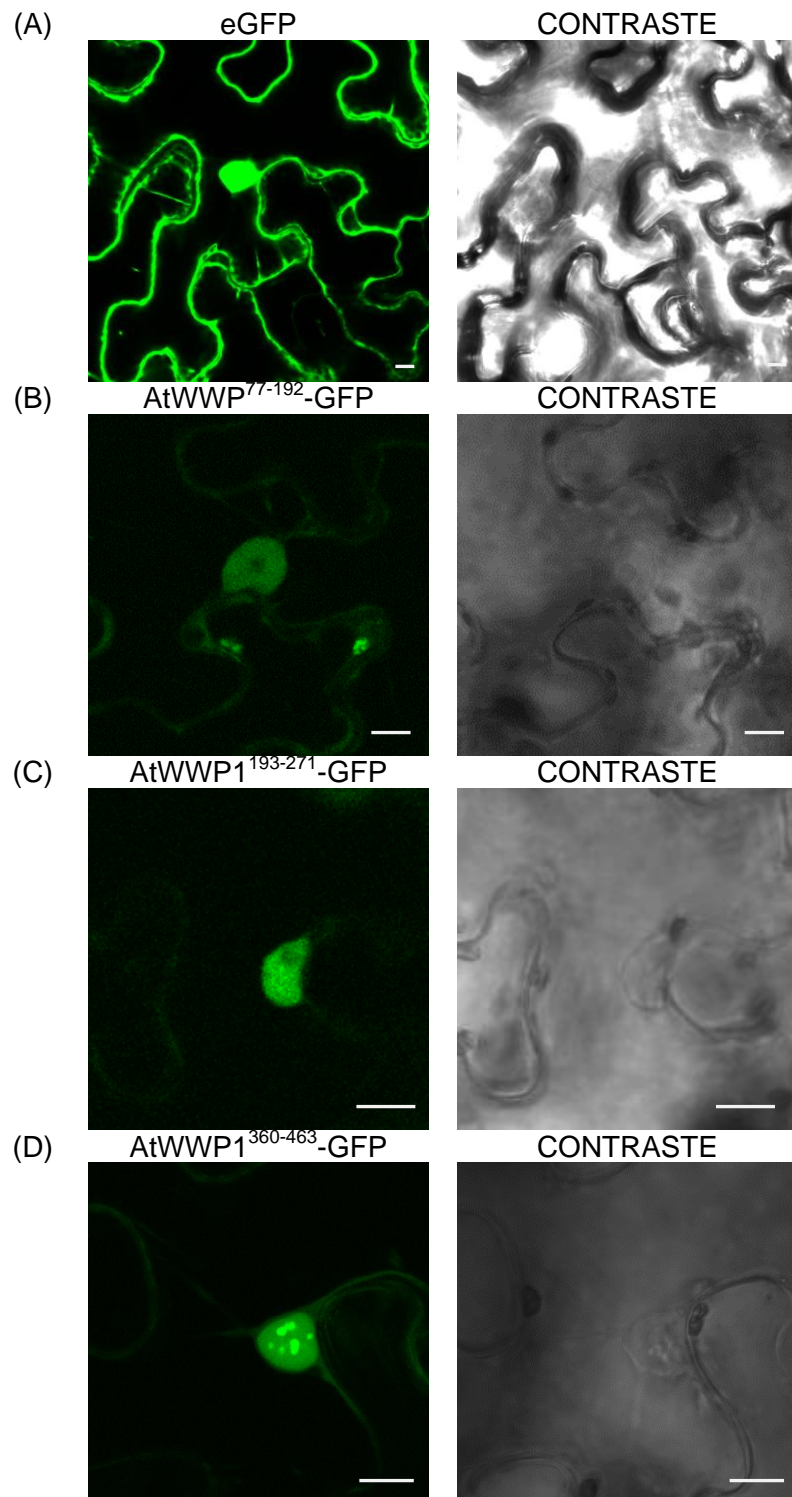


Figura 4: A capacidade de formação de corpos nucleares e atribuída à porção C-terminal de AtWWP1. Folhas de *N. benthamiana* expressando transientemente as construções AtWWP1¹⁷⁷⁻¹⁹²-GFP (A), AtWWP1¹⁹³⁻²⁷¹-GFP (B) e AtWWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³-GFP (C) foram analisadas por microscopia confocal. As barras correspondem a 10μm.

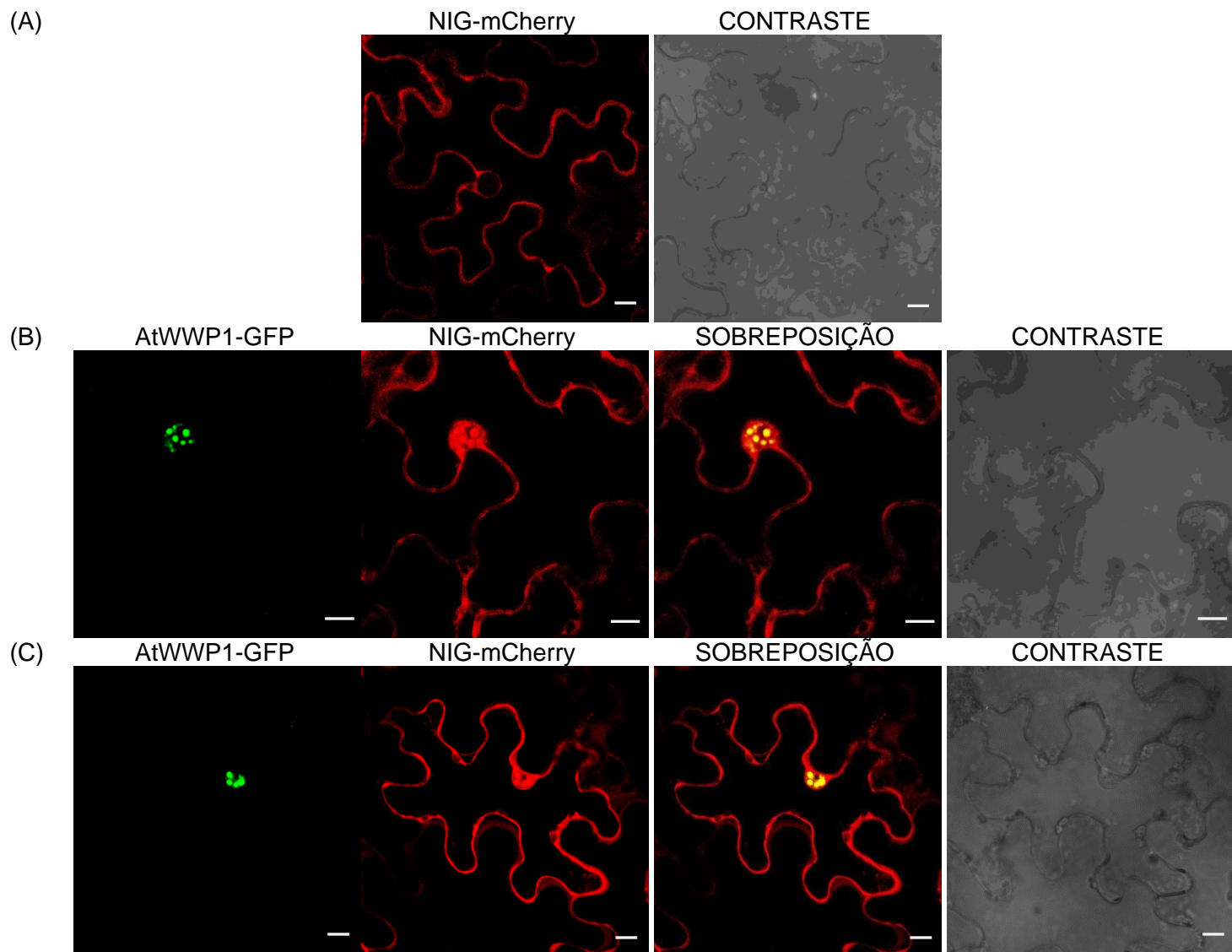


Figura 5: NIG é redirecionada para o núcleo quando co-expressa com AtWWP1. Folhas de *N. benthamina* foram agroinfiltradas com NIG-mCherry (A) e AtWWP1-GFP + NIG-mCherry (B e C), as imagens de microscopia confocal foram obtidas após 72 horas após a agroinfiltração. As barras correspondem a 10 μm

A interação *in vivo* entre NIG e AtWWP1 foi também avaliada pelo ensaio de complementação de fluorescência bimolecular, BiFC (Figura 7). Além de detectar a interação *in vivo* entre proteínas candidatas, esta técnica permite identificar a localização subcelular da interação. Inicialmente, as proteínas NIG e AtWWP1 foram fusionadas às porções N-terminal e C-terminal não-fluorescentes, da proteína amarela fluorescente (YFP). Culturas de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV3101, carreando as combinações das construções foram agroinoculadas em folhas de *N. benthamina*. Após 72hs, fragmentos das folhas infiltradas foram analisados em microscopia confocal. A fluorescência emitida por YFP foi reconstituída no núcleo de células coexpressando AtWWP1-SPYNE e NIG-SPYCE (Figura 7A), bem como em folhas coexpressando AtWWP1-SPYCE e NIG-SPYNE (Figura 7B). Nenhuma fluorescência foi detectada quando AtWWP1 e NIG foram coinfiltradas com o vetor complementar vazio (Figuras 7C e 7D). Estes resultados demonstram que a interação detectada entre NIG e AtWWP1 pelo sistema de duplo híbrido em leveduras (MACHADO,2012) ocorre também *in vivo*. Além disso, foi possível verificar que a interação entre NIG e AtWWP1 ocorre no núcleo com a formação de corpúsculos nucleares (Figuras 7A e 7B), reforçando o argumento de que AtWWP1 direciona NIG para os corpos nucleares.

3.5 A proteína AtWWP1 também interage com AtMBD2, proteína que contém um domínio de ligação a CG metilado

Com a finalidade de confirmar a propriedade inerente de AtWWP1 de compartimentalização de proteínas ligantes em corpos nucleares, inicialmente foi identificado, através do interactoma de *Arabidopsis thaliana* (<http://signal.salk.edu/interactome/A11.html>), a proteína AtMBD2, como uma possível parceira adicional de AtWWP1.

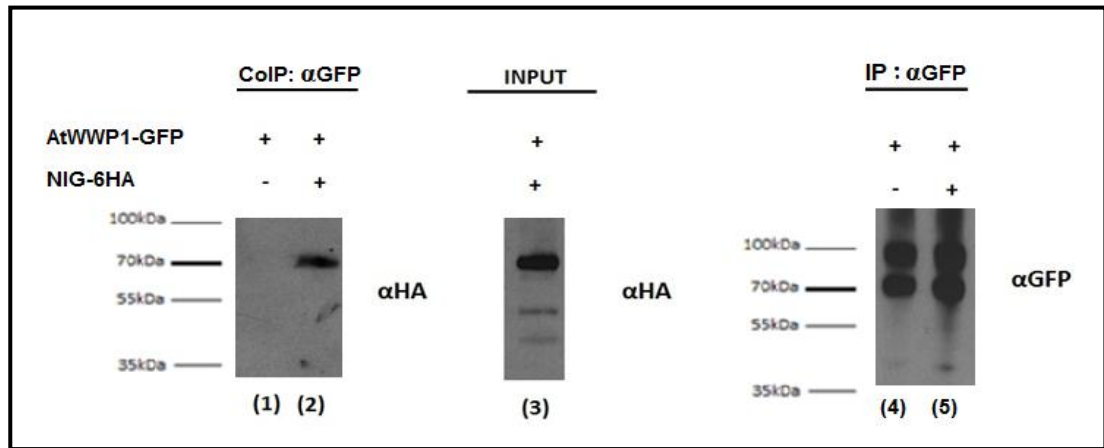


Figura 6: NIG e AtWWP1 interagem *in vivo*. Extrato proteico de folhas de *N. benthamiana* agroinoculadas com AtWWP1-GFP (canaleta 1) e AtWWP1-GFP+ NIG-6HA (canaleta 2), foram imunoprecipitados com *beads* anti-GFP e detectadas com anticorpo anti-HA. O nível de expressão da proteína recombinante NIG-6HA (input) foi monitorado através de *immunoblot* de uma fração do extrato proteico de folhas coinfiltradas com AtWWP1-GFP + NIG-6HA sondado com anti-HA (canaleta 3). As canaletas 4 e 5 (inputs), representam 12,5% dos totais aplicados nas canaletas 1 e 2, respectivamente, reveladas com o anticorpo anti-GFP, indicando que a proteína AtWWP1-GFP foi expressa em ambas as condições.

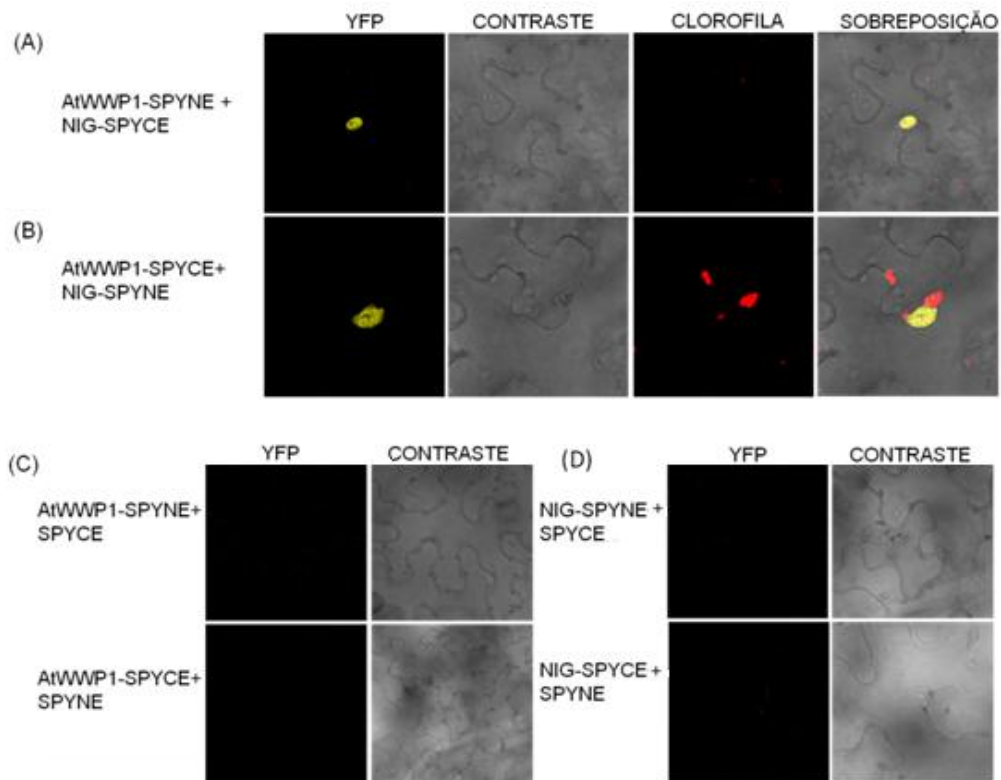


Figura 7: A interação entre NIG e At2G41020 ocorre no núcleo. Fragmentos não-fluorescentes da proteína amarela fluorescente (YFP), NE e CE, foram fusionados a NIG e AtWWP-1. Diferentes combinações das construções, conforme indicado, foram agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana* e analisadas por microscopia confocal, 72 h após agroinfiltração.

AtMBD2 (AT5G35330) pertence à família de proteínas de Arabidopsis, caracterizada estruturalmente pela presença de um domínio MBD (methyl-CpG-binding domain) e, de acordo com o interactoma de Arabidopsis, interage com uma série de fatores de transcrição. A interação entre AtWWP1 e AtMBD2 foi confirmada por meio do ensaio de duplo híbrido em leveduras (Figura 8). Leveduras expressando as proteínas quiméricas BD-AtWWP1 + AD-AtMBD2, bem como as construções inversas pAD-AtWWP1 + pBD-AtMBD2, apresentaram crescimento tanto em meio deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina quanto no mesmo meio, acrescido de 10 mM de 3AT (Figura 8A). Os controles negativos pBD + pAD-AtWWP1; pBD-AtMBD2+ pAD, pBD + pAD-AtMBD2 e pBD + pAD apresentaram crescimento apenas em meio deficiente de leucina e triptofano, que seleciona os duplos transformantes. Entretanto, foi observado o crescimento do controle negativo pBD-AtWWP1+ pAD tanto em meio deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina quanto no mesmo meio seletivo, acrescido de 10 mM de 3AT. Este resultado indica que a proteína AtWWP1 exibe atividade de ativação transcricional em leveduras.

Além de promover prototrofia a histidina, a coexpressão de AtWWP1 e AtMBD2 fusionados aos domínios de GAL4 resultou na transativação do gene repórter *LacZ*, (Figura 8B) Leveduras co-transformadas com pBD-AtWWP1 + pAD-AtMBD2 ($3.77 \pm 0,38$), bem como as construções inversas pAD-AtWWP1 + pBD-AtMBD2 ($2,95 \pm 0,34$), apresentaram atividade da enzima β -galactosidase significativamente superior (ao nível de 5% de significância pelo teste t) àquela apresentada pelos controles negativos, que corresponderam pBD + pAD-AtWWP1 (0.67 ± 0.07); pBD-AtMBD2+ pAD (0.58 ± 0.04), pBD + pAD-AtMBD2 (0.63 ± 0.06), pBD-AtWWP1+ pAD (1.21 ± 0.34) e pBD + pAD (0.58 ± 0.04). Leveduras coexpressando pBD-AtWWP1 + pAD apresentaram atividade da enzima β -galactosidase superior aos demais controles negativos, embora os valores não tenham sido estatisticamente diferentes. Coletivamente, estes resultados confirmam que a proteína AtMBD2 interage com AtWWP1 em leveduras e sugerem que AtWWP1 possa ter uma atividade transativadora fraca em leveduras.

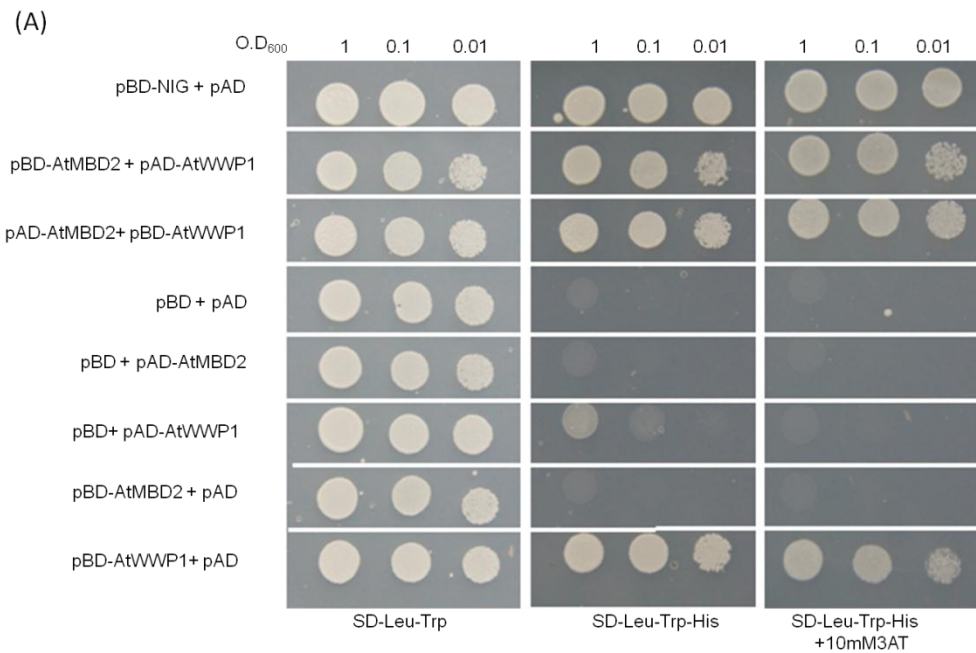
3.6 A proteína AtWWP1 interage in vivo com AtMBD2

Com o objetivo de verificar se a interação entre AtWWP1 e AtMBD2 ocorre *in planta* foi realizado o ensaio de coimunoprecipitação (Figura 9),

utilizando o extrato proteico de folhas de *N. benthamiana* expressando transientemente AtWWP1-6HA e AtMBD2-GFP.

A especificidade do anticorpo anti-HA foi avaliada através de *immunoblots* de imunoprecipitados de extrato proteico de folhas expressando transientemente AtMBD2-GFP preparados com *beads* anti-GFP mas sondados com o anticorpo anti-HA (canaleta 1). A ausência de bandas comprova que o anticorpo anti-HA não reconhece a proteína AtMBD2-GFP, sendo portanto, específico para o epítopo HA. A interação entre AtWWP1 e AtMBD2 foi avaliada na canaleta 2 em que o extrato proteico de folhas expressando transientemente AtWWP1-6HA + AtMBD2-GFP foi imunoprecipitado utilizando *beads* anti-GFP, e detectada por *western blotting* com o anticorpo anti-HA, revelando a presença de duas bandas, ambas correspondentes à proteína AtWWP1-6HA (~55kDa e ~75kDa). O nível de expressão de AtWWP1-6HA no extrato proteico de folhas coinfiltradas com ATWWP1-6HA + AtMBD2-GFP foi monitorado através de *immunoblot* de uma fração desses extratos sondado com anti-HA (canaleta 3). Estes resultados confirmam os resultados anteriores de expressão de AtWWP1-GFP em plantas, nos quais duas bandas de AtWWP1 são detectadas e que, provavelmente, representam diferentes formas modificadas postraducionalmente. As canaletas 4 e 5 (inputs), representam uma alíquota correspondente a 12,5% dos totais aplicados nas canaletas 1 e 2, respectivamente, reveladas com o anticorpo anti-GFP, indicando o nível de expressão da proteína AtMBD2-GFP em ambas as condições.

A interação *in vivo* entre AtMBD2 e AtWWP1 foi também avaliada pelo ensaio de complementação de fluorescência bimolecular BiFC (Figura 10). As proteínas AtMBD2 e AtWWP1 foram fusionadas às porções N-terminal e C-terminal, não-fluorescentes, da proteína amarela fluorescente (YFP). Culturas de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV3101, carreando as combinações das construções foram agroinoculadas em folhas de *N. benthamiana* e, após 72 h, fragmentos das folhas infiltradas foram analisados por microscopia confocal. A fluorescência emitida por YFP foi reconstituída no núcleo de células coexpressando AtWWP1-SPYNE e AtMBD2-SPYCE (Figura 10A), bem como em folhas coexpressando AtWWP1-SPYCE e AtMBD2-SPYNE (Figura 10B). Nenhuma fluorescência foi detectada quando as fusões de AtWWP1 e AtMBD2 foram coinfiltradas com o vetor complementar vazio (Figura 10C e 10D). Estes resultados confirmam que AtWWP1 e AtMBD2 interagem *in vivo* e que a formação do complexo AtMBD2-AtWWP1 ocorre no núcleo, mais precisamente, em corpos nucleares.



(B)

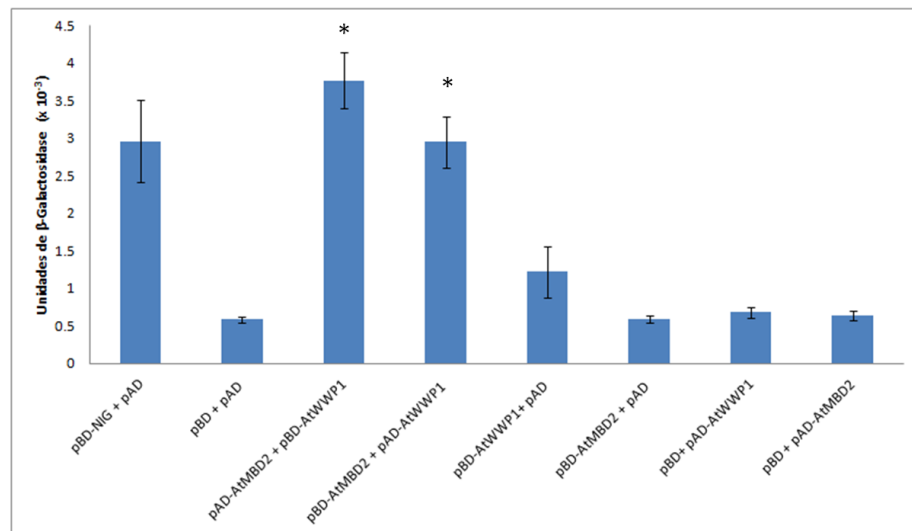


Figura 8: AtWWP1 interage com AtMBD2 em leveduras. (A) Leveduras cotransformadas com as construções indicadas foram avaliadas quanto à sua prototrofia à histidina, sendo plaquedas em meio seletivo deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, suplementado com 10 mM de 3AT. (B) A quantificação da atividade da enzima β -galactosidase (representada em $\text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) foi utilizada para confirmar as interações. Os pares foram comparados pelo teste t e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

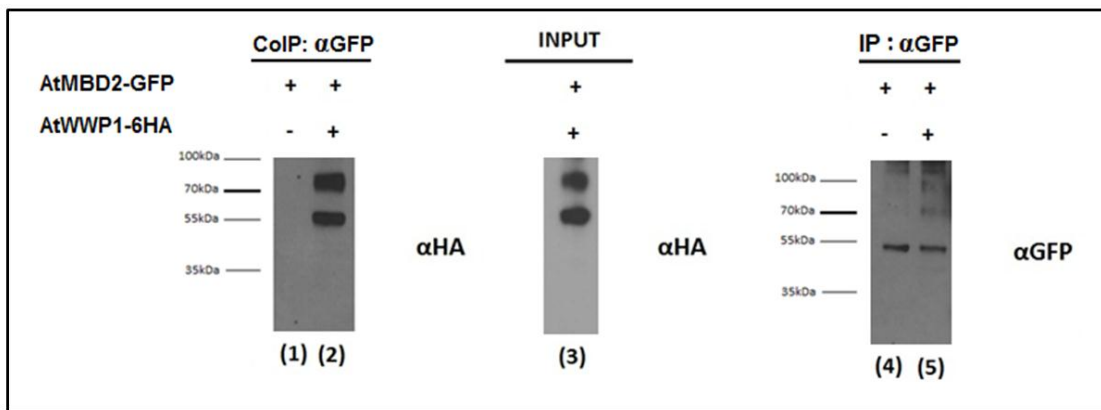


Figura 9: AtWWP1 e AtMBD2 interagem *in vivo*. Extrato proteico de folhas de *N. benthamiana* agroinoculadas com AtMBD2-GFP (canaleta 1) e AtMBD2-GFP+ AtWWP1-6HA (canaleta 2), foram imunoprecipitados com *beads* anti-GFP e detectadas com anticorpo anti-HA. O nível de expressão da proteína recombinante HA-AtWWP1 foi monitorado por *immunoblots* de uma fração do extrato proteico de folhas coinfiltradas com AtMBD20-GFP+ AtWWP1-6HA sondado com anti-HA. As canaletas 4 e 5 (inputs), representam 12,5% dos totais aplicados nas canaletas 1 e 2, respectivamente, reveladas com o anticorpo anti-GFP, indicando que a proteína AtMBD2-GFP foi expressa em ambas as condições.

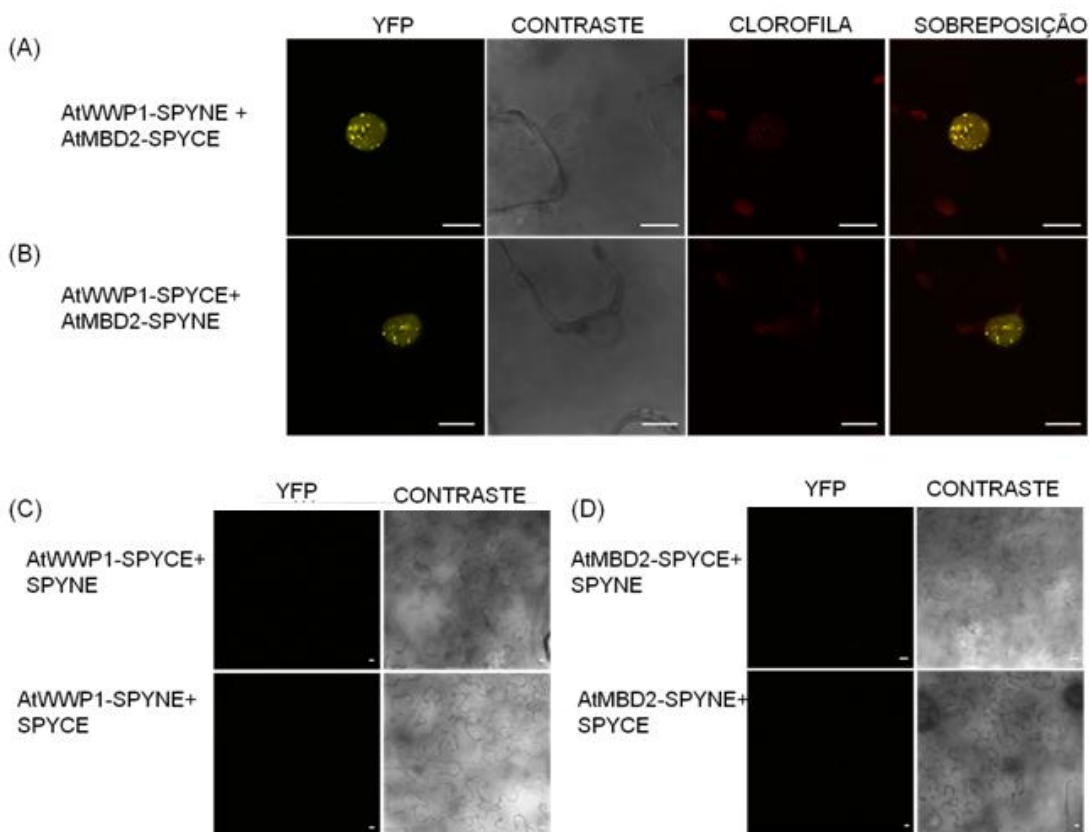


Figura 10: A interação entre AtWWP1 e AtMBD2 ocorre no núcleo. Ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC). Fragmentos não-fluorescentes da proteína amarela fluorescente (YFP), NE e CE, foram fusionados à AtMBD2 e AtWWP1. Diferentes combinações das construções foram agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana* e examinadas por microscopia confocal. As barras correspondem a 10 μ m.

3.7 Co-localização de AtWWP1 com a proteína AtMBD2 em corpos nucleares

Previamente, foi demonstrado que a proteína AtMBD2 é uma proteína nuclear, dispersa no nucleoplasma e não encontrada em corpos nucleares (Zemach *et al.*, 2005; Figura 11A). Entretanto, a co-expressão transiente da proteína AtMBD2-mCherry com AtWWP1-GFP resultou na sua realocação para corpos nucleares formados por AtWWP1 (Figura 11B), o que é condizente com os resultados obtidos no ensaio de complementação de fluorescência bimolecular que mostrou a interação entre as proteínas ocorrendo em corpos nucleares (Figura 10). Uma vez que NIG é parceiro celular de AtWWP1, a co-localização entre NIG e AtMBD2 também foi analisada (Figura 11C). Diferentemente do observado quando coexpressa com AtWWP1 (Figura 4B), NIG permaneceu no citoplasma quando expressa com AtMBD2. Estes resultados acomodam diversas interpretações. Primeiramente, eles indicam que a localização de ambas as proteínas NIG e AtMBD2 para os corpos nucleares é dependente de interação com AtWWP1. Segundo, provavelmente a interação entre NIG e AtMDB2 não ocorre *in vivo*. Finalmente, um possível homólogo de AtWWP1 de *N. bethammiana* não é capaz de intermediar a interação entre as proteínas heterólogas de Arabidopsis ou é expresso em concentrações abaixo do nível de detecção.

3.8 Interação de AtWWP1 com AtMBD2 ocorre via seu domínio C-terminal conservado

Com a finalidade de mapear em AtWWP1 os domínios de interação com seu parceiros celulares NIG e AtMBD2, as 3 formas truncadas de ATWWP1, WWP1⁷⁷⁻¹⁹², WWP1¹⁹³⁻²⁷¹ e WWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³, foram fusionadas a domínios de GAL4 e as possíveis interações avaliadas pelo sistema duplo híbrido em leveduras (Figura1). A porção C-terminal de AtWWP1 foi responsável pela interação com AtMBD2 (Figura12). Leveduras expressando as proteínas quiméricas BD-AtWWP1⁷⁷⁻¹⁹² + AD-AtMBD2, AD-AtWWP1⁷⁷⁻¹⁹² + BD-AtMBD2, AD-AtWWP1¹⁹³⁻²⁷¹ + BD-AtMBD2, apresentaram crescimento apenas em meio deficiente de leucina e triptofano, que seleciona os duplos transformantes (Figura 12A e 12B). Embora expressão o das proteínas quiméricas BD-AtWWP1¹⁹³⁻²⁷¹+ pAD-AtMBD2 tenha promovido prototrofia a histidina, o crescimento das leveduras co-transformadas foi interrompido na presença de 10 mM de 3AT (Figura 12B). Além disso, expressão das proteínas quiméricas AD- AtWWP1¹⁹³⁻²⁷¹ + BD-

AtMBD2 não resultou em prototrofia a histidina e, tampouco, promoveu crescimento no meio seletivo acrescido de 3AT. Em contraste, leveduras expressando BD-AtWWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³+ AD-AtMBD2, bem como a construção inversa pAD-AtWWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³+ pBD-AtMBD2 apresentaram crescimento em meio deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina tanto na ausência quanto na presença de 10 mM de 3AT (Figura 12C), enquanto que os controles negativos correspondentes apresentaram crescimento apenas em meio deficiente de leucina e triptofano, que seleciona os duplos transformantes. Estes resultados delimitam o domínio de ligação a AtMBD2 na região C-terminal, posições 360 a 463, de AtWWP1 que corresponde ao domínio altamente conservado entre homólogos de espécies vegetais e animais, responsável por relocar AtWWP1 para os corpos nucleares.

3.9 A porção C-terminal de AtWWP1 é suficiente para relocar AtMBD2 para os corpos nucleares

Uma vez que o domínio C-terminal conservado de AtWWP1 retém a habilidade de formar corpos nucleares e de ligar a AtMBD2, foi de interesse verificar se este domínio por si só seria suficiente para relocar AtMBD2 para os corpos nucleares. Folhas de *N. benthamiana* coexpressando transientemente as construções AtWWP1⁷⁷⁻¹⁹²-GFP+AtMBD2-mCherry (Figura 13A), AtWWP1¹⁹³⁻²⁷¹-GFP+AtMBD2-mCherry (Figura 13B) e AtWWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³-GFP+AtMBD2-mCherry (Figura 13C) foram analisadas em microscópio confocal, 72 horas após a agroinfiltração. Conforme apresentado na Figura 13C, a proteína AtMBD2 é relocada para os corpos nucleares quando colocalizada com a porção C-terminal de AtWWP1. Esses resultados reforçam o argumento de que a região C-terminal conservada de AtWWP1 possui a capacidade de formar agregados subnucleares e de direcionar proteínas ligantes para estes corpos nucleares.

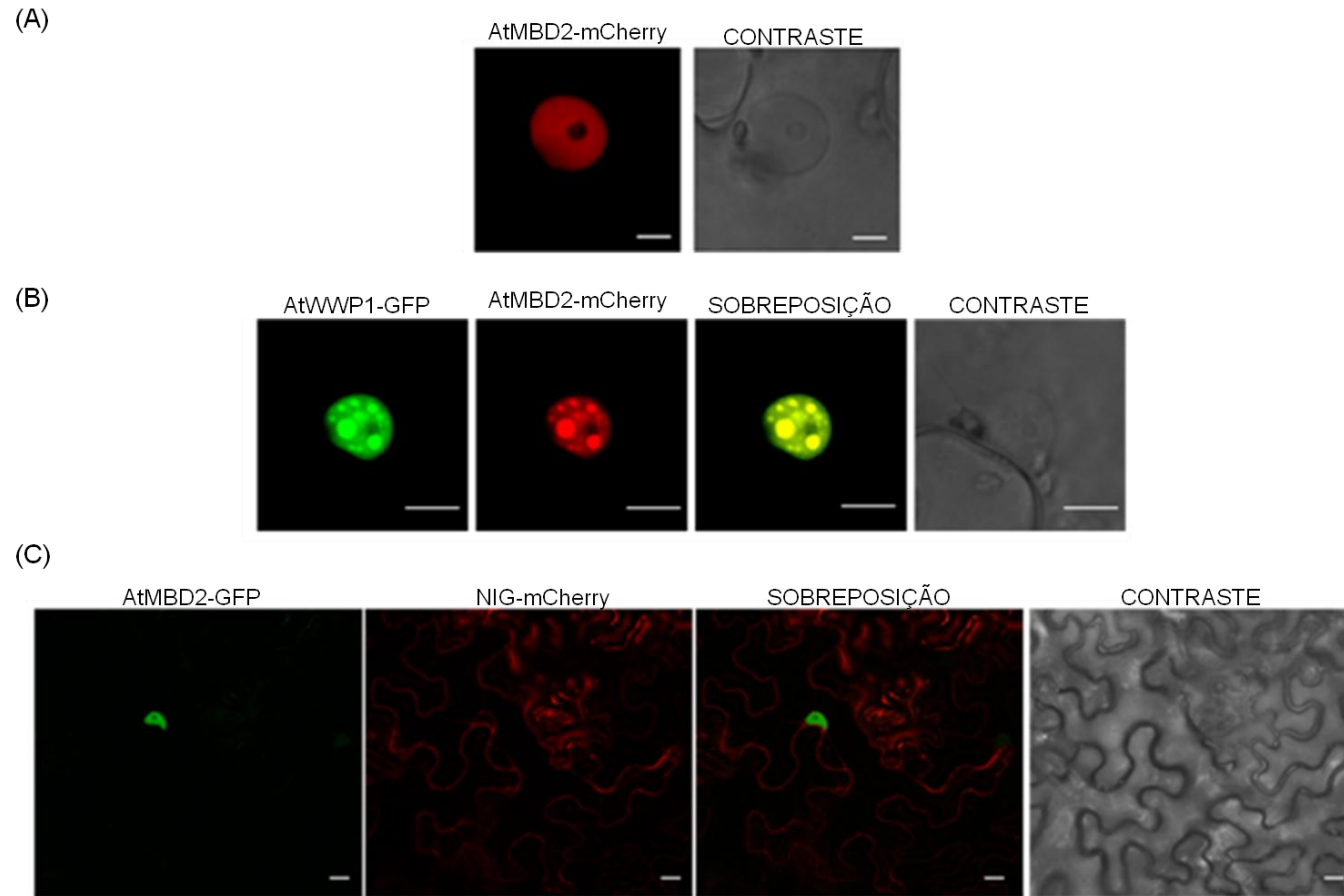


Figura 11: Localização subcelular de AtWWP1 com AtMBD2 e NIG. Folhas de *N. benthamiana* expressando transientemente as construções AtMBD2-mCherry (A), AtMBD2-mCherry + AtWWP1-GFP (B) e AtMBD2-GFP + NIG-mCherry (C) foram analisadas em microscópio confocal, 72 horas após a agroinfiltração. (B). As barras correspondem a 10 μ m

3.10 Natureza dos corpos nucleares formados por AtWWP1

Com o objetivo de caracterizar os corpos nucleares formados por AtWWP1, foi realizado a colocalização de AtWWP1 com 7 proteínas formadoras de corpos nucleares, envolvidas em processos biológicos conhecidos. Os marcadores utilizados foram: Fibrillarina (AT4G25630), Coilina (AT1G13030), CCR2 (AT2G21660), CypRS64 (AT3G63400), CDKC2 (AT5G64960), SCL33 (AT1G55310) e SR34 (AT1G02840), todos fusionados à *etiqueta* mCherry. Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com AtWWP1-GFP juntamente com cada um dos marcadores acima. Após 72hs, fragmentos das folhas infiltradas foram analisados em microscopia confocal (Figura 14).

Corpos nucleares conhecidos como *speckles* são característicos por funcionarem como subcompartimentos para diversos fatores envolvidos no *splicing* do pré-mRNA, incluindo snRNPs e proteínas ricas em repetições Serina/Arginina (família SR) (Mao *et al.*, 2011). A proteína CypRS64, uma ciclofilina membro da família RS, tem seu papel associado à regulação da maquinaria de *splicing* em *Arabidopsis*. Foi demonstrado que CypRS64 se associa ao fator SR34, importante no reconhecimento da região 5' durante o processo de *splicing* (Lorcovick *et al.*, 2004a; 2004b). Outro fator de *splicing*, membro da família SR em *Arabidopsis*, é a proteína SCL33, homóloga a proteína SR35 em mamíferos, capaz de se ligar a U1-70kDa, uma snRNP envolvida em múltiplos papéis durante o processamento do pre-mRNA (Ali *et al.*, 2003). A proteína CCR2 desempenha papel na regulação do ciclo circadiano em *Arabidopsis* (Heintzen *et al.*, 1997), além de, ter sua função associada ao fenômeno de *splicing* alternativo (Staiger *et al.*, 2003). A coexpressão de AtWWP1 com os fatores de *splicing* CypRS64, SR34, SCL33 e CCR2 indicou diferentes perfis de localização em todos os casos analisados (Figuras 14A, 14B, 14C e 14D), sendo que o padrão de *speckles* dos fatores de *splicing* não foi alterado, conforme pode ser verificado comparando-se a expressão de cada fator individualmente, com a coexpressão com AtWWP1.

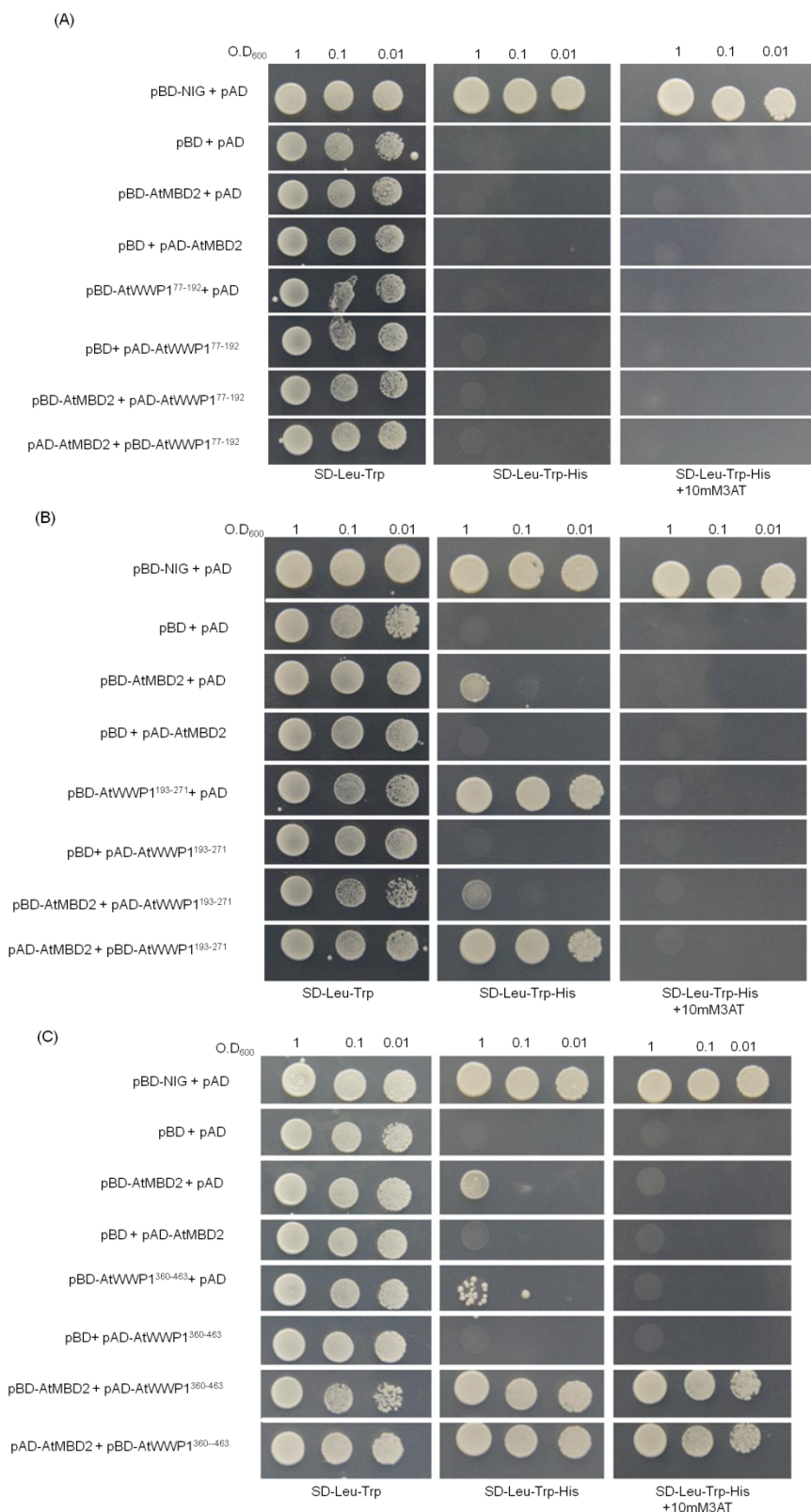


Figura 12: A porção C-terminal de AtWWP1 é suficiente para a interação com a proteína AtMBD2. Leveduras cotransformadas com as construções indicadas foram avaliadas quanto à sua prototrofia à histidina, sendo plaquedas em meio seletivo deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, suplementado com 10 mM de 3AT.

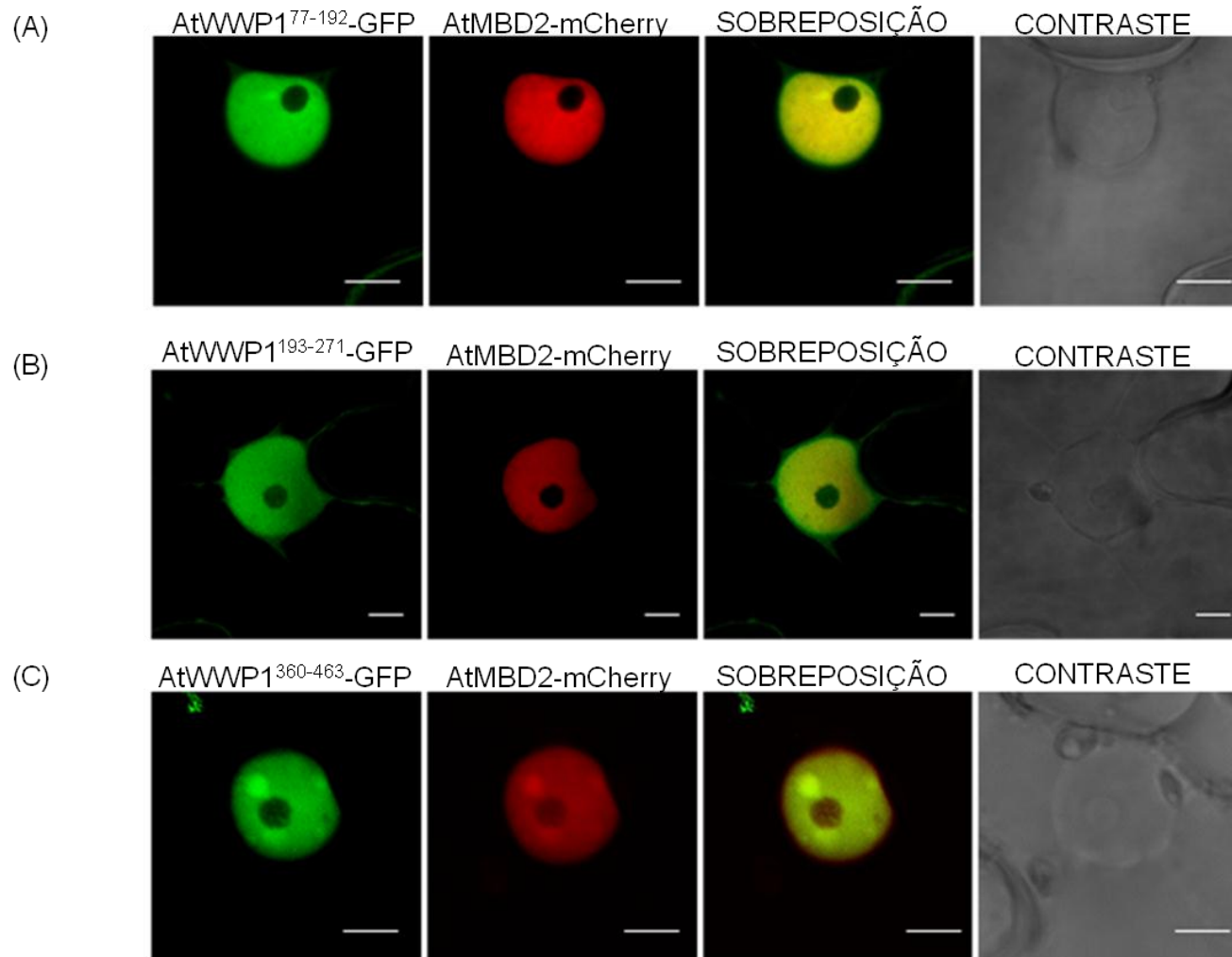


Figura 13: A proteína AtMBD2 é relocada para os corpos nucleares quando expressa com a porção C-terminal de AtWWP1. Folhas de *N. benthamiana* coexpressando transientemente as construções AtWWP1⁷⁷⁻¹⁹²-GFP +AtMBD2-mCherry (A), AtWWP1¹⁹³⁻¹²⁷¹-GFP +AtMBD2-mCherry (B) e AtWWP1³⁶⁰⁻⁴⁶³-GFP AtMBD2-mCherry (C) foram analisadas em microscópio confocal, 72 horas após a agroinfiltração. As barras correspondem a 10 μ m.

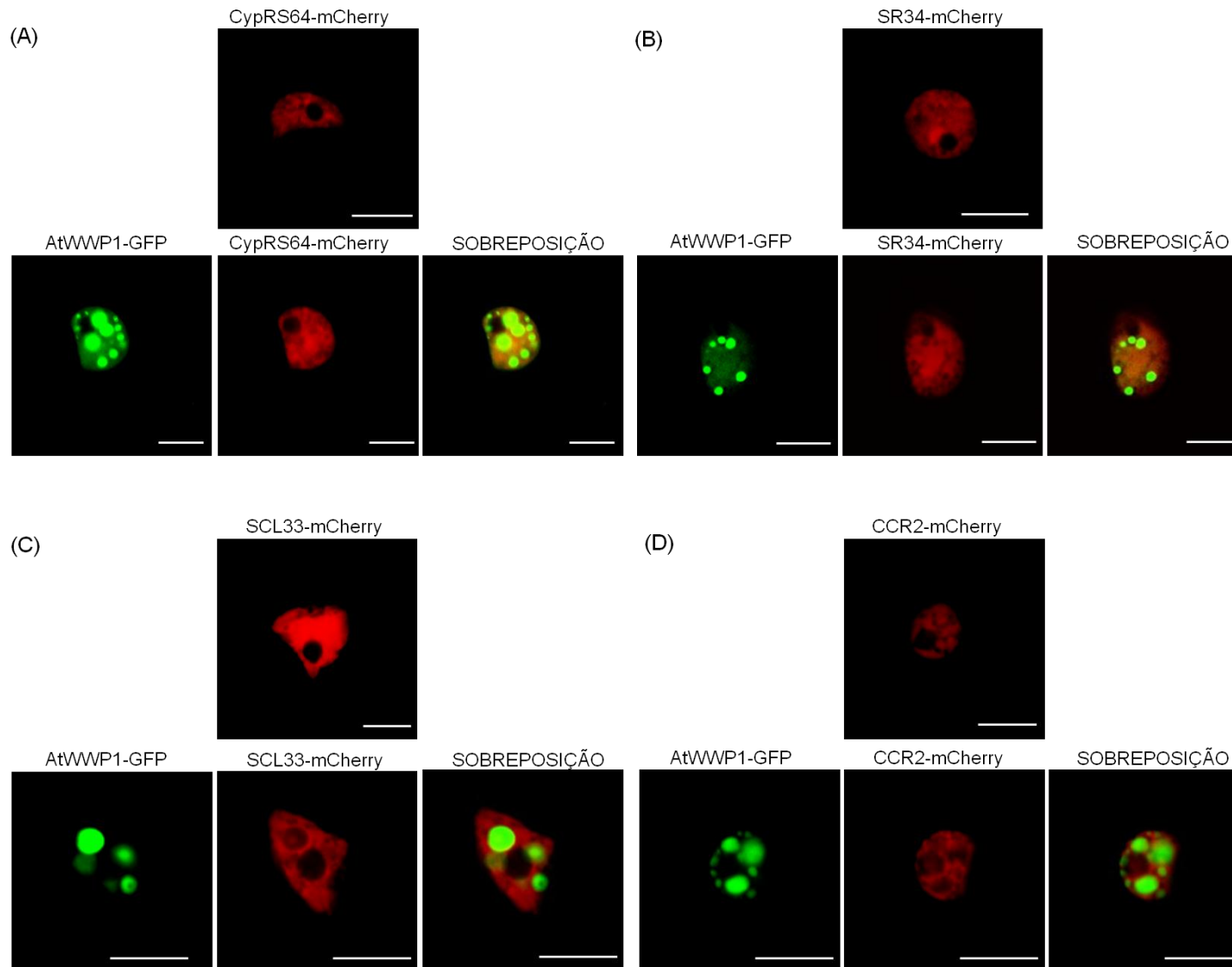
Portanto, os corpos nucleares contendo AtWWP1 foram claramente distintos daqueles formados pelos fatores de *splicing* analisados, nestes estudos de co-localização. O mesmo foi observado quando AtWWP1 foi coexpresso com a proteína nucleolar fibrilarina. Diferentes perfis de colocalização foram observados (Figura 14E), indicando a ausência de AtWWP1 no nucléolo. A proteína AtWWP1 também não compõe o complexo formador dos corpos de cajal (Figura 14F), indicado pelo diferente perfil de localização quando coexpressa com a proteína Coilina, principal componente dos corpos de Cajal (Ogg & lamond, 2002). Muitas kinases e fosfatases capazes de fosforilar e desfosforilar componentes da maquinaria de *splicing*, respectivamente, tem sido encontrados em *speckles*, o que condiz com o papel dessas proteína na regulação das modificações pós-traducionais de componentes da maquinaria de *splicing*. (Mao *et al.*2011). A proteína CDK (*cyclin-dependent kinase*) desempenha um papel regulatório chave em diversas funções celulares, incluindo progressão do ciclo celular, transcrição e tradução. Em plantas, foi reportada a co-localização da proteína CDKC2 com componentes do spliceossomo (Kitsios *et al.*, 2008). A coexpressão de AtWWP1-GFP e CDKC2-mCherry revelou que ambas co-localizam no núcleo somado de um discreto aumento dos *speckles* de CDKC2 (Figura 14D). Embora CDKC2 não tenha sido claramente relocada para os corpos nucleares de AtWWP1, e áreas sem sobreposição do GFP e RFP sejam observadas no núcleo mesmo que em menor frequência, nota-se um padrão similar de localização subnuclear entre as duas proteínas o que sugere que AtWWP1 e CDKC2 devem estar envolvidas em um mesmo fenômeno biológico.

3.11 Avaliação da capacidade de AtWWP1 de ligação a ácidos nucléicos *in vitro*

A capacidade de formar corpos nucleares compartimentalizados com CDKC2 sugere que AtWWP1 exibe atividades bioquímicas condizentes com funções nucleares, tais como atividade de ligação a RNA e atividade de ligação a DNA. A capacidade de ligação de AtWWP1, e também da proteína parceira AtMBD2a, ao RNA foi avaliada *in vitro*, utilizando RNA total de *Arabidopsis thaliana* ligado a biotina e conjugado a *beads* de streptavidina. As proteínas AtWWP1 e AtMBD2 fusionadas ao epitopo GST foram transcritas e traduzidas *in vitro* e incubadas com complexo RNA-*beads*. Estes ensaios demonstraram que

AtWWP1 e AtMBD2 não possuem a capacidade de ligação a RNA (Figura 15A, canaletas 3 e 4 respectivamente). Como controle positivo, na canaleta 2, foi utilizada a proteína CCR2, dotada de um domínio característico de ligação a RNA e cuja capacidade de ligação foi previamente reportada (Heintzen *et al.*, 1997). A canaleta 1 representa a expressão de GST, vno vetor vazio pTNT-GST, indicando que não há ligação inespecífica entre GST e o RNA. As canaletas (5), (6), (7) e (8) representam os *inputs* CCR2, GST, AtWWP1 e AtMBD2, respectivamente, demonstrando que todas as proteínas foram corretamente expressas *in vitro*.

A capacidade de ligação de AtWWP1, AtMBD2 e NIG a DNA fita simples (ssDNA) e/ou fita dupla (dsDNA) foi avaliada pelo ensaio de ligação *in vitro* utilizando *beads* de celulose conjugados a ssDNA ou dsDNA (Sigma; Figura 16). As proteínas AtWWP1 e AtMBD2 exibiram a capacidade de ligação a ssDNA (canaletas 4 e 5, respectivamente) e dsDNA (canaletas 9 e 10), enquanto que NIG não apresentou capacidade de ligação a nenhuma das duas formas de DNA (canaletas 3 e 8). Como controle positivo, foi utilizado o fator de transcrição PIF4 (AT2G41010, canaletas 2 e 7) cuja ligação a DNA foi previamente reportada (Sun *et al.*, 2012). As canaletas 1 e 6 representam vetor vazio pXHA incubado com os *beads* conjugados a ssDNA e dsDNA, respectivamente. As canaletas 11, 12, 13 e 14 representam os *inputs* de PIF4, NIG, AtWWP1 e AtMBD2, respectivamente, demonstrando que todas as proteínas foram corretamente expressas *in vitro*. Experimentos futuros serão necessários para avaliar se a atividade de ligação ao DNA de AtWWP1 confere seletividade para formação de corpos nucleares em regiões discretas da cromatina ou se seria uma propriedade inerente de AtWWP1 como possível fator de transcrição.



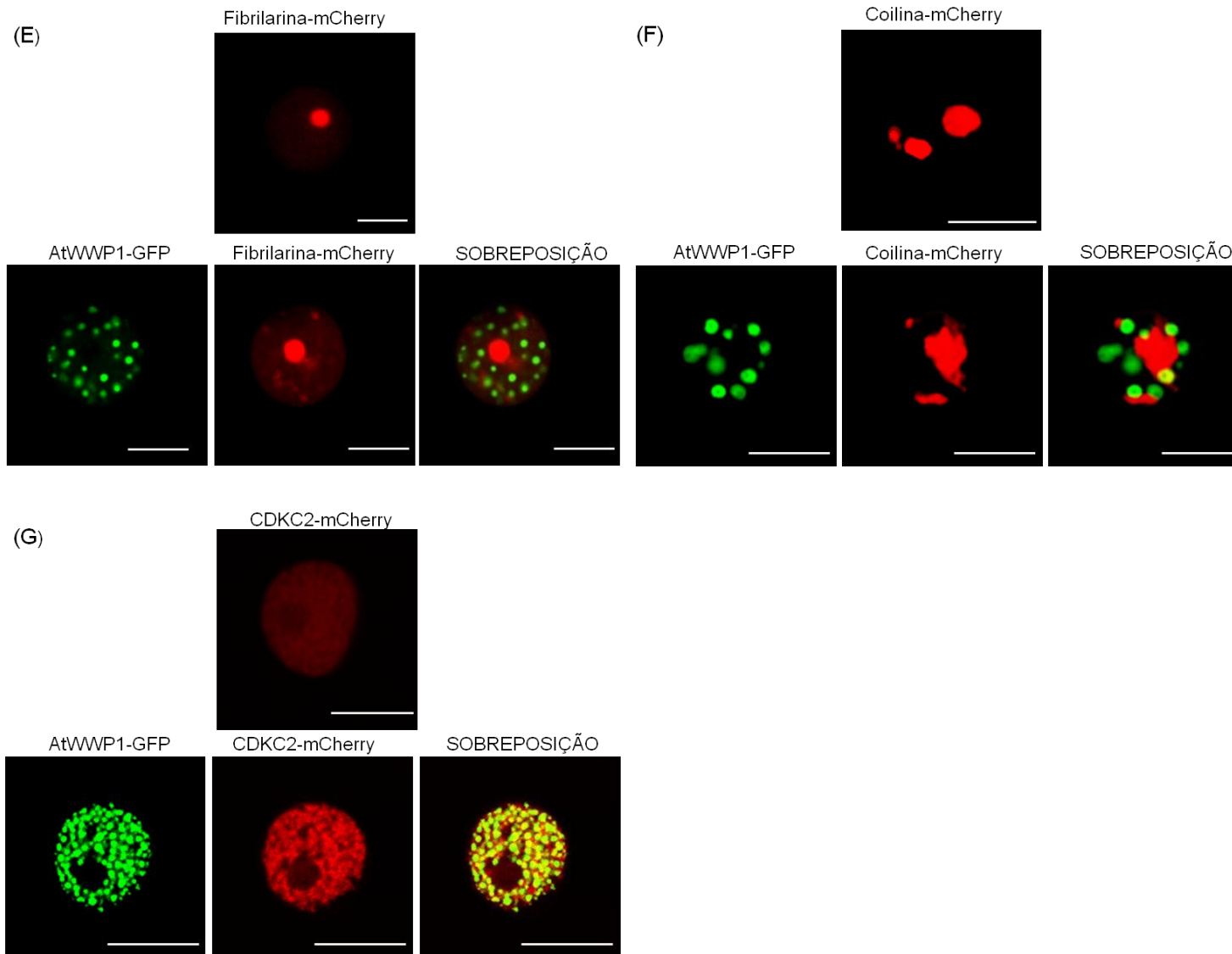


Figura 14: Localização subnuclear de AtWWP1 com proteínas formadoras de corpos nucleares. A proteína AtWWP1-GFP foi coexpressa em *N. benthamina* juntamente com as proteínas CypRS64-mCherry (A), SR34-mCherry (B), SCL33-mCherry (C), CCR2 -mCherry (D), Fibrilarina-mCherry (E), Coilina-mCherry (F) e CDKC2-mCherry (G). Cada uma das proteínas avaliadas também foram expressas separadamente. As barras correspondem a 10 μ m.

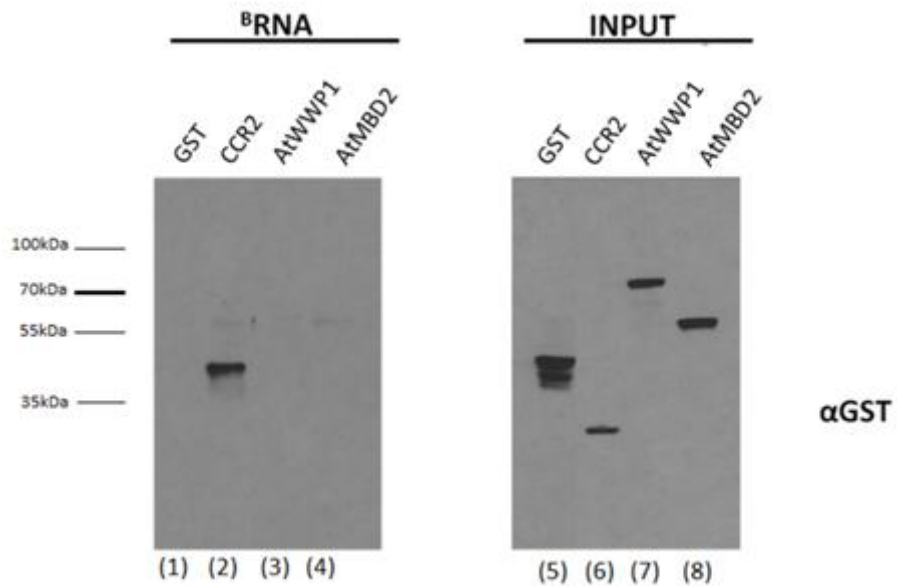


Figura 15: Ensaio de ligação de AtWPP1 e AtMBD2 a RNA *in vitro*. O RNA total de *Arabidopsis thaliana* foi marcado com biotina e posteriormente conjugado a *beads* magnéticos de streptavidina. As proteínas AtWPP1 e AtMBD2 fusionadas a GST foram transcritas e traduzidas *in vitro* e incubadas com complexo RNA-*beads*. Os controles negativo e positivo estão representados nas canaletas (1) e (2) respectivamente. As canaletas (5), (6), (7) e (8) representam os *inputs* de CCR2, GST, AtWPP1 e AtMBD2, respectivamente, demonstrando que todas as proteínas foram corretamente expressas *in vitro*.

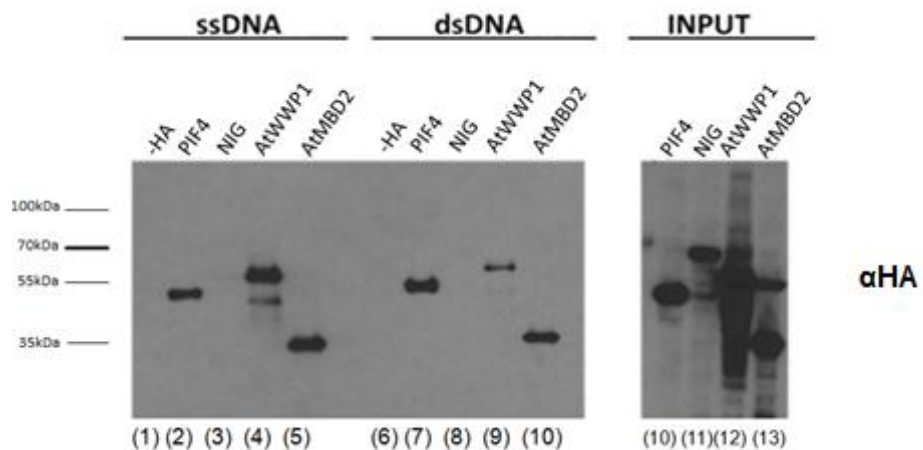


Figura 16: Ensaio de ligação de AtWPP1, AtMBD2 e NIG a DNA *in vitro*. As proteínas AtWPP1, AtMBD2 e NIG, fusionadas a HA, foram transcritas/traduzidas *in vitro* e posteriormente incubadas com DNA fita simples (ssDNA) e fita dupla (dsDNA), ambos conjugados a *beads* de celulose. O controle positivo PIF4 fusionado a HA o vetor vazio pIXHA também foram incubados com *beads* de ssDNA e dsDNA. As canaletas (11), (12), (13) e (14) representam os *inputs* de HA-PIF4, HA-NIG, HA-AtWPP1 e HA-AtMBD2, respectivamente, demonstrando que todas as proteínas foram corretamente expressas *in vitro*.

4.0 DISCUSSÃO

4.1 Papel biológico de AtWWP1 como proteína formadora de corpos nucleares

O locus AT2G41020 codifica uma proteína de função desconhecida, designada AtWWP1, devido á presença de dois domínios WW em sua sequência. Dentre seus homólogos mais bem caracterizados, destaca-se a proteína PQBP1 (*polyglutamine binding protein 1*)/Npw38 de humanos (Komuro *et al.*, 1999; Waragai *et al.*,1999), cujo papel está associado ao processamento do mRNA e a transcrição dirigida pela RNA polimerase II (Sudol *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2010). Os resultados dessa investigação forneceram diversas linhas de evidência demonstrando que AtWWP1 deve compartilhar com PQBP1 um certo grau de analogia funcional. Inicialmente, foi demonstrado que, similarmente a PQBP1, a proteína AtWWP1, localiza-se no núcleo, sendo capaz de formar corpos subnucleares que variam em número e tamanho (Okazawa *et. al.*; 2001, Figura 3). Em segundo lugar, as duas proteínas estão estruturalmente organizadas em módulos conservados em função e posição, quais sejam: o domínio WW, localizado na porção interna das proteínas, além de um domínio C-terminal englobando 58 aminoácidos altamente conservado. Enquanto que o domínio WW corresponde a um domínio bem caracterizado de interação proteína-proteína (Sudol & Hunter, 2000), o domínio C-terminal conservado foi caracterizado, nesta investigação, como sendo essencial para o endereçamento da proteína AtWWP1 para os corpos nucleares (Figura 4). Provavelmente, o domínio C-terminal de PQBP1 também exibe similar função, uma vez que a remoção da porção C-terminal de PQBP1, acarreta em perda da sua capacidade de formação de estruturas subnucleares, resultando em difusão da forma truncada no nucleoplasma e no citoplasma (Okazawa *et. al.*; 2001). Finalmente, foi demonstrada que, similarmente a PQBP1, a porção C-terminal de AtWWP1 também exibe uma função de interação proteína-proteína e retém a capacidade de relocar as proteínas ligantes para os corpos nucleares. De fato, foi demonstrado que a interação de AtWWP1 com seu parceiro AtMBD2 ocorre via região C-terminal, sendo essencial e suficiente para co-localização de AtMBD2 em corpos subnucleares (Figuras 12 e 13). Similar funções de interação proteína-proteína e relocação de proteínas parceiras para estruturas subnucleares também foram designadas para o domínio C-terminal de PBQ1. Zhang e colaboradores (2000) demonstraram que PQBP1 se associa a U5-15kDa/ Dim1, componente

do complexo de splicing U5 (Waragai *et al.*,2000), e o complexo se co-localiza em estruturas subnucleares. Essa co-localização em corpos nucleares também é observada quando Dim1 é coexpressa com a porção C-terminal de PBQ1, mas não ocorre quando apenas o domínio WW de PQBP1 é coexpresso com Dim1. Coletivamente, esses resultados indicam que a porção C-terminal de AtWWP1, conservada nas proteínas homólogas de espécies vegetais e animais, possui propriedades inerentes a um sinal de localização ou de biogênese de corpos nucleares. A capacidade de formação de corpos nucleares ainda não foi reportada em nenhuma das dez proteínas de *Arabidopsis thaliana* identificadas por sua homologia com AtWWP1 (Figura 2).

O recente sequenciamento do genoma de espécies vegetais revelou que em torno de 80% da região codificante de genes nucleares são interrompidas por sequências intrônicas (Redy 2007). A geração de RNAs funcionais (mRNAs) envolve a excisão precisa dessas sequências intrônicas com posterior ligação de exons. Esse fenômeno conhecido como splicing do pré-mRNA ocorre no spliceossomo, cuja montagem envolve uma série de interações RNA-RNA, RNA-proteína e proteína-proteína. Tem sido proposto que a proteína PQBP1, homóloga de AtWWP1, acopla os processos de transcrição com o processamento do mRNA, através de interações diretas com RNA pol II (Zhang *et al.*, 2000; Waragai *et al.*,2000), via domínio WW, e com U5-15kDa/Dim1, via domínio C-terminal conservado. Embora, não tenha sido ensaiado uma possível interação de AtWWP1 com componentes da maquinaria de *splicing*, duas linhas de evidências indicam que provavelmente AtWWP1 não seja sequestrada para o spliceossomo. Em ensaios de interação RNA-proteína *in vitro*, foi demonstrado que AtWWP1 não exibe a atividade de ligação a RNA. Além disso, os corpos nucleares de AtWWP1 foram claramente distintos daqueles formados pelos fatores de *splicing* CypRS64, SR34, SCL33 e CCR2 (Figura 14). Entretanto foi observado um padrão de co-localização entre os corpos nucleares de AtWWP1 e da proteína CDKC2. Kitisos e colaboradores (2008) demonstraram que CDKC2 se associa dinamicamente aos componentes do spliceossomo, tendo seu padrão de *speckles* modificados quando co-localizado com a ciclofilina CypRS64 e com SR34.

O fenômeno de *splicing*, bem como outras atividades catalíticas incluindo o capeamento, poliadenilação e clivagem ocorrem co-transcricionalmente de modo a garantir a maturação do pré-mRNA em mRNA. Todos esses processos são controlados por um grande número de proteínas capazes de formar complexos dinâmicos, os quais envolvem interações com DNA, pré-mRNA e proteínas, de modo a coordenar tais atividades. Dessa forma, evidências vem apontando um abundante “cross-talk” entre mecanismos regulatórios envolvendo a síntese do RNA e seu processamento

(Redy 2007). O ciclo de transcrição envolvendo a RNA polymerase II (RNAP II) envolve a fosforilação do domínio C-terminal de sua subunidade maior (CTD) (Pinheiro *et al.*, 2004). Desse modo, a fosforilação da CTD regula a transição da enzima RNAP II desde o complexo de iniciação ao de alongação, além de sua eficiência de alongação e processamento do pré-mRNA (capeamento, *splicing* e polyadenilação) (Barroco *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2004). Em *Arabidopsis*, foi demonstrado que a proteína CDKC2 é capaz de fosforilar a porção C-terminal de RNAP II, por meio da interação com uma ciclina T (Cui *et al.*, 2007). Esses resultados demonstram o papel dinâmico de CDKC2, associada a eventos transcripcionais e de *splicing*. A associação de AtWW1 com CDKC2, mas não componentes de *splicing* e corpos de Cajal (Figura 14) pode indicar o envolvimento dessa proteína primordialmente no processo de transcrição. De fato, estudos envolvendo PQBP-1 apontam sua associação à porção C-terminal da RNAP II, via seu domínio WW (Sudol *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2010). Em *Arabidopsis* foi demonstrado por Kang e colaboradores (2009), que 3 homólogos de AtWWP1 (Figura 2), membros da família ATPRP40 são capazes de interagir *in vitro* com o domínio C-terminal da subunidade maior da RNA polymerase II, via domínio WW. Além disso, foi demonstrado que a proteína AtWWP1 interage *in vivo* (Figuras 9 e 10) com AtMBD2, pertencente a família de proteínas dotadas de um domínio de ligação a CG metilado, cujo papel é associado à repressão da transcrição (Bird, 2002). Consistente com um papel no processo de transcrição, análise *in silico* do Interactoma de *Arabidopsis* (<http://signal.salk.edu/interactome/index2.html>) revela que AtMBD2 conecta AtWWP1 a uma rede de interações de repressores de transcrição envolvidos na resposta de sinalização do hormônio auxina (Figura 18). Seria interessante avaliar se aplicação de auxina afetaria a dinâmica ou a biogênese de corpos nucleares formados por AtWWP1.

Corpos nucleares compartimentalizam espacialmente o ambiente nuclear, criando sítios distintos dentro de um confinado volume, promovendo a concentração de substratos e enzimas de modo a aumentar a especificidade e eficiência de processos biológicos específicos (Kaiser *et al.*, 2008). Entre as estruturas nucleares mais bem caracterizadas estão: corpos de Cajal, estrutura nucleolar, clastomas, paraspeckles e speckles (Dunr & Misteli, 2010; Mao *et al.*, 2011). Os dados obtidos pelos os ensaios de co-localização somados às características estruturais e bioquímicas apresentadas por AtWWP1, não permitiram posicionar AtWWP1 como componente em nenhuma dessas estruturas. Entretanto, recentemente, um novo tipo de agregado subnuclear vem sendo proposto, denominados *transcription factories* ou *transcription sites* (Martin & Pombo 2003; Sutherland & Bickmore, 2009; Cook, 2010). De acordo com esse modelo, a RNAPII encontra-se concentrada e ancorada em

estruturas subnucleares. Uma vez que a RNAP I se concentra na região nucleolar e que, vem sendo demonstrado que a RNAPIII também se encontra agrupada espacialmente, acredita-se que a transcrição pela RNAPII também ocorra em subestruturas nucleares (Sutherland & Bickmore, 2009). De acordo com Lorvic & Barta (2004a), os sítios de transcrição são estruturas subnucleares em que a RNA polimerase II, bem como seus componentes se encontram co-localizados e, embora o *splicing* do pré-mRNA ocorra co-transcricionalmente, fatores de *splicing* não se encontram acumulados nesses sítios. Essas informações corroboram com os dados obtidos de que AtWWP1 não apresentou co-localização com nenhum fator de *splicing*, embora tenha co-localizado com CDKC2, cujo papel está associado também à transcrição. Além disso, segundo uma das vertentes desse modelo, em uma “fábrica” transcricionalmente ativa, uma série de componentes, tais como fatores de transcrição, são recrutados para esses sítios. Foi demonstrado que NIG e AtMBD2, cujas funções podem estar relacionados à transcrição, são incapazes de formar corpos nucleares sozinhos, mas são realocados para corpos nucleares de AtWWP1. Desse modo, o papel de AtWWP1 pode estar associado à maquinaria de transcrição celular, através da formação de estruturas subnucleares. (Figura 17). Embora a ideia de concentração da maquinaria de transcrição em subestruturas seja importante uma vez que pode aumentar a eficiência desse processo biológico, a origem e função dessas estruturas permanecem incertas. Além da RNAP II, não são conhecidos quais componentes estão presentes nesses sítios ou quais componentes são requeridos para a formação dessas estruturas. Além disso, não se sabe ao certo se essas estruturas representam sítios pré-montados de transcrição para os quais genes se movem ou representam apenas zonas de transcrição formadas em um *loci* gênico ativo durante o processo de expressão gênica. Alternativamente, no caso específico de AtWWP1, em que as interações proteína-proteína convergem para uma rede de interações de repressores de transcrição, envolvidos na via de sinalização de auxina (<http://signal.salk.edu/interactome/index2.html>), estas estruturas nucleares podem representar sítios de estocagem de repressores ou loci de silenciamento gênico.

Corpos nucleares são estruturas proeminentes no núcleo as quais concentram e contribuem para a eficiência de processos nucleares. Embora importante, a biogênese dessas estruturas são pouco conhecidas. A proteína AtWWP1, parece se comportar como um *hub*, capaz de conectar múltiplas proteínas envolvidas em processos biológicos básicos. A identificação de outros parceiros de AtWWP1, bem como estudos envolvendo alterações nas

taxas de transcrição celular irão auxiliar na elucidação da função dessa proteína, bem como sua capacidade de se aglomerar em corpos nucleares.

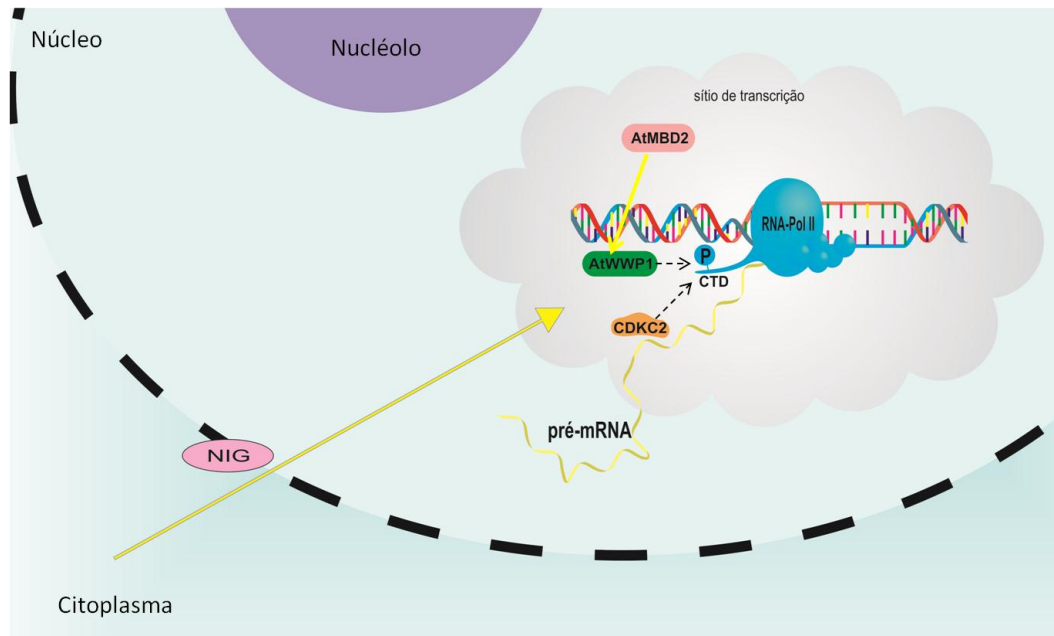


Figura 17: Modelo esquemático da compartimentalização subnuclear de AtWWP1 em sítios de transcrição. AtWWP1 co-localiza com a proteína CDKC2 e é capaz de recrutar NIG e AtMB2 para os corpos nucleares.

4.2 Integração de AtWWP1 no hub que converge para CNS5A do sistema imune de plantas

Estudos envolvendo vírus patogênicos em animais revelaram que esses patógenos tendem a alvejar proteínas centrais e altamente interconectadas (*hubs*; De Chasse *et al.*, 2008; Dyer *et al.*, 2008). Em plantas, foi demonstrado que bactérias e fungos patogênicos também interagem com *hubs* do sistema imune do hospedeiro (Mukhtar *et al.*, 2011). Dessa forma, espera-se que esse padrão também seja observado considerando vírus de plantas. De fato, Lozano-Durán e colaboradores (2011) descreveram a interação da proteína C2 de geminivírus com o *hub* CSN5A. Essa proteína constitui um componente do COP9 signalossomo (CSN); o qual consiste em um complexo protéico evolutivamente conservado, identificado inicialmente em *Arabidopsis* como um repressor do desenvolvimento regulado pela luz (Wei, *et al.*, 1994; Deng *et al.*, 2000). A interação de C2 com CSN5A promove um redirecionamento dos processos de ubiquitinação e interfere na atividade de derrubilação do complexo COP9, cuja função envolve o controle da degradação de proteínas na célula (Lozano-Durán *et al.*, 2011).

Vírus tipicamente codificam proteínas multifuncionais capazes de redirecionar a maquinaria de replicação e transcrição, reprogramando assim a célula hospedeira, de modo a promover um ambiente favorável à infecção viral. Como componente de uma rede de interações convergentes para o *hub* CNS5A e como alvo da proteína NSP de geminivírus, é provável que NIG participe de processos celulares básicos influenciados pela infecção viral (Carvalho *et al.*, 2008b, Machado, 2011). De fato, expressão ectópica de NIG em *Arabidopsis* aumenta a suscetibilidade a geminivírus (Carvalho *et al.*, 2008b). Além disso, NIG tem seu papel relacionado ao processo de transcrição celular, uma vez que se associa a quatro fatores de transcrição (*The NAPPA Network*; <http://signal.salk.edu/interactome/index2.html>) e também à proteína AtWWP1, cujo possível papel está acoplado à maquinaria de transcrição e silenciamento. Dessa forma, a perturbação dessa rede de interações por NSP, resultaria na alteração da homeostase celular, por meio da interferência nos processos celulares de transcrição e silenciamento gênico do hospedeiro, se propagando até o *hub* central CSN5A (Figura 18), o qual também atua como um regulador transcricional (Chamovitz, 2009).

Alvejando, em vários níveis, a organização celular, embora não necessariamente no mesmo ponto, os vírus podem levar a rompimentos múltiplos no funcionamento da célula hospedeira, certamente porque essas redes são resistentes a perturbações aleatórias, porém são extremamente frágeis a ataques nos *hubs* centrais (Barábasi & Oltvai, 2004). Além disso, plantas possuem vias de sinalização altamente interligadas, permitindo ao vírus que se beneficie simultaneamente de vários processos celulares (sinalização hormonal, controle do ciclo celular, transporte e modificação de proteínas; Culver, 2007). Nesse sentido, a proteína AtMBD2, também conecta AtWWP1 a uma rede de interações de repressores de transcrição envolvidos na resposta de sinalização do hormônio auxina a qual se interliga ao *hub* CSN5A (Figura 18).

Ensaio futuros de infecção viral, somados a avaliação de sua interação com proteínas virais e do hospedeiro, permitirão o posicionamento de AtWWP1 na complexa rede de interações convergentes que ocorrem entre geminivírus e hospedeiro. Adicionalmente, essas informações poderão auxiliar no entendimento da estratégia de virulência de geminivírus bem como mecanismos de defesa da planta para contrapor a infecção viral.

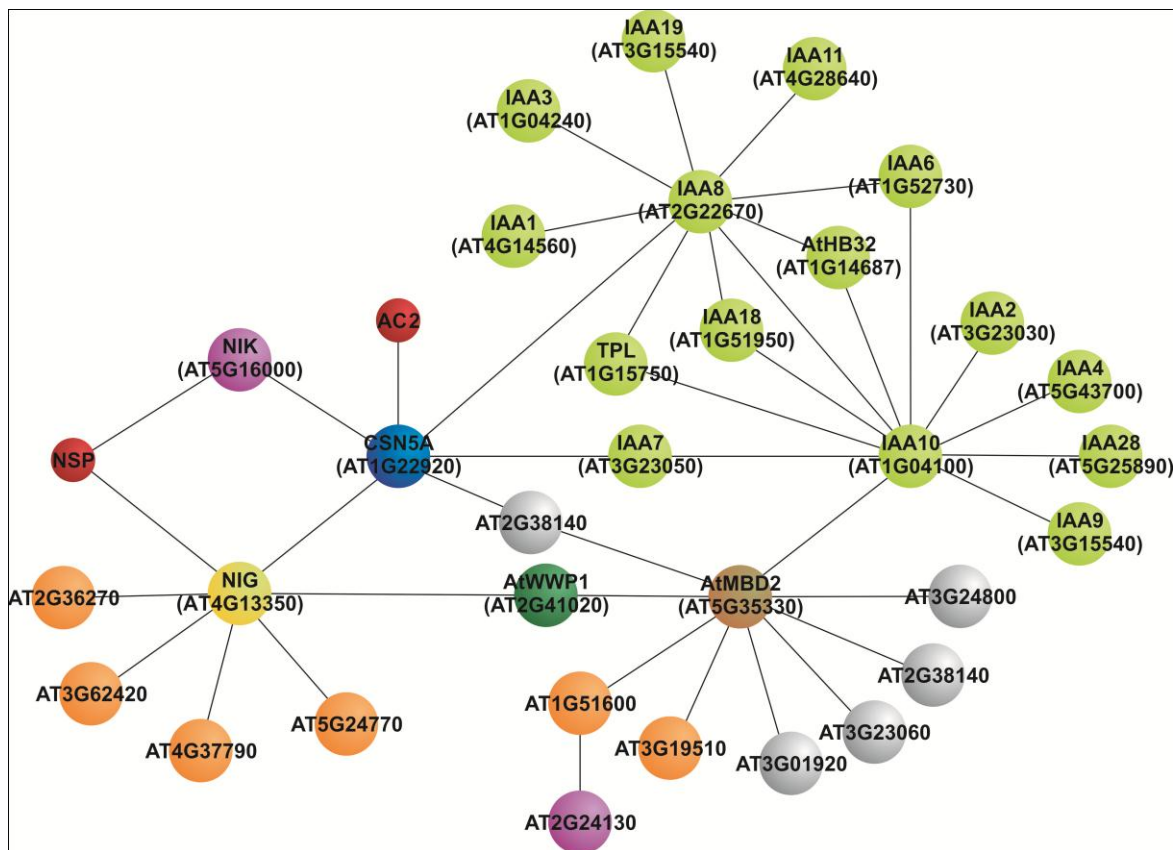


Figura 17: Modelo esquemático da rede de interação envolvendo AtWWP1. Rede de interações derivadas do Interactoma de Arabidopsis , do Interactoma do sistema imune e do interactoma de transfatores. Em verde escuro, AtWWP1; em amarelo e marrom, alvos diretos de AtWWP1; em azul, hub do sistema imune de plantas; em vermelho, proteínas virais; em verde claro, repressores de transcrição da via de sinalização de auxina; em laranja, fatores de transcrição; em roxo, receptores-like kinase

5.0 CONCLUSÃO

A proteína AtWWP1, identificada inicialmente por sua interação com NIG, é membro de uma família de proteínas de *Arabidopsis* contendo dois domínios WW, além de uma região carboxi terminal conservada em espécies vegetais e animais. AtWWP1 é uma proteína nuclear capaz de formar corpos subnucleares via o domínio C-terminal conservado. Ensaios de co-imunoprecipitação e BiFC demonstraram que AtWWP1 interage *in vivo* com a proteína citoplasmática NIG promovendo o seu redirecionamento para corpos nucleares. AtWWP1 também interage *in vivo* com a proteína nuclear AtMBD2, promovendo sua realocação do nucleoplasma para os corpos nucleares. Estes ensaios de localização subnuclear de proteínas parceiras permitiram delimitar o carboxi terminal conservado de AtWWP1 como responsável pela formação de corpos nucleares. Ensaios de co-localização demonstraram que os corpos nucleares contidos em AtWWP1 são distintos daqueles formados por proteínas envolvidas em *splicing* do RNA; porém co-localizam com corpos nucleares contendo CDKC2. Além disso, foi demonstrado que AtWWP1 não liga a RNA, mas exibe uma atividade de ligação ao DNA e se insere em uma rede de interações composta por diversos repressores e transfatores transcricionais. Coletivamente, esses resultados sugerem o envolvimento de AtWWP1 em processos celulares básicos, como transcrição e silenciamento gênico.

Além disso, AtWWP1 foi posicionada na rede de interações que converge para o *hub* funcional CS5NA do sistema imune de plantas, via interação direta com NIG, alvo da proteína de geminivírus NSP. Assim sendo, a perturbação dessa rede pela proteína viral NSP pode resultar na alteração das taxas de transcrição mediadas por NIG e AtWWP1.

A identificação de outros parceiros de AtWWP1, bem como estudos envolvendo alterações nas taxas de transcrição celular irão auxiliar na elucidação da função dessa proteína, bem como sua capacidade de se aglomerar em corpos nucleares. Além disso, como componente de um *hub* funcional na interação geminivírus-hospedeiro, torna-se relevante avaliar a interação de AtWWP1 com proteínas virais e, se a infecção viral é capaz de afetar a biogênese de corpos nucleares formados por essa proteína.

Figura Suplementar - S1

At2g41020.1MGEELQYQQNGSSVTSNYGYGSSL	24
Vitis vinifera	MQSHPESSNGSLLHGGHQTAAADGIGLRSINQGTAEAVPMHHYDQIPQETSASFQWGNRV	60
Oryza sativaMDNSHEQFLPPGVGAWFF.....PPSIHPAKFKFPNPQYATPYGATPNN	44
Zea maysMDNSQNQPPPPGVGTWPC.....APPSHPPQCHADPQSYHPQFAAREFN	44
Homo sapiens	0
Equus caballus	0
Canis familiares	0
At2g41020.1	A.....YDQSQ.DIESAANTALLREQEI	46
Vitis vinifera	SG.....NDRSMGDIETAACDAVLRQEI	84
Oryza sativa	GSNHNAASYSAAAQPTMPFPNMDAGGAQSNQTAHEVSNHNDSAADIESAVQEA VLREQDI	104
Zea mays	AS.....ANNSGSSANIESAVQEA VLHAQDI	70
Homo sapiens	0
Equus caballus	0
Canis familiares	0
At2g41020.1	ETQKLIQQQREAGT SVAGDSKHNTDILRLR.ADPNALKEHLLKFTANHRAEAAA KRGGSV	105
Vitis vinifera	ATQRIIHSQRQA.KGESEPSMNDTDILSGRRHDPNALKEHLLKMTTEHRAEMALKRGKST	143
Oryza sativa	ETQQVIQNRQA.KATIEPTQGEDLLSNR.RNPNALKEHLLKMTAEHRAEMANKRGKPL	162
Zea mays	ETQQVIQNRQA.NTTSEPTKYGEDLLSNR.RDPNALKEHLLKMTADHRAEMASKRGKPL	128
Homo sapiens	0
Equus caballus	0
Canis familiares	0
At2g41020.1	STCGEGNVVDVNGYGI PGGVAYAGHS....ELSGKPE.....PTNASNNLEHYLRQKL	154
Vitis vinifera	LRE.EGNIEIGNGYGV PGGGAYYGASRSNIAMPSKPEEYHIESEKSESKBLEEYLRQKL	202
Oryza sativa	HAD.NGNVEIGNGYGV PGGGAYYAAN.MSS...DREKD...IADKAKGADLLEEFFRQRL	214
Zea mays	HPN.NGNCEIGNGYGV PGGGAYYAAN.LFSFQMNKPRD...ETDKAKCANDLLEDFLRQRL	183
Homo sapiensMPLFVALQTRL	11
Equus caballusMPLFVALQTRL	11
Canis familiaresMPLFVALQTRL	11
At2g41020.1	KARGILRDGAGAVTSNPEDT SAVSWNRQATLPFQANASTLRLGWVDAKDPASCATYYYNQ	214
Vitis vinifera	RARGILKDDTAKGDPHINTFKAMKLEAQSTQTTPA..AKLFTGWVEAKDPASCASYYYNE	260
Oryza sativa	RARGILKDEAT...NNSFTIRQNVDSVPGQIKSA..QLLPGWVEAKDPTSCASIFYNQ	268
Zea mays	RARGILKDETT...NKNYTSQTQVDSQEIENKSA..QLLPGWVIEVKDPTTCAPIFYNQ	237
Homo sapiens	AKRGILKHLEPE...PEEEIIAEDYDDDFVDYEATRLEGLFSPWYKVFDPSCGLPYWNA	68
Equus caballus	AKRGILKHLEPE...PEEEIIAEDYDDDFVDYEATRLEGLFSP.....CGLPYWNV	60
Canis familiares	AKRGILKHLEPE...PEEEIIAEDYDDDFVDYEATRLEGLFP.....	50
At2g41020.1	HTGTCQWERF.VELSYATSSAPP.VLSKEEWIETFEASGHKXYFYNTRTHVSWQWEP... 269	
Vitis vinifera	NIGMSQWERE.VETSFSSQPPSE.LLPLPEDWEEALDVITGQKYYNRRKTQASQWEPENTV 318	
Oryza sativa	STGMTQWRPFGAFLNMQHQAAPPSSSLPENWEEALDQSTGQKYYNNTNTQATQWEP... 325	
Zea mays	STGVSQWRPREDSVVNIMQHQVSE...SLPENWEEALDKSTGHKYYNNTTQTQWEP... 292	
Homo sapiens	DTDLVSWLSPHDPNSVVTKSARKLR.SNADAEEKLDRSHDKSDRSHERLDRGHDKSD... 125	
Equus caballus	DTDLVSWLSPHDPNSVVTKSARKLR.SNIDAEEKLDRSHEKSDRGHEKSDRGHEKSD... 117	
Canis familiaresSWYKVFDP...WENNADAEEKLDRGHEKSDRNHERPDRSHEKSD... 92	
At2g41020.1	...ASLQKPAATNSNNAVQTSTANGKEHPPSQLEFRCSCGGGWGVGLVQRWGYCVHCTR 325	
Vitis vinifera	QQVPNTVQQVASGHSNGMVF SNAVNGNQIDRSAMLRKCMCGCGGWGVGLVQMWGYCNHCTR 378	
Oryza sativa	...TAVNPGVAPHAFTNAAVEMAAQNTIIWNSQMQRCLGCGGWGVGLVQPWGYCNHCTR 381	
Zea mays	...TSVNTNVTPEASTNVAEFPVAQAALIWNSQMQRCLGCGGWGVGLVQPWGYCNHCTR 348	
Homo sapiensRGHDKSDR.....DRERGY.....DKVDR 144	
Equus caballusRGHEKSDRGHEKLDRGHEKSDRDRERGY.....DKVDR 150	
Canis familiaresRSHEKSDR.....SHEKSDRDRERGY.....DKVDR 118	
At2g41020.1	VFNLFQKQFLPAHLNHFTN....AGDSCQKDPNQSSSKPEMKKVIK...KRAHAEDD 377	
Vitis vinifera	VLNLFQSQYLASSLQQQSRSNVNIKGDSEKPKSPKQSNLKPPIGKGRKDRFRAYTEDD 438	
Oryza sativa	VQNLFFQQYPSYPNNTIHSSSN...KNPCNVAAKDRSSAKPEEFCANRKHDRRNRPEDD 438	
Zea mays	VQNRFFQQYPSYTNNTMHASGNNAKPTQGNVSAKNRSSSKPELCKPNRKHDRRNRPEDD 408	
Homo sapiens	ERERDRDRDRDRGYDKADR.....EESKERRHRRREELAEYFK.....SKRAVSRKDE 192	
Equus caballus	ERERDRDRDRDRGYDKADR.....EESKERRHRRREELAEYFK.....SKRAASRKDE 198	
Canis familiares	ERDRDRDRDRDRGYDKSDR.....EESKERRHRRREELAEYFK.....SKRAASRKDE 166	

At2g41020.1	ELDPMDPSSYSDAPRGQWVVGKGG..VQERRADTTASGGLFQQRPYPSPGAVLRKNAEVA	435
Vitis vinifera	ELDPMDPSSYSDAPRGQWVVGKGG..VQERRADTTATGGLFQQRPYPSPGAVLRKNAEIA	496
Oryza sativa	ELDPMDPSSYSDAPRGQWVVGKGG..VQERRADTTATGGLFQQRPYPSPGAVLRKNAEVA	496
Zea mays	ELDPMDPSSYSDAPRGQWVVGKGG..VQERRADTTATGGLFQQRPYPSPGAVLRKNAEVA	466
Homo sapiens	ELDPMDPSSYSDAPRGQWVVGKGG..VQERRADTTATGGLFQQRPYPSPGAVLRKNAEAS	252
Equus caballus	ELDPMDPSSYSDAPRGQWVVGKGG..VQERRADTTATGGLFQQRPYPSPGAVLRKNAEAS	258
Canis familiares	ELDPMDPSSYSDAPRGQWVVGKGG..VQERRADTTATGGLFQQRPYPSPGAVLRKNAEAS	226
At2g41020.1	SSQKKKPN SQFTEITKRGDGS DGLGDA	462
Vitis vinifera	S.QSKKPGSHYAPISKRGDGS DGLGDA	522
Oryza sativa	S.HGKRRG..MAPITKRGDGS DGLGEA	520
Zea mays	T.HGKRRGG.MAPITKRGDGS DGLGEA	491
Homo sapiens	R.....TKQQD.....	258
Equus caballus	R.....TKQQD.....	264
Canis familiares	R.....TKQQD.....	232

Figura S1. Alinhamento múltiplo de AtWWP1 com homólogos de espécies vegetais e animais. As proteínas homólogas foram obtidas utilizando o programa BLASTp e utilizadas para realização de um alinhamento múltiplo utilizando o programa DNAMAN. As proteínas utilizadas possuem os seguintes números de acesso: XP_002278437.1 (*Vitis vinifera*); EEC72028.1 (*Oryza sativa*); ACG25308.1 (*Zea mays*); CAJ00538.1 (*Homo sapiens*); XP_538029.2 (*Canis familiaris*) e XP_003365832.1 (*Equus caballus*). Em preto, são demarcados os resíduos de aminoácidos idênticos em todas as proteínas, em cinza escuro aqueles com frequência $\geq 75\%$ e em cinza claro $\geq 50\%$.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, G.S., Golovkin, M.; Reddy, A.S. Nuclear localization and in vivo dynamics of a plant-specific serine/arginine-rich protein. *The Plant Journal* **36**, 883(2003)
- Amberg, D.C., Burke, D.J., Strathern, J.N. Assay of β -Galactosidase in Yeast: Assay of Crude Extracts. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA (2005).
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium: Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science* **333**, 601 (2011).
- Barábasi, A.L., Oltvai, ZN: Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics* **5**, 101 (2004).
- Barroco, R.M., De Veylder, L., Magyar, Z., Engler, G., Inze, D., Mironov, V. Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell. Mol. Life Science*. **60**: 401(2003).
- Baurle I., Smith L, Baulcombe D.C, Dean C: Widespread role for the flowering-time regulators FCA and FPA in RNA-mediated chromatin silencing. *Science* **318**, 109 (2007).
- Bisaro,DM. Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* **344**, 158 (2006). Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* **16**, 6(2002) .
- Boller, T. He, S.Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* **324**, 742 (2009).
- Carvalho M, Lazarowitz, S. Interaction of the movement protein NSP and the Arabidopsis acetyltransferase AtNSI is necessary for cabbage leaf curl geminivirus infection and pathogenicity. *Journal of Virology* **78**, 11161 (2004).

- Carvalho, C.M., Santos, A.A., Pires, S.R., Rocha, C.S., Saraiva, D.I., Machado, J.P.B., Mattos, E.C., Fietto, L.G., Fontes, E.P.B. Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. *PLoS Pathogens* **4**(12), (2008a).
- Carvalho, C.M., Fontenelle, M.R., Florentino, L.H., Santos, A.A., Zerbini, F.M., Fontes, E.P.B. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *The Plant Journal* **5**, 869-80 (2008b).
- Carvalho, C.M., Machado, J.P.B., Zerbini, F.M., Fontes, E.P.B. NSP-interacting GTPase: A cytosolic protein as cofactor for nuclear shuttle proteins. *Plant Signaling & Behavior*. **3**, 752 (2008c).
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B. J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803 (2006).
- Cook, P.R. A model for all genomes: the role of transcription factories. *Journal of Molecular Biology* **395**, 1(2010).
- Cui, X., Fan, B., Scholz, J. and Chen, Z. Roles of Arabidopsis cyclin-dependent kinase C complexes in cauliflower mosaic virus infection, plant growth and development. *Plant Cell* **19**, 1388(2007).
- Culver, J.N., Padmanabhan, M.S. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annual Review in Phytopathology* **45**:221 (2007).
- De Chasse, B., Navratil, V., Tafforeau, L., Hiet, M.S., Aublin-Gex, A., Agaugue, S.; Meiffren, G., Pradezynski, F., Faria, B.F., Chantier, T. et al.: Hepatitis C virus infection protein network. *Molecular System Biology*, (2008).
- Deng, X.W., Dubiel, W., Wei, N., Hofmann, K., Mundt, K., Colicelli, J., Kato, J., Naumann, M., Segal, D., Seeger, M., Carr, A., Glickman, M., Chamovitz, D.A. Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends in Genetics* **16**, 202 (2000).

- Diaz-Pendon, J.A., Ding, S.W. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annual Reviews Phytopathology* **46**, 303 (2008).
- Dyer, M.D., Murali, T.M., Sobral, B.W. The landscape of human proteins interacting with viruses and other pathogens. *PLoS Pathogens* **4**, 32 (2008).
- Dodds, P.N.; Rathjen, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539 (2010).
- Dundr, M. and Misteli, T. Biogenesis of nuclear bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, (2010).
- Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., Zhou, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*. **153**, 783(2008).
- Florentino, L.H., Santos, A.A., Fontenelle, M.R., Pinheiro, G.L., Zerbini, F.M., Baracat-Pereira, M.C., Fontes, E.P.B. A PERK-Like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *Journal of Virology*. **80**, 6648(2006).
- 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*. **18**, 2545 (2004).
- Gafni, Y., Epel, B.L. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminivirus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**, 231 (2002).
- Hanley-bowdoin, L., Settlege, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., Robertson, D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Science*. **35**, 105 (2000).
- Hanley-Bowdoin, L.; Settlege, S.; Robertson, D. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus replication, *Molecular Plant Pathology* **5**, 149 (2004).

- Hehnle, S., Wege, C., Jeske, H. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *Journal of Virology*. **78**, 7698 (2004).
- Heintzen C, Nater M, Apel K, Staiger D. AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadianregulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science* **94**,8515 (1997).
- Jones, J.D; Dangl J.L. The plant immune system. *Nature* **444**, 323 (2006).
- Kaiser, T.E. et al. De novo formation of a subnuclear body. *Science* **322**, 1713(2008).
- Kang C. H., Feng Y., Vikram M., Jeong I. S., Lee J. R., Bahk J. D., Yun D. J., Lee S. Y., Koiwa H. *Arabidopsis thaliana* PRP40s are RNA polymerase II C-terminal domain-associating proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **484**, 30(2009).
- Kitsios, G., Alexiou, K.G., Bush, M., Shaw, P., and Doonan, J.H. A cyclin-dependent protein kinase, CDKC2, colocalizes with and modulates the distribution of spliceosomal components in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. **54**, 220(2008).
- Komuro, A., Saeki, M. and Kato, S. Npw38, a novel nuclear protein possessing a WW domain capable of activating basal transcription. *Nucleic Acids Research* **27**, 1957(1999).
- Lazarowitz, S.G., Beachy, R.N. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*. **11**, 535(1999).
- Li, J., Jia, D., Chen, X. HUA1, a Regulator of stamen and carpel identities in *Arabidopsis*, codes for a nuclear RNA binding protein. *The Plant Cell*, **13**, 2269 (2001)
- Lorkovic, J.Z ; Barta, A. Compartmentalization of the splicing machinery in plant cell nuclei. *TRENDS in Plant Science* **9**, 568 (2004a).

- Lorkovic, Z.J., Lopato, S., Pexa, M., Lehner, R. and Barta, A. Interactions of Arabidopsis RS domain containing cyclophilins with SR proteins and U1 and U11 small nuclear ribonucleoprotein-specific proteins suggest their involvement in pre-mRNA. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 33890(2004b) .
- Lozano-Durán R.; Rosas-Díaz, R.; Gusmarolli, G.; Luna, A.P.; Taconat, L.; Deng, X.W.; Benajaro, E. Geminiviruses Subvert Ubiquitination by Altering CSN-Mediated Derubylation of SCF E3 Ligase Complexes and Inhibit Jasmonate Signaling in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* **23**, 1014 (2011).
- Lozano-Duran, R.; Bejanaro, E. Geminivirus C2 protein might be the key player for geminiviral co-option of SCF-mediated ubiquitination. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 999-1001 (2011).
- Lukasik, E., Takken, F.L. STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 427 (2009).
- Machado, J.P., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa Identificação e caracterização de alvos celulares da proteína NIG (NSP-Interacting GTPase). Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes (2011).
- 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*. **318**, 24 (2004).
- Martin, S. & Pombo, A. Transcription factories: quantitative studies of nanostructures in the mammalian nucleus. *Chromosome Research*. **11**, 461 (2003).
- Mao, Y.S.; Zhang, B., Spector, D.L: Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends in Genetics* **27**,:295 (2011).
- Mukhtar et al. Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network. *Science* **333**, 596 (2011).

- Noueiry, A.O., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. *Cell*. **76**, 925 (1994).
- Ogg S.C.; Lamond, A.I. Cajal bodies and coilin—moving towards function. *Journal of Cell Biology* **159**, 117 (2002).
- Okazawa, H., Sudol, M. and Rich, T. PQBP-1 (Np/PQ): a polyglutamine tract-binding and nuclear inclusion-forming protein. *Brain Research. Bulletin* **56**, 273(2001).
- 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*. **6**, 995 (1994).
- Pinhero, R., Liaw, P., Bertens, K., and Yankulov, K. Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II. European. *Journal of Biochemistry*. **271**: 1004(2004).
- Raja, P., Wolf, J.N., Bisaro, D.M. RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimica et Biophysica Acta* **1799**, 337 . (2010)..
- Reddy, A.S.N. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annual Review of Plant Biology* **58**,267(2007).
- 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. **43**, 361(2005).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning - A Laboratory Manual, Ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1989)
- Sanderfoot, A.A., Lazarowitz, S.G. Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *The Plant Cell*. **7**, 1185(1995).

- Sanderfoot, A.A., Lazarowitz, S.G. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biology*. **6**, 353(1996).
- Santos, A.A., Carvalho, C.M., Florentino, L.H., Ramos, H.J.O., Fontes, E.P.B. Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. *PLoS ONE*. **4**, 5781(2009).
- Santos, A.A.; Lopes, K.V.G.; Apfata, J.A.C. ; Fontes, E.P.B. . NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signalling. *Journal of Experimental Botany* **61**, 3839 (2010).
- Staiger D, Zecca L, Kirk DA, Apel K, Eckstein L The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *The Plant Journal* **33**,361 (2003).
- Settlage, S.B., Miller, A.B., Grissem, W., Hanley-Bowdoin, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology*. **279**, 570 (2001).
- Sudol, M., Sliwa, K. and Russo, T. Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett*. **490**, 190 (2001).
- Sudol, M.; McDonald, C.B.; Farooq, A. Molecular insights into the WW domain of Golabi-Ito-Hall syndrome protein PQBP1. *Federation of European Biochemical Societies* **586**, 2795 (2012).
- Sun J, Qi L, Li Y, Chu J, Li C PIF4–Mediated Activation of *YUCCA8* Expression Integrates Temperature into the Auxin Pathway in Regulating *Arabidopsis* Hypocotyl Growth. *PLoS Genetics* **8**, 3 (2012).
- Sutherland, H. and Bickmore, W.A. Transcription factories: gene expression in unions? *Nature Reviews Genetics* **10**, 457 (2009).
- Takahashi, M.; Mizuguchi, M.; Shinoda, H.; Aizawa, T.; Demura, M., Okazawa, H.; Kawano, K. Polyglutamine tract-binding protein-1 binds to U5-15kD via a continuous 23-residue segment of the C-terminal domain. *Biochimica et biophysica acta* **1804**, 1500 (2010).

- Tameling, W.I.L.; Takken, F.L.W. Resistance proteins: Scouts of the plant innate immune system. *European Journal of Plant Pathology* **121**, 243 (2007).
- Vert, G., Chory, J. Downstream events in brassinosteroids signaling. *Nature* **41**, 95 (2006).
- Voinnet, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* **6**, 206 (2005).
- Vollmer, A.H.; Youssef, N.N.; DeWald, D.B. Unique cell wall abnormalities in the putative phosphoinositide phosphatase mutant AtSAC9. *Planta* **234**, 993(2011).
- Waragai, M., Lammers, C.H., Takeuchi, S., Imafuku, I., Udagawa, Y., Kanazawa, I., Kawabata, M., Mouradian, M.M. and Okazawa, H. PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Human Molecular Genetics*. **8**, 977(1999).
- Waragai, M., Junn, E., Kajikawa, M., Takeuchi, S., Kanazawa, I., Shibata, M., Mouradian, M.M., and Okazawa, H. PQBP-1/Npw38, a nuclear protein binding to the polyglutamine tract, interacts with U5-15kD/dim1p via the carboxyl-terminal domain. *Biochemistry and Biophysics Research Community*. **273**, 592(2000).
- Wei, N., Chamovitz, D.A., Deng, X.W. Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* **78**, 117(1994).
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101 (1994).
- Zhang Y, Lindblom T, Chang A, Sudol M, Sluder AE & Golemis EA (Evidence that dim1 associates with proteins involved in pre-mRNA splicing, and delineation of residues essential for dim1 interactions with hnRNP F and Npw38/PQBP-1. *Gene* **257**, 33 (2000).

Zemach, A.;Li, Y.;Wayburn, B.; Ben-Meir, H.; Kiss, V.; Avivi, Y.; Kalchenko, V.;Jacobsen; SE.; Grafi, G. DDM1 binds *Arabidopsis* methyl-CpG binding domain proteins and affects their subnuclear localization. *Plant Cell* **17**: 1549(2005).