

RENAN DE SOUZA CASCARDO

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS SI-GAL83 E TCTP NA
INFECÇÃO DE HOSPEDEIROS SUSCETÍVEIS PELO POTYVÍRUS *Pepper
yellow mosaic virus* (PepYMV)**

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
2011

RENAN DE SOUZA CASCARDO

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS SI-GAL83 E TCTP NA
INFECÇÃO DE HOSPEDEIROS SUSCETÍVEIS PELO POTYVÍRUS *Pepper
yellow mosaic virus* (PepYMV)**

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: 28 de fevereiro de 2011

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz

**Pesq. Poliane Alfenas-Zerbini
(Coorientadora)**

**Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior
(Orientador)**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Valder e Rita, meus irmãos Alice e Thadeu e minha noiva Glaucia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valder e Rita, por tudo que fizeram por mim. Amor, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Thadeu e Alice, pelo carinho comigo.

À Gláucia pelo grande carinho e amor durante todo esse tempo juntos. E ao nosso novo amor: Laka.

À Vó Lalá, Vô Walter e Vó Glorinha, pessoas maravilhosas, exemplos de vida.

Ao prof. Murilo Zerbini pelos ensinamentos, confiança e orientação.

À Dr^a Poliane Alfenas-Zerbini pela orientação e atenção durante todo esse período.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular que me ajudaram nos trabalhos de bancada, em especial à Fernanda por me ajudar diretamente em alguns ensaios.

Aos amigos, tios e primos.

À Universidade Federal de Viçosa por possibilitar a realização do curso de mestrado.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa.

BIOGRAFIA

Renan de Souza Cascardo, filho de Valder Cascardo e Rita de Cássia Lima de Souza Cascardo, nasceu em 5 de agosto de 1985 em Muriaé, Minas Gerais, Brasil.

Em 2004 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, vindo a graduar-se em julho de 2008.

Em março de 2009 ingressou no curso de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em Fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Alterações no padrão da expressão gênica do hospedeiro durante infecções virais.....	4
2.2. A Família <i>Potyviridae</i>	6
2.3. Ciclo de infecção de potyvírus	9
2.3.1. Tradução do RNA genômico e produção das proteínas virais	9
2.3.2. Replicação do genoma.....	11
2.3.3. Movimento do vírus na planta	15
2.4. Os genes <i>Translationally controlled tumor protein</i> (TCTP) e <i>SNF1 kinase complex anchoring protein</i> (SI-Gal83)	19
2.4.1. <i>Translationally Controlled Tumor Protein</i> (TCTP)	19
2.4.2. <i>SNF1 kinase complex anchoring protein</i> (Gal83).....	22
2.5. Detecção de interação entre proteínas <i>in vivo</i> por purificação por afinidade em tandem (<i>Tandem affinity purification</i> , TAP)	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Isolado viral	25
3.2. Efeito do silenciamento dos genes TCTP e SI-Gal83 na infecção de tomateiro pelo PepYMV	25
3.2.1. Obtenção dos vetores pK7WG2-TCTP, pK7GWIWG2-TCTP, pK7GWIWG2-SI-Gal83.....	25
3.2.2. Transformação de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. 'MoneyMaker'	26
3.2.3. Confirmação da inserção do T-DNA.....	27
3.2.4. Avaliação do nível de silenciamento dos genes TCTP e SI-Gal83 nas plantas transgênicas	27
3.2.5. PCR quantitativo.....	28
3.2.6. Inoculação das plantas transformadas com PepYMV	29
3.3. Análise da localização subcelular de TCTP co-infiltrada com as proteínas virais.....	29
3.3.1. Clonagem de cada uma das proteínas do PepYMV	29
3.3.2. Expressão transiente em folhas de <i>N. benthamiana</i>	31
3.3.3. Microscopia confocal e processamento de imagens.....	31
3.4. Expressão transiente de TCTP etiquetada	31
3.4.1. Obtenção do vetor pNTAPi-TCTP	31
3.4.2. Expressão transiente das construções pNTAPi-TCTP e pNTAPi-GFP em folhas de <i>N. benthamiana</i>	32
3.4.3. Extração de proteínas totais e <i>Western blot</i>	32
3.4.4. Purificação por afinidade em tandem e caracterização dos complexos.....	33
3.4.5. Identificação das proteínas por espectrometria de massa	33
4. RESULTADOS	34

4.1. Obtenção e caracterização das plantas transgênicas.....	34
4.2. Efeito do silenciamento dos genes SI-Gal83 e TCTP na infecção de tomateiro pelo PepYMV	40
4.3. Localização subcelular da proteína TCTP durante a expressão de cada uma das proteínas de PepYMV em <i>N. benthamiana</i>	49
4.4. Expressão transiente de TCTP etiquetada para identificação de proteínas que interagem com ela	51
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

CASCARDO, Renan de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Estudo do envolvimento das proteínas SI-Gal83 e TCTP na infecção de hospedeiros suscetíveis pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV).** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Junior. Co-orientadores: Poliane Alfenas-Zerbini e Claudine Márcia Carvalho.

O genoma da maioria dos vírus que infectam plantas codifica apenas 4-10 proteínas, que são necessárias para completar o ciclo de infecção, incluindo as etapas de replicação do genoma viral, movimento célula-a-célula e movimento sistêmico. Para uma infecção bem sucedida, as proteínas virais devem interagir com fatores do hospedeiro, modulando processos metabólicos e coordenando uma rede complexa de interações bioquímicas e moleculares a favor do patógeno. Uma biblioteca subtrativa foi construída a partir de plantas de tomateiro suscetíveis infectadas pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Foram identificados vários genes potencialmente envolvidos nas etapas iniciais do processo de infecção viral. Dentre os genes identificados encontram-se os genes que codificam as proteínas *Translationally controlled tumor protein* (TCTP) e o homólogo de tomate de *Saccharomyces cerevisiae* Gal83 (SI-Gal83), uma proteína do complexo *Sucrose non-fermenting-1* (SNF1). TCTP é uma proteína altamente conservada em eucariotos, e está envolvida em vários processos celulares básicos, como crescimento celular, progressão do ciclo celular, morte celular programada e proteção contra diversos tipos de estresses. SNF1 desempenha um papel importante na ativação da transcrição e expressão de genes envolvidos na resposta celular aos diferentes tipos de estresses, tais como limitação de nutrientes, salinidade elevada, choque térmico e infecção viral. O objetivo deste trabalho foi estudar o papel das proteínas TCTP e SI-Gal83 durante o processo de infecção pelo PepYMV em hospedeiros suscetíveis. Plantas transgênicas de tomate cv. MoneyMaker silenciadas para estes genes foram produzidas e inoculadas mecanicamente com o PepYMV. O estabelecimento da infecção viral foi avaliado por ELISA e qRT-PCR. Plantas não-transformadas foram infectadas, enquanto as plantas silenciadas permaneceram assintomáticas. Nas plantas silenciadas o ELISA apresentou resultado negativo e a carga viral foi reduzida. A localização subcelular de TCTP em plantas saudáveis e infectadas pelo PepYMV foi analisada por microscopia confocal utilizando-se uma fusão YFP-TCTP. Em plantas saudáveis a localização subcelular de TCTP é citoplasmática, conforme descrito para outros organismos. Quarenta e oito horas após a infecção pelo PepYMV, TCTP foi redirecionada para o núcleo. Para determinar qual é a proteína viral que direciona a relocação de TCTP para o núcleo, cada uma das

proteínas virais (P1, HC-Pro, P3, PIPO, P3N-PIPO, CI, 6K2, NIa, NIb e CP) foi co-infiltrada individualmente com pYFP-TCTP. Os resultados mostraram que TCTP acumula predominantemente no núcleo quando co-infiltrada com CI e NIa, e está igualmente distribuída no núcleo e citoplasma, quando co-infiltrada com P1, PIPO, P3N-PIPO, 6K2 e NIb. Em plantas co-infiltradas com HC-Pro, P3 e CP, TCTP permaneceu no citoplasma. Para identificar possíveis proteínas virais e/ou do hospedeiro que interagem com TCTP foi realizado um ensaio de purificação por afinidade em tandem. A análise por SDS-PAGE de extratos protéicos de plantas expressando nTAPi-TCTP mostrou duas bandas entre 40 e 50 kDa presentes no extrato purificado. Os fragmentos foram analisados por espectrometria de massa, porém não foi possível identificar as proteínas. Provavelmente o limitante para uma detecção mais eficiente foi a baixa concentração de proteínas eluídas. Com isso, torna-se necessário a otimização do protocolo de extração/eluição para a obtenção de uma maior concentração de proteínas complexadas com nTAPi-TCTP. Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que tanto TCTP quanto SI-Gal83 possuem papéis fundamentais na interação PepYMV-tomate, sendo necessárias para o estabelecimento de uma infecção sistêmica. Estudos adicionais devem ser realizados para melhor compreensão da natureza e dos mecanismos das interações entre TCTP, SI-Gal83 e o PepYMV.

ABSTRACT

CASCARDO, Renan de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011.
Study of the involvement of the genes that encode the proteins SI-Gal83 and TCTP in the infection of a susceptible host by *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV).
Advisor: Francisco Murilo Zerbini Junior. Co-Advisors: Poliane Alfenas-Zerbini and Claudine Márcia Carvalho.

The genomes of most plant viruses code for only 4-10 proteins which are required to complete the infection cycle, including the stages of viral genome replication, cell-to-cell movement and systemic spread. For a successful infection, these viral proteins must interact with host factors, modulating metabolic pathways and coordinating a complex network of biochemical and molecular interactions in the pathogen's favor. A subtractive library constructed from susceptible tomato plants infected by the plant potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) identified several genes which are putatively involved in the initial steps of the viral infection process, including those that code for the Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) and the tomato homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* Gal83 (SI-Gal83), a protein of the SNF1 complex. TCTP is a highly conserved protein in eukaryotes, and is involved in several fundamental cellular processes such as cell growth, cell cycle progression, programmed cell death and protection against different types of stresses. SNF1 plays an important role in transcriptional activation and expression of genes involved in the cellular response to different stresses, such as nutrient limitation, high salinity, heat shock and virus infection. The objectives of this work were to study the roles of TCTP and SI-Gal83 during PepYMV infection in susceptible hosts. Transgenic tomatoes (cv. 'Moneymaker') silenced for these genes were generated and were mechanically inoculated with PepYMV. ELISA and qRT-PCR were performed to verify the phenotype resulting from SI-Gal83 and TCTP silencing. The results showed that non-transformed plants were infected, while all ten silenced plants remained symptomless, were ELISA negative and had reduced viral load. The subcellular localization of TCTP in healthy and PepYMV-infected plants was analyzed by confocal microscopy using a TCTP-YFP fusion. In healthy plants the subcellular localization of TCTP is cytoplasmatic, as described for other organisms. Forty-eight hours after PepYMV infection, TCTP is relocated to the nucleus. To determine which PepYMV protein(s) promotes nuclear targeting of TCTP, each viral protein (P1, HC-Pro, P3, PIPO, P3N-PIPO, CI, 6K2, NIa, NIb and CP) was coexpressed individually with pYFP-TCTP. Results showed that TCTP accumulates predominantly in the nucleus when co-infiltrated with CI and NIa, and is distributed

equally in the nucleus and cytoplasm when co-infiltrated with P1, PIPO, P3N-PIPO, 6K2 and N1b. In plants co-infiltrated with HC-Pro, P3 and CP, TCTP remained in the cytoplasm. In order to identify and characterize additional viral and host factors involved in the TCTP-mediated network of plant-potyvirus interactions, TCTP was cloned as a TAP (tandem affinity purification) tag fusion. Protein complexes were purified using TAP, and its constituents were analyzed by mass spectrometry. However, it was not possible to identify the proteins. The probable limiting factor for a more efficient detection was the low concentration of protein eluted. Thus, it is necessary to optimize the protocol of extraction/elution to obtain a higher concentration of proteins complexed with nTAPI-TCTP. Together, the results of this work indicate that both TCTP and SI-Gal83 play critical roles in the tomato-PepYMV interaction, being necessary for the establishment of a systemic infection. Further studies should be conducted to improve our understanding of the nature and mechanisms of the interactions between TCTP, SI-Gal83 and PepYMV.

1. INTRODUÇÃO

Vírus utilizam uma grande variedade de estratégias para promover a infecção em hospedeiros suscetíveis. A infecção por vírus pode alterar profundamente a fisiologia do hospedeiro. Em plantas, as doenças induzidas por vírus podem variar amplamente em termos de severidade, incluindo desde respostas tolerantes que pouco alteram a fisiologia da planta hospedeira até respostas severas que podem culminar com a morte da planta (Collmer et al., 2000; Hull, 2002; Krause-Sakate et al., 2005).

O genoma dos vírus de plantas codifica em média 4 a 10 proteínas necessárias para completar o ciclo de infecção que envolve as etapas de replicação do genoma viral, movimento célula-a-célula e movimento sistêmico (Whitham and Wang, 2004). Para uma infecção eficiente as proteínas virais devem ser capazes de interagir com fatores da célula hospedeira, manipulando vias metabólicas e co-ordenando interações bioquímicas que favorecem a infecção. Assim, durante a coevolução entre vírus e seus hospedeiros, interações complexas foram estabelecidas envolvendo diversos mecanismos de ataque do patógeno, e de defesa do hospedeiro.

As estratégias utilizadas pelos vírus para infectar o hospedeiro incluem modificações estruturais na célula hospedeira (Lucas, 2006), a supressão do silenciamento gênico pós-transcricional (Diaz-Pendon and Ding, 2008; Voinnet, 2005; Roth et al., 2004) e a interferência com a regulação do ciclo celular (Gutierrez et al., 2004), dentre outras. Em contrapartida, as plantas desenvolveram mecanismos para se proteger da infecção viral, como o próprio silenciamento gênico pós-transcricional (Baulcombe, 2004), e a ativação de respostas induzidas por PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e por efetores (Jones and Dangl, 2006). Estas respostas de defesa são acompanhadas por alterações na expressão gênica do hospedeiro que incluem a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR – *pathogenesis-related proteins*), de inúmeras proteínas envolvidas na sinalização celular e proteínas envolvidas em respostas a estresse, metabolismo, fotossíntese, transporte e transdução de sinais (Cooper, 2001; Shen and Hanley-Bowdoin, 2006; Kundu et al., 2011).

Infecções virais resultam na ativação e repressão da transcrição de uma ampla gama de genes do hospedeiro. Dessa forma, estudos envolvendo a identificação de genes diferencialmente expressos no contexto da infecção viral têm fornecido informações importantes sobre os fatores do hospedeiro potencialmente envolvidos no

processo de infecção viral (Golem and Culver, 2003; Whitham et al., 2003; Pompe-Novak et al., 2006; Yang et al., 2007; Babu et al., 2008; Alfenas-Zerbini et al., 2009).

A família *Potyviridae* é uma das maiores e economicamente mais importante família de vírus que infectam plantas, contendo cerca de 16% das espécies descritas. O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso, com mais de 100 espécies descritas (Berger et al., 2005). Seu genoma é constituído por uma única molécula de RNA fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos que codifica uma poliproteína de 350 kDa que sofre autoproteólise gerando de 8 a 10 peptídeos maduros (Fauquet et al., 2005), e uma segunda fase aberta de leitura denominada *pipo* que codifica um peptídeo com peso molecular de aproximadamente 25 kDa (Chung et al., 2008).

Com o objetivo de identificar fatores do hospedeiro diferencialmente expressos durante as etapas iniciais da infecção por potyvírus, uma biblioteca subtrativa foi produzida a partir de plantas suscetíveis de tomateiro infectadas pelo PepYMV, utilizando-se folhas inoculadas, 72 horas pós-inoculação (hpi). Foram identificados 881 genes diferencialmente expressos, e 53 tiveram a expressão diferencial confirmada por RT-PCR quantitativo ou por análises de macroarranjos. Os genes identificados possuem identidade com proteases, componentes do proteossomo, diversos fatores de transcrição, enzimas e proteínas envolvidas na via de ubiquitinação, proteínas de resposta a choque térmico, catalases e proteínas envolvidas em vias de transdução de sinais. Foram identificados também genes relacionados com a biogênese de endomembranas, além de fatores regulatórios da atividade protéica como ativadores de proteases, cinases e inibidores enzimáticos. Dentre os genes identificados, verificou-se que em plantas de tomateiro infectadas pelo PepYMV ocorre um aumento da expressão das proteínas *Translationally Controlled Tumor Protein* (TCTP) e *SNF1 kinase complex anchoring protein* (Sl-Gal83) (Alfenas-Zerbini et al., 2009). Entretanto, o papel exato destes genes no contexto da infecção viral não foi determinado.

TCTP é uma proteína altamente conservada em organismos eucariotos, que está envolvida em diversos processos importantes como crescimento celular, progressão do ciclo celular, proteção das células contra diferentes condições de estresse, e apoptose (revisado por Bommer and Thiele, (2004)). Em *Arabidopsis thaliana*, TCTP é um importante regulador de crescimento e sua inativação resulta em profundas alterações fenotípicas. Linhagens carregando inserções de T-DNA em um alelo codificando TCTP apresentaram forte redução no crescimento do tubo polínico, enquanto linhagens onde a TCTP foi silenciada apresentaram tamanho reduzido em consequência da diminuição do tamanho celular. Curiosamente, essas mesmas

linhagens foram pouco sensíveis ao tratamento com auxina exógena e apresentaram altos níveis de auxina endógena (Berkowitz et al., 2008).

Diversos homólogos de TCTP têm sido clonados e caracterizados em um número cada vez maior de organismos (Wang et al., 2009; Yubero et al., 2009; Qin et al., 2010; Li et al., 2010). Entretanto, apesar da descrição de vários aspectos funcionais, o modo de ação preciso nos diferentes processos celulares ainda não está totalmente esclarecido.

As proteínas SNF1 constituem uma família de proteínas cinases inicialmente identificadas em leveduras com função essencial na ativação transcricional e na regulação gênica, além de possuírem função na resposta celular a diferentes estresses, como limitação de nutrientes, estresses salinos e choque térmico (Sanz, 2003). Proteínas ortólogas à SNF1 são encontradas em plantas (SnRK1) e em mamíferos (AMPK), e constituem famílias altamente conservadas de proteínas cinases (Baena-Gonzalez and Sheen, 2008). As proteínas SNF1 formam um complexo composto pela subunidade catalítica que é a própria proteína SNF1 (subunidade α) junto com a subunidade regulatória SNF4 (subunidade γ) e a subunidade composta pelas proteínas Sip1, Sip2 ou Gal83 (subunidade β) (Dyck et al., 1996). As proteínas Sip1, Sip2 e Gal83 representam uma família conservada de proteínas que têm função dupla nesse complexo. Elas possuem um papel estrutural, ancorando a subunidade SNF4 à subunidade SNF1 via dois domínios conservados distintos. Em plantas, as proteínas relacionadas a SNF1 regulam a expressão de genes dos diferentes tipos de estresses, como osmótico, salino, falta de nutrientes, choque térmico, poluição, presença de patógenos, além de outros fatores que alteram a taxa de assimilação de carbono e/ou a respiração, além de estarem envolvidas no processo de infecção por geminivírus (Baena-Gonzalez and Sheen, 2008; Shen and Hanley-Bowdoin, 2006; Rosa et al., 2009).

Este trabalho teve como objetivo estudar o envolvimento dos genes que codificam as proteínas TCTP e SI-Gal83, identificados como diferencialmente expressos em plantas de tomateiro infectadas pelo PepYMV.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Alterações no padrão da expressão gênica do hospedeiro durante infecções virais

Alterações no padrão de expressão gênica causadas pelo processo de infecção viral em plantas já foram relatadas em diversas interações compatíveis. Estudos de hibridização *in situ* mostraram que a infecção de cotilédones de ervilha por diferentes vírus induz o acúmulo do mRNA de *Hsp70*, um gene envolvido em resposta a estresses abióticos (Escaler et al., 2000). Whitham et al., (2003) identificaram mudanças co-ordenadas na expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em resposta à infecção por diversos vírus. As modificações incluem alterações gerais e específicas na expressão de genes associados a respostas de defesa e de estresse. A análise da região promotora destes genes sugere que diversos vírus induzem respostas comuns em plantas hospedeiras suscetíveis por vias de sinalização ainda não caracterizadas. Uma análise de abundância de transcritos no patossistema *Populus-Poplar mosaic virus* (PopMV) identificou um aumento de transcritos de genes envolvidos em morte celular programada, remodelamento de parede celular, proteínas relacionadas à patogênese (PRs) e glucanases (Smith et al., 2004). Na interação *Arabidopsis-Tobacco mosaic virus* (TMV) também foram induzidos genes relacionados a respostas a estresses, como por exemplo tioredoxina, glutathionina-S transferase e β -glucanases, além de fatores de transcrição tipo WRKY e fatores de transcrição que respondem a etileno (Golem and Culver, 2003). A indução de vários fatores de transcrição tipo WRKY e MYB foi observada também na interação incompatível TMV-tabaco. O acúmulo do RNA mensageiro de WRKY3 (Chen and Chen, 2000) e de MYB1 (Yang and Klessig, 1996) é rapidamente induzido após a infecção pelo TMV de plantas de tabaco contendo o gene de resistência *N*.

O padrão da expressão gênica em resposta à infecção viral pelo potyvírus *Potato virus Y* (PVY) em batatas suscetíveis a este vírus foi estudado ao longo do tempo. As maiores alterações foram detectadas em folhas não inoculadas aos 14 dias pós-infecção (dpi). Foram identificados diversos genes relacionados a estresses como genes que codificam proteínas de resposta a choque térmico, catalases e proteínas envolvidas na via fotossintética (Pompe-Novak et al., 2006).

A indução do gene *Crumpled leaf* (CRL) foi observada durante a infecção pelo begomovírus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) em *Arabidopsis thaliana*. A superexpressão de CRL em *A. thaliana* fez com que aumentasse a susceptibilidade a infecção por CaLCuV, enquanto que o silenciamento diminuiu a susceptibilidade. Com

base nas características da proteína CRL e nos dados obtidos a partir de plantas transgênicas silenciadas e expressando CRL foi proposto que CRL poderia participar no movimento viral interagindo com proteínas virais já que CRL estaria localizada nas imediações dos plasmodesmas. Investigações adicionais serão necessárias para elucidar a função molecular da proteína CRL na infecção por begomovírus (Trejo-Saavedra et al., 2009).

Muitas pesquisas têm tentado elucidar os mecanismos básicos da interação de diferentes proteínas virais com fatores do hospedeiro. A proteína capsidial (CP) dos potyvírus é necessária para várias etapas durante a infecção da planta, como montagem do vírion, movimento célula-a-célula, e transporte a longa distância. Isso sugere uma série de interações com possíveis fatores do hospedeiro que, no entanto, são em grande parte desconhecidos. Um subconjunto de novas proteínas DnaJ-like foi identificado em *Nicotiana tabacum*, designadas *capsid protein interacting proteins* (NtCPIPs), que se ligam especificamente a CP do PVY. Como consequência do silenciamento parcial de NtCPIP em plantas transgênicas observou-se um forte aumento na resistência ao vírus, provavelmente devido à redução da propagação célula-a-célula de PVY. Foi então proposto que NtCPIPs atuam como fatores de suscetibilidade durante a infecção viral, possivelmente através do recrutamento de proteínas HSP70 relacionadas com a montagem da partícula viral e/ou dispersão celular (Hofius et al., 2007).

A proteína de movimento (MP) do tobamovírus *Tobacco mosaic virus* (TMV) potencializa o transporte do RNA viral a partir de células infectadas para células vizinhas via plasmodesmas, o que certamente envolve interação com fatores do hospedeiro. Recentemente foi relatado o isolamento e caracterização de uma nova proteína DnaJ-like de *Nicotiana tabacum*, designada *MP-interacting protein 1* (NtMPIP1), que interage diretamente com a MP do TMV. O silenciamento gênico induzido por vírus (*Virus-induced gene silencing* - VIGS) de NtMPIP1 inibiu significativamente a disseminação do TMV. Concluiu-se que NtMPIP1 é um fator do hospedeiro envolvido na propagação célula-a-célula do TMV por meio da interação com a proteína MP (Shimizu et al., 2009).

Nas infecções por potyvírus, a interação entre a proteína viral VPg e o fator de iniciação da tradução 4E (eIF4E) tem recebido atenção especial desde que a caracterização molecular de diversos genes que conferem resistência a potyvírus mostrou que a resistência à infecção viral é causada por mutações no fator de iniciação da tradução eIF4E (Nicaise et al., 2003; Yeaman et al., 2007). VPg também interage com outras proteínas codificadas pelo genoma do hospedeiro, como a proteína *Potyvirus VPg-interactin protein* (PVIP) (Dunoyer et al., 2004) e do vírus,

incluindo a proteína viral HC-Pro. Usando proteínas recombinantes produzidas em bactérias ou em plantas infectadas, as interações entre VPg e HC-Pro do LMV e entre VPg do LMV e eIF4E foram demonstradas *in vitro*. Essas interações dependem principalmente do domínio central de VPg (Roudet-Tavert et al., 2007). Em muitos potyvírus, variações no domínio central de VPg estão associadas à quebra de resistência.

As plantas estão constantemente expostas a micro-organismos e, assim como os animais, desenvolveram um sistema imune para prevenir a infecção por patógenos. Embora esse sistema imune as proteja contra a maioria dos patógenos em potencial, os mecanismos moleculares que garantem imunidade às plantas não hospedeiras não são totalmente conhecidos. Uma estratégia de defesa contra begomovírus recentemente descrita é a ativação via fosforilação de uma proteína receptora localizada na membrana plasmática, designada NIK (NSP-interacting protein). Uma vez ativada como resposta à infecção viral, a proteína é translocada para o núcleo, onde atua impedindo a proliferação ou o movimento do vírus. Em interações compatíveis, a proteína viral NSP suprime a atividade do receptor NIK, superando o mecanismo de defesa da planta (Mariano et al., 2004; Carvalho et al., 2008).

Proteínas nucleares estão envolvidas no ciclo de vida de alguns vírus de plantas e animais que replicam no citoplasma, mas as funções específicas destas proteínas no processo de infecção pelo vírus são geralmente desconhecidas. Foi demonstrado que a proteína codificada pela ORF3 do umbravírus *Groundnut rosette virus* (GRV) percorre o núcleo, passando pelos corpos de Cajal no nucléolo, e em seguida retorna para o citoplasma. Esse percurso é absolutamente necessário para a formação das partículas virais, que são essenciais para o movimento do vírus. Foi demonstrado que esses processos dependem da interação da proteína codificada pela ORF3 com fibrilarina, uma proteína nucleolar. Fibrilarina é necessária, juntamente com a proteína codificada pela ORF3 e o RNA viral, para a montagem de partículas infecciosas (Kim et al., 2007).

2.2. A Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* é uma das maiores e economicamente mais importantes entre as famílias de vírus que infectam plantas, contendo cerca de 16% das espécies descritas (Fauquet et al., 2005). Está dividida em seis gêneros (*Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*), de acordo com o agente vetor e a organização do genoma (Berger et al., 2005). Os *Potyviridae* são

encontrados em todo o mundo, infectando mais de 2.000 espécies de plantas. Todos os potyvírus formam corpos de inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, também denominadas “cata-ventos”, sendo esta uma característica relevante para a identificação de espécies pertencentes à família. Membros dessa família são facilmente transmitidos experimentalmente de plantas infectadas para plantas sadias pela inoculação via extrato vegetal tamponado ou utilizando preparações virais purificadas ou concentradas (Berger et al., 2005).

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família *Potyviridae*, com mais de 100 espécies descritas (Fauquet et al., 2005). Em conjunto, essas espécies infectam uma ampla gama de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas em diferentes regiões climáticas, causando grandes danos econômicos em várias culturas. Esses vírus são transmitidos de maneira não-persistente por afídeos e as partículas virais são alongadas, flexuosas, com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído de uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por cerca de 2.000 cópias da proteína capsidial (CP), que possui massa molecular de aproximadamente 34 kDa (Bock and Conti, 1974; Fauquet et al., 2005; DiPiero et al., 2006).

A proteína capsidial dos potyvírus apresenta uma região amino-terminal altamente variável em tamanho e sequência, uma região central altamente conservada contendo de 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxi-terminal com 18-20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da partícula viral, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e, consequentemente, da partícula viral (Shukla et al., 1991). O RNA dos potyvírus é covalentemente ligado a uma proteína de origem viral (*genome-linked viral protein*, VPg) em sua extremidade 5' (Riechmann et al., 1989) e apresenta uma cauda poliadenilada, de origem viral, em sua extremidade 3' (Allison et al., 1986). O RNA genômico apresenta duas fases abertas de leitura (*open reading frames*, ORF) sobrepostas localizadas entre duas regiões não codificadoras denominadas 5'NTR e 3'NTR. A tradução da ORF maior origina uma poliproteína com peso molecular de aproximadamente 350 kDa (Allison et al., 1986), que é autoprocessada por meio da atividade proteolítica de três proteases (P1, HC-Pro e NIa), dando origem a 8-10 produtos finais (Carrington et al., 1990) (Figura 1). As proteases P1 e HC-Pro catalisam unicamente suas próprias clivagens em *cis* e a protease NIa, além de catalisar sua própria clivagem em *cis*, catalisa seis clivagens adicionais em *trans* (Daros and Carrington, 1997). A principal consequência desse mecanismo de expressão gênica é que todas as proteínas virais derivadas da poliproteína são

produzidas em quantidades estequiométricas, independente da necessidade do vírus para cada proteína em particular. As proteínas produzidas em excesso acumulam na célula infectada na forma de inclusões. Essa estratégia de replicação e expressão gênica é bastante danosa para a célula, implicando em um grande dreno de metabólitos, o que se reflete em sintomas severos na planta infectada (Zerbini and Zambolim, 1999). Uma segunda ORF denominada *pipo* (Pretty Interesting *Potyvirus* ORF) localiza-se dentro da região codificadora da proteína P3, porém em outra fase de leitura. A tradução desta ORF resulta em um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 25 kDa, o que é condizente com o esperado para uma fusão entre a porção N-terminal da proteína P3 com a proteína PIPO (Chung et al., 2008).

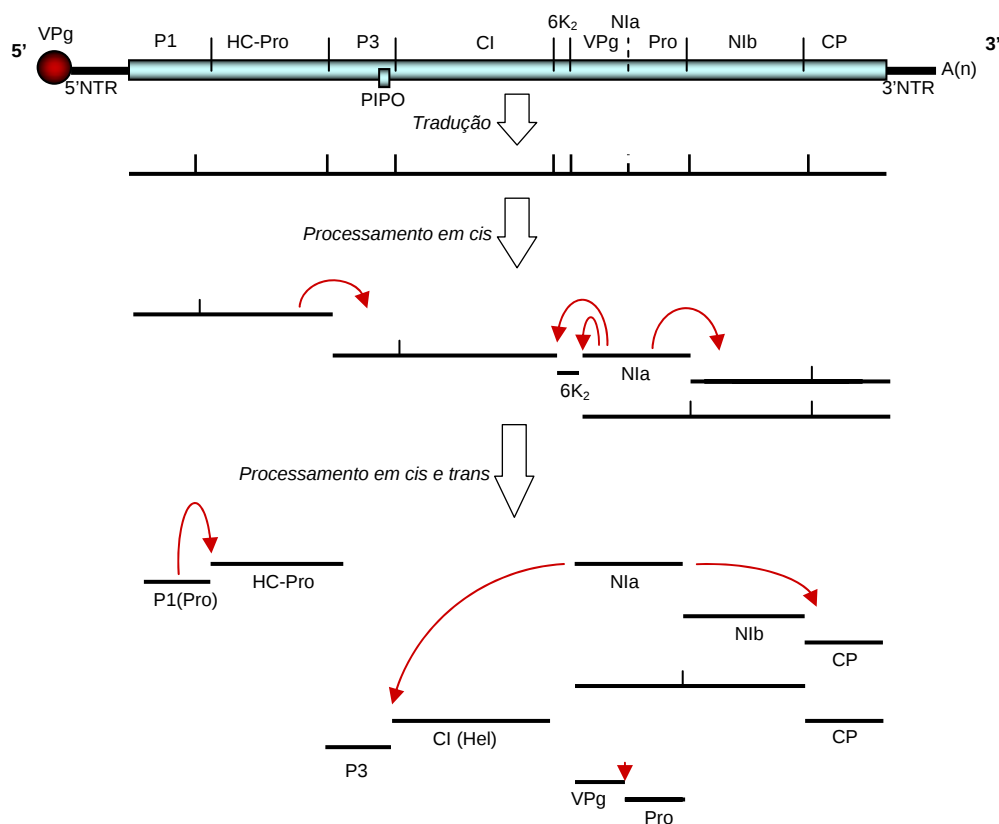


Figura 1. Representação esquemática da organização e expressão do genoma de um potyvírus. O RNA viral possui uma proteína viral (VPg) ligada à sua extremidade 5' e uma cauda poli-A em sua extremidade 3'. A ORF principal dá origem a uma poliproteína que sofre autoproteólise gerando diferentes intermediários e, finalmente, 8 proteínas virais (P1, HC-Pro, P3, CI, 6K₂, Nla, Nib e CP). A proteína Nla pode sofrer uma clivagem adicional gerando VPg e Pro, dependendo da espécie viral. Em alguns potyvírus, a proteína P3 sofre clivagem adicional gerando as proteínas P3 e 6K₁. A ORF PIPO está sobreposta à região codificadora da proteína P3, mas em uma fase de leitura diferente. Adaptado de Shukla et al. (1994) e Chung et al. (2008).

2.3. Ciclo de infecção de potyvírus

2.3.1. Tradução do RNA genômico e produção das proteínas virais

O primeiro evento que ocorre após um potyvírus alcançar o interior de uma célula vegetal é o desencapsidamento do vírion, seguido da tradução da ORF maior em uma poliproteína que será processada produzindo uma quantidade suficiente de proteínas virais para serem utilizadas nos processos subsequentes de replicação, movimento e montagem das novas partículas virais.

Todos os mRNAs celulares eucarióticos possuem uma estrutura “capeada” em seu terminal 5' (um nucleotídeo modificado, quase sempre m⁷GpppN), necessária para que ocorra a tradução e para a manutenção da integridade do mRNA (Niepel and Gallie, 1999). O RNA genômico dos potyvírus não possui tal estrutura, e sua tradução é independente de sua presença (Carrington and Freed, 1990). Dois elementos regulatórios fundamentais para a tradução independente da capa (*cap-independent regulatory elements*, CIREs) foram identificados na região 5'NTR do *Tobacco etch virus* (TEV), e a combinação destes dois elementos resulta em um efeito multiplicativo da tradução (Niepel and Gallie, 1999). No caso do TEV, as regiões 5' e 3' do genoma viral (cauda poli-A) agem de forma sinérgica na regulação da tradução, de forma que a tradução é estimulada pela presença da cauda poli-A (Gallie et al., 1995).

Existem controvérsias quanto à maneira pela qual ocorre o processo de tradução dos potyvírus. Quando uma estrutura em forma de grampo é posicionada à frente da 5'NTR do potyvírus *Turnip mosaic virus* (TuMV) foi verificado que a expressão do gene repórter β-glucuronidase (GUS), situado logo em seguida, não foi alterada indicando que a tradução ocorre por meio de iniciação interna (Basso et al., 1994). Entretanto, trabalhos realizados com o *Plum pox virus* (PPV) indicaram que para esse vírus a tradução se inicia pelo mecanismo de *leaky scanning*, pois o primeiro ATG localizado na posição 36 (₃₆AUG) não é reconhecido pelo ribossomo, por não estar em um contexto favorável. O ribossomo escaneia o RNA viral até atingir o próximo códon de iniciação (₁₄₇AUG), este em contexto favorável, e então inicia a tradução. Quando o primeiro AUG é colocado em um contexto favorável por meio de mutações sítio-específicas, a tradução passa a ocorrer a partir deste códon. Este modelo pode ser explicado pela ausência de estruturas secundárias fortes na 5'NTR. Desta forma, é possível que potyvírus distintos utilizem estratégias diferentes para a tradução do genoma, ou que ambas estratégias sejam utilizadas em conjunto.

Uma outra função desempenhada pela estrutura capeada do terminal 5' dos mRNAs é o recrutamento de fatores de tradução antes da chegada dos ribossomos.

Desta forma é possível supor que nos potyvírus essa função pode ser desempenhada pela VPg. De fato, a VPg é capaz de se associar aos fatores de iniciação de tradução eIF4E ou eIF(iso)4E (Ruffel et al., 2002; Nicaise et al., 2003). Ensaios realizados utilizando o sistema duplo-híbrido de leveduras demonstraram que a VPg do TuMV interage com o eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana* (Wittmann et al., 1997) e de trigo (*Triticum aestivum*) (Léonard et al., 2000). A VPg do TEV interage com o eIF4E de tomateiro e tabaco, e esta interação é estirpe-específica (Schaad et al., 2000). Impedida esta interação por meio de mutação de um único resíduo no domínio de interação da VPg do TuMV, a produção de partículas virais em *Brassica perviridis* foi altamente comprometida. O fato de terem sido encontradas interações VPg/eIF(iso)4E em diferentes patossistemas envolvendo potyvírus (revisado por Robaglia and Caranta (2006)) reflete a importância desta interação para o ciclo de infecção viral. Curiosamente, transcritos sintetizados a partir de um clone infeccioso do PPV sem a VPg ligada ao terminal 5' foram traduzidos em nível suficiente para iniciar a infecção, indicando que a VPg não é essencial, pelo menos, para os primeiros eventos de tradução do genoma do PPV na planta (Riechmann et al., 1990) e nem para a infectividade do RNA viral (Hari, 1981). De fato, a função específica da interação VPg-eIF4E ainda não está determinada (Robaglia and Caranta, 2006).

O produto da tradução da ORF maior dos potyvírus é uma poliproteína, processada por meio de clivagens proteolíticas realizadas pelas três proteases (P1, HC-Pro e NIa), originando as proteínas virais (Dougherty et al., 1988). A proteína NIa consiste de dois polipeptídeos com funções distintas (a VPg na porção amino e a protease na porção carboxílica) e catalisa as clivagens entre todos os polipeptídeos que compõem a poliproteína, com exceção das clivagens entre P1/HC-Pro e HC-Pro/P3, que são realizadas pelas proteases P1 e HC-Pro, respectivamente (Dougherty and Parks, 1991).

A protease NIa, que atua em *cis* e *trans*, é do tipo cisteína e todos os cinco sítios de clivagens apresentam a sequência conservada Glu-X-X-Tyr-X-Gln/Ser, Gly, Ala, Val, com o sítio de clivagem localizado após o resíduo de glutamina. As posições X são ocupadas por aminoácidos neutros ou hidrofóbicos (Carrington and Dougherty, 1988; Dougherty et al., 1988). Por se tratar de uma sequência degenerada, as clivagens das diferentes regiões são processadas com eficiências distintas, dependendo do contexto de aminoácidos da sequência, e esta regulação é essencial para a replicação viral (Schaad et al., 1996). O sítio de clivagem localizado entre as porções VPg e Pro da própria NIa é processado de maneira imperfeita, pois não possui a sequência ideal de reconhecimento. A sequência neste sítio para o TEV é Glu-Asp-Leu-Thr-Phe-Glu/Gly, o que prejudica o reconhecimento da sequência. É

interessante notar, entretanto, que mutações que aceleram a clivagem deste sítio são prejudiciais à replicação do genoma viral (Schaad et al., 1996).

A protease P1, responsável pela proteólise da junção P1/HC-Pro, é do tipo serina e seu sítio ativo, Gli-X-Ser-Gli, é conservado em todos os potyvírus cuja sequência de P1 já foi determinada (Adams et al., 2005). A proteína HC-Pro, responsável pela clivagem entre HC-Pro e P3, é dependente de cisteína e no caso do TEV a clivagem ocorre entre os dois resíduos de glicina da sequência Tyr-X-Val-Gly-Gly (Carrington et al., 1989).

Uma consequência da estratégia de expressão do genoma dos potyvírus é a produção de quantidades estequiométricas de todas as proteínas virais derivadas da poliproteína, independentemente da necessidade de cada uma delas durante o ciclo de infecção. Deste modo, diversas proteínas acumulam-se na célula infectada na forma de inclusões. As proteínas NIa e NIb acumulam-se no núcleo das células infectadas, devido ao sinal de localização nuclear presente em suas sequências (Restrepo et al., 1990) e a proteína CI se acumula em altos níveis no citoplasma da célula formando as inclusões citoplasmáticas (Roberts et al., 1998). Embora não exista regulação da quantidade de proteínas produzidas, ocorre regulação temporal com base na eficiência de clivagem dos sítios de reconhecimento da protease NIa, conforme mencionado anteriormente.

2.3.2. Replicação do genoma

Uma vez ocorrida a tradução do RNA viral, o vírus dispõe de todas as proteínas necessárias para a replicação do genoma. A replicação da fita positiva é catalisada pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral (a proteína NIb) em conjunto com proteínas do hospedeiro. A replicação é iniciada pela síntese de uma fita complementar de polaridade negativa a partir da fita de RNA viral (polaridade positiva). As novas fitas positivas são em seguida sintetizadas utilizando-se as fitas negativas como molde. A especificidade do complexo replicativo é assegurada pelo reconhecimento de sinais em *cis* presentes em ambas as fitas (Simón-Buela et al., 1997). A VPg atua como iniciadora da síntese de fitas de RNA negativo, por meio do grupamento hidroxil presente em um resíduo conservado de tirosina (Murphy et al., 1996).

A sequência da 3'NTR é essencial para a amplificação viral, uma vez que ela contém o promotor para a síntese da fita negativa. Foi demonstrado que a 3'NTR do TEV apresenta estruturas secundárias essenciais para a replicação do genoma, formadas pelo pareamento de sequências dentro da própria 3'NTR e também de

sequências localizadas na região codificadora da proteína capsidial. Mutações afetando a estrutura secundária destas sequências reduzem o nível de replicação viral, porém se a sequência é alterada, mas a estrutura secundária mantida, a replicação é restaurada a nível normal (Haldeman-Cahill et al., 1998). Desta maneira, a região codificadora da proteína capsidial e a 3'NTR estão envolvidas na amplificação do genoma viral por meio da formação de estruturas secundárias que serão reconhecidas pelo complexo replicativo. Foi demonstrado que plantas transgênicas expressando a proteína capsidial e a 3'NTR do LMV sintetizam fitas de RNA negativo para estas sequências quando co-infectadas com potyvírus distintos como o TEV, *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) ou *Pepper mottle virus* (PepMoV) (Teycheney et al., 2000). Isto evidencia a presença de elementos essenciais na sequência codificadora da proteína capsidial e na 3' NTR que permitem o reconhecimento específico do RNA viral pela polimerase de potyvírus distintos.

A maioria das proteínas codificadas pelos potyvírus é necessária, direta ou indiretamente, para a replicação viral. Dentre estas, as proteínas CI, NIa e NIb formam o núcleo replicativo, catalisando processos enzimáticos essenciais durante a replicação. A proteína CI possui atividades de helicase, ATPase e ligação a RNA (Laín et al., 1991). A proteína NIb é a RNA polimerase dependente de RNA e possui a sequência de aminoácidos Gln-Asp-Asp característica das RdRp's virais (Hong and Hunt, 1996). O processo de replicação ocorre em associação com membranas do retículo endoplasmático das células infectadas (Schaad et al., 1997a). A proteína 6K₂ é responsável pela indução da formação de vesículas no retículo endoplasmático e funciona como uma âncora, graças à presença de um domínio central hidrofóbico de 19 aminoácidos que lhe confere a propriedade de associação a membranas (Restrepo-Hartwig and Carrington, 1994; Schaad et al., 1997a). Como o sítio de clivagem entre 6K₂ e NIa possui baixa afinidade pela protease, essas proteínas permanecem como um único polipeptídeo por um tempo relativamente longo, ancoradas ao retículo endoplasmático (Restrepo-Hartwig and Carrington, 1992). Foi demonstrado que a indução da formação de vesículas pela proteína 6K₂ é dependente de COPI e COPII ("coat protein complex" I e II, respectivamente), que são heterocomplexos protéicos envolvidos na modulação do transporte entre o retículo endoplasmático e o aparato de Golgi (Wei and Wang, 2008).

Vesículas induzidas por 6K₂ contendo o complexo de replicação viral podem trafegar ao longo do citoplasma de células infectadas em associação aos microfilamentos de actina que compõem o citoesqueleto. Consistente com essas observações, o tratamento de tecidos infectados pelo TuMV com agentes que

despolimerizam os microfilamentos resulta em forte redução do acúmulo viral (Cotton et al., 2009).

Por meio do uso de clones infecciosos recombinantes do TuMV expressando a proteína 6K₂ fundida a mCherry ou GFP foi demonstrado que cada vesícula carrega apenas 1 cópia do genoma viral. Este resultado sugere que a replicação do RNA viral ocorre *in cis* e que as vesículas podem ser também sítios da tradução do RNA viral. De fato, os fatores da tradução eIF(iso)4E, PABP e eEF1A co-localizaram com vesículas contendo RNA e proteínas virais reforçando a hipótese de que vesículas são também sítios da tradução do RNA viral (Cotton et al., 2009).

A proteína Nlb é recrutada para o retículo endoplasmático por meio de interações proteína-proteína (Nla-VPg/Nlb). Estudos *in vitro* utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura demonstraram que a proteína Nla-VPg interage com Nlb, possivelmente estimulando sua atividade de RNA polimerase (Fellers et al., 1998). Observou-se que a interação Nlb/Nla-VPg do TVMV diminui quando são feitas mutações no domínio VPg, sugerindo que a porção VPg é responsável pela interação (Fellers et al., 1998). Entretanto, outros autores mostraram que o domínio protease é o responsável pela interação Nla-VPg/Nlb do TEV (Li et al., 1997). Durante o processo de replicação a VPg se liga à extremidade 5' do RNA viral por meio de um resíduo de tirosina situado na porção amino terminal da proteína, onde irá exercer sua função de iniciadora da replicação (Murphy et al., 1996). Ao final da replicação, o complexo é liberado do retículo endoplasmático por meio da autoproteólise entre as porções VPg e Pro da proteína Nla (Schaad et al., 1997a).

As proteínas P1, P3 e HC-Pro também participam do processo de replicação como ativadores ou reguladores. A P1 atua como fator de amplificação do genoma viral (Verchot and Carrington, 1995b) e pode estar envolvida na infectividade e acúmulo viral (Rajamaki et al., 2005). Um mutante do TEV no qual foi deletada a sequência codificadora para a proteína P1 possui a capacidade de infectar a planta sistemicamente, porém o nível de replicação foi muito inferior quando comparado ao vírus selvagem. Plantas transgênicas expressando a proteína P1 foram capazes de complementar sua função, restaurando os níveis de replicação viral mostrando assim a atividade em *trans* de P1 (Verchot and Carrington, 1995a). Mutantes de inserção na proteína P3 são incapazes de se replicar em protoplastos (Klein et al., 1994). Por meio do uso de fusões da proteína P3 do *Papaya ringspot virus* (PRSV) com GFP foi demonstrado que P3 co-localiza com dsRed2 fusionado aos sinais de localização e retenção no retículo do gene da proteína quitinase básica de *Arabidopsis thaliana*. Análises envolvendo deleções na proteína P3 mostraram que a porção C-terminal de P3 é a responsável pela localização no retículo. Um domínio hidrofóbico de 19

aminoácidos contido na região deletada foi suficiente para redirecionar GFP para o retículo, indicando que esta região é, de fato, a responsável pela localização subcelular de P3 (Eiamtanaset et al., 2007). A proteína P3 do TEV também foi observada em associação a membranas do retículo e do aparato de Golgi, onde foi responsável pela indução de estruturas pontuadas. A localização de P3 na membrana do retículo, à semelhança da proteína 6K₂, também foi dependente da atividade dos heterocomplexos COPI e II. Além disso, o domínio hidrofóbico presente na porção C-terminal de P3 de TEV foi suficiente para redirecionar P3-YFP para a membrana do retículo, sugerindo que esta mesma porção pode ser o determinante da localização subcelular da P3 de diferentes potyvírus (Cui et al., 2010). Tanto a proteína P3 (Rodriguez-Cerezo et al., 1993) como a P1 (Arbatova et al., 1998) foram encontradas associadas à proteína CI em células infectadas, e as interações entre as proteínas P3/NiB e P1/CI foram demonstradas utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura (Merits et al., 1999), sugerindo que as proteínas P1 e P3 estão envolvidas na replicação do RNA viral.

O papel da proteína HC-Pro durante a replicação é complexo, e envolve no mínimo suas regiões central e carboxi-terminal. O processamento da proteína HC-Pro é essencial para a replicação. Mutantes que suprimem a atividade proteolítica de HC-Pro não são viáveis e esta atividade não pode ser complementada por HC-Pro selvagem produzida em plantas transgênicas, indicando a sua atividade exclusivamente em *cis* (Kasschau and Carrington, 1995). Mutantes para a região central da proteína apresentam capacidade proteolítica, porém exibem um fenótipo de supressão da amplificação viral, demonstrando que não somente a atividade proteolítica é importante para a amplificação do genoma (Kasschau et al., 1997). Mutantes para a região central da proteína HC-Pro podem ser complementados em *trans* (Kasschau et al., 1997). A afinidade da HC-Pro do PVY e do *Potato virus A* (PVA) ao RNA viral foi demonstrada *in vitro* (Maia and Bernardi, 1996). Foram mapeados dois domínios independentes localizados na região central da HC-Pro, denominados “domínio A” (aminoácidos 89-230) e “domínio B” (aminoácidos 234-321) responsáveis pela ligação de HC-Pro de maneira não específica a ácidos nucleicos, preferencialmente RNA. O domínio B apresenta um motivo ribonucleoprotéico (RNP) que é encontrado em uma grande família de proteínas envolvidas no processamento e transporte de RNA, expressão gênica e desenvolvimento celular (Urcuqui-Inchima et al., 2000). A provável forma ativa da HC-Pro é um homodímero, uma vez que esta é a forma purificada a partir de plantas infectadas (Thornbury et al., 1985). Utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura, foram obtidas evidências da capacidade das HC-Pro's do LMV e do PVY em auto-interagir, verificando-se também a possibilidade de

uma interação heteróloga entre estas HC-Pro's e demonstrando-se que 72 aminoácidos presentes na região amino-terminal da proteína são responsáveis pela interação (Urcuqui-Inchima et al., 1999).

A região do RNA viral que codifica a proteína capsidial (CP) também está envolvida na replicação viral. Mutantes do TEV nos quais ocorre terminação prematura da tradução apresentam replicação deficiente, enquanto mutantes nos quais a fase de leitura foi modificada, porém sem terminação prematura, replicaram normalmente indicando que a tradução completa da região codificadora da CP, porém não a proteína propriamente dita, é essencial para a replicação (Mahajan et al., 1996).

2.3.3. Movimento do vírus na planta

O movimento de vírus que infectam plantas pode ser dividido em duas etapas: movimento célula-a-célula (curta distância) e movimento sistêmico (longa distância) (Lucas, 2006). Inicialmente, a partir da célula infectada, o vírus se movimenta célula-a-célula por meio das conexões citoplasmáticas denominadas plasmodesmas, que permitem a continuidade do citoplasma e do sistema de endomembranas entre células adjacentes. Como o limite de exclusão passivo dos plasmodesmas em células do mesófilo é de aproximadamente 1 kDa, os vírus de plantas produzem “proteínas de movimento” capazes de aumentar esse limite de exclusão, ligando-se ao RNA viral e permitindo a passagem deste pelos plasmodesmas na forma de um complexo RNA viral-proteína de movimento ou na forma de vírions (Lucas, 2006).

Os potyvírus, ao contrário da maioria dos outros vírus de plantas já estudados, não possuem proteína com função exclusiva no movimento célula-a-célula. Diversas proteínas dos potyvírus já foram implicadas no movimento célula-a-célula, incluindo CP, HC-Pro, CI, VPg e PIPO.

Evidências genéticas demonstram que a função da CP do TEV no movimento célula-a-célula é independente da formação de vírions (Dolja et al., 1994). Mutantes na região central da CP do TEV não foram capazes de se movimentar célula-a-célula, e deleções na região amino-terminal da CP também implicaram em uma redução do movimento, sugerindo que esta região atua de forma acessória (Dolja et al., 1994; Dolja et al., 1995).

O envolvimento da proteína HC-Pro no movimento foi demonstrado por meio de ensaios genéticos e de microinjeção. Mutações na HC-Pro do TEV reduziram o movimento célula-a-célula quando comparado ao vírus selvagem (Cronin et al., 1995; Kasschau et al., 1997), indicando possível envolvimento da proteína como fator acessório ao movimento. Estudos de microinjeção de proteínas dos potyvírus *Bean*

common mosaic necrosis virus (BCMNV) e LMV expressas em *Escherichia coli* demonstraram a capacidade das proteínas CP e HC-Pro de se movimentarem célula-a-célula, aumentarem o limite de exclusão dos plasmodesmas e facilitarem o movimento de RNA viral. Mutações na região central da CP e na região carboxi-terminal de HC-Pro aboliram a capacidade de movimentação célula-a-célula destas proteínas. Os experimentos indicaram uma interação entre CP, HC-Pro e os plasmodesmas, sugerindo que os potyvírus codificam duas proteínas com características de proteínas de movimento (Rojas et al., 1997). A proteína CI não foi capaz de aumentar o limite de exclusão dos plasmodesmas (Rojas et al., 1997), entretanto, diversos trabalhos mostraram seu envolvimento no movimento viral (Rodríguez-Cerezo et al., 1997; Carrington et al., 1998). Análises ultra-estruturais de folhas de tabaco cinco dias após inoculação com o TVMV revelaram a co-localização das proteínas CI e CP próximas ou sobre a abertura dos plasmodesmas (Rodríguez-Cerezo et al., 1997). Além disso, foram realizadas mutações na região amino-terminal da proteína CI do TEV e indivíduos carregando essas mutações apresentaram níveis de replicação equivalente ao vírus selvagem, entretanto não foram capazes de se movimentar célula-a-célula (Carrington and Whitham, 1998).

A proteína VPg também parece estar envolvida no movimento célula-a-célula. Por meio da construção de vírus quiméricos, o determinante de virulência do TVMV em plantas de *Nicotiana tabacum* cv. TN86 (que contém o gene de resistência *va*) foi identificado como sendo a VPg (Nicolas et al., 1997). Verificou-se que a substituição da VPg do isolado TVMV-WT, incapaz de infectar plantas contendo o gene de resistência, no genoma do isolado TVMV-S, capaz de infectar plantas com o gene de resistência, confinava a infecção às células iniciais, indicando deficiência no movimento célula-a-célula.

Recentemente, foi demonstrado que a proteína PIPO é essencial ao movimento célula-a-célula do *Soybean mosaic virus* (SMV). Indivíduos de SMV fusionado a GUS com mutações que geram códons de terminação prematuros na região codificadora da ORF *pipo*, mas que não alteram a sequência da poliproteína apresentaram taxas normais de replicação do genoma viral. Porém a infecção ficou confinada às células inicialmente infectadas. O movimento viral não foi restaurado mesmo quando o vírus mutante e o tipo-selvagem foram inoculados simultaneamente ou sequencialmente (Wen and Hajimorad, 2010). Além disso, foi demonstrado que a localização de CI nos plasmodesmas em células de *Nicotiana benthamiana* é modulada por P3N-PIPO, e que esta proteína se localiza nos plasmodesmas e interage fisicamente com CI (Wei et al., 2010).

Pelo menos três proteínas virais parecem estar envolvidas no movimento a longa distância dos potyvírus: CP, HC-Pro e VPg. Para a proteína CP, foi verificado que mutantes de TEV-GUS apresentando deleções nas porções amino- e carboxi-terminais da CP apresentavam restrições no movimento a longa distância. O movimento a longa distância destes mutantes não pôde ser restabelecido pela expressão da CP a partir de plantas transgênicas (Dolja et al., 1994; Dolja et al., 1995). Para o PSbMV, verificou-se por meio da análise de quimeras que a substituição de uma serina na posição 47 da CP era suficiente para permitir o movimento a longa distância em *Chenopodium quinoa* de um isolado normalmente restrito às folhas inoculadas (Andersen and Johansen, 1998). Foi demonstrado que o resíduo de ácido aspártico na sequência Asp-Ala-Gli da CP do TMV também confere ao vírus habilidade de se movimentar sistemicamente em plantas de tabaco (Atreya et al., 1995; Lopez-Moya and Pirone, 1998).

O envolvimento de HC-Pro no movimento a longa distância foi demonstrado por diversos autores. Mutantes de TEV na sequência Cys-Cys-Cys-Glu, localizada na região central da proteína, são deficientes no movimento a longa-distância e este é restabelecido pela expressão da HC-Pro do TEV em plantas transgênicas (Cronin et al., 1995). A análise do comportamento deste mutante em diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto, transgênicos ou não, mostrou que o movimento a longa-distância só ocorre na presença da combinação enxerto e porta-enxerto transgênicos, indicando a necessidade da HC-Pro tanto nos tecidos inoculados como não inoculados (Kasschau et al., 1997). Além disso, foi demonstrado que mutações na porção amino-terminal da HC-Pro do TMV resultaram em ausência de movimento sistêmico (a longa distância) do vírus (Klein et al., 1994).

Estudos envolvendo recombinantes entre duas estirpes do TEV demonstraram o envolvimento da VPg no movimento a longa distância. Analisando-se as estirpes TEV-HAT, restrita às células inoculadas na cultivar de tabaco V20 mas capaz de infectar sistemicamente a cultivar Havana, e TEV-Oxnard, que causa infecção sistêmica em ambas as cultivares, verificou-se que o híbrido TEV-HAT contendo a VPg do TEV-Oxnard era capaz de se mover a longa distância na cultivar V20 (Schaad et al., 1997b).

Ecotipos de *Arabidopsis thaliana* que restringem o movimento à longa distância do TEV sem envolver a resposta de hipersensibilidade foram selecionados para se estudar a restrição ao movimento viral. Verificou-se que pelo menos dois genes dominantes, *RTM1* e *RTM2*, presentes nos ecotipos Columbia-0 (Col-0) e Wassilewskija-2 (Ws-2), são responsáveis pela restrição do movimento a longa distância, permitindo a replicação e movimento célula-a-célula (Mahajan et al., 1998).

Ambos foram clonados, e verificou-se que *RTM1* codifica uma proteína similar a várias proteínas que contêm repetições múltiplas de sequências tipo jacalinas (Chisholm et al., 2000). Jacalina é uma lecitina encontrada em sementes de frutos de jaca (*Artocarpus integrifolia*) (Sankaranarayanan et al., 1996), que se ligam de forma reversível a mono ou oligossacarídeos (Peumans and Van Damme, 1995). Proteínas relacionadas às jacalinas parecem estar envolvidas na resistência de plantas contra vírus, insetos e fungos (Chisholm et al., 2000). O produto do gene *RTM2* é uma proteína apresentando multidomínios contendo uma região amino-terminal de alta similaridade com *small heat shock proteins* (HSPs) (Whitham et al., 2000). A expressão de HSPs de plantas é geralmente induzida por temperatura, mas este não é o caso para a proteína codificada pelo gene *RTM2*, que, além disso, não confere termotolerância às plantas (Whitham et al., 2000).

O mecanismo pelo qual os genes *RTM1* e *RTM2* cooperam no mecanismo de restrição ao movimento à longa distância do TEV ainda não está estabelecido. A restrição pode ser derivada a um bloqueio físico para entrada ou passagem do vírus pelo floema, ou à inibição de algum fator necessário durante o movimento do vírus nos elementos de tubo crivados. Em experimentos de co-infecção do TEV-GUS com outros vírus como o *Cucumber mosaic virus* (CMV) ou TMV verificou-se que estes vírus não eram capazes de auxiliar o movimento à longa distância do TEV no ecotipo Col-0, descartando uma resposta de defesa generalizada. O CMV e o TEV codificam respectivamente as proteínas 2b e HC-Pro, envolvidas na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional. Em plantas de *Nicotiana* spp. o TEV ocasiona um aumento do acúmulo do CMV, porém este efeito sinérgico não é verificado em plantas Col-0 (*RTM1/RTM2*), indicando que nessas plantas a HC-Pro do TEV não é eficaz na supressão do silenciamento (Whitham et al., 2000). É possível, embora ainda não existam evidências experimentais nesse sentido, que o bloqueio da capacidade de HC-Pro em suprimir a resposta de silenciamento seja a responsável pela restrição ao movimento a longa distância do vírus em plantas contendo os genes *RTM1* e *RTM2*.

2.4. Os genes Translationally controlled tumor protein (TCTP) e SNF1 kinase complex anchoring protein (SI-Gal83)

2.4.1. Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP)

A família de proteínas TCTP é amplamente distribuída e conservada entre os eucariotos (Bommer and Thiele, 2004). TCTP foi isolada inicialmente de células tumorais de humanos (Chitpatima et al., 1988). O gene TCTP é regulado em nível pós-transcricional, tendo sido relatada a ocorrência do transcrito do gene na ausência da proteína (revisado por Bommer and Thiele (2004)).

Diversos homólogos de TCTP têm sido clonados e caracterizados em um número cada vez maior de organismos (Li et al., 2010; Qin et al., 2010; Wang et al., 2009; Yubero et al., 2009). Entretanto, apesar da descrição de vários aspectos funcionais, seu modo de ação nos diferentes processos celulares ainda não está totalmente esclarecido.

A TCTP de *Arabidopsis* foi relatada como uma reguladora positiva do crescimento mitótico, por controlar especificamente a duração do ciclo celular. Em contraste à TCTP de *Drosophila*, a TCTP de *Arabidopsis* não está implicada na regulação do crescimento pós-mitótico. Curiosamente, a TCTP de *Drosophila* é capaz de resgatar completamente a proliferação celular em *Arabidopsis* nocauteadas para o gene *tctp*, e vice-versa. Esses resultados sugerem que a função de TCTP em regular a divisão celular é parte de uma via regulatória de crescimento conservada em plantas e animais, e que embora a maquinaria de divisão celular seja compartilhada em todos os organismos multicelulares para controlar o crescimento, a expansão celular pode ser desacoplada da divisão celular em plantas mas não em animais (Brioudes et al., 2010).

Recentemente, foi demonstrado que a expressão das TCTPs de humanos e de *Schistosoma mansoni* é aumentada após células serem submetidas a altas temperaturas. Ambas as TCTPs foram capazes de ligar-se à proteínas desnaturadas e nativas protegendo-as de danos provocados pelo choque térmico, sugerindo que essas proteínas podem atuar de forma semelhante às chaperonas moleculares (Gnanasekar et al., 2009). Adicionalmente, resultados também sugerem que a TCTP de *Brugia malayi* é capaz de proteger o DNA celular de danos causados por estresse oxidativo (Gnanasekar and Ramaswamy, 2007).

Em humanos, TCTP é capaz de inibir a apoptose mediada pela proteína Bax. Bax modula a permeabilidade da membrana mitocondrial durante a apoptose através da formação de canais que são gerados após sua dimerização. TCTP e Bax não

interagem diretamente, entretanto, a ancoragem de TCTP à membrana mitocondrial impede a dimerização de Bax e consequentemente a apoptose é inibida (Susini et al., 2008).

A comparação das sequências de TCTP de diferentes organismos mostra um alto nível de conservação entre todos os eucariotos. Em plantas, dos 168 aminoácidos de TCTP, 86 (50%) dos resíduos são totalmente conservados entre as espécies. Por exemplo, as TCTPs de *Arabidopsis* e couve-flor possuem 90% de identidade, e as de ervilha e arroz possuem 85%. Todas as sequências de TCTPs de plantas já determinadas possuem tirosinas adicionais nas posições 64 e 73. Estes resíduos são conservados exclusivamente em plantas e ausentes nos demais organismos. Estes sítios são alvos de proteínas cinases C específicas de plantas, sugerindo que TCTP em plantas pode ter funções adicionais que são especificamente reguladas por proteínas cinases C (Venugopal, 2005).

Em *Arabidopsis thaliana* TCTP é um importante regulador de crescimento e seu nocaute resulta em profundas alterações fenotípicas. Linhagens carregando inserções de T-DNA no alelo *tctp* apresentam forte redução no crescimento do tubo polínico enquanto linhagens onde TCTP é silenciada apresentam tamanho reduzido em consequência da redução do tamanho celular. Curiosamente, essas mesmas linhagens são pouco sensíveis ao tratamento com auxina exógena e apresentam altos níveis de auxina endógena (Berkowitz et al., 2008). Em arroz (*Oriza sativa*) foi observada a superexpressão da TCTP após a exposição das raízes ao alumínio e após tratamento com um elicitor, demonstrando provável atuação na resposta a estresses (Liao et al., 2009).

Estudos de controle do transporte de macromoléculas pelo floema de abóbora demonstraram que duas proteínas do floema, CmPP16-1 e CmPP16-2, interagem especificamente com TCTP, regulando o transporte destas proteínas. Os autores propõem um modelo no qual o destino de macromoléculas é determinado pela saída seletiva da macromolécula do floema e que o controle desta saída pode ser mediado por TCTP (Aoki et al., 2005). A saída seletiva de macromoléculas dos elementos de tubo crivado já foi relatada para RNA (Foster et al., 2002; Zhu et al., 2002) e para proteínas de movimento viral (Itaya et al., 2002). Desta forma, é razoável propor que TCTP possa estar envolvida no processo de controle de saída seletivo do floema de RNA e proteínas virais, regulando assim o movimento viral.

Além disso, foi demonstrado que TCTP interage com os fatores de alongação da tradução eIF1A e eIF1B (Cans et al., 2003). Em eucariotos, a alongação da cadeia peptídica durante a síntese proteica é regulada pela troca GDP/GTP. Em uma interação códon/anti-códon correta ocorre a hidrólise do GTP ligado ao eIF1A,

resultando no complexo GDP-eIF1A. O GDP é então removido pelo eIF1B permitindo a adição de um novo aminoácido à cadeia polipeptídica. Os autores demonstraram que a ligação de TCTP estabiliza o complexo GDP-eIF1A, diminuindo a taxa de síntese protéica (Cans et al., 2003). A infecção por potyvírus leva a uma diminuição na taxa de síntese de proteínas do hospedeiro. Sendo assim, é possível que essa diminuição seja mediada por TCTP.

Foi proposto ainda que a TCTP pode estar envolvida na resposta de defesa mediada por dsRNA. Foi demonstrado que o mRNA de TCTP é altamente estruturado, e capaz de ativar uma proteína cinase dependente de dsRNA (PKR) (Bommer et al., 2002), que por sua vez induz uma série de respostas de defesa, incluindo respostas de defesa antiviral mediadas por interferon em células de mamíferos e diminuição na taxa de síntese protéica do hospedeiro (Schneider and Mohr, 2003; Valchanova et al., 2006). Como estratégia para combater o mecanismo de defesa do hospedeiro mediada por PKR, alguns vírus codificam proteínas que se ligam a dsRNA, e inibem a resposta de defesa mediada por dsRNA (Child et al., 2004; Child et al., 2006). Vírus que infectam plantas também codificam proteínas capazes de suprimir a resposta de defesa mediada por dsRNA. Foi demonstrado que ligação a dsRNA pode ser uma estratégia geral de vírus de plantas para suprimir o silenciamento gênico mediado por RNA (Merai et al., 2006). Desta forma, é razoável supor que em plantas infectadas ocorra uma indução da expressão de TCTP como parte da resposta de defesa, e que proteínas virais supressoras desta resposta de defesa se liguem a TCTP, levando à sua inativação.

O papel de TCTP na resposta a estresses bióticos também tem sido avaliado. Foi demonstrado que em camarão (*Penaeus monodon*), o produto do gene TCTP possui propriedades anti-apoptóticas e está presente em níveis elevados durante o início da infecção por *White spot syndrome virus* (WSSV). Os níveis de TCTP aumentam consideravelmente entre 24 e 48 horas após a infecção pelo WSSV. Foi demonstrado que camarões injetados com TCTP recombinante tiveram uma sobrevivência de 80-100%, apresentando baixa taxa de infecção pelo WSSV. Este resultado implica que a injeção de TCTP recombinante diminui a taxa de infecção viral por um mecanismo ainda desconhecido (Tonganunt et al., 2008).

Recentemente, foi demonstrado por expressão transiente em *N. benthamiana* que a TCTP se localiza no citoplasma de plantas saudáveis. Nos estágios iniciais da infecção pelo PepYMV, TCTP é redirecionada para o núcleo. Em infecções já estabelecidas esse efeito não é observado, e TCTP expressa transientemente acumula-se predominantemente no citoplasma, indicando um provável papel da proteína restrito aos estágios iniciais da infecção viral (Côco, 2009).

2.4.2. SNF1 kinase complex anchoring protein (Gal83)

As proteínas SNF1 constituem um grupo de proteínas cinases inicialmente identificadas em leveduras com função na ativação transcricional e na regulação gênica, além de possuírem funções na resposta celular a diferentes estresses, como limitação de nutrientes, estresses salinos e choque térmico (Sanz, 2003). PAK1, TOS3, e ELM1 são três cinases capazes de ativar SNF1 via fosforilação (Nath et al., 2003; Sutherland et al., 2003). Proteínas ortólogas à SNF1 são encontradas em plantas (SnRK1) e em mamíferos (AMPK) e constituem famílias altamente conservadas de proteínas cinases (Baena-Gonzalez and Sheen, 2008).

Além do controle do metabolismo de fontes alternativas de carbono, as SNF1 de leveduras também atuam no controle da respiração, gliconeogênese, transporte de nutrientes e meiose, na falta de glicose. Tanto ativadores como repressores transcricionais são regulados por estas enzimas, assim como as histonas H3 e a RNA polimerase II (Baena-Gonzalez and Sheen, 2008).

As proteínas SNF1 formam um complexo composto pela subunidade catalítica que é a própria proteína SNF1 (subunidade α) junto com a subunidade regulatória SNF4 (subunidade γ) e a subunidade composta pelas proteínas Sip1, Sip2 e Gal83 (subunidade β) (Dyck et al., 1996). As proteínas Sip1, Sip2 e Gal83 representam uma família conservada de proteínas que têm função dupla nesse complexo. Elas possuem um papel estrutural ancorando a subunidade SNF4 à subunidade SNF1 via dois domínios distintos conservados. O domínio carboxi-terminal ASC se liga a SNF4 independente de SNF1 e a região interna KIS interage com SNF1 independente de SNF4 (Jiang and Carlson, 1997). Além do papel estrutural, elas possuem um papel regulatório via um domínio de ligação a glicogênio (*glycogen-binding domain* – GBD) (Polekhina et al., 2003). Em mamíferos, a ligação de glicogênio a essa subunidade causa uma inibição na atividade de AMPK. A importância de ligação de glicogênio ao GBD em leveduras é questionável já que células sem a capacidade de produzir glicogênio têm uma regulação normal de SNF1 em resposta a limitação de glicose (Momcilovic et al., 2008). Mesmo assim, a deleção do GBD da proteína Gal83 resultou na ativação constitutiva da atividade de SNF1, sugerindo que esse domínio é requerido para a limitação da atividade de SNF1 durante condições de abundância de glicose (Momcilovic et al., 2008).

Em plantas, as proteínas relacionadas a SNF1 regulam a expressão de genes dos diferentes tipos de estresses, como osmótico, salino, falta de nutrientes, choque térmico, poluição, presença de patógenos, além de outros fatores que alteram a taxa de assimilação de carbono e/ou a respiração (Baena-Gonzalez and Sheen, 2008;

Rosa et al., 2009). Situações de estresse em mamíferos, como hipoxia, esquemia e choque térmico, também levam à ativação das AMPKs (Hardie, 2007; Hedbacker and Carlson, 2008; Hardie, 2007; Hedbacker and Carlson, 2008).

Duas cinases SnRK1 foram identificadas em *Arabidopsis* como reguladores centrais da transcrição em condições de escuro e de diferentes estresses (Baena-Gonzalez and Sheen, 2008). Mais de 300 genes envolvidos em processos biossintéticos são reprimidos por SnRK1, e aproximadamente 300 genes envolvidos em processos de remobilização e catabolismo são induzidos em condições de falta de energia (Baena-Gonzalez and Sheen, 2008).

No contexto de infecções virais, foi demonstrado que proteínas virais de begomovírus são capazes de se ligar a proteínas relacionadas a SNF1. Foi demonstrado que a ligação da proteína Trap do begomovírus *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) a SNF1 leva a um aumento de suscetibilidade do hospedeiro, e que plantas de *Nicotiana tabacum* que superexpressam SNF1 possuem uma maior resistência à infecção por begomovírus (Hao et al., 2003). A proteína Rep de begomovírus é capaz de se ligar e inibir as cinases GRIK1 e GRIK2, que são similares a PAK1, TOS3, e ELM1, todas ativadoras de SNF1, e a infecção viral regula positivamente a expressão dessas proteínas (Shen and Hanley-Bowdoin, 2006). A superexpressão das proteínas de transativação Trap do TGMV e C2 do curtovírus *Beet curly top virus* (BCTV) em plantas transgênicas levam a uma maior suscetibilidade, caracterizada por um aumento da concentração viral (Wang et al., 2003). Esta maior suscetibilidade foi atribuída à interação da AC2 e C2 com uma adenosina cinase (ADK) e com SNF1 (Hao et al., 2003; Wang et al., 2003). A ADK catalisa a síntese de 5'-AMP, o qual por sua vez ativa SNF1, um regulador do nível de ATP celular. O fato de Trap interagir com SNF1 e ADK sugere que as respostas metabólicas mediadas por SNF1 são um componente importante da resposta de defesa a vírus, e que os begomovírus desenvolveram uma estratégia de contra-ataque baseada na inativação dos dois componentes iniciais dessa via de defesa (SNF1 e ADK).

Recentemente foi realizada a indução de silenciamento gênico por vírus (VIGS – *virus-induced gene silencing*) do gene SNF1 kinase complex anchoring protein, utilizando-se o *Tobacco rattle virus* (TRV) como vetor de indução de VIGS e posterior análise do efeito do silenciamento na infecção viral. Os resultados indicaram que o silenciamento levou a uma redução significativa na carga viral 72 horas após a inoculação (Bruckner, 2010).

2.5. Detecção de interação entre proteínas *in vivo* por purificação por afinidade em tandem (*Tandem affinity purification*, TAP)

No estudo proteômico, o método TAP (*tandem affinity purification*) constitui uma ferramenta poderosa para a identificação da interação direta ou indireta entre proteínas *in vivo*. O método permite a purificação de proteínas complexadas a uma proteína alvo etiquetada. A etiqueta consiste de um domínio de proteína A, um sítio de clivagem da protease do TEV e um domínio de ligação a calmodulina (CBP - “cauomodulin-binding protein”) (Figura 2) (Rigaut et al., 1999). Este método baseia-se em dois procedimentos seguidos de purificação por cromatografia de afinidade, e tem sido utilizado para identificação de proteínas em heterocomplexos, por meio de espectrometria de massa, em leveduras (Gavin et al., 2002), em células de mamíferos (Knuesel et al., 2003), em *Escherichia coli* (Gully et al., 2003), em células de insetos (Forler et al., 2003) e em plantas (Rohila et al., 2004; Dufresne et al., 2008). O método TAP apresenta aplicações similares ao sistema duplo-híbrido de leveduras. Entretanto, apresenta a vantagem de identificar interações diretas e indiretas em um único experimento, sendo utilizado preferencialmente na identificação de heterocomplexos de proteínas (Rigaut et al., 1999). Utilizando TAP no estudo da interação entre *A. thaliana* e *Turnip mosaic virus* (TuMV) foi possível detectar a interação entre as proteínas Hsp70 e Eif1A com a RdRp viral, sendo esta interação essencial para a infecção viral (Dufresne et al., 2008).

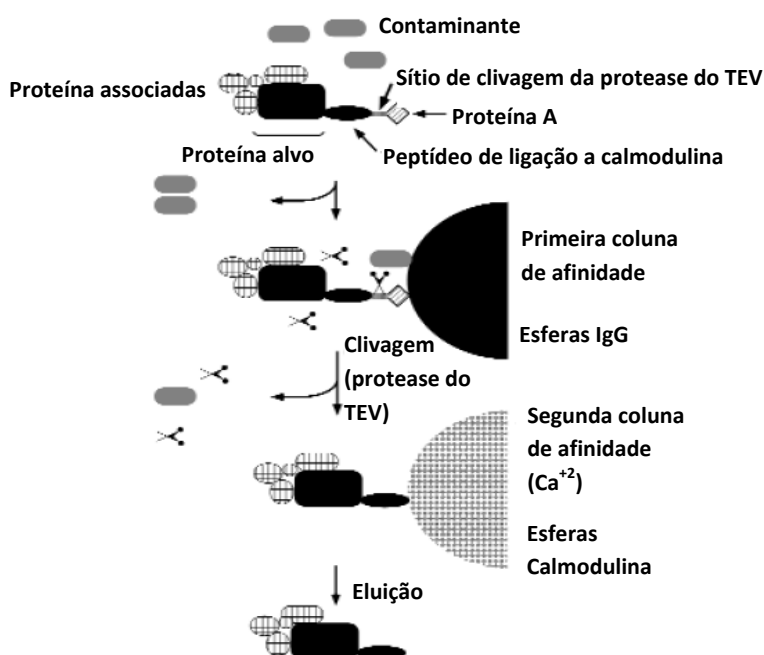


Figura 2. Representação esquemática do procedimento de purificação por afinidade em tandem (TAP). Adaptado de Rigaut et al., (1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolado viral

O isolado 3 do PepYMV foi descrito por Truta et al. (2004) e vem sendo mantido em plantas de *Nicotiana debneyi* por meio de inoculações sucessivas via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,2M pH 7,2 com 1% de bissulfito de sódio. As plantas infectadas são mantidas em casa de vegetação.

3.2. Efeito do silenciamento dos genes TCTP e SI-Gal83 na infecção de tomateiro pelo PepYMV

3.2.1. Obtenção dos vetores pK7WG2-TCTP, pK7GWIWG2-TCTP, pK7GWIWG2-SI-Gal83

A partir do vetor de entrada pENTR-TCTP obtido por Côco (2009) a região codificadora de TCTP foi transferida para o vetor pK7WG2 por meio de recombinação homóloga utilizando-se a enzima LR Clonase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, gerando o plasmídeo pK7WG2-TCTP. As sequências de SNF1 kinase complex anchoring protein (SI-Gal83) e TCTP obtidas por Alfenas-Zerbini et al. (2009) foram clonadas em pENTR11 e sub-clonadas no vetor pK7GWIWG2 como descrito para o gene TCTP, gerando os plasmídeos pK7GWIWG2-SI-Gal83 e pK7GWIWG2-TCTP, respectivamente. As clonagens foram confirmadas por sequenciamento (Macrogen, Inc. Seul, Coréia do Sul). Desta forma, a construção pK7WG2-TCTP carrega toda a porção codificadora da TCTP de tomateiro, enquanto as construções pK7GWIWG2-SI-Gal83 e pK7GWIWG2-TCTP carregam fragmentos de 480 e 285 nucleotídeos correspondendo às regiões centrais do mRNA de cada um dos genes, respectivamente (Figura 3).

As construções obtidas foram utilizadas para a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 por choque térmico (Brasileiro and Carneiro, 1998).

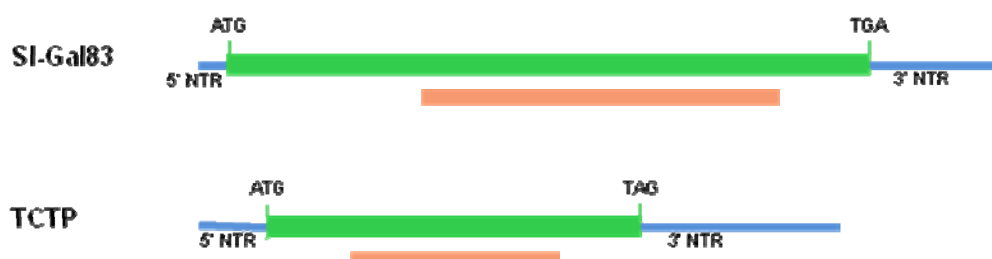


Figura 3. Representação esquemática do mRNA que codifica SI-Gal83 e TCTP. Em azul estão representadas as regiões 5' e 3' não traduzidas; em verde a região codificadora e em laranja os fragmentos utilizados para a indução do silenciamento. Preparado com base nas sequências de TCTP de tomate (AY642284.1) e Gal 83 de batata (DQ222485.1) depositadas no Genbank.

3.2.2. Transformação de *Solanum lycopersicum* cv. 'Moneymaker'

Sementes de tomateiro cultivar 'Moneymaker' foram desinfestadas por imersão em etanol 70% por 1 minuto e lavadas em água milli-Q autoclavada, seguido por incubação em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo e Tween 20 a 0,1% sob agitação por 20 minutos. As sementes desinfestadas foram lavadas quatro vezes em água milli-Q autoclavada e, após secagem em papel-filtro estéril, foram germinadas em caixas magenta contendo meio de cultura MS meia força (Murashige and Skoog, 1962) acrescido de *mio*-inositol 50 mg/l, sacarose 10 g/l, ágar-gel 6 g/l e vitamina MS (Murashige and Skoog, 1962). As sementes foram mantidas em sala de crescimento ($26^{\circ}\text{C} \pm 2$) por 10 dias sob irradiância de $24 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após a germinação, as folhas cotiledonares e os hipocótilos foram seccionados em fragmentos de 0,5 e 1 cm, respectivamente, e pré-cultivados por 24 horas em meio de regeneração composto por sais MS força total (Murashige and Skoog, 1962) adicionado de vitaminas de Nitsch and Nitsch (1969), zeatina 1 mg/l, sacarose 30 g/l, e acetoseringona 100 μM . As folhas cotiledonares foram mantidas com a face adaxial voltada para o meio de cultivo.

Após o pré-cultivo foi realizado o co-cultivo dos explantes. Para isso, culturas de *A. tumefaciens* contendo as construções obtidas no item 3.2.1 foram crescidas em meio LB a 28°C acrescido dos antibióticos espectinomicina, estreptomicina e gentamicina nas concentrações de 300, 100 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. Em seguida as culturas foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos a 22°C e ressuspensas em 10 ml de meio MS líquido (Murashige and Skoog, 1962) acrescido de *mio*-inositol 100 mg/l e sacarose 20 g/l. A densidade ótica das suspensões foi medida em espectrofotômetro e ajustada para 0,4 por meio da adição de meio MS.

Os explantes foram imersos por 5 minutos na suspensão de *A. tumefaciens* e em seguida foram secos em papel-filtro estéril e transferidos novamente para o meio de pré-cultivo contendo um papel-filtro autoclavado e estéril disposto sobre o meio, no qual foram mantidos por mais 2 dias em sala de crescimento ($26^{\circ}\text{C} \pm 2$) sob irradiância de $24 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após o co-cultivo os explantes foram transferidos para o meio de regeneração seletivo [MS força total (Murashige and Skoog, 1962), *mio*-inositol 100 mg/l, vitaminas de Nitsch and Nitsch (1969), sacarose 20 g/l, zeatina 2 mg/l, e ágar-gel 6 g/l, suplementado com timentin 300 mg/l e canamicina 100 mg/l]. Os explantes foram mantidos em meio de regeneração por um período de 20 dias. Explantes originados de

folhas cotiledonares foram cultivados com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

Decorrida a etapa de regeneração, os explantes foram transferidos para o meio de alongamento [saís MS força total (Murashige and Skoog, 1962), *mio*-inositol 100 mg/l, vitaminas de Nitsch and Nitsch, 1969), sacarose 20 g/l, zeatina 1 mg/l, e ágar-gel 6 g/l, suplementado com timentin 300 mg/l e canamicina 100 mg/l], no qual foram mantidos por aproximadamente 30 dias. Brotações diferenciadas e alongadas foram seccionadas e transferidas para o meio de enraizamento [MS força total, *mio*-inositol 100 mg/l, vitaminas de Nitsch and Nitsch (1969), sacarose 20 g/l, ágar-gel 6 g/l, ácido indol-3-acético 2 mg/l e glicina 2 mg/l, suplementado com timentin 300 mg/l]. Em todas as etapas os explantes/regenerantes foram mantidos em sala de crescimento a 26 °C $\pm$ 2 sob irradiância de 24 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$ e fotoperíodo de 16 horas.

Plantas de tomateiro enraizadas e com a parte aérea desenvolvida foram transferidas para copos plásticos descartáveis contendo água, cobertas por sacos plásticos e mantidas em sala de crescimento a 26 °C $\pm$ 2 por 15 dias. Os sacos plásticos foram gradativamente abertos a cada dois dias para a realização de trocas gasosas e diminuição da umidade relativa do ar. Em seguida as plantas foram transferidas para vasos contendo substrato orgânico e mantidas em casa de vegetação sob sombrite 50% até a completa adaptação.

3.2.3. Confirmação da inserção do T-DNA

A confirmação da transformação foi realizada por PCR. Para isto, o DNA total das plantas regeneradas foi extraído como descrito por Doyle and Doyle (1987) e utilizado como molde em uma reação de PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene *nptII* (NPTIIF: 5' TCA GCG CAG GGG CGC CCG GTT 3' e NPTIIR: 5' GCG GTC AGC CCA TTC GCC 3') que direcionam a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 650 nucleotídeos. Uma alíquota de 5 μl foi utilizada para análise dos produtos de amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose 0,7%.

3.2.4. Avaliação do nível de silenciamento dos genes *TCTP* e *Sl-Gal83* nas plantas transgênicas

O acúmulo de mRNA nas plantas transgênicas obtidas foi determinado por meio de qRT-PCR 72 horas após a inoculação (hpi) e 21 dias após a inoculação (dpi). Para isso foi extraído RNA total de aproximadamente 100 mg de tecido foliar

utilizando-se o Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 0,5X, e o RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2.000 (Thermo Scientific). Dois microgramas de RNA total foram tratados com DNase I (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e utilizado para a síntese de cDNA utilizando-se oligo d(T) e a enzima SuperScriptIII (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2.000 (Thermo Scientific). Um micrograma de cDNA foi utilizado nas reações de PCR quantitativo.

3.2.5. PCR quantitativo

A verificação do nível de expressão dos genes TCTP e SI-Gal83 nas plantas transformadas e a quantificação do acúmulo viral nas plantas transgênicas silenciadas foram realizadas por RT-PCR quantitativo. Como normalizador foi utilizado o gene que codifica a *Adenosil fosfotransferase 1* (APT1) e os oligonucleotídeos para os genes alvo TCTP e SNF1 kinase complex anchoring protein descritos por Alfenas-Zerbini et al. (2009).

As análises quantitativas foram realizadas em um termociclador CFX96 Real-Time System (Bio-Rad), utilizando SYBR Green para monitorar a síntese de DNA fita dupla. As reações foram preparadas em um volume final de 12 µl utilizando-se “SYBR Green Master Mix” (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas. As eficiências de reação foram determinadas de acordo com Pfaffl (2001) e Vandesompele et al. (2002), e a especificidade da amplificação foi determinada por meio da análise das curvas de dissociação.

A quantificação dos níveis de expressão dos genes foi realizada utilizando-se o método comparativo de C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak and Schmittgen, 2001). Para a quantificação da carga viral uma curva padrão foi preparada utilizando-se diluições seriadas de DNA plasmidial contendo a sequência codificadora da proteína capsidial do PepYMV (10^0 a 10^6 cópias do plasmídeo por reação). A curva padrão foi obtida por regressão dos valores de C_t de cada uma das três repetições de uma dada diluição em relação ao log da quantidade de DNA plasmidial em cada diluição, e a carga viral foi determinada por interpolação dos valores de C_t de cada amostra testada.

3.2.6. Inoculação das plantas transformadas com PepYMV

As plantas com a transformação e silenciamento confirmados foram inoculadas com o PepYMV a partir de folhas infectadas de *Nicotiana debneyi*. A inoculação foi realizada via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,2 M pH 7,2, com bissulfito de sódio 1%, na proporção de 1 g de folha infectada para 5 ml de tampão. A infecção viral foi confirmada por meio de ELISA indireto com anti-soro específico contra o PepYMV 21 dpi, conforme descrito por Truta et al. (2004) e a carga viral foi determinada por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) 72 hpi e 21 dpi conforme descrito no item 3.2.5.

3.3. Análise da localização subcelular de TCTP co-infiltrada com as proteínas virais

3.3.1. Clonagem de cada uma das proteínas do PepYMV

Para a clonagem de cada uma das proteínas virais do PepYMV, RNA total de plantas de tomateiro infectadas foi extraído conforme descrito no item 3.2.4, e o RNA total foi utilizado como molde para a síntese de DNA complementar (cDNA) como descrito no item 3.2.6. As regiões codificadoras foram amplificadas utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada uma das proteínas virais (Tabela 1) desenhados com base na sequência do genoma completo do PepYMV (NC_014327). As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se a Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Os fragmentos foram clonados no vetor de entrada pENTR11 (Invitrogen) de acordo com técnicas padrão (Sambrook and Russel, 2001).

A partir do vetor de entrada pENTR11, a região codificadora de cada uma das proteínas virais foi transferida para o vetor de expressão em plantas pK7WG2 por meio de recombinação homóloga conforme descrito no item 3.2.1. A confirmação da clonagem foi realizada por sequenciamento (MacroGen) e os clones obtidos foram transferidos para *A. tumefaciens* cepa GV3101 conforme descrito no item 3.2.1 e utilizados em ensaios de co-infiltração com o vetor pYFP-TCTP obtido por Côco (2009).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões codificadoras das proteínas virais. O sítio de enzima de restrição incluído em cada oligonucleotídeo está sublinhado.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Enzima de restrição	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
P1 F	TTT <u>GGT ACC</u> TTA TGG AGA TCC AAG C	KpnI	870
P1 R	CCC <u>GAA TTC</u> CTA AAA GTG TTG CAT T	EcoRI	
HC-Pro F	CCC <u>GGT ACC</u> ACA TGT CAA ATG CTG A	KpnI	1368
HC-Pro R	CCC <u>GAA TTC</u> CTA TCC AAC ACG GTA A	EcoRI	
P3 F ^a	CCC <u>GGT ACC</u> TTA TGG GAA AAT TGA A	KpnI	1110
P3 R	CCC <u>GAA TTC</u> CTA TTG GTG CTC AAC C	EcoRI	
PIPO F	CCC <u>GGT ACC</u> CTA TGA AAA AAC TAT CTC	KpnI	195
PIPO R ^a	CCC <u>GAA TTC</u> TAC ATT GGG TCA C	EcoRI	
6K1 F	CCC <u>GGT ACC</u> ACA TGA AAT CCA CCA G	KpnI	156
6K1 R	TTT <u>CTC GAG</u> CTA CTG GTG ACG AAC T	XhoI	
CI F	AAA <u>GTC GAC</u> ATG TCA CTG GAC ACT A	Sall	1902
CI R	ACC <u>CTC GAG</u> CTA TTG ATG ATG CAC A	XhoI	
6K2 F	GTT <u>GGA TCC</u> ATA TGT CAA AGC GAC T	BamHI	156
6K2 R	CCC <u>CTC GAG</u> CTA TTG ATA ATG AAC A	XhoI	
Nla-Pro F	CCC <u>GTC GAC</u> ATG GGT AGA GCG AAA T	Sall	1302
Nla-Pro R	AAA <u>GCG GCC GCC</u> TAC TGC TCA CGC A	NotI	
NIb F	TTT <u>GGA TCC</u> AGA TGG GCC AAA ACT T	BamHI	1557
NIb R	TTT <u>CTC GAG</u> CTA TTG GTG GCG CAC C	XhoI	
CP F	CAA <u>GGT ACC</u> ACA TGG CGG ATG AGA A	KpnI	837
CP R	CCC <u>CTC GAG</u> CTA CAT ATT TCT CAC C	XhoI	

^aPara amplificação do gene que codifica a proteína P3N-PIPO foram utilizados os primers P3 F e PIPO R.

3.3.2. Expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*

Plantas de *N. benthamiana* foram crescidas em casa-de-vegetação, e aproximadamente 5 semanas após a germinação foram transferidas para câmara de crescimento a 22°C com um fotoperíodo de 16 horas, e mantidas nestas condições por aproximadamente 5 dias antes da infiltração.

Culturas de *A. tumefaciens* contendo as construções pYFP-TCTP (Côco, 2009) e as construções referentes às proteínas virais descritas no item 3.3.1 foram crescidas a 28°C em 5 ml de meio LB contendo os antibióticos apropriados, até atingir densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm (D.O.600) entre 0,5 e 1,0. As culturas foram centrifugadas a 6000 g por cinco minutos, o sedimento foi lavado duas vezes com tampão de infiltração (MES 10 mM pH 5,6, MgCl₂ 10 mM e acetosseringona 200 µM) e ressuspenso em 1 ml do mesmo tampão. As D.O.(600) foram ajustadas para 0,1 e folhas de plantas de *N. benthamiana* foram infiltradas com uma mistura em partes iguais (1:1) das culturas de *A. tumefaciens* contendo a construção pYFP-TCTP e cada uma das proteínas virais por meio de uma leve pressão sobre a face abaxial da folha, utilizando-se seringas estéreis sem agulha.

3.3.3. Microscopia confocal e processamento de imagens

Dois dias após a infiltração, as folhas agroinfiltradas foram observadas ao microscópio LSM 510 META invertido (Carl Zeiss). A análise foi realizada em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² montados em lâminas com água. Para excitação do fluoróforo foi utilizado o comprimento de onda de 514 nm para YFP e as imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser 4” (Carl Zeiss) e do programa Adobe Photoshop 7.0.1.

3.4. Expressão transiente de TCTP etiquetada

3.4.1. Obtenção do vetor pNTAPi-TCTP

A partir do vetor de entrada pENTR-TCTP (Côco, 2009) a região codificadora de TCTP foi transferida para o vetor de expressão em plantas pNTAPi (Rohila et al., 2004) por meio de recombinação homóloga utilizando-se a enzima LR Clonase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, gerando o plasmídeo pNTAPi-TCTP (Figura 4A). Como controle foi utilizado o vetor pNTAPi-GFP (Figura 4B). Para isso, a sequência codificadora da proteína GFP foi amplificada com os oligonucleotídeos GFP *EcoRI* (F) (5' ACTGGAATTCTGGTGAGCAAGGGC 3') e GFP *XhoI* (R) (5' ACTGCTCGAGTTACTTGTACAGCTCG3'). O fragmento amplificado foi

purificado, clonado em pENTR11 e sub-clonado no vetor pNTAPi conforme descrito para o gene TCTP, dando origem ao plasmídeo pNTAPi-GFP. As clonagens foram confirmadas por sequenciamento (Macrogen, Inc. Seul, Coréia do Sul).

As construções obtidas (pNTAPi-TCTP e pNTAPi-GFP) foram utilizadas para a transformação de *A. tumefaciens* GV3101 por choque térmico conforme descrito no item 3.2.1.

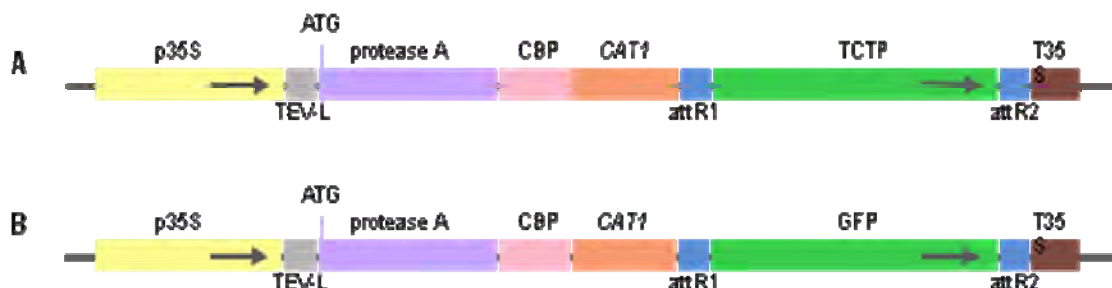


Figura 4. Representação esquemática das construções utilizadas para a expressão de TCTP e GFP etiquetada. (A) Construção utilizada para a expressão de pNTAPi-TCTP; (B) Construção utilizada para a expressão de pNTAPi-GFP. p35S, promotor 35S; TEV-L, sequência líder do genoma de TEV; CBP, sítio de ligação a calmodulina; CAT1, catalase intron 1; attR1 e attR2 sítios de recombinação.

3.4.2. Expressão transiente das construções pNTAPi-TCTP e pNTAPi-GFP em folhas de *N. benthamiana*

Plantas de *N. benthamiana* foram crescidas conforme descrito no item 3.3.2. Após aproximadamente 3 semanas as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 22°C com um fotoperíodo de 16 horas, e mantidas nestas condições por aproximadamente 3 dias. Após esse período as plantas foram inoculadas com o PepYMV conforme descrito no item 3.2.6 e imediatamente infiltradas com as construções pNTAPi-TCTP ou pNTAPi-GFP conforme descrito no item 3.3.2.

3.4.3. Extração de proteínas totais e Western blot

A expressão da proteína TCTP etiquetada foi confirmada por *Western blot* em diferentes tempos após a agroinfiltração. Para isso, um disco foliar de 0,25 g foi macerado em nitrogênio líquido, adicionando-se 1 ml de tampão de extração (Tris-HCl 150 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%). O extrato foi transferido para um tubo de microcentrífuga e fervido por três minutos. A amostra foi centrifugada

a 14.000 rpm por cinco minutos e 15 µl do sobrenadante foram utilizados para eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

Após a eletroforese, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) por 30 minutos. As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore) utilizando-se o aparelho Mini Trans-Blot Cell (BioRad), conforme as instruções do fabricante.

Após a transferência a membrana foi incubada em leite em pó desnatado 5% em PBS (NaCl 0,15 M; KH₂PO₄ 1 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KCl 2 mM; NaN₃ 3 mM) por um tempo mínimo de uma hora a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi enxaguada brevemente com PBS-T (PBS acrescido de 0,3% de Tween 20) e incubada em 15 ml de anti-soro diluído 1:1.000 em PBS, sob agitação lenta, por 1,5 horas a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada em PBS-T duas vezes por 15 minutos e incubada em 15 ml de conjugado cabra anti-coelho diluído 1:2.000 em PBS, sob agitação lenta, por 1,5 horas a temperatura ambiente. A membrana foi lavada em PBS-T três vezes por 15 minutos e incubada em 10 ml de substrato "Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit" (BioRad) conforme instruções do fabricante no escuro por até 30 minutos, verificando o progresso da reação a cada 3-5 minutos.

3.4.4. Purificação por afinidade em tandem e caracterização dos complexos

Plantas de *N. benthamiana* inoculadas com o PepYMV e expressando a proteína NTAPi-TCTP foram utilizadas para a purificação dos complexos protéicos conforme descrito por Rohila et al. (2006). Os complexos purificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida gradiente 4-15% (SDS-PAGE) e coradas com prata (Silver staining plus; Bio-Rad). O mesmo procedimento foi realizado para as plantas inoculadas com PepYMV e expressando a proteína NTAPi-GFP (controle negativo).

3.4.5. Identificação das proteínas por espectrometria de massa

As análises em espectrometria de massa foram realizadas conforme Rohila et al. (2004). Os peptídeos eluídos foram analisados por espectrometria de massa em tandem (MALD-TOF/TOF Ultraflex 3, Bruker Daltonics).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e caracterização das plantas transgênicas

Para analisar o possível envolvimento dos genes TCTP e SI-Gal83 durante o processo de infecção pelo PepYMV, plantas de tomateiro cv. 'MoneyMaker' foram transformadas com construções que direcionam o silenciamento dos genes TCTP e SI-Gal83 e com uma construção que super-expressa o gene TCTP. Para a indução do silenciamento, um fragmento de 480 nucleotídeos correspondente à porção central da região codificadora de SI-Gal83 foi clonado em orientações opostas separadas por um íntron no vetor pK7GWIWG2, gerando a construção pK7GWIWG2-SI-Gal83 (Figura 5A). Para a indução do silenciamento de TCTP foi utilizado um fragmento de 280 nucleotídeos que corresponde à região 5' da sequência codificadora do mRNA de TCTP, também clonado no vetor pK7GWIWG2, gerando a construção pK7GWIWG2-TCTP (Figura 5B). Para a super-expressão do gene que codifica a TCTP, a região codificadora completa foi clonada no vetor de expressão em plantas pK7WG2, gerando a construção pK7WG2-TCTP (Figura 5C).

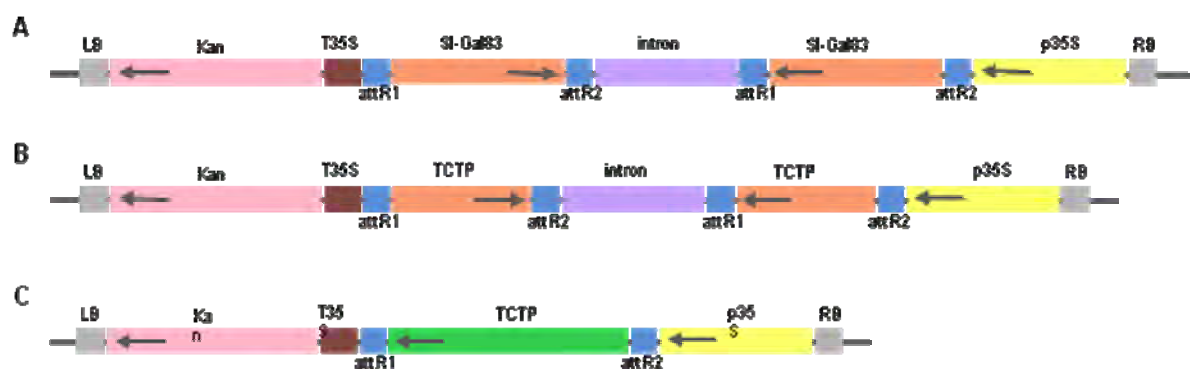


Figura 5. Representação esquemática das construções utilizadas para a transformação de plantas de tomateiro. (A) construção utilizada para a indução do silenciamento de SI-Gal83; (B) construção utilizada para a indução do silenciamento de TCTP; (C) construção utilizada para a super-expressão de TCTP. LB, borda esquerda do T-DNA; Kan, gene de resistência à canamicina; T35S, terminador 35S; attR1 e attR2, sítios de recombinação; p35S, promotor 35S; RB, borda direita do T-DNA.

Não foram observadas diferenças significativas nas etapas de regeneração dos transformantes para o processo de transformação com cada uma das construções, exceto que foram obtidas poucas brotações nos explantes transformados da construção responsável por direcionar o silenciamento de TCTP. Os explantes foram preparados a partir de plântulas germinadas *in vitro* (Figura 6A). Foram utilizados explantes originados a partir de folhas cotiledonares (Figura 6B) e de hipocótilos (Figura 6C). Os explantes de folhas cotiledonares se desenvolveram de forma mais lenta, quando comparados com os explantes de hipocótilos, sendo que todos os transformantes obtidos foram originados a partir de hipocótilos (Figura 6D). Após aproximadamente 50 dias as brotações foram transferidas para meio de alongamento e mantidas nessas condições até atingirem o tamanho de plântulas (Figura 6D). Em seguida, as plântulas foram transferidas para meio de enraizamento até desenvolverem o sistema radicular, um período que variou entre 30 e 50 dias (Figura 6E). Após o desenvolvimento do sistema radicular iniciou-se o período de aclimação, que durou cerca de 20 dias (Figura 6F).

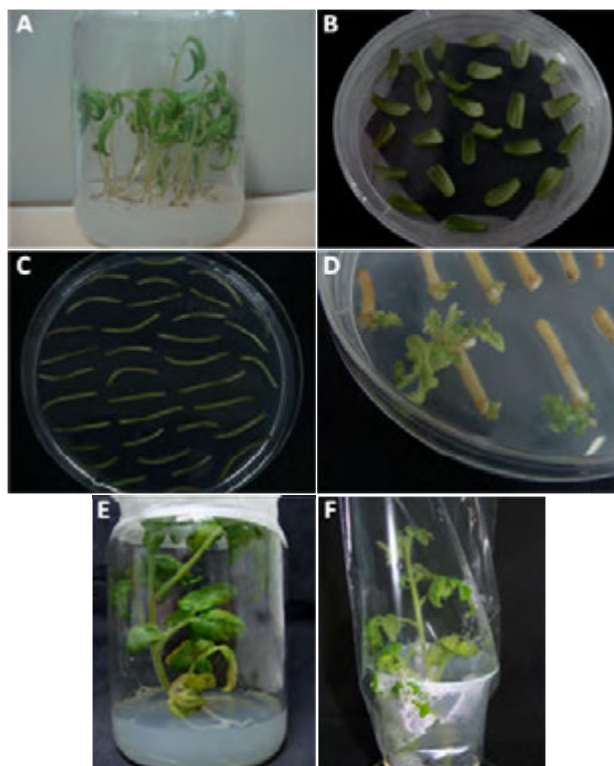


Figura 6. Etapas da transformação de *Solanum lycopersicum* cv. 'MoneyMaker'. (A) Sementes de tomateiro 'MoneyMaker' desinfestadas e germinadas em frascos contendo meio de cultura apropriado; (B) Explantes de hipocótilos pré-cultivados em meio de regeneração; (C) Explantes cotiledonares pré-cultivados em meio de regeneração; (D) Explantes de hipocótilos em meio de regeneração seletivo suplementado com timentin e canamicina; (E) Planta de tomateiro enraizada e com a parte aérea desenvolvida no meio de enraizamento; (F) Planta de tomateiro em processo de aclimação no copo descartável contendo água.

Foram regeneradas 21 plantas transformadas com a construção para indução de silenciamento de SI-Gal83, entretanto somente em quatro plantas foi observada a amplificação do fragmento de 650 nucleotídeos correspondente ao gene de seleção *nptII*, comprovando-se a inserção do transgene somente nestes regenerantes (Figura 7A). Foram regeneradas 11 plantas com a construção responsável pela indução na expressão de TCTP, entretanto nenhuma apresentou a inserção do transgene (Figura 7B). Na transformação com a construção que induz o silenciamento de TCTP foi regenerado somente um transformante, que teve a inserção do transgene confirmada (Figura 7C).

O número de escapes observado foi maior do que o esperado, que gira em torno de 10% (Frery and Earle, 1996). Esse fato pode ser explicado pelo fato da utilização de canamicina como agente de seleção, que é considerado um agente seletivo menos rigoroso que a higromicina (Padilla and Burgos, 2010). Além disso, já foram observadas diferenças no número de escapes no processo de transformação quando utilizado mesmo agente seletivo, e diferentes vetores de expressão (Costa et al., 2000). Desta forma, para aumentar a eficiência de transformação é necessária a realização de uma curva de morte dos explantes antes da realização de novos eventos de transformação.

Após o processo de aclimação, as plantas com a transformação confirmada foram mantidas em casa-de-vegetação para a produção de frutos e coleta de sementes. Entre as quatro plantas transformadas com a construção responsável por direcionar o silenciamento de SI-Gal83 foi observado um transformante com desenvolvimento mais lento, crescimento reduzido, com frutos anormais e sem sementes (Figura 8A). As demais plantas apresentaram desenvolvimento normal. A planta transformada com a construção que direciona o silenciamento de TCTP também apresentou um desenvolvimento lento, crescimento reduzido com entrenós bem curtos e ausência de floração (Figura 8B).

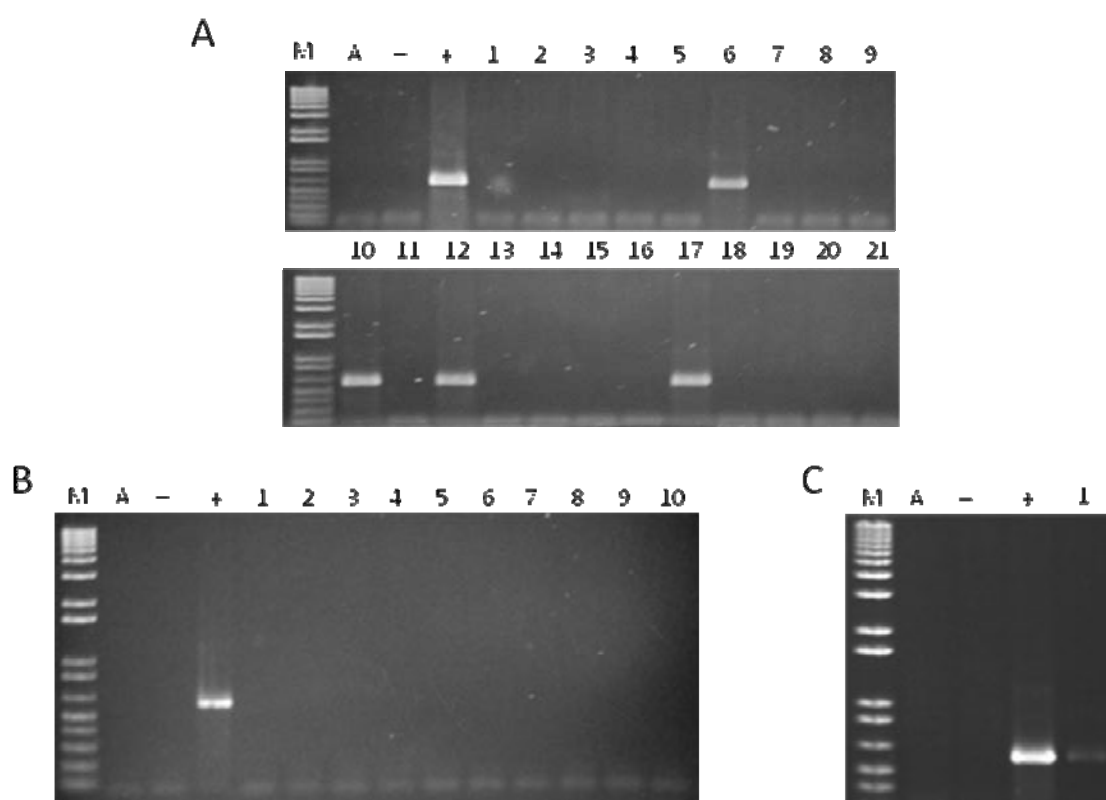


Figura 7. PCR para confirmação da inserção do T-DNA nas plantas regeneradas. (A) Plantas regeneradas transformadas com a construção para indução de silenciamento de SI-Gal83. (B) Plantas regeneradas transformadas com a construção para a superexpressão de TCTP. (C) Plantas regeneradas transformadas com a construção para indução de silenciamento de TCTP. M, marcador de comprimento (1kb “plus” DNA ladder); A, água; - DNA total extraído de plantas de tomate ‘MoneyMaker’ não transformado; +, DNA plasmidial do vetor utilizado em cada evento de transformação (pK7GWIWG2-SI-Gal83, pK7WG2-TCTP, pK7GWIWG2-TCTP); os números indicam DNA total extraído dos regenerantes obtidos em cada evento de transformação.

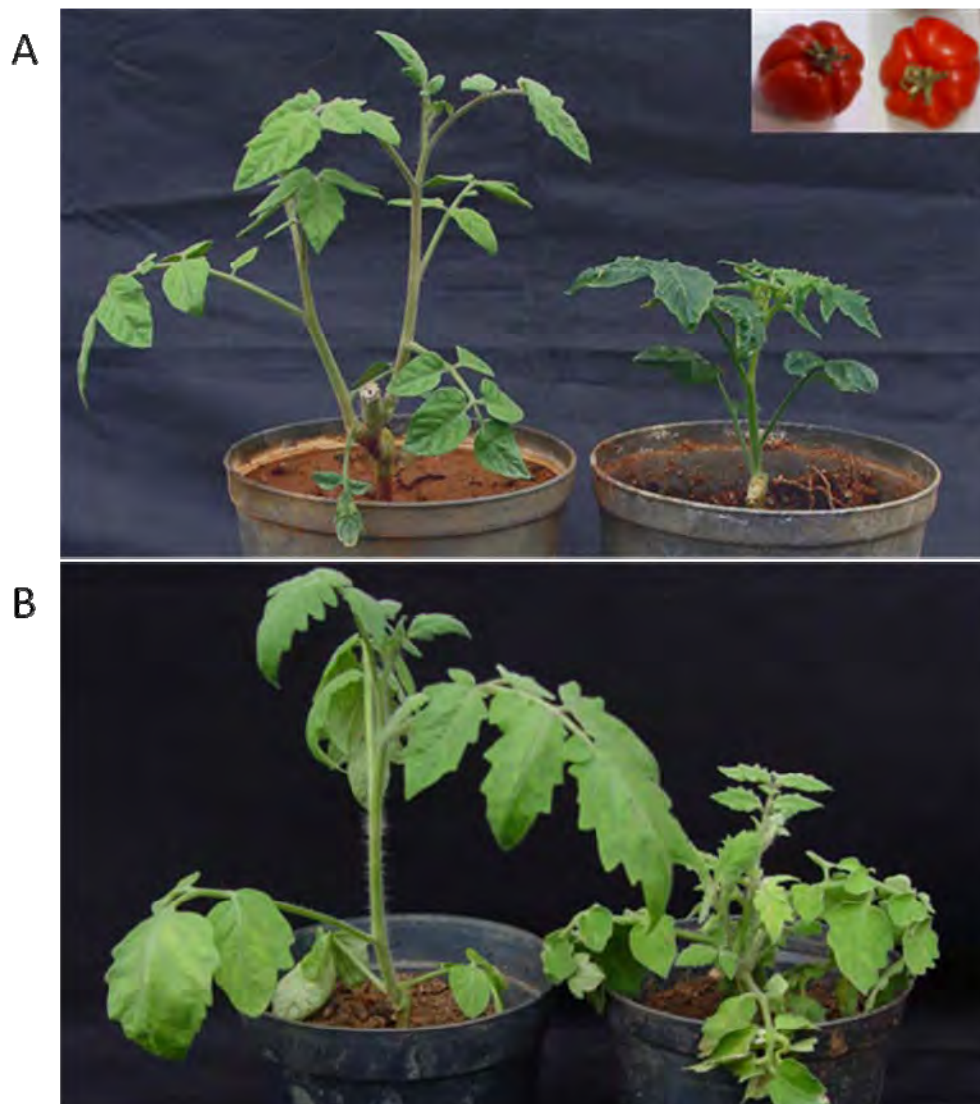


Figura 8. Fenótipo observado nas plantas de tomateiro transformadas. (A) Planta de tomateiro transformada com a construção para indução de silenciamento de Sl-Gal83. À esquerda planta não transformada, e à direita planta transformada. No detalhe os frutos das plantas transformadas. (B) Planta de tomateiro transformada com a construção para indução de silenciamento de TCTP. À esquerda planta não transformada, e à direita planta transformada.

Os genes TCTP e SI-Gal83 estão envolvidos em inúmeros processos do metabolismo básico dos organismos, de forma que eram esperadas alterações fenotípicas nas plantas silenciadas para esses genes. Desta forma, essas duas plantas foram selecionadas para análise do nível de acúmulo de mRNA de SI-Gal83 e TCTP por qRT-PCR.

O nível de expressão de SI-Gal83 no transformante analisado foi 62% menor do que na planta selvagem, enquanto que no transformante com silenciamento induzido para TCTP a redução foi de apenas 27% quando comparado com a planta selvagem (Figura 9). Esses resultados sugerem que o silenciamento de TCTP é mais danoso para a planta, de forma que só foi observado um regenerante com uma redução de apenas 27% no acúmulo de mRNA de TCTP. Entre as plantas com silenciamento de SI-Gal83 induzido pode ser que outros transformantes apresentem níveis menores de silenciamento de forma que o fenótipo não é alterado. A análise do nível de silenciamento destas plantas deve ser realizada para confirmar essa hipótese.

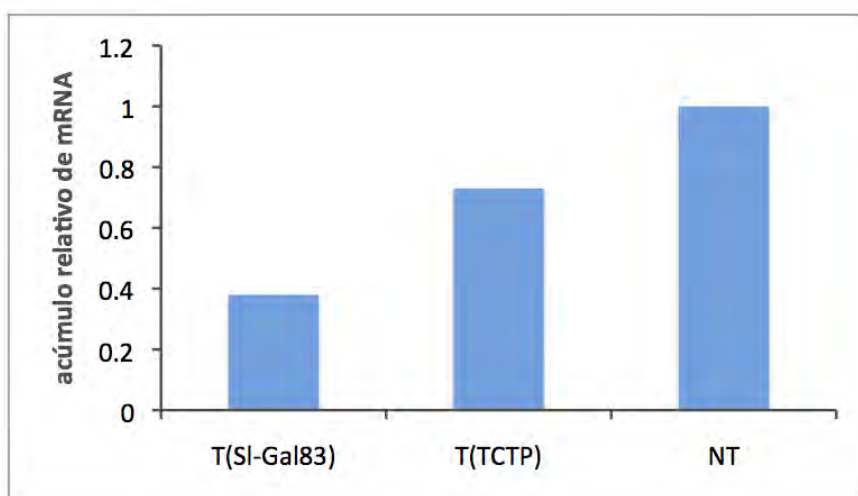


Figura 9. Expressão relativa normalizada dos mRNAs de SI-GAL83 e TCTP nas plantas transformadas com alterações fenotípicas. Quantificação relativa de mRNA de SI-GAL83 e TCTP nas plantas transformadas T(SI-GAL83) e T(TCTP) respectivamente. NT, planta não transformada.

4.2. Efeito do silenciamento dos genes SI-Gal83 e TCTP na infecção de tomateiro pelo PepYMV

Plantas silenciadas para os genes em estudo e plantas selvagens foram propagadas vegetativamente, uma vez que não produziam sementes, e inoculadas mecanicamente com o PepYMV. Dez estacas de cada transformante silenciado foram inoculadas e duas estacas foram inoculadas com tampão. De plantas selvagens foram inoculadas cinco estacas com o vírus e duas somente com tampão de inoculação.

Nas plantas selvagens, a partir de 14 dias após a inoculação (dpi), foi possível a observação de sintomas de mosaico leve, típicos da infecção de tomateiro cv MoneyMaker pelo PepYMV. As plantas silenciadas para SI-Gal83 ou TCTP permaneceram assintomáticas, o que se manteve até o último dia de avaliação de sintomas, que foi realizada 21 dias após a inoculação (dpi) (Figura 10).

Para avaliar a manutenção do silenciamento ao longo dos tempos avaliados (72 hpi e 21 dpi), o acúmulo de mRNA de SI-Gal83 e TCTP nas plantas transgênicas multiplicadas vegetativamente inoculadas com tampão de inoculação foi comparado com o acúmulo em plantas selvagens também propagadas vegetativamente e inoculadas com o tampão de inoculação. Em ambos os tempos avaliados o silenciamento de SI-Gal83 e TCTP foi mantido. A 72 hpi o nível de silenciamento de SI-Gal83 e TCTP das estacas inoculadas com tampão de inoculação foi semelhante ao observado nas respectivas plantas mães. A 21 dpi foi observada uma diminuição no nível de silenciamento de SI-GAL83, sendo que a redução no acúmulo relativo do mRNA para esse gene na planta silenciada passou a ser de apenas 34%. Ao contrário, na planta silenciada para TCTP, a 21 dpi, foi observado um aumento no nível de silenciamento, que passou de 35% (72 hpi) para 76,6% (Figura 11). Apesar da variação observada ao longo do tempo, as plantas permaneceram silenciadas. Inclusive, o silenciamento de TCTP foi até mais eficiente a 21 dpi. Uma possível explicação para esse resultado é que ao longo do desenvolvimento das plantas essa seja uma variação normal de expressão. Para confirmar essa hipótese é necessária a avaliação do acúmulo de mRNA destes genes nas plantas transgênicas e selvagens usando como referência o tempo 0 hpi.

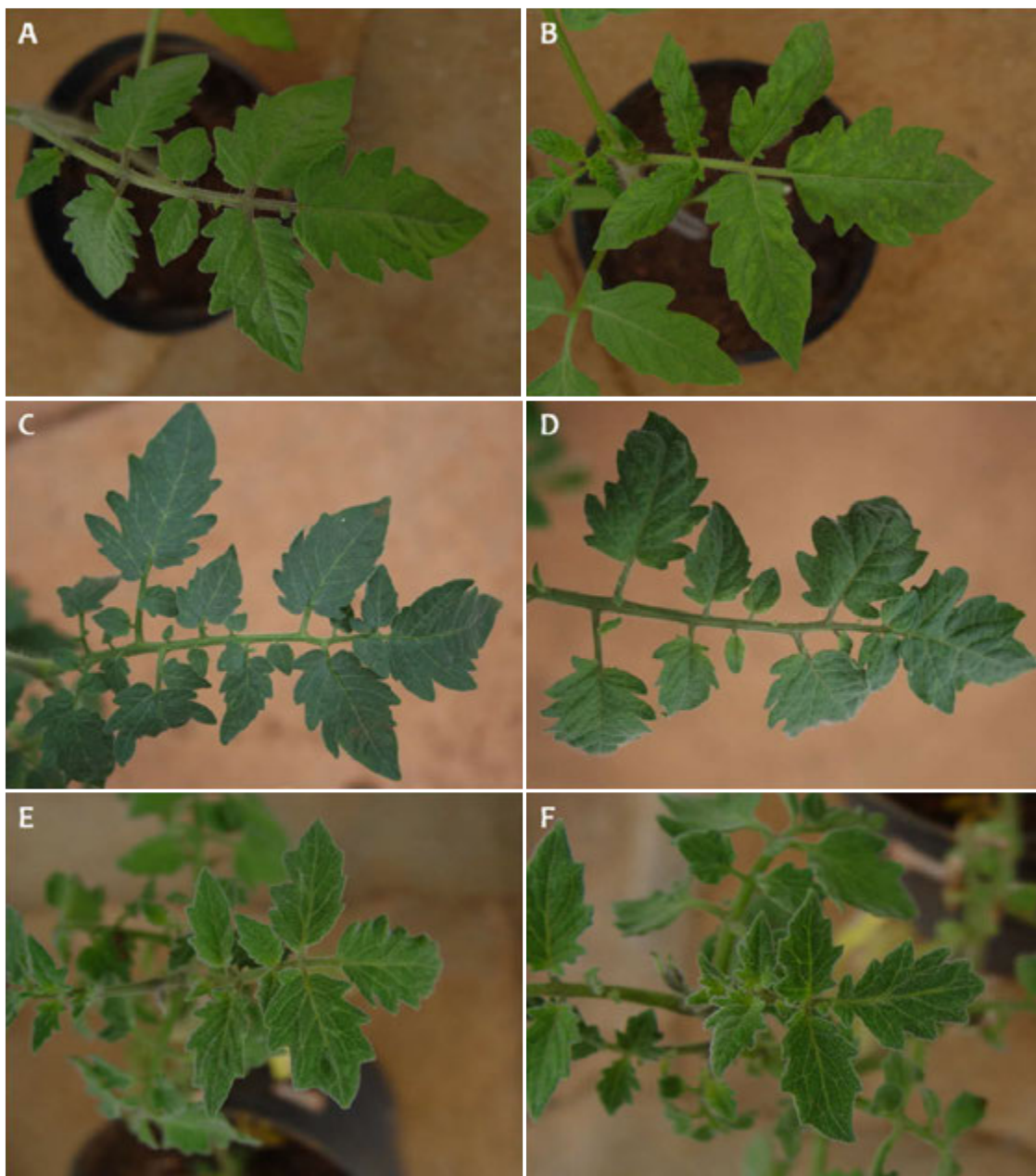


Figura 10. Sintomas em tomateiro ‘Moneymaker’ selvagem e silenciado para os genes SI-Gal83 ou TCTP, 21 dias após inoculação mecânica com PepYMV. (A) Planta não transformada, não inoculada; (B) Planta não transformada, inoculada; (C) Planta silenciada para SI-Gal83, não inoculada; (D) Planta silenciada para SI-Gal83, inoculada; (E) Planta silenciada para TCTP, não inoculada; (F) Planta silenciada para TCTP, inoculada.

Os potyvírus codificam um forte supressor de silenciamento, a proteína HC-Pro (Anandalakshmi et al., 1998; Brigneti et al., 1998; Kasschau and Carrington, 1998). Desta forma, é possível que a infecção viral altere o nível de silenciamento nas plantas transgênicas silenciadas. Além disso, foi demonstrado que a infecção viral induz a expressão destes genes a 72 hpi (Alfenas-Zerbini et al., 2009). Assim, para verificar se o silenciamento estava sendo mantido após a inoculação com o PepYMV, o nível do acúmulo de mRNA que codifica a SI-Gal83 e TCTP foi medido nas plantas silenciadas inoculadas e comparado com o acúmulo em plantas selvagens inoculadas. Para ambos os genes o silenciamento foi mantido tanto a 72 hpi quanto 21 dpi (Figura 12). Entretanto, nas plantas silenciadas para TCTP, apesar do silenciamento ter sido mantido, foi observado um aumento inesperado no acúmulo de mRNA de TCTP a 21 dpi, uma vez que nas plantas silenciadas não inoculadas o silenciamento de TCTP foi mais eficiente a 21 dpi.

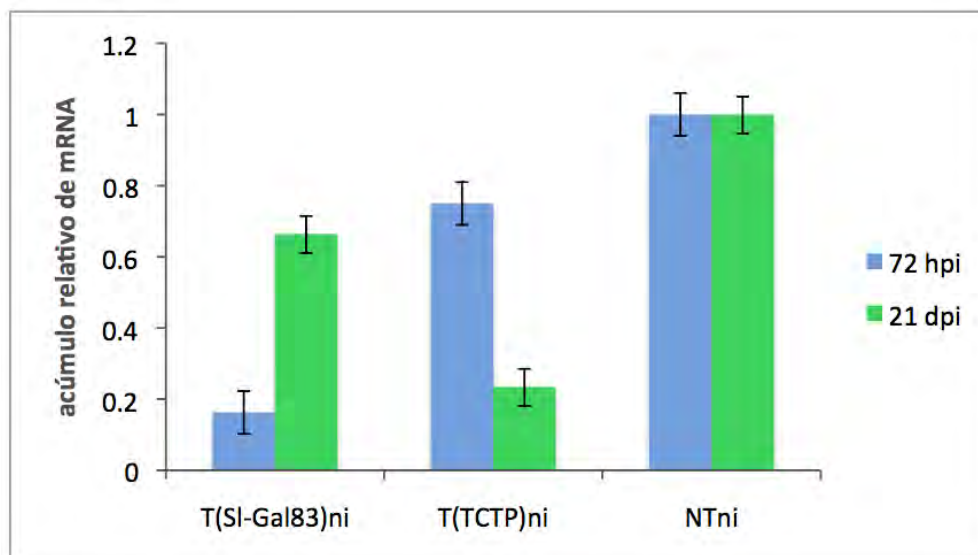


Figura 11. Expressão relativa normalizada dos mRNAs de SI-Gal83 e TCTP nas plantas transformadas silenciadas propagadas vegetativamente inoculadas com tampão de inoculação. Quantificação relativa de mRNA de SI-GAL83 e TCTP nas plantas transformadas inoculadas com tampão T(SI-Gal83)ni e T(TCTP)ni, respectivamente. NTni, planta não transformada inoculada com tampão de inoculação. As barras azuis correspondem à expressão relativa do mRNA de SI-Gal83 e TCTP 72 hpi e as verdes a 21 dpi.

Com o objetivo de avaliar o efeito da infecção viral na expressão de SI-Gal83 e TCTP nas plantas silenciadas, o acúmulo de mRNA dos genes SI-Gal83 e TCTP foi medido nestas plantas e comparado com o acúmulo de mRNA nas plantas silenciadas não inoculadas. Nas plantas selvagens foi observado um aumento na expressão a 72 hpi de ambos os genes, resultado que está de acordo com os resultados obtidos por Alfenas-Zerbini et al. (2009). A 21 dpi não foi mais observada a indução, ocorrendo uma pequena diminuição na taxa de acúmulo do mRNA (12%). Entretanto essa pequena redução não foi significativa, de forma que a infecção pelo PepYMV não alterou a taxa de acúmulo de mRNA de SI-Gal83 a 21 dpi (Figura 13A). Nas plantas silenciadas para SI-Gal83 a infecção viral induziu aumento no acúmulo do mRNA de SI-Gal83 a 72 hpi, e uma pequena diminuição a 21 dpi quando comparado com plantas silenciadas não inoculadas (Figura 13A). Para as plantas transgênicas silenciadas para TCTP, a 72 hpi foi observado um aumento no acúmulo de mRNA de TCTP conforme observado para as plantas selvagens (Figura 13B). Entretanto, a 21 dpi foi observado um aumento de aproximadamente duas vezes no acúmulo de mRNA de TCTP, diferente do observado na planta selvagem onde ocorreu uma diminuição em relação à planta selvagem não inoculada (Figura 13B). Esse resultado sugere que a infecção viral exerce um efeito significativo na expressão de TCTP nas plantas silenciadas para esse gene a 21 dpi.

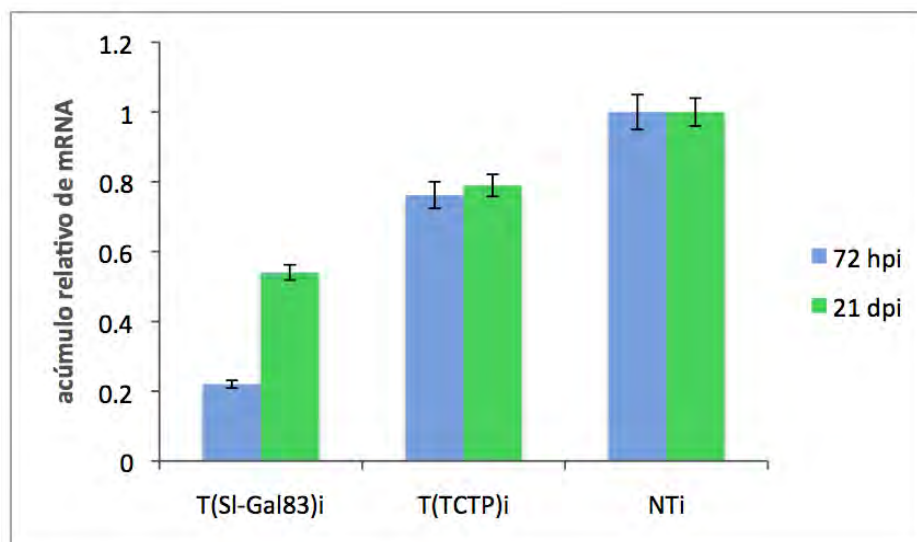
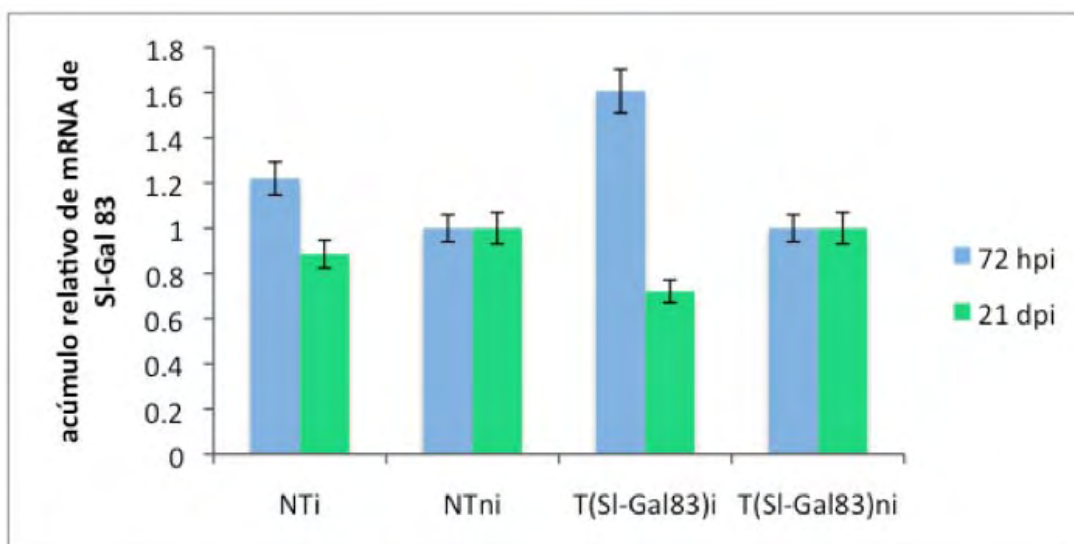


Figura 12. Expressão relativa normalizada dos mRNAs de SL-Gal83 e TCTP nas plantas transformadas com alterações fenotípicas propagadas vegetativamente inoculadas com o PepYMV. Quantificação relativa de mRNA de SL-GAL83 e TCTP nas plantas transformadas inoculadas com PepYMV T(SI-GAL83)i e T(TCTP)i respectivamente. NTi, planta não transformada inoculada com o PepYMV. As barras azuis correspondem à expressão relativa de mRNA de SI-GAL83 e TCTP 72 hpi e as verdes a 21 dpi.

A



B

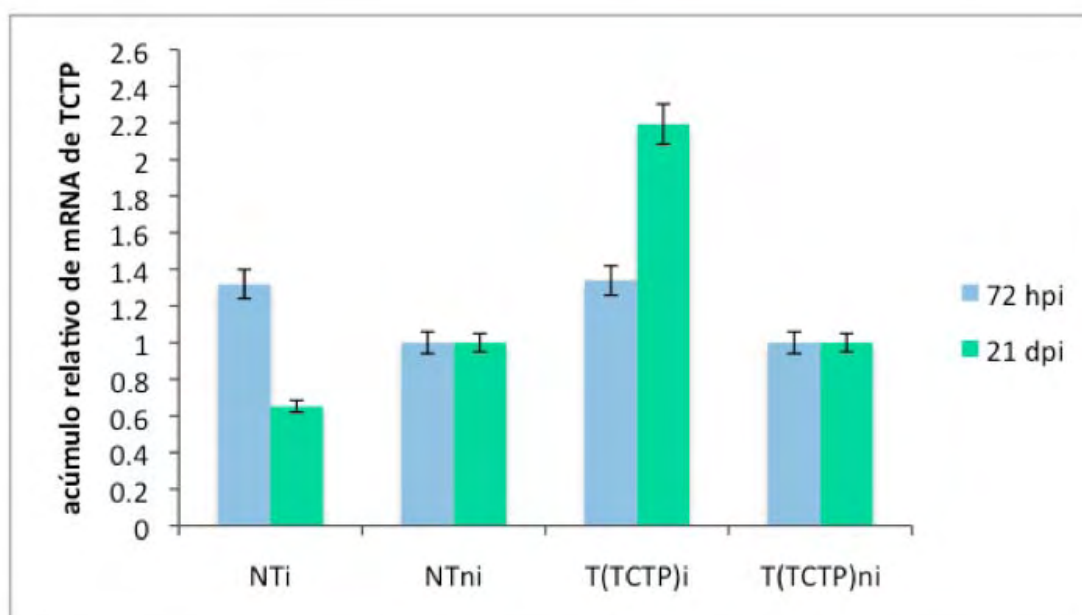


Figura 13. Expressão relativa normalizada dos mRNAs de SL-Gal83 e TCTP. (A) Acúmulo do mRNA de SL-Gal83 em plantas selvagens ou silenciadas inoculadas com o PepYMV em relação a plantas selvagens ou silenciadas não inoculadas. (B) Acúmulo do mRNA de TCTP em plantas selvagens ou silenciadas inoculadas com o PepYMV em relação a plantas selvagens ou silenciadas não inoculadas. NTi, planta não transformada inoculada com o PepYMV; NTni, planta não transformada inoculada com o tampão de inoculação; T(SI-Gal83)i, planta silenciada para SI-Gal83 inoculada com o PepYMV; T(SI-Gal83)ni, planta silenciada para SI-Gal83 inoculada com o tampão de inoculação; T(TCTP)i, planta silenciada para TCTP inoculada com o PepYMV; T(TCTP)ni, planta silenciada para TCTP inoculada com o tampão de inoculação. As barras azuis correspondem à expressão relativa do mRNA de SL-GAL83 e TCTP 72 hpi e as verdes a 21 dpi.

O efeito do silenciamento dos genes SI-Gal83 e TCTP no título viral foi avaliado por ELISA a 21 dpi. Nas plantas silenciadas para ambos os genes foi observada uma diminuição no título viral, de forma que as plantas foram ELISA negativo (Figura 14). Além do título viral por ELISA, a carga viral foi avaliada por qRT-PCR a 72 hpi e 21 dpi. Nas plantas silenciadas para SNF1 foi observada uma redução na carga viral tanto a 72 hpi (Figura 15A) quanto a 21 dpi, sendo que 21 dpi a redução da carga viral foi bastante significativa (Figura 15B). É possível que essa maior redução observada a 21 dpi seja devido à detecção de inóculo a 72 hpi. Para as plantas silenciadas para TCTP a 72 hpi não foi observada uma redução da carga viral (Figura 15A), o que pode ser explicado pelo baixo nível de silenciamento nestas plantas, além da possível detecção do inóculo. Já a 21 dpi foi observada uma forte redução no acúmulo viral, como o observado nas plantas silenciadas para SI-Gal83 (Figura 15B).

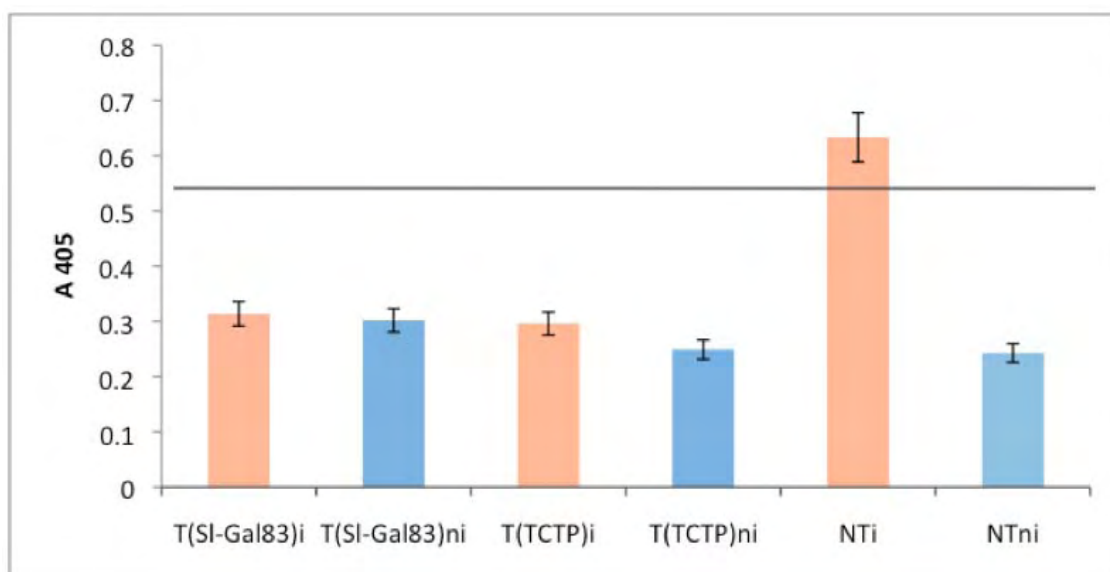


Figura 14. Detecção de PepYMV por ELISA indireto em plantas de tomate ‘MoneyMaker’ transformadas e não transformadas 21 dias após a inoculação com PepYMV. T(SI-Gal83)i, média da absorbância de dez plantas silenciadas para SI-Gal83 e inoculadas com o PepYMV; T(SI-Gal83)ni, média da absorbância de duas plantas silenciadas para SI-Gal83 inoculadas com tampão de inoculação; T(TCTP)i, média da absorbância de dez plantas silenciadas e inoculadas com o PepYMV; T(TCTP)ni, média da absorbância de duas plantas silenciadas para TCTP inoculadas com tampão de inoculação; NTi, média de absorbância de cinco plantas não transformadas inoculadas; NTni, absorbância de uma planta não transformada inoculada com tampão de inoculação. A linha horizontal representa o limite positivo/negativo, que corresponde a duas vezes o valor da absorbância da planta não transformada inoculada com tampão de inoculação.

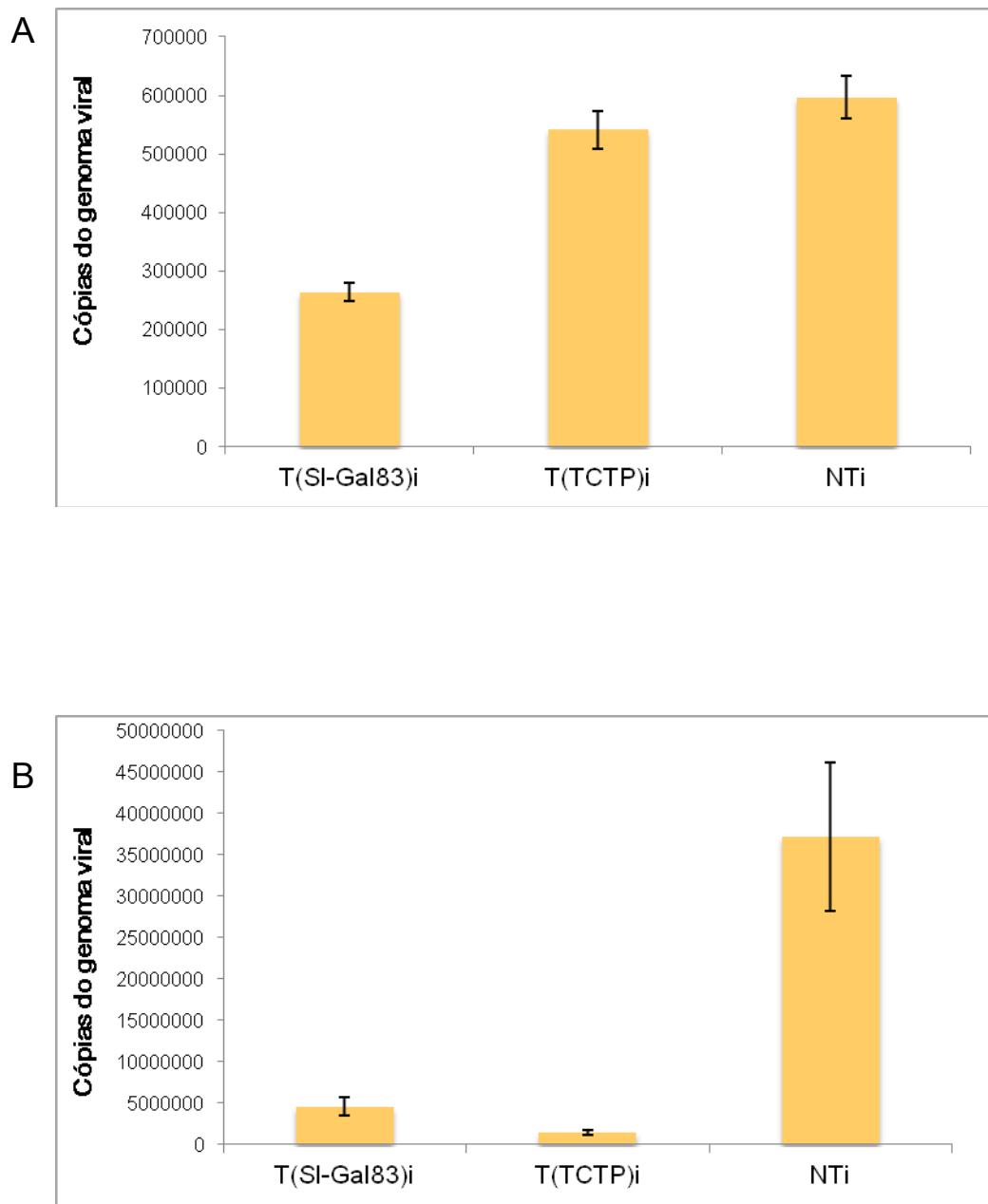


Figura 15. Carga viral de PepYMV por qRT-PCR em plantas de tomate ‘MoneyMaker’ silenciadas e não transformadas. (A) Carga viral nas plantas silenciadas 72 hpi; (B) Carga viral nas plantas silenciadas 21 dpi. T(SI-Gal83)i, média da carga viral de dez plantas silenciadas para SI-Gal83 inoculadas com o PepYMV; T(TCTP)i, média da carga viral de dez plantas silenciadas para TCTP inoculadas com o PepYMV; NTi, média de carga viral de três plantas não transformadas inoculadas com o PepYMV.

Em *N. benthamiana*, a redução da expressão de SNF1 mostrou um aumento na susceptibilidade à infecção por geminivírus. Reciprocamente, a superexpressão de SNF1 levou a um aumento na resistência ao vírus (Hao et al., 2003). Dessa forma, é possível que o silenciamento do gene que codifica a proteína SI-Gal83 em plantas de tomate resulta na ativação da proteína SNF1, levando a um aumento na resistência ao PepYMV.

Resposta metabólica mediada pelo complexo SNF1-SNF4-Sip1/Sip2/Gal83 parece fazer parte do sistema de defesa inata da planta {Hao, 2003 #4023}. Então, podemos supor que o vírus PepYMV contra-ataca essa defesa inibindo a atividade de SNF1 via aumento da expressão de SI-Gal83. Não apenas o aumento da expressão desse gene, mas uma modificação a nível molecular de SI-GAL83 e posterior desativação de SNF1 é necessária para que o modelo proposto seja aceito. Para isso, se torna necessário um ensaio de interação física entre alguma(s) proteína(s) de PepYMV com SI-Gal83 e a visualização da sinalização da última pela suposta proteína viral.

O mecanismo pelo qual SNF1 leva a um aumento na resistência não está claro. Hao et al. (2003) especulam que respostas a estresses atuam limitando a replicação viral nas células inicialmente infectadas, reduzindo a probabilidade de propagação para células vizinhas em número suficiente para estabelecer uma infecção sistêmica. Entretanto, se essa limitação é reprimida, segue-se uma infecção normal. Duas hipóteses na qual a resposta metabólica poderia interferir no processo de infecção: (1) SNF1 ativa pode assegurar que a carga energética celular seja suficiente para permitir a rápida ativação das vias de resposta de defesa metabolicamente que são bastante custosas para a célula atuando diretamente na limitação da replicação viral; (2) Respostas mediadas por SNF1 podem limitar a capacidade de precursores essenciais pelo “desligamento” de certas vias biosintéticas. A replicação viral eficiente necessita de uma fonte de precursores de ácidos nucléicos e proteínas que têm que ser obtido do meio celular e é possível que um ou mais desses se tornem limitantes se a biosíntese deles for bloqueada {Hao, 2003 #4023}.

Da mesma forma, o PepYMV parece induzir a expressão de TCTP, o que facilita o processo de infecção, já que plantas que possuem um nível de expressão baixo dessa proteína têm uma maior resistência. Esse resultado é o oposto aos resultados encontrados por Tonganunt et al. (2008), já que o aumento da expressão de TCTP em camarão diminuiu a taxa de infecção pelo vírus WSSV.

O resultado leva a propor que TCTP possa estar envolvida no processo de controle de saída seletivo do floema de RNA e proteínas virais, regulando o movimento viral, já que estudos de controle do transporte de macromoléculas pelo

floema de abóbora demonstraram que duas proteínas do floema interagem especificamente com TCTP, regulando o transporte destas proteínas (Aoki et al., 2005). Porém não podemos descartar o envolvimento de TCTP no processo de replicação do genoma viral, já que ela é redirecionada para o núcleo quando co-expressa com proteínas virais relacionadas com o processo de replicação como será mostrado posteriormente.

4.3. Localização subcelular da proteína TCTP durante a expressão de cada uma das proteínas de PepYMV em *N. benthamiana*

Foi demonstrado que em plantas saudáveis TCTP tem localização citoplasmática e que 48 hpi pelo PepYMV ela é redirecionada para o núcleo (Côco, 2009). Com o objetivo de tentar identificar a(s) proteína(s) virais responsáveis por essa alteração, a região codificadora de cada proteína foi clonada no vetor de expressão em plantas pK7WG2 e co-infiltradas com o vetor pYFP-TCTP (Côco, 2009) em plantas de *N. benthamiana*. Quando TCTP foi co-infiltrada com CI ou com NIa-Pro, TCTP passou a se acumular no núcleo das células visualizadas. Nas plantas co-infiltradas com TCTP e P1, PIPO, P3N-PIPO, 6K2 e NIb foi possível visualizar TCTP tanto no núcleo quanto no citoplasma. As proteínas HC-Pro, P3 e CP não foram capazes de alterar a localização subcelular de TCTP, de forma que ela permaneceu no citoplasma (Figura 16).

O redirecionamento de TCTP para o núcleo quando se expressou NIa-Pro e NIb pode ser explicado pelo fato dessas proteínas acumularem-se no núcleo das células infectadas, devido ao sinal de localização nuclear presente em suas sequências (Restrepo et al., 1990). Desta forma, essas proteínas podem estar sequestrando TCTP para desempenhar alguma função no núcleo. Estudos de co-localização de TCTP com NIa e NIb e a comprovação da interação física entre essas proteínas são necessários para confirmar essa hipótese.

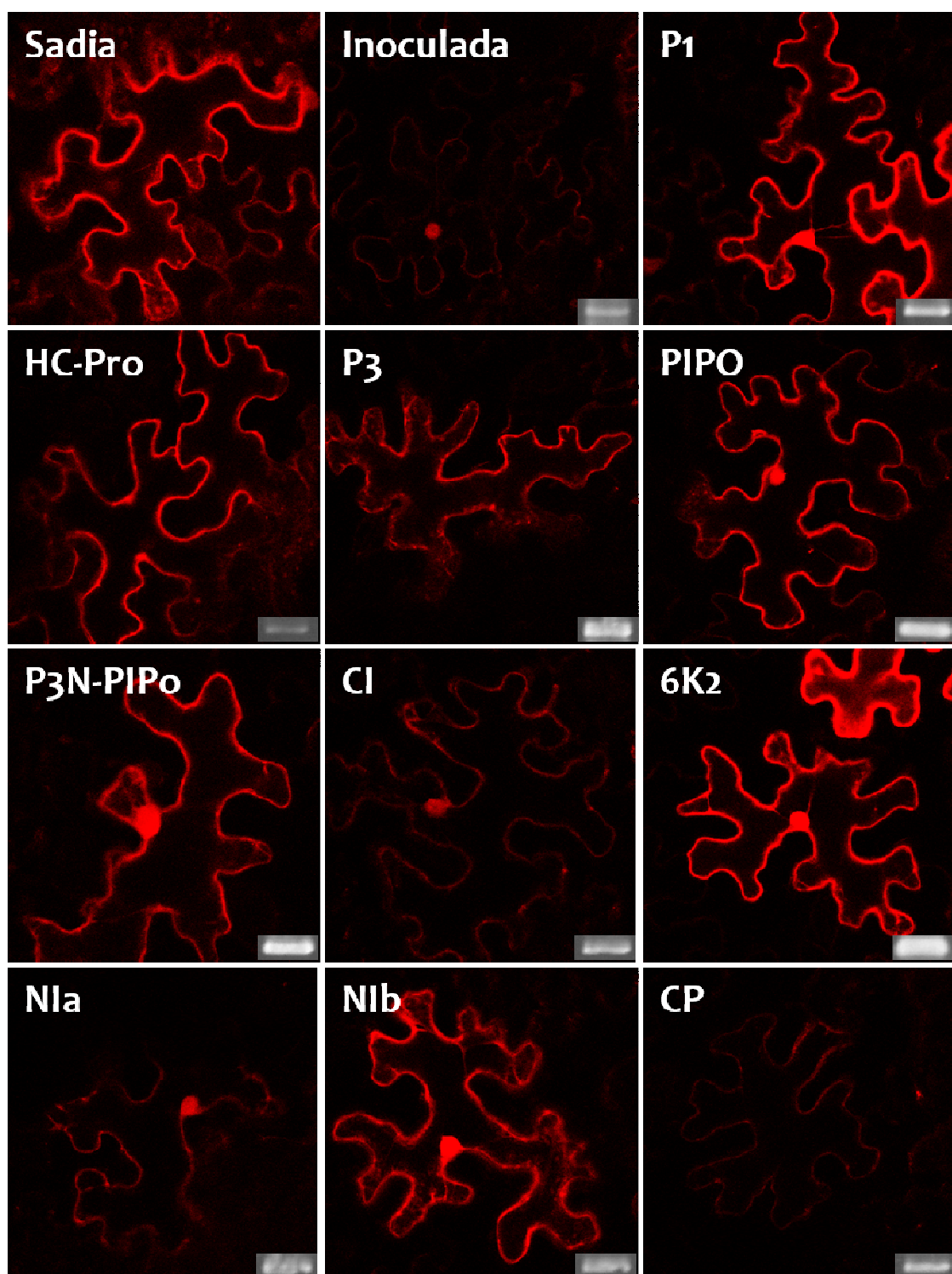


Figura 16. Folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com *A. tumefaciens* contendo pYFP-TCTP e cada uma das proteínas virais 48 horas após a infiltração. (Sadia) pYFP-TCTP; (Inoculada) pYFP-TCTP + inoculação com PepYMV; (P1) pYFP-TCTP + pK7WG2-P1; (HC-Pro) pYFP-TCTP + pK7WG2-HC-Pro; (P3) pYFP-TCTP + pK7WG2-P3; (PIPO) pYFP-TCTP + pK7WG2-PIPO; (P3N-PIPO) pYFP-TCTP + pK7WG2-P3N-PIPO; (CI) pYFP-TCTP + pK7WG2-CI; (6K2) pYFP-TCTP + pK7WG2-6k2; (NIa-Pro) pYFP-TCTP + pK7WG2-NIa-Pro; (NIb) pYFP-TCTP + pK7WG2-NIb; (CP) pYFP-TCTP + pK7WG2-CP. No canto direito inferior, a detecção da expressão de cada proteína viral por RT-PCR.

A proteína CI forma o núcleo replicativo em conjunto com NIa e NIb com atividade de helicase, ATPase e ligação a RNA (Laín et al., 1991). A proteína 6K2 funciona como uma âncora fazendo com que o processo de replicação ocorra em associação com membranas do retículo. Dessa forma é possível supor que não só NIa e NIb, mas também CI e 6K2 podem estar redirecionando TCTP para o núcleo para desempenhar alguma função relacionada com o processo replicativo.

A proteína PIPO é encontrada *in vivo* como P3N-PIPO, ou seja, fusionada a parte amino-terminal da proteína P3 (Chung et al., 2008). Pode ser que a porção de aminoácidos referente à PIPO seja a responsável pela realocização de TCTP e por isso apenas expressão dessa parte direcione TCTP para o núcleo. Sabe-se que a proteína P3N-PIPO é essencial ao movimento célula-a-célula do SMV e que ela modula a localização de CI nos plasmodesmas (Wen and Hajimorad, 2010).

4.4. Expressão transiente de TCTP etiquetada para identificação de proteínas que interagem com ela

A fim de identificar proteínas do hospedeiro e/ou virais que interagem com a proteína TCTP foi utilizada a técnica de purificação por afinidade em tandem (Rigaut et al., 1999), seguido de análise em espectrômetro de massa. Para isso, TCTP foi fusionada à etiqueta TAP, e plantas de *N. benthamiana* foram inoculadas com o vírus PepYMV e infiltradas com culturas de *A. tumefaciens* contendo a construção pNTAPI-TCTP. Como controle negativo foi utilizada a construção pNTAPI-GFP. A confirmação da expressão de pNTAPI-TCTP nas plantas infiltradas foi realizada por *Western blot* no qual verificou-se um maior nível de expressão 48 horas após a agroinfiltração (Figura 17).

Folhas de plantas infectadas e expressando nTAPI-TCTP foram coletadas 48 horas após inoculação/agroinfiltração para purificação por afinidade em tandem. O eluído foi analisado por SDS-PAGE e corado com nitrato de prata 0,1% (Figura 18). Foi possível identificar duas bandas com tamanhos entre 40 e 50 kDa presentes no extrato de TCTP, mas ausentes no extrato de GFP. Estas bandas foram cortadas e analisadas por espectrometria de massa. Como controle foi cortado um fragmento do gel onde nenhuma amostra tinha sido aplicada, para eliminar a análise de picos provenientes de contaminação durante a manipulação do gel e preparo das amostras para a espectrometria. A análise do espectro gerado mostrou um padrão de picos muito semelhante no branco, e nas bandas entre 40 e 50 kDa (Figura 19). Entretanto, foi possível detectar um pico presente somente no espectro da banda maior, que será submetido ao sequenciamento. Esses resultados confirmam que a técnica é uma

opção para a identificação e caracterização de complexos protéicos em plantas, sendo que provavelmente o limitante para uma detecção mais eficiente foi a baixa concentração de proteínas eluídas. Com isso, torna-se necessário a otimização do protocolo de extração/eluição para a obtenção de uma maior concentração de proteínas complexadas com nTAPi-TCTP, uma vez que em maiores concentrações a detecção se torna mais eficiente.

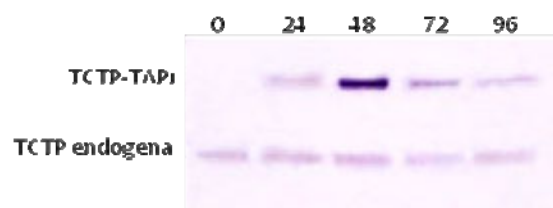


Figura 17. Western blot da proteína TCTP em folhas de *N. benthamiana* expressando a construção pNTAPi-TCTP de forma transiente. Foi utilizado antisoro anti-TCTP produzido por Alfenas-Zerbini P. no laboratório de Virologia Vegetal Molecular, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa. 0, 24, 48, 72 e 96 indicam as horas após infiltração.

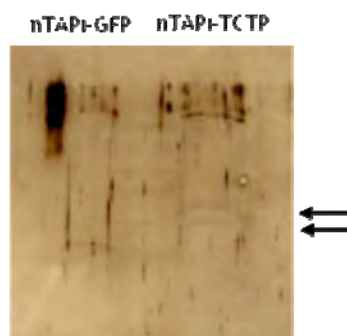


Figura 18. SDS-PAGE das proteínas etiquetadas purificadas. As setas indicam as bandas entre 50kDa e 40 kDa cortadas do gel e analisadas no espectrômetro de massa.

5. CONCLUSÕES

- O processo de transformação para o silenciamento dos genes SI-Gal83 e TCTP, apesar de apresentar uma baixa eficiência, foi suficiente para a obtenção de plantas silenciadas para os genes.
- O nível de expressão de SI-Gal83 no transformante analisado foi 62% menor do que na planta selvagem e o de TCTP foi 27%.
- O silenciamento dos genes SI-Gal83 e TCTP foi mantido mesmo com a inoculação do PepYMV.
- A inoculação levou a indução na expressão dos genes nas plantas não transformadas a 72 hpi e uma repressão a 21 dpi.
- A expressão de SI-Gal83 aumentou a 72 hpi nas plantas silenciadas inoculadas em relação a planta transformada, porém a 21 dpi houve uma redução nessa expressão. Já para TCTP, houve um aumento em ambos os tempos.
- Nas plantas silenciadas para ambos os genes houve uma redução na infecção pelo PepYMV quando avaliado por ELISA e qRT-PCR 21 dpi.
- As proteínas virais CI e NIa-Pro relocizaram TCTP para o núcleo enquanto que as proteínas P1, PIPO, P3N-PIPO, 6K2 e NIb mantiveram TCTP no núcleo e no citoplasma. As proteínas HC-Pro, P3 e CP não foram capazes de alterar a localização subcelular de TCTP.
- Após ensaio de purificação por afinidade em tandem o eluído foi analisado por SDS-PAGE encontrando-se duas bandas que são possíveis proteínas que interagem com TCTP.
- A análise no espectrômetro de massa não foi satisfatória, de forma que a purificação por afinidade em tandem deve ser otimizada para obter uma maior concentração de proteínas.
- Os resultados sugerem que as proteínas SI-Gal83 e TCTP têm um papel no estabelecimento da infecção viral.
- Estudos adicionais devem ser conduzidos para confirmar essa hipótese e aumentar a nossa compreensão dos mecanismos de interação entre essas proteínas e PepYMV.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.J., Antoniwi, J.F., and Beaudoin, F. (2005). Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Molecular Plant Pathology* 6, 471-487.
- Alfenas-Zerbini, P., Maia, I.G., Fávaro, R.D., Cascardo, J.C.M., Brommonschenkel, S.H., and Zerbini, F.M. (2009). Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 352-361.
- Allison, R., Johnston, R.E., and Dougherty, W.G. (1986). The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* 154, 9-20.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B. (1998). A viral supressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 13079-13084.
- Andersen, K., and Johansen, I.E. (1998). A single conserved amino acid in the coat protein gene of Pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* 241, 304-311.
- Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2005). Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. *Plant Cell* 17, 1801-1814.
- Arbatova, J., Lehto, K., Pehu, E., and Pehu, T. (1998). Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *Journal of General Virology* 79, 2319-2323.
- Atreya, P.L., Lopez-Moya, J.J., Chu, M.H., Atreya, C.D., and Pirone, T.P. (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology* 76, 265-270.
- Babu, M., Gagarinova, A.G., Brandle, J.E., and Wang, A. (2008). Association of the transcriptional response of soybean plants with soybean mosaic virus systemic infection. *Journal of General Virology* 89, 1069-1080.
- Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Science* 13, 474-482.
- Basso, J., Dallaire, P., Charest, P.J., Devantier, Y., and Laliberte, J.F. (1994). Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology* 75, 3157-3165.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Berger, P.H., Adams, M.J., Barnett, O.W., Brunt, A.A., Hammond, J., Hill, J.H., Jordan, R.L., Kashiwazaki, S., Rybicki, E.P., Spence, N., Stenger, D.C., Ohki, S.T., Uyeda, I., van Zaayen, A., Valkonen, J.P., and Vetten, H.J. (2005). Family *Potyviridae*. In *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball, eds (San Diego: Elsevier Academic Press), pp. 819-841.
- Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S., and Masle, J. (2008). Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20, 3430-3447.

- Bock, K.R., and Conti, M. (1974). Cowpea aphid-borne mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 134.
- Bommer, U.A., and Thiele, B.J. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36, 379-385.
- Bommer, U.A., Borovjagin, A.V., Greagg, M.A., Jeffrey, I.W., Russell, P., Laing, K.G., Lee, M., and Clemens, M.J. (2002). The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. RNA 8, 478-496.
- Brasileiro, A.C.M., and Carneiro, V.T.C. (1998). Manual de Transformação Genética de Plantas. (Brasília, DF: Embrapa Cenargen).
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., and Baulcombe, D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. EMBO Journal 17, 6739-6746.
- Brioudes, F., Thierry, A.M., Chambrier, P., Mollereau, B., and Bendahmane, M. (2010). Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 107, 16384-16389.
- Bruckner, F.P. (2010). Silenciamento gênico induzido por vírus dos genes TCTP, SNF1 e Subα: análise por RT-PCR quantitativo e efeito na infecção de *N. benthamiana* pelo PepYMV. (Monografia de conclusão de curso). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa.
- Cans, C., Passer, B.J., Shalak, V., Nancy-Portebois, V., Crible, V., Amzallag, N., Allan, D., Tufino, R., Argentini, M., Moras, D., Fiucci, G., Goud, B., Mirande, M., Amson, R., and Telerman, A. (2003). Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 100, 13892-13897.
- Carrington, J.C., and Dougherty, W.G. (1988). A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 85, 3391-3395.
- Carrington, J.C., and Freed, D.D. (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. Journal of Virology 64, 1590-1597.
- Carrington, J.C., and Whitham, S.A. (1998). Viral invasion and host defense: strategies and counter- strategies. Current Opinion in Plant Biology 1, 336-341.
- Carrington, J.C., Freed, D.D., and Sanders, T.C. (1989). Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in escherichia-coli and invitro. Journal of Virology 63, 4459-4463.
- Carrington, J.C., Freed, D.D., and Oh, C.-S. (1990). Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. EMBO Journal 9, 1347-1353.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E., and Shaad, M.C. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. Plant Journal 14, 393-400.
- 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., and Fontes, E.P.B. (2008). Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. Plos Pathogens 4, e1000247.

- Chen, C., and Chen, Z. (2000). Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Molecular Biology* 42, 387-396.
- Child, S.J., Hakki, M., De Niro, K.L., and Geballe, A.P. (2004). Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *Journal of Virology* 78, 197-205.
- Child, S.J., Hanson, L.K., Brown, C.E., Janzen, D.M., and Geballe, A.P. (2006). Double-stranded RNA binding by a heterodimeric complex of murine cytomegalovirus m142 and m143 proteins. *Journal of Virology* 80, 10173-10180.
- Chisholm, S.T., Mahajan, S.K., Whitham, S.A., Yamamoto, M.L., and Carrington, J.C. (2000). Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Biology* 97, 489-494.
- Chitpatima, S.T., Makrides, S., Bandyopadhyay, R., and Brawerman, G. (1988). Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Research* 16, 2350.
- Chung, B.Y., Miller, W.A., Atkins, J.F., and Firth, A.E. (2008). An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105, 5897-5902.
- Côco, D. (2009). Estudo da localização subcelular da proteína Translationally controlled tumor protein (TCTP) durante a infecção de *Nicotiana benthamiana* pelo Pepper yellow mosaic virus. (Monografia de conclusão de curso). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa.
- Collmer, C.W., Marston, M.F., Taylor, J.C., and Jahn, M. (2000). The *I* gene of bean: A dosage-dependent allele conferring extreme resistance, hypersensitive resistance, or spreading vascular necrosis in response to the potyvirus *Bean common mosaic virus*. *Phytopathology* 13, 1266-1270.
- Cooper, B. (2001). Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *Plant Journal* 26, 339-349.
- Costa, M.G.C., Nogueira, F.T.S., Otoni, W.C., and Brommonschenkel, S.H. (2000). Transformação genética de cultivares de tomateiro industrial mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12, 107-118.
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T.Y., Wang, A.M., and Laliberte, J.F. (2009). Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *Journal of Virology* 83, 10460-10471.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C., and Carrington, J.C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7, 549-559.
- Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R.V., Sun, G., and Wang, A. (2010). The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* 397, 56-63.
- Daros, J.A., and Carrington, J.C. (1997). RNA binding activity of Nla proteinase of tobacco etch potyvirus. *Virology* 237, 327-336.
- Diaz-Pendon, J.A., and Ding, S.W. (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 46, 303-326.

- DiPiero, R.M., Rezende, J.A.M., Yuki, V.A., Pascholati, S.F., and Delfino, M.A. (2006). Transmissão do Passionfruit woodiness virus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. *Neotropical Entomology* 35, 139-140.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G., and Carrington, J.C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal* 13, 1482-1491.
- Dolja, V.V., Haldeman Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A., and Carrington, J.C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206, 1007-1016.
- Dougherty, W.G., and Parks, D. (1991). Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* 183, 449-456.
- Dougherty, W.G., Carrington, J.C., Cary, S.M., and Parks, T.W. (1988). Biochemical and mutational analysis of a plant virus cleavage site. *EMBO Journal* 7, 1281-1287.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 11-15.
- Dufresne, P.J., Thivierge, K., Cotton, S., Beauchemin, C., Ide, C., Ubalijoro, E., Laliberte, J.F., and Fortin, M.G. (2008). Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology* 374, 217-227.
- Dunoyer, P., Thomas, C., Harrison, S., Revers, F., and Maule, A. (2004). A cysteine-rich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *Journal of Virology* 78, 2301-2309.
- Dyck, J.R., Gao, G., Widmer, J., Stapleton, D., Fernandez, C.S., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1996). Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits. *Journal Biological Chemistry* 271, 17798-17803.
- Eiamtanasate, S., Juricek, M., and Yap, Y.K. (2007). C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum. *Virus Genes* 35, 611-617.
- Escaler, M., Aranda, M.A., Thomas, C.L., and Maule, A.J. (2000). Pea embryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. *Virology* 267, 318-325.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (2005). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* (San Diego: Elsevier Academic Press).
- Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G.B., and Hunt, A.G. (1998). *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology* 79, 2043-2049.
- Forler, D., Kocher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E., and Wilm, M. (2003). An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nature Biotechnology* 21, 89-92.
- Foster, T.M., Lough, T.J., Emerson, S.J., Lee, R.H., Bowman, J.L., Forster, R.L., and Lucas, W.J. (2002). A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex. *Plant Cell* 14, 1497-1508.
- Frary, A., and Earle, E.D. (1996). An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports* 16, 235-240.

- Gallie, D.R., Tanguay, R.L., and Leathers, V. (1995). The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene* 165, 233-238.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Gnanasekar, M., and Ramaswamy, K. (2007). Translationally controlled tumor protein of *Brugia malayi* functions as an antioxidant protein. *Parasitology Research* 101, 1533-1540.
- Gnanasekar, M., Dakshinamoorthy, G., and Ramaswamy, K. (2009). Translationally controlled tumor protein is a novel heat shock protein with chaperone-like activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386, 333-337.
- Golem, S., and Culver, J.N. (2003). *Tobacco mosaic virus*-induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 681-688.
- Gully, D., Moinier, D., Loiseau, L., and Bouveret, E. (2003). New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Letters* 548, 90-96.
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M., Sanz-Burgos, A.P., Luque, A., and Missich, R. (2004). Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology* 98, 111-119.
- Haldeman-Cahill, R., Daros, J.A., and Carrington, J.C. (1998). Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *Journal of Virology* 72, 4072-4079.
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G., and Bisaro, D.M. (2003). Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell* 15, 1034-1048.
- Hardie, D.G. (2007). AMPK and SNF1: Snuffing Out Stress. *Cell Metabolism* 6, 339-340.
- Hari, V. (1981). The RNA of tobacco etch virus: Further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology* 112, 391-399.
- Hedbacker, K., and Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience* 13, 2408-2420.
- Hofius, D., Maier, A.T., Dietrich, C., Jungkuntz, I., Bornke, F., Maiss, E., and Sonnewald, U. (2007). Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for *Potato virus Y* infection in tobacco plants. *Journal of Virology* 81, 11870-11880.
- Hong, Y., and Hunt, A.G. (1996). RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 226, 146-151.
- Hull, R. (2002). *Matthew's Plant Virology*. (Londres, Inglaterra: Academic Press).
- Itaya, A., Ma, F.S., Qi, Y.J., Matsuda, Y., Zhu, Y.L., Liang, G.Q., and Ding, B. (2002). Plasmodesma-mediated selective protein traffic between "symplasmically isolated" cells probed by a viral movement protein. *Plant Cell* 14, 2071-2083.

- Jiang, R., and Carlson, M. (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Molecular Cell Biology* 17, 2099-2106.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (1995). Requirement of HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* 209, 268-273.
- Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
- Kasschau, K.D., Cronin, S., and Carrington, J.C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228, 251-262.
- Kim, S.H., Macfarlane, S., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Ryabov, E.V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J.W., and Taliansky, M. (2007). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 11115-11120.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodríguez-Cerezo, E., Hunt, A.G., and Shaw, J.G. (1994). Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204, 759-769.
- Knuesel, M., Wan, Y., Xiao, Z., Holinger, E., Lowe, N., Wang, W., and Liu, X. (2003). Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system. *Molecular Cell Proteomics* 2, 1225-1233.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jadao, A.S., Houvenaghel, M.C., German-Retana, S., Pavan, M.A., Candresse, T., Zerbini, F.M., and Le Gall, O. (2005). Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Research* 109, 175-180.
- Kundu, S., Chakraborty, D., and Pal, A. (2011). Proteomic analysis of salicylic acid induced resistance to Mungbean Yellow Mosaic India Virus in *Vigna mungo*. *Journal of Proteomics* 74, 337-349.
- Laín, S., Martín, M.T., Riechmann, J.L., and García, J.A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection - nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *Journal of Virology* 65, 1-6.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G., and Laliberté, J.-F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology* 74, 7730-7737.
- Li, C., Qiu, L., Ning, X., Chen, A., Qin, S., Wu, H., and Zhao, J. (2010). The first molluscan TCTP in *Venerupis philippinarum*: molecular cloning and expression analysis. *Fish Shellfish Immunology* 29, 530-533.
- Li, X.H., Valdez, P., Olvera, R.E., and Carrington, J.C. (1997). Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology* 71, 1598-1607.
- Liao, M., Li, Y., and Wang, Z. (2009). Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach. *Proteomics* 9, 2809-2819.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25, 402-408.

- Lopez-Moya, J.J., and Pirone, T.P. (1998). Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *Journal of General Virology* 79, 161-165.
- Lucas, W.J. (2006). Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344, 169-184.
- Mahajan, S., Dolja, V.V., and Carrington, J.C. (1996). Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology* 70, 4370-4379.
- Mahajan, S.K., Chisholm, S.T., Whitham, S., and Carrington, J.C. (1998). Identification and characterization of a locus (RTM1) in *Arabidopsis thaliana* that restricts long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Journal* 14, 177-186.
- Maia, I.G., and Bernardi, F. (1996). Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. *Journal of General Virology* 77, 869-877.
- Mariano, A.C., Andrade, M.O., Santos, A.A., Carolino, S.M.B., Oliveira, M.L., Baracat-Pereira, M.C., Brommonshenkel, S.H., and Fontes, E.P.B. (2004). Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology* 318, 24-31.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* 80, 5747-5756.
- Merits, A., Guo, D., Järvekülg, L., and Saarma, M. (1999). Biochemical and genetic evidence for interactions between potato a potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* 263, 15-22.
- Momcilovic, M., Iram, S.H., Liu, Y., and Carlson, M. (2008). Roles of the glycogen-binding domain and Snf4 in glucose inhibition of SNF1 protein kinase. *Journal Biological Chemistry* 283, 19521-19529.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15, 473-497.
- Murphy, J.F., Klein, P.G., Hunt, A.G., and Shaw, J.G. (1996). Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* 220, 535-538.
- Nath, N., McCartney, R.R., and Schmidt, M.C. (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Molecular and Cellular Biology* 23, 3909-3917.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C., and LeGall, O. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiology* 132, 1272-1282.
- Nicolas, O., Dunnington, S.W., Gotow, L.F., Pirone, T.P., and Hellmann, G.M. (1997). Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology* 237, 452-459.
- Niepel, M., and Gallie, D.R. (1999). Identification and characterization of the functional elements within the *Tobacco etch virus* 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology* 73, 9080-9088.
- Nitsch, J.P., and Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* 163, 85-87.

- Padilla, I.M., and Burgos, L. (2010). Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on in vitro plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports* 29, 1203-1213.
- Peumans, W.J., and Van Damme, E.J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109, 347-352.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45.
- Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B.J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S.C., Jennings, I.G., Campbell, D.J., Witters, L.A., Parker, M.W., Kemp, B.E., and Stapleton, D. (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Current Biology* 13, 867-871.
- Pompe-Novak, M., Gruden, K., Baebler, S., Krecic-Stres, H., Kovac, M., Jongsma, M., and Ravnika, M. (2006). *Potato virus Y*-induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67, 237-247.
- Qin, X., Gao, F., Zhang, J., Gao, J., Lin, S., Wang, Y., Jiang, L., Liao, Y., Wang, L., Jia, Y., Tang, L., Xu, Y., and Chen, F. (2010). Molecular cloning, characterization and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein (TCTP) from *Jatropha curcas* L. *Molecular Biology Reports* 38, 3101-3112.
- Rajamaki, M.L., Kelloniemi, J., Alminante, A., Kekarainen, T., Rabenstein, F., and Valkonen, R.P.T. (2005). A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous protein and suggest some P1 functions. *Virology* 342, 88-101.
- Restrepo, M.A., Freed, D.D., and Carrington, J.C. (1990). Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell* 2, 987-988.
- Restrepo-Hartwig, M.A., and Carrington, J.C. (1992). Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of Virology* 66, 5662-5666.
- Restrepo-Hartwig, M.A., and Carrington, J.C. (1994). The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology* 68, 2388-2397.
- Riechmann, J.L., Lain, S., and Garcia, J.A. (1989). The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 70, 2785-2789.
- Riechmann, J.L., Lain, S., and Garcia, J.A. (1990). Infectious *invitro* transcripts from a plum pox potyvirus cDNA clone. *Virology* 177, 710-716.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology* 17, 1030-1032.
- Robaglia, C., and Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science* 11, 40-45.
- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K., and Maule, A.J. (1998). Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* 245, 173-181.
- Rodriguez-Cerezo, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P., and Shaw, J.G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* 74, 1945-1949.

- Rodríguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J.G., Lomonossoff, G.P., Qiu, S.G., Linstead, P., Shanks, M., and Risco, C. (1997). The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* 236, 296-306.
- Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R., and Fromm, M.E. (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant Journal* 38, 172-181.
- Rohila, J.S., Chen, M., Chen, S., Chen, J., Cerny, R., Dardick, C., Canlas, P., Xu, X., Gribskov, M., Kanrar, S., Zhu, J.K., Ronald, P., and Fromm, M.E. (2006). Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. *Plant Journal* 46, 1-13.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L., and Lucas, W.J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237, 283-295.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., Gonzalez, J.A., Hilal, M., and Prado, F.E. (2009). Soluble sugars-metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signal Behavior* 4, 388-393.
- Roth, B.M., Pruss, G.J., and Vance, V.B. (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research* 102, 97-108.
- Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E., and Le Gall, O. (2007). Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *Journal of General Virology* 88, 1029-1033.
- Ruffel, S., Dussault, M.H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal* 32, 1067-1075.
- Sambrook, J., and Russel, D. (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3rd ed.). (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A., and Vijayan, M. (1996). A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. *Nature Structural Biology* 3, 596-603.
- Sanz, P. (2003). Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast. *Biochemical Society Transactions* 31, 178-181.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E., and Carrington, J.C. (1997a). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO Journal* 16, 4049-4059.
- Schaad, M.C., Lellis, A.D., and Carrington, J.C. (1997b). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology* 71, 8624-8631.
- Schaad, M.C., Anderberg, R.J., and Carrington, J.C. (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* 273, 300-306.
- Schaad, M.C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S., and Carrington, J.C. (1996). Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology* 70, 7039-7048.

- Schneider, R.J., and Mohr, I. (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 130-136.
- Shen, W., and Hanley-Bowdoin, L. (2006). Geminivirus infection up-regulates the expression of two Arabidopsis protein kinases related to yeast SNF1-and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant Physiology* 142, 1642-1655.
- Shimizu, T., Yoshii, A., Sakurai, K., Hamada, K., Yamaji, Y., Suzuki, M., Namba, S., and Hibi, T. (2009). Identification of a novel tobacco DnaJ-like protein that interacts with the movement protein of tobacco mosaic virus. *Archives of Virology* 154, 959-967.
- Shukla, D.D., Frenkel, M.J., and Ward, C.W. (1991). Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 178-191.
- Shukla, D.D., Ward, C.W., and Brunt, A.A. (1994). *The Potyviridae*. (Wallingford, UK: CAB International).
- Simón-Buela, L., Guo, H.S., and García, J.A. (1997). Cap-independent *leaky scanning* as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. *Journal of General Virology* 78, 2691-2699.
- Smith, C.M., Rodriguez-Buey, M., Karlsson, J., and Campbell, M.M. (2004). The response of the poplar transcriptome to wounding and subsequent infection by a viral pathogen. *New Phytologist* 164, 123-136.
- Susini, L., Besse, S., Duflaut, D., Lespagnol, A., Beekman, C., Fiucci, G., Atkinson, A.R., Busso, D., Poussin, P., Marine, J.C., Martinou, J.C., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R., and Telerman, A. (2008). TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differentiation* 15, 1211-1220.
- Sutherland, C.M., Hawley, S.A., McCartney, R.R., Leech, A., Stark, M.J.R., Schmidt, M.C., and Hardie, D.G. (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Current Biology* 13, 1299-1305.
- Teycheney, P.Y., Aziz, R., Dinant, S., Slanki, K., Tourneur, C., Balzs, E., Jacquemond, M., and Tepfer, M. (2000). Synthesis of (-) strand RNA from the 3'untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *Journal of General Virology* 81, 1121-1126.
- Thornbury, D.W., Hellmann, G.M., Rhoads, R.E., and Pirone, T.P. (1985). Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* 114, 260-267.
- Tonganunt, M., Nupan, B., Saengsakda, M., Suklour, S., Wanna, W., Senapin, S., Chotigeat, W., and Phongdara, A. (2008). The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 633-637.
- Trejo-Saavedra, D.L., Vielle-Calzada, J.P., and Rivera-Bustamante, R.F. (2009). The infective cycle of Cabbage leaf curl virus (CaLCuV) is affected by CRUMPLED LEAF (CRL) gene in Arabidopsis thaliana. *Virology Journal* 6, 169.
- Truta, A.A.C., Souza, A.R.R., Nascimento, A.V.S., Pereira, R.C., Pinto, C.M.F., Brommonschenkel, S.H., Carvalho, M.G., and Zerbini, F.M. (2004). Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. *Fitopatologia Brasileira* 29, 160-168.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Drugeon, G., Haenni, A.-L., and Bernardi, F. (1999). Effect of mutations within the cys-rich region of potyvirus helper component-proteinase on self-interaction. *Journal of General Virology* 80, 2809-2812.

- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Arruda, P., Haenni, A.-L., and Bernardi, F. (2000). Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* 268, 104-111.
- Valchanova, R.S., Picard-Maureau, M., Budt, M., and Brune, W. (2006). Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. *Journal of Virology* 80, 10181-10190.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, research0034-research0034.11.
- Venugopal, T. (2005). Evolution and expression of Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142, 8-17.
- Verchot, J., and Carrington, J.C. (1995a). Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *Journal of Virology* 69, 1582-1590.
- Verchot, J., and Carrington, J.C. (1995b). Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology* 69, 3668-3674.
- Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6, 206-220.
- Wang, H., Hao, L.H., Shung, C.Y., Sunter, G., and Bisaro, D.M. (2003). Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 15, 3020-3032.
- Wang, S., Zhao, X.F., and Wang, J.X. (2009). Molecular cloning and characterization of the translationally controlled tumor protein from *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Biology Reports* 36, 1683-1693.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., and Wang, A. (2010). Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens* 6, e1000962.
- Wei, T.Y., and Wang, A.M. (2008). Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner. *Journal of Virology* 82, 12252-12264.
- Wen, R.H., and Hajimorad, M.R. (2010). Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* 400, 1-7.
- Whitham, S.A., and Wang, Y. (2004). Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 365-371.
- Whitham, S.A., Anderberg, R.J., Chisholm, S.T., and Carrington, J.C. (2000). *Arabidopsis* RTM2 gene is necessary for specific restriction of *Tobacco etch virus* and encodes an unusually small heat shock-like protein. *Plant Cell* 12, 569-582.
- Whitham, S.A., Quan, S., Chang, H.S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X., and Hou, Y.M. (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Journal* 33, 271-283.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M.G., and Laliberte, J.F. (1997). Interaction of the viral protein genome linked [proteinase] of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234, 84-92.

- Yang, C., Guo, R., Jie, F., Nettleton, D., Peng, J., Carr, T., Yeakley, J.M., Fan, J.-B., and Whitham, S.A. (2007). Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 358-370.
- Yang, Y., and Klessig, D.F. (1996). Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93, 14972-14977.
- Yeam, I., Cavatorta, J.R., Ripoll, D.R., Kang, B.C., and Jahn, M.M. (2007). Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* 19, 2913-2928.
- Yubero, N., Estes, G., Cardona, H., Morera, L., Garrido, J.J., and Barbancho, M. (2009). Molecular cloning, expression analysis and chromosome localization of the Tpt1 gene coding for the pig translationally controlled tumor protein (TCTP). *Molecular Biology Reports* 36, 1957-1965.
- Zerbini, F.M., and Zambolim, E.M. (1999). A família Potyviridae. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 7, 1-66.
- Zhu, Y., Qi, Y., Xun, Y., Owens, R., and Ding, B. (2002). Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiology* 130, 138-146.