

FERNANDA PRIETO BRUCKNER

ASPECTOS DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA TCTP E O
POTYVÍRUS PEPMV NA INFECÇÃO DE TOMATEIRO E *Nicotiana*
benthamiana

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

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

T

B888a
2012

Bruckner, Fernanda Prieto, 1986-

Aspectos da interação entre a proteína TCTP e o potyvírus
PepYMV na infecção de tomateiro e *Nicotiana benthamiana* /
Fernanda Prieto Bruckner. – Viçosa, MG, 2012.
80f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 70-80

1. Potyvírus. 2. Relação hospedeiro-parasito.
3. *Pepper yellow mosaic virus*. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.28

FERNANDA PRIETO BRUCKNER

Aspectos da interação entre a proteína TCTP e o potyvírus PepYMV na
infecção de tomateiro e *Nicotiana benthamiana*

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

APROVADA: 19 de julho de 2012

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior

Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz
(Coorientadora)

Prof^a. Poliane Alfenas Zerbini
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre abençoar meu caminho.

Aos meus pais Cláudio e Hermínia, por todo apoio e por muitas vezes clarearem meus horizontes.

Aos meus irmãos Ju, Caco e Rafu, por alegrarem a minha vida mesmo nos dias mais difíceis.

À minha orientadora Poliane, pela amizade, confiança e valiosa orientação.

Ao Prof. Murilo pelo apoio físico e intelectual e por estimular nosso pensamento crítico.

Ao Prof. Humberto Ramos, pela grande ajuda nos experimentos de espectrometria de massas.

A todos os colegas e amigos do LVVM e da MIND, pela boa convivência no dia a dia, pela amizade, e pela ajuda em diversos momentos. Agradeço em especial ao Renan e ao André, meus companheiros de bancada, por estarem sempre me ajudando e pensando comigo, e à Larissa, Glória e Sil, pela grande amizade e pelos ouvidos sempre disponíveis.

Ao Glauco por estar sempre ao meu lado.

À todos os meus amigos, que perto ou longe fazem parte das minhas conquistas.

Ao programa de Microbiologia Agrícola e a UFV pelos conhecimentos adquiridos e pela oportunidade de me aprimorar profissionalmente.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Alterações no padrão de expressão gênica causadas por infecções virais.....	13
2.2. Interação <i>Potyvirus</i> -hospedeiro	16
2.3. O gênero <i>Potyvirus</i> e o <i>Pepper yellow mosaic virus</i>	19
2.4. <i>Translationally controlled tumor protein</i> (TCTP)	26
2.5. Silenciamento gênico induzido por vírus (<i>VIGS – Virus Induced Gene Silence</i>)	29
2.6. Ferramentas para estudo de interação proteína-proteína	32
3. Material e Métodos.....	36
3.1. Isolado Viral e inoculação mecânica	36
3.2. Material vegetal	36
3.3. Silenciamento do gene <i>TCTP</i>	36
3.4. Expressão transiente de proteínas virais em <i>N. benthamiana</i>	37
3.5. Extração de RNA e síntese de cDNA	38
3.6. RT-PCR quantitativo	39
3.7. Ensaio de duplo-híbrido	40
3.8. Identificação <i>in vitro</i> de proteínas que interagem com a TCTP durante a infecção....	41
3.9. Identificação <i>in vivo</i> de proteínas que interagem com a TCTP durante a infecção....	42
3.10. Espectrometria de massa	43
4. RESULTADOS	45
4.1. A redução na expressão de TCTP leva a um menor acúmulo viral nos estágios iniciais da infecção.	45
4.2. A expressão transiente de P3 e CP induz a expressão de TCTP, enquanto a NIB reduz sua expressão em <i>N. benthamiana</i>	51
4.3. A TCTP não interage diretamente com proteínas isoladas do PepYMV	53
4.4. Identificação <i>in vitro</i> de proteínas que interagem com a TCTP durante a infecção....	54
4.5. Identificação <i>in vivo</i> de proteínas que interagem com a TCTP durante a infecção....	59
5. DISCUSSÃO.....	60
5.1. Silenciamento gênico induzido por vírus e suas limitações na análise de infecções sistêmicas por <i>Potyvirus</i>	60

5.2. O silenciamento de TCTP reduz o acúmulo viral em folhas inoculadas.....	62
5.3. A expressão de TCTP é induzida pelas proteínas P3 e CP, e reprimida pela NIB	62
5.4. A TCTP não interagiu com proteínas isoladas do PepYMV	62
5.5. Análise de interações entre TCTP e outras proteínas por espectrometria de massas ..	64
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS	70

RESUMO

BRUCKNER, Fernanda Prieto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **Aspectos da interação entre a proteína TCTP e o potyvírus PepYMV na infecção de tomateiro e *Nicotiana benthamiana*.** Orientadora: Poliane Alfnas Zerbini. Coorientadores: Marisa Vieira de Queiroz e Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Os vírus são organismos com genomas pequenos, de organização simples, que codificam em média 3 a 10 proteínas. O sucesso da infecção depende da manipulação da célula pelo vírus, por meio de interações complexas que ocorrem entre fatores virais e fatores do hospedeiro. As modificações induzidas na célula incluem alterações morfológicas, alteração do ciclo celular e na expressão gênica, entre outras. A compreensão dos processos que favorecem a infecção viral passa necessariamente pelo estudo de interações vírus-hospedeiro. No intuito de compreender melhor os processos relacionados à infecção de tomateiros pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) uma biblioteca subtrativa foi construída 72 horas após a infecção. Diversos genes cuja expressão foi alterada pela infecção foram identificados. Dentre os genes induzidos, se encontra o gene que codifica a *Translationally controlled tumor protein* (TCTP). A proteína TCTP é altamente conservada em todos os eucariotos. Suas funções estão relacionadas a controle do crescimento e ciclo celular, atividade anti-apoptótica, e resposta a diferentes tipos de estresses abióticos e bióticos. O envolvimento desta proteína na infecção pelo PepYMV ainda não foi estabelecido, porém estudos em uma linhagem de tomateiro transgênica silenciadas para a TCTP, mostraram que as plantas silenciadas apresentam um menor acúmulo de PepYMV, indicando que a TCTP favorece a infecção por este vírus. Neste trabalho, buscou-se avançar na compreensão dos mecanismos que envolvem a TCTP no processo de infecção pelo PepYMV. Plantas de *Nicotiana benthamiana* silenciadas para TCTP por VIGS (*Virus Induced Gene Silence*) foram utilizadas para estudar o efeito do silenciamento na infecção viral, sendo que as plantas silenciadas acumularam menos vírus no início da infecção. A expressão individual das proteínas de origem viral em *N. benthamiana* identificou a P3 e a CP como capazes de induzir a expressão de TCTP em níveis semelhantes aos observados durante a infecção pelo PepYMV, sendo que a expressão da proteína Nib reduziu a expressão de TCTP. A verificação da ocorrência de interações diretas entre a TCTP e as proteínas virais, por ensaio de duplo híbrido, mostrou que a TCTP não interage separadamente com as proteínas de origem viral. A purificação de proteínas de plantas de *N. benthamiana*, sadias e infectadas, por afinidade com a TCTP identificou diversas proteínas que possivelmente

interagem com a TCTP. Assim como no ensaio de duplo híbrido, a interação com proteínas virais não foi detectada. Estes resultados sugerem que o papel da TCTP deve envolver a formação de complexos proteicos entre proteínas virais e da planta, ou favorecer a infecção de forma indireta.

ABSTRACT

BRUCKNER, Fernanda Prieto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Aspects of TCTP protein interaction with the potyvirus PepYMV during infection of tomato and *N. benthamiana*.** Advisor: Poliane Alfenas Zerbini. Co-Advisors: Marisa Vieira de Queiroz e Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Viruses are organisms with small genomes of simple organization, which code about 3 to 10 viral proteins. The success of the infection depends on the manipulation of the cell by the virus, by means of complex interactions occurring between viral factors and host factors. The induced changes by virus infection include cell morphology changes, cell cycle changes and alterations in gene expression, among others. Understanding the processes that favor viral infection necessarily involves the study of virus-host interactions. In order to better understand the processes related to infection by tomato potyvirus Pepper yellow mosaic virus (PepYMV) a subtractive library was built 72 hours after infection. Several genes were identified as induced or repressed by viral infection. Among the induced genes, is the gene encoding the *Translationally controlled tumor protein* (TCTP). TCTP protein is highly conserved in all eukaryotes. Its functions are related to growth control and cell cycle, anti-apoptotic activity, and response to different biotic and abiotic stresses. The involvement of this protein in infection PepYMV has not been established, but studies in a strain of transgenic tomato plants silenced for TCTP showed that the silenced plants have a lower accumulation of PepYMV, indicating that TCTP promotes viral infection. In this study, we sought to advance the understanding of mechanisms involving TCTP in the process of infection by PepYMV. *N. benthamiana* plants silenced by VIGS TCTP were used to study the effect of silencing in viral infection, and the silenced plants accumulate fewer viruses in early stages of virus infection. Individual expression of viral proteins in *N. benthamiana* identified P3 and CP as capable of inducing TCTP expression at similar levels to those induced during PepYMV infection, and expression of NIb reduced expression of TCTP. The verification of direct interactions occurrence between viral proteins and TCTP by double-hybrid assay showed that TCTP not interact separately with any of the proteins of viral origin. Purification of proteins of healthy and infected *N. benthamiana* plants by affinity with TCTP identified several proteins that putatively interact with TCTP. As in two hybrid assay, interactions involving PepYMV proteins were not detected. These results suggest that TCTP activation must involve the formation of protein complexes involving viral and plant proteins or contribute

indirectly to PepYMV infection, without involving direct interactions between TCTP and viral proteins.

1. INTRODUÇÃO

Os vírus que infectam plantas possuem o genoma pequeno, codificando em média 3 a 10 proteínas. Apesar do pequeno número de proteínas de origem viral expressas durante a infecção, os vírus são capazes de causar danos severos em diferentes organismos celulares, sendo responsáveis por uma ampla gama de doenças em várias culturas de plantas, causando queda na produtividade e enormes perdas econômicas.

O processo de infecção de plantas por vírus envolve as etapas de replicação do genoma viral, movimento célula a célula e movimento sistêmico (Whitelam e Cockburn, 1996). Para uma infecção eficiente, as proteínas virais necessitam interagir com fatores da célula hospedeira, manipulando vias metabólicas e coordenando interações bioquímicas e intermoleculares que favorecem a infecção. Assim, durante a co-evolução entre vírus e seus hospedeiros, interações complexas foram estabelecidas envolvendo diversos mecanismos de ataque do patógeno e de defesa do hospedeiro.

Infecções virais resultam na ativação e repressão da transcrição de uma ampla gama de genes do hospedeiro. Dessa forma, estudos que descrevem alterações transcricionais e no perfil proteômico de células infectadas têm contribuído para um aumento significativo do conhecimento sobre os fatores potencialmente envolvidos no processo de infecção viral (Senthil, Liu *et al.*, 2005; Pompe-Novak, Gruden *et al.*, 2006; Gandia, Conesa *et al.*, 2007; Yang, Guo *et al.*, 2007; Babu, Gagarinova *et al.*, 2008; Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009; Baebler, Krecic-Stres *et al.*, 2009; Naqvi, Sarwat *et al.*, 2011; Hillung, Cuevas *et al.*, 2012; Pacheco, Garcia-Marcos *et al.*, 2012). Entretanto, o papel exato de muitos destes fatores no processo de infecção viral permanece indeterminado e estudos funcionais precisam ser realizados para a elucidação dos mecanismos e interações envolvidos na infecção viral.

A família *Potyviridae* é uma das duas maiores e economicamente mais importantes famílias de vírus que infectam plantas, sendo o gênero *Potyvirus* o mais numeroso da família, com mais de 140 espécies descritas que correspondem a cerca de 90% das espécies pertencentes à família (Gibbs e Ohshima, 2010; King, Adams *et al.*, 2012). Em conjunto, essas espécies infectam uma ampla gama de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas em diferentes regiões climáticas, e causam grandes danos econômicos em várias culturas (Urcuqui-Inchima, Maia *et al.*, 2000). Seu genoma é constituído por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000

nucleotídeos, ligada a uma proteína de origem viral, a VPg, na extremidade 5' e a uma cauda poli (A) na extremidade 3'. O RNA viral codifica uma poliproteína de cerca de 350 kDa, que sofre autoproteólise gerando de oito a dez peptídeos maduros (Fauquet, Mayo *et al.*, 2005). Uma segunda sequência aberta de leitura (*Open reading frame* - ORF), denominada PIPO (*Pretty interesting Potyviridae ORF*) foi identificada recentemente (Chung, B. Y. W., Miller, W. A. *et al.*, 2008). Esta se localiza sobreposta à ORF codificadora da poliproteína, na região que origina a proteína P3 e é expressa fusionada a extremidade N-terminal da P3, gerando um peptídeo com peso molecular de aproximadamente 25 kDa (Chung, B. Y. W., Miller, W. A. *et al.*, 2008; Wen e Hajimorad, 2010).

O *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) pertence ao gênero *Potyvirus* e é amplamente distribuído no Brasil. Foi encontrado inicialmente no estado de São Paulo e no Distrito Federal, infectando plantas de pimentão (*Capsicum annum*), causando mosaico amarelo e deformação foliar (Inoue-Nagata, Fonseca *et al.*, 2002). Desde então, sua ocorrência foi verificada em diferentes estados, infectando plantações de tomate e pimentão (Ávila, Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Truta, Souza *et al.*, 2004; Dianese, Resende *et al.*, 2008).

Com o objetivo de determinar o perfil de expressão gênica em plantas de tomateiro infectadas pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), foi construída uma biblioteca subtrativa a partir de folhas de tomateiro inoculadas, 72 horas após a inoculação viral. Foram identificados 881 genes como diferencialmente expressos e 53 tiveram a expressão diferencial confirmada por RT-PCR quantitativo ou por análises de macroarranjos (Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009). Dentre os genes identificados, foi demonstrado que ocorre um aumento no acúmulo do mRNA que codifica a *Translationally controlled tumor protein* (TCTP) (Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009), uma proteína envolvida na regulação de diversos processos celulares. Entretanto o papel da TCTP na infecção pelo PepYMV permanece indeterminado.

A família de proteínas TCTP é amplamente distribuída e conservada entre os eucariotos (Bommer e Thiele, 2004). Ela foi isolada inicialmente de células tumorais de humanos (Chitpatima, Makrides *et al.*, 1988) e está envolvida na regulação de diversos processos celulares importantes como crescimento celular, progressão do ciclo celular e proteção das células contra diferentes condições de estresse e apoptose. O gene codificador

da TCTP é regulado de maneira pós-transcricional, tendo sido relatada a ocorrência de transcritos do gene e ausência da proteína (revisado por Bommer e Thiele, 2004).

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

Em plantas, já foi demonstrado o envolvimento da TCTP no controle do crescimento mitótico, divisão celular e embriogênese (Berkowitz, Jost *et al.*, 2008; Brioudes, Thierry *et al.*, 2010). Foi demonstrado também que sua expressão é aumentada em resposta a diversos estresses abióticos como seca, salinidade, calor e frio (Liao, Li *et al.*, 2009; Qin, Gao *et al.*, 2010). Em *Arabidopsis thaliana*, a superexpressão de TCTP aumenta a resistência da planta a seca, devido ao fechamento mais rápido dos estômatos por um mecanismo envolvendo a ligação da TCTP a microtúbulos, de maneira dependente de cálcio (Kim, Han *et al.*, 2012). O envolvimento da TCTP com o controle do transporte seletivo de moléculas pelo floema em abóbora foi sugerido por Aoki *et al.* (2005), devido à ligação da TCTP com as proteínas CmPP16-1 e CmPP16-2 cujo transporte pelo floema foi regulado pela TCTP.

Em plantas de *N. benthamiana* cuja expressão de *TCTP* foi silenciada por VIGS (*Virus Induced Gene Silence*) para o gene *TCTP*, o desenvolvimento de sintomas pela infecção por PepYMV é reduzido em relação a plantas não silenciadas (Bruckner, 2010). Em plantas transgênicas de tomate silenciadas para o gene *TCTP* foi verificado um menor acúmulo de PepYMV em relação a plantas não transformadas 21 dias após a inoculação viral (Cascardo, 2011). Estes resultados indicam que o aumento da expressão da *TCTP* durante os primeiros estágios da infecção por PepYMV deve contribuir para o estabelecimento da infecção viral.

Este trabalho teve como objetivo avançar na compreensão da função do gene *TCTP* na infecção pelo PepYMV, buscando identificar os mecanismos envolvidos na indução de TCTP pelo vírus bem como proteínas que interagem com a TCTP favorecendo a infecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Alterações no padrão de expressão gênica causadas por infecções virais

Vírus são fitopatógenos de grande importância no cenário econômico mundial, causando sérias perdas em diversas culturas de importância agrônômica. Os sintomas e danos gerados são extremamente variáveis, refletindo a adaptação do vírus ao hospedeiro e a eficiência da resposta de defesa da planta (Culver e Padmanabhan, 2007). Para o estabelecimento de uma infecção eficiente, os vírus precisam suprimir ou neutralizar as respostas de defesa da planta além de manipular vias metabólicas e coordenar interações bioquímicas e intermoleculares que favorecem a infecção. Assim, durante a co-evolução entre vírus e seus hospedeiros, interações complexas foram estabelecidas envolvendo diversos mecanismos de ataque do patógeno e de defesa do hospedeiro.

O conhecimento dos mecanismos pelos quais os vírus causam doença passa pelo estudo das interações vírus-planta, uma vez que estes organismos dependem completamente da maquinaria celular para se estabelecer. Os vírus que infectam plantas possuem diferentes mecanismos para infectar o hospedeiro. As alterações no padrão de expressão gênica causadas pelas infecções virais são resultado tanto da indução de genes essenciais para o ciclo viral quanto de genes de resposta de defesa expressos no sentido de conter a infecção.

O desenvolvimento de ferramentas para a análise global da expressão gênica tem permitido a identificação de um grande número de genes envolvidos na interação vírus-planta (Senthil, Liu *et al.*, 2005; Pompe-Novak, Gruden *et al.*, 2006; Gandia, Conesa *et al.*, 2007; Yang, Guo *et al.*, 2007; Babu, Gagarinova *et al.*, 2008; Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009; Baebler, Krecic-Stres *et al.*, 2009; Naqvi, Sarwat *et al.*, 2011; Hillung, Cuevas *et al.*, 2012; Pacheco, Garcia-Marcos *et al.*, 2012). Análises globais do perfil de expressão gênica do hospedeiro em infecções por potyvírus têm fornecido informações a respeito dos mecanismos de infecção e resposta de defesa do hospedeiro (Pompe-Novak, Gruden *et al.*, 2006; Babu, Gagarinova *et al.*, 2008; Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009; Hillung, Cuevas *et al.*, 2012).

Estudos de hibridização *in situ* mostraram que a infecção de cotilédones de ervilha pelos vírus *Pea seed-borne mosaic virus*, *Pea early browning virus* (PEBV), *White Clover mosaic virus*, e *Beet curly top virus* (BCTV), induz o acúmulo do mRNA de *Hsp70*, um gene envolvido em resposta a estresses bióticos e abióticos (Escaler, Aranda *et al.*, 2000;

Aparicio, Thomas *et al.*, 2005). Este gene foi identificado como diferencialmente expresso em diversos estudos do padrão de expressão de plantas submetidas a infecções virais (Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009; Catoni, Miozzi *et al.*, 2009). (Whitham, Quan *et al.*, 2003) identificaram mudanças coordenadas na expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em resposta à infecção por diversos vírus de diferentes famílias, como o cucumovírus *Cucumber mosaic virus* (CMV), os tobamovírus *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV) e *Turnip vein clearing virus* (TVCV), o potexvírus *Potato virus X* (PVX) e o potyvírus *Turnip mosaic virus* (TuMV). 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.

Na interação *Arabidopsis-Tobacco mosaic virus* (TMV) também foram identificados genes envolvidos em respostas a estresses, como os que codificam a tiorredoxina, glutationina-S transferase e β -glucanases, além de fatores de transcrição como a proteína de ligação a DNA tipo WRKY e fatores de transcrição que respondem a etileno (Golem e Culver, 2003). A ativação transcricional de vários fatores de transcrição tipo WRKY e MYB foi observada na interação incompatível TMV-tabaco. O acúmulo do mRNA de WRKY3 (Chen e Chen, 2000) e de MYB1 (Yang e Klessig, 1996) é rapidamente induzido após a infecção pelo TMV de plantas de tabaco contendo o gene de resistência *N*.

Em plantas de tomate infectadas pelo tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), uma ampla gama de genes diferencialmente expressos foi observada em raízes e parte aérea da planta. Genes relacionados a respostas de defesa como glutathione-S-transferase, genes envolvidos no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive oxygen species*), proteínas de choque térmico, fatores transcricionais do tipo WRKY, genes envolvidos na biossíntese de poliaminas e em resposta a estresses bióticos e abióticos tiveram sua expressão alterada. O número de genes diferencialmente expressos na parte aérea foi aproximadamente o dobro do encontrado nas raízes, embora o vírus se acumule igualmente nos dois tipos de tecido. Comparando-se o padrão de expressão na raiz e parte aérea, apenas 15% dos genes foram co-regulados, e alguns sofreram alterações antagônicas. Estes resultados demonstram que a alteração no padrão de expressão genica induzida por vírus varia de acordo com os tecidos analisados (Catoni, Miozzi *et al.*, 2009).

O padrão da expressão gênica em resposta à infecção viral por *Potato virus Y* (PVY) em batatas suscetíveis a este vírus foi estudado ao longo do tempo durante a infecção. A maior alteração no padrão da expressão de genes funcionalmente distintos foi detectada em folhas infectadas sistemicamente 14 dias após a inoculação. 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, Gruden *et al.*, 2006). Em folhas de tomateiro infectadas pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) 881 genes foram identificados como diferencialmente expressos 72 horas após a inoculação e 53 tiveram a expressão diferencial confirmada por RT-PCR quantitativo ou por análises de macroarranjos. Os genes identificados possuem identidade com genes que codificam proteases, diversos fatores de transcrição, enzimas e outras proteínas envolvidas na via de ubiquitinação, proteínas de resposta a choque térmico, catalases, proteínas envolvidas em vias de transdução de sinais como cinases, calreticulinas e transdutores de sinais transmembrana. 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 (Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009).

Yang *et al.* (2007) identificaram 556 genes diferencialmente expressos durante a infecção de *Arabidopsis* por TuMV, e os níveis de alteração foram positivamente correlacionados ao acúmulo viral. Genes envolvidos em assimilação e utilização de enxofre, fotossíntese e modificação de parede celular foram reprimidos, enquanto genes envolvidos em defesa, reação de hipersensibilidade, virulência, síntese e degradação de proteínas e genes que codificam proteínas ribossomais, foram induzidos. Estes mesmos autores mostraram que a expressão dos genes que codificam as proteínas ribossomais RPL19, RPL13, RPL7 e RPS2, identificados como induzidos pela infecção viral, são requeridos para a infecção de *A. thaliana* por TuMV e TMV (Yang, Zhang *et al.*, 2009).

Estes trabalhos demonstram uma ampla gama de genes diferencialmente expressos em resposta à infecção por diferentes vírus. Alguns mecanismos gerais como a repressão de genes relacionados a metabolismo primário ou a indução de proteínas de choque térmico parecem ocorrer. No entanto, os padrões de expressão podem variar muito, sendo dependentes do sistema vírus-hospedeiro em estudo. Uma forte repressão de vários genes já foi relatada para diferentes vírus (Escaler, Aranda *et al.*, 2000; Havelda, Varallyay *et al.*, 2008; Catoni, Miozzi *et al.*, 2009), porém em potyvírus o número de genes induzidos foi

maior do que o de reprimidos nos trabalhos de Yang et al., (2007) e Alfenas-Zerbini et al.,(2009).

2.2. Interação *Potyvirus*-hospedeiro

No ciclo de infecção por *Potyvirus*, várias interações entre proteínas virais e do hospedeiro, essenciais para a infecção, já foram identificadas (Cheng, Liu *et al.*, 2008; Shen, Yan *et al.*, 2010; Lin, Luo *et al.*, 2011). Uma das redes de interações mais bem estudadas é a que envolve a interação entre a proteína VPg e o fator de iniciação da tradução eIF4E ou sua isoforma eIF(iso)4E. Essa interação é necessária para infecção em diferentes patossistemas potyvirus - hospedeiro (Wittmann, Chatel *et al.*, 1997; Léonard, Plante *et al.*, 2000). Genes de resistência recessiva naturalmente identificados em tomateiro, pimentão, alface e ervilha foram identificados como codificadores de eIF4E ou eIF(iso)4E. Estes alelos codificam proteínas com pequenas mutações próximas ao sítio de ligação de eIF(iso)4E com a VPg (revisado por Robaglia e Caranta, 2006; Maule, Caranta *et al.*, 2007). Cultivares de alface resistentes ao potyvirus *Lettuce mosaic virus* (LMV) possuem uma isoforma de eIF(iso)4E que não interage com a VPg do LMV, demonstrando que esta interação é essencial para a infectividade viral (Nicaise, German-Retana *et al.*, 2003). Mutações em genes que codificam a eIF(iso)4E em *Arabidopsis* são capazes de conferir resistência a diversos potyvirus, como TEV e TuMV (Lellis, Kasschau *et al.*, 2002).

Inicialmente, três modelos distintos foram propostos para explicar o papel fundamental da interação VPg-eIF4E (Lellis et al., 2002). O primeiro modelo propõe que eIF(iso)4E atue recrutando fatores de iniciação da tradução através da interação com a VPg, uma vez que eIF(iso)4E interage com o CAP de mRNAs. O segundo propõe que a interação possui função de estabilização do RNA viral, protegendo-o da degradação por exonucleases, função demonstrada para eIF4(iso)E em leveduras. O terceiro modelo propõe um papel na localização e transporte do RNA viral, a partir da interação com eIF(iso)4G. eIF(iso)4G é capaz de interagir com microtúbulos e sua interação com eI(iso)F4E é aumentada pela ligação da VPg.

Trabalhos recentes tem indicado um papel da VPg-eIF4E no favorecimento da tradução do RNA viral em relação aos mRNAs do hospedeiro. German-Retana *et al.* (2008) mostraram, através mutações em eIF4E que a capacidade de infecção em alface pelo LMV não está relacionada a capacidade de ligação deste fator ao CAP ou a eIF4G,

sugerindo que a função da eIF4E no ciclo dos potyvirus difere de sua função biológica em plantas saudáveis. Eskelin et al. (2011) demonstraram a capacidade da VPg do PVA de reduzir a tradução de mRNAs capeados e não capeados sem a região 5'NTR do vírus em *N. benthamiana*. Os autores sugerem que a redução da tradução do mRNA da planta e aumento da tradução do RNA viral dependem da presença de eIF4E, corroborando com a hipótese de que esta interação atua favorecendo a tradução do RNA viral em detrimento dos mRNAs da planta.

Outro fator do hospedeiro que participa deste complexo de interações é o fator de iniciação da tradução eIF4G. Esta proteína não interage diretamente com a VPg, porém a interação VPg-eIF4E aumenta a afinidade da interação eIF4E-eIF4G, levando a redução da transcrição de mRNAs capeados (Michon, Estevez *et al.*, 2006).

A proteína VPg de potyvirus interage com diversos outros fatores do hospedeiro. A interação entre a proteína PABP (*Poli(A) Binding Protein*) e a VPg do TuMV foi demonstrada *in vitro* e em *Brassica perviridis* (Léonard et al., 2004). Em *Arabidopsis*, a proteína PABP2 interage com a proteína Nib do TuMV, sendo encontrada no interior das vesículas de replicação (Dufresne et al., 2008). PABP atua na circularização de mRNAs eucariotos, aumentando sua taxa de tradução. A presença de PABP no complexo de replicação interagindo com outras proteínas deste complexo de sugere uma função de PABP relacionada à tradução ou replicação do genoma viral (Dufresne, 2008).

Recentemente foi identificado o envolvimento da porção C terminal da proteína CI de LMV na quebra de resistência em cultivares de alface contendo os alelos *mo1¹* e *mo1²*, que codificam eIF4E. Estudos de genética reversa demonstraram que a presença de uma serina no lugar de uma treonina na posição 621 do LMV, que corresponde à proteína CI, confere a capacidade de quebrar a resistência devido à ambas formas alélicas resistentes do gene *mo* (Abdul-Razzak, Guiraud *et al.*, 2009). A ocorrência de interação entre a porção C terminal da CI com a VPg e com eIF4E foi demonstrada *in vitro*. A interação ocorreu em todas as combinações CI-eIF4E, envolvendo tanto as isoformas de eIF4E dos cultivares resistentes e as isoformas da CI dos vírus capaz e incapaz de quebrar a resistência. A interação CI – eIF4E foi demonstrada *in vivo* por BiFC (Tavert-Roudet et al., 2012)

Duas possíveis proteínas com provável atividade de helicase capazes de interagir com a VPg foram identificadas recentemente. A proteína PpDDXL interage com a VPg do PPV em pêssogo (*Prunus persicae*) e seu homólogo, AtRH8 de *Arabidopsis* interage com a VPg do PPV e do TuMV. Esta interação foi demonstrada *in vitro* e *in vivo*, e é necessária

para a infecção viral uma vez que a infecção não ocorre em mutantes *knockout* de *Arabidopsis* para AtRH8. Os autores também demonstraram a co-localização de AtRH8 com as vesículas replicativas do TuMV, sugerindo um envolvimento desta proteína na replicação ou tradução do genoma viral (Huang et al., 2010).

Interações envolvendo outras proteínas virais e fatores do hospedeiro já foram demonstradas. A proteína Hsc70, uma chaperona pertencente à família Hsp70, foi purificada de plantas de *Arabidopsis* transgênicas expressando a Nib do TuMV. Esta interação foi confirmada *in vitro* e *in vivo*. Durante a infecção, Hsc70-3 co-localiza-se com a Nib e é relocada para vesículas replicativas derivadas do retículo endoplasmático, onde possivelmente se associa ao complexo replicativo e exerce sua função (Dufresne et al., 2008).

Um ensaio de duplo híbrido utilizando a proteína CP do PVY como isca identificou a interação desta proteína viral com duas proteínas DnaJ-like, NtCPIP1 e NtCPIP2. Estas interações foram confirmadas *in planta* por BiFC. Plantas superexpressando a CPIP selvagem e formas mutantes que não interagem com a CP foram utilizadas para analisar a função desta interação. A não ocorrência da interação CP-CPIP resultou na ausência de acúmulo viral, mostrando que a CPIP é um fator de susceptibilidade a PVY (Hofius et al. 2007).

Em mamão (*Carica papaya*), foi demonstrado que a HC-Pro do potyvírus *Papaya ringspot virus* interage com calreticulina, uma proteína com alta capacidade de se ligar a íons cálcio. A expressão da calreticulina é induzida nos primeiros estágios de infecção, e a interação com a HC-Pro possivelmente interfere na sinalização mediada por cálcio, que pode estar associada a respostas de defesa ou ao estabelecimento da infecção viral (Shen, Yan et al., 2010).

As proteínas P3 e P3N-PIPO dos vírus *Shallot yellow stripe virus* isolado de cebola (SYSV-O), *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Soybean mosaic virus* isolado *Pinellia* (SMV-P), e TuMV foram capazes de interagir com as subunidade maior e menor da proteína ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RubisCo) de cebola. A porção N-terminal da P3 é responsável pela interação, que possivelmente interfere na atividade desta enzima e contribui para os sintomas causados pela infecção (Lin, Luo et al., 2011).

Recentemente, foi demonstrado que a P3N-PIPO do TuMV interage com a proteína ligante de cálcio PCaP1 de *Arabidopsis*, através do domínio PIPO. A PCaP1 é uma proteína hidrofílica que se associa a membrana plasmática por meio de uma miristoilação.

Os resultados indicam um envolvimento da PCaP1 no movimento viral, uma vez que o vírus replica-se normalmente em protoplastos de plantas *knockouts* para esta proteína, porém a infecção na planta fica restrita às células inoculadas (Vijayapalani, Maeshima *et al.*, 2012).

2.3. O gênero *Potyvirus* e o *Pepper yellow mosaic virus*.

A família *Potyviridae* é uma das duas maiores e economicamente mais importantes famílias de vírus que infectam plantas (Berger, Adams *et al.*, 2005). É composta por sete gêneros: *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus* e *Brambyvirus*, que se diferenciam pelo tipo de vetor e organização genômica (King, Adams *et al.*, 2012). Os potyvírus são amplamente distribuídos em todo o mundo, infectando mais de 2.000 espécies de plantas em mais de 550 gêneros e 81 famílias. Todos os potyvírus formam inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, conhecidas como “catalentos”, 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 saudáveis pela inoculação via extrato tamponado (Shukla, Ward *et al.*, 1994; Zerbini e Zambolim, 1999).

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família, com mais de 140 espécies descritas (King, Adams *et al.*, 2012) que correspondem a cerca de 90% das espécies pertencentes à família (Gibbs e Ohshima, 2010). Em conjunto, essas espécies infectam uma ampla gama de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas em diferentes regiões climáticas, causando grandes danos econômicos em várias culturas (Urcuqui-Inchima, Maia *et al.*, 2000).

O genoma viral é constituído de uma única molécula de RNA de fita simples, uma cauda poli-A na extremidade 3' (Allison, Johnston *et al.*, 1986) e uma proteína VPg (*genome-linked viral protein*) na extremidade 5' (Riechmann, Lain *et al.*, 1989). A partícula viral é composta pelo RNA viral envolto por cerca de 2.000 cópias da proteína capsidial (CP), formando uma estrutura alongada e flexuosa de 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro (Bock e Conti, 1974; Fauquet, Mayo *et al.*, 2005; Dipiero, Rezende *et al.*, 2006). A transmissão natural de plantas infectadas para plantas saudáveis é mediada por afídeos, de maneira não persistente.

O RNA genômico apresenta duas fases abertas de leitura (*open reading frames*, ORF) sobrepostas localizadas entre duas regiões não codificadoras denominadas 5'NTR

(*Non-translated region*) e 3'NTR. A tradução da ORF maior origina uma poliproteína com massa molecular de aproximadamente 350 kDa (Allison, Johnston *et al.*, 1986). Esta sofre autoproteólise dando origem a 8-10 produtos finais (Carrington e Freed, 1990). A principal consequência desse mecanismo de expressão gênica é que todas as proteínas virais originadas a partir da clivagem da poliproteína são produzidas em quantidades equimolares, independente da necessidade do vírus para cada proteína em particular. As proteínas produzidas em excesso se acumulam na célula infectada na forma de inclusões (Riedel, Lesemann *et al.*, 1998). 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 e Zambolim, 1999).

Uma segunda ORF denominada *Pipo* (*Pretty Interesting Potyviridae ORF*) localiza-se dentro da região codificadora da proteína P3, porém em uma fase de leitura +2 em relação a da poliproteína. A tradução desta ORF provavelmente envolve uma alteração no posicionamento do ribossomo durante a tradução, e resulta em um polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 25 KDa, condizente com o esperado para uma fusão entre a porção N-terminal da proteína P3 e a proteína PIPO (Chung, B. Y., Miller, W. A. *et al.*, 2008).

As proteínas dos potyvírus são essencialmente multifuncionais, e algumas delas atuam em quase todas as etapas do ciclo de infecção viral, que envolve a expressão do genoma, replicação, movimento célula a célula, movimento sistêmico e transmissão pelo inseto vetor.

Após a entrada do vírus na célula, ocorre sua desencapsidação. O RNA viral atua como um RNA mensageiro e sua tradução é necessária para as outras etapas do ciclo viral, pois codifica todas as proteínas virais. O RNA viral não é capeado, portanto sua tradução ocorre de forma independente desta estrutura (Carrington, Freed *et al.*, 1990). Dois elementos regulatórios fundamentais para a tradução independente de CAP (*cap-independent regulatory elements*, CIREs) foram identificados na região 5'NTR do *Tobacco etch virus* (TEV), e ambos atuam em conjunto para a tradução do RNA viral (Niepel e Gallie, 1999). No caso do TEV, as regiões 5' e 3' do genoma viral, incluindo a cauda poli-A agem de forma sinérgica na regulação da tradução, ou seja, a tradução é estimulada pela presença da cauda poli-A (Gallie, Tanguay *et al.*, 1995). Existem controvérsias quanto à maneira pela qual ocorre o processo de tradução dos potyvírus. Para o *Turnip mosaic virus* (TuMV) evidências indicam que a tradução ocorre por meio de

iniciação interna (Basso, Dallaire *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* (Simón-Buela, Guo *et al.*, 1997). É possível que potyvírus distintos utilizem estratégias diferentes para a tradução do genoma, ou que ambas as estratégias sejam utilizadas em conjunto. Uma vez sintetizada, a poliproteína sofre auto-proteólise pela ação das regiões que vão gerar a P1, HC-Pro e NIa, sendo esta última a responsável pela maior parte das clivagens (Carrington e Dougherty, 1988).

A replicação viral envolve a maioria das proteínas dos potyvírus, de maneira direta ou indireta. Inicialmente, uma fita de RNA negativo é amplificada a partir da extremidade 3' do RNA viral. Esta fita negativa serve de molde para a replicação de várias fitas de RNA sentido positivo que constituem novos RNAs virais. As extremidades 5'NTR e 3'NTR são essenciais para a replicação, uma vez que possuem as sequências promotoras para a síntese de RNA viral. Estruturas secundárias presentes na região 3'NTR e na sequência codificadora da proteína capsidial do TEV são essenciais para o reconhecimento pela proteína NIb e conseqüentemente para a replicação viral (Haldeman-Cahill, Daros *et al.*, 1998; Teycheney, Aziz *et al.*, 2000).

As proteínas CI, NIa e NIb formam o núcleo replicativo. A proteína CI possui atividade de helicase, ATPase e ligação a RNA (Laín, Martín *et al.*, 1991). A proteína NIb é uma RNA polimerase dependente de RNA típica de vírus (Hong e Hunt, 1996). A proteína NIa estimula a atividade da NIb por meio de interação direta entre as duas proteínas (Fellers, Wan *et al.*, 1998). A extremidade C-terminal da NIa contém a proteína VPg que é clivada da porção protease apenas após a montagem do complexo, no início da replicação. A VPg possui uma tirosina específica que fornece a hidroxila livre para a adição de nucleotídeos, onde o RNA viral permanece covalentemente ligado. Dessa forma, a VPg atua como iniciadora da replicação (Murphy, Klein *et al.*, 1996).

O complexo de replicação é ancorado à membrana do retículo endoplasmático (RE) pela 6K2, onde se formam vesículas dentro das quais a replicação ocorre (Schaad, Jensen *et al.*, 1997). A proteína 6K2 possui um domínio hidrofóbico que interage com a membrana do retículo e induz a formação das vesículas (Restrepo-Hartwig e Carrington, 1994; Schaad, Jensen *et al.*, 1997) de maneira 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 e Wang, 2008). Vesículas induzidas pela 6K₂ contendo o complexo de replicação viral

trafegam ao longo do citoplasma de células infectadas associadas aos microfilamentos de actina que compõem o citoesqueleto. Cada vesícula carrega apenas uma cópia do genoma viral, constituindo provavelmente um único complexo de replicação (Cotton, Grangeon *et al.*, 2009).

As proteínas P1, P3 e HC-Pro participam do processo de replicação como ativadores ou reguladores. A P1 atua como fator de amplificação do genoma (Verchot e Carrington, 1995) e pode estar envolvida na infectividade e acúmulo viral (Rajamaki, Kelloniemi *et al.*, 2005). Um mutante do TEV no qual a sequência codificadora para a proteína P1 foi deletada foi capaz de se movimentar na planta, porém apresentou um nível de replicação muito inferior ao do vírus selvagem (Verchot e Carrington, 1995). Mutantes de inserção na região codificadora da proteína P3 são incapazes de se replicar em protoplastos (Klein, Klein *et al.*, 1994). A proteína P3 do *Papaya ringspot virus* interage com a membrana do retículo endoplasmático em *Arabidopsis* por meio de um domínio hidrofóbico de 19 aminoácidos, presente em sua porção C-terminal (Eiamtanasate, Juricek *et al.*, 2007). Em *N. benthamiana*, foi observada a associação da proteína P3 do TEV à membranas do retículo e do aparato de Golgi, onde a P3 foi responsável pela indução da formação de estruturas pontuadas (Cui, Wei *et al.*, 2010). A localização de P3 na membrana do retículo, à semelhança da proteína 6K₂, também foi dependente da atividade de COPI e II. O domínio hidrofóbico presente na porção C-terminal foi novamente identificado como responsável pela localização subcelular da P3, possivelmente exercendo este papel em todos os potyvírus (Cui, Wei *et al.*, 2010). Tanto a proteína P3 (Rodriguez-Cerezo, Ammar *et al.*, 1993) como P1 (Arbatova, Lehto *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, Guo *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem que as proteínas P1 e P3 estão envolvidas na replicação do RNA viral.

O papel da proteína HC-Pro durante a replicação é complexo. O processamento da proteína HC-Pro ocorre somente em *cis* e é essencial para a replicação. Mutantes que suprimem a atividade proteolítica de HC-Pro não são viáveis (Kasschau e Carrington, 1995). Mutantes para a região central da proteína apresentam capacidade proteolítica, porém exibem um fenótipo de redução da replicação viral, demonstrando que não somente a atividade proteolítica é importante para a amplificação da replicação do genoma (Kasschau, Cronin *et al.*, 1997). A afinidade da HC-Pro do *Potato virus Y* (PVY) e *Potato*

virus A (PVA) ao RNA viral foi demonstrada *in vitro* (Maia e Bernardi, 1996). A HC-Pro se liga de maneira não específica a ácidos nucleicos, preferencialmente RNA, e apresenta um motivo ribonucleoprotéico (RNP) encontrado em uma grande família de proteínas envolvidas no processamento e transporte de RNA, expressão gênica e desenvolvimento celular (Urcuqui-Inchima, Maia *et al.*, 2000).

A região do RNA viral que codifica a proteína capsidial (CP) também está envolvida na replicação viral. Mahajan *et al.* (1996) produziram uma série de mutantes nos quais foram inseridos códons de terminação prematura ao longo da CP do TEV. Mutantes com deleções nas regiões 5' e 3' da CP também foram analisados. Os autores observaram que a tradução da região do RNA viral entre os códons 138 e 189 da CP é essencial para a replicação viral e que a presença no RNA de *cis* elementos localizados entre a região codificadora dos codons 211 e 246, mas não a tradução desta região, também é necessária. A presença da proteína CP, no entanto, não é necessária para a replicação (Mahajan, Dolja *et al.*, 1996).

Os potyvírus, de maneira diferente aos outros vírus de plantas já estudados, não possuem proteína com função exclusiva no movimento célula-a-célula. Diversas proteínas já foram descritas como envolvidas no movimento célula-a-célula, incluindo CP, HC-Pro, CI, VPg e P3N-PIPO.

O movimento de vírus de plantas no hospedeiro 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 deverá se movimentar célula-a-célula por meio das conexões citoplasmáticas denominadas plasmodesmas, que permitem a continuidade do citoplasma e do sistema de endomembranas entre as células. Como o limite de exclusão passivo dos plasmodesmas em células do mesófilo é de aproximadamente 1 kDa, os vírus de plantas produzem proteínas 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).

As proteínas CP e HC-Pro possuem a capacidade de aumentar o limite de exclusão dos plasmodesmas e passar através deles, além de facilitar o movimento do RNA viral, constituindo proteínas de movimento típicas (Rojas, Zerbini *et al.*, 1997). Evidências genéticas demonstram que a função da CP do TEV no movimento célula-a-célula é independente da formação de vírions (Dolja, Haldeman *et al.*, 1994).

A proteína CI não é capaz de alterar o limite de exclusão dos plasmodesmas (Rojas, Zerbini *et al.*, 1997), porém co-localiza-se com a CP em regiões próximas ou sobre a abertura dos plasmodesmas em folhas de tabaco recém-infectadas com o TVMV e em cotilédones de ervilha infectados com o *Pea seed borne mosaic virus* (PSbMV) (Rodríguez-Cerezo, Findlay *et al.*, 1997).

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

Recentemente, foi demonstrado que a expressão da ORF PIPO é essencial ao movimento célula-a-célula do *Soybean mosaic virus* (SMV). Mutantes SMV-GUS apresentando códons de terminação prematuros na região codificadora da ORF *Pipo* e que expressam a poliproteína intacta, não tiveram a replicação do RNA genômico afetada, porém a infecção foi confinada às células iniciais. Interessantemente, o movimento não foi restaurado pela inoculação simultânea ou sequencial do vírus mutante e do tipo-selvagem (Wen e Hajimorad, 2010).

Pelo menos três proteínas virais parecem estar envolvidas no movimento a longa distância dos potyvírus: CP, HC-Pro e VPg. Mutantes do TEV-GUS apresentando deleções nas porções amino- e carboxi-terminais da CP apresentam restrições no movimento a longa distância (Dolja, Haldeman *et al.*, 1994; Dolja, Haldeman Cahill *et al.*, 1995). No caso do PSbMV, verificou-se que a substituição de uma serina na posição 47 da CP por uma prolina foi suficiente para permitir o movimento a longa distância em *Chenopodium quinoa* de um isolado normalmente restrito às folhas inoculadas (Andersen e Johansen, 1998).

O envolvimento da HC-Pro no movimento a longa distância foi demonstrado por diversos autores. Mutantes do TEV-GUS 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, Verchot *et al.*, 1995). Mutações na porção amino-terminal da HC-Pro do TVMV resultaram em ausência de movimento sistêmico do vírus (Klein, 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, Lellis *et al.*, 1997).

A transmissão pelo inseto vetor é essencial para a dispersão do vírus no campo. As proteínas CP e HC-Pro estão envolvidas neste processo. A HC-Pro é capaz de se ligar tanto a CP como a uma proteína presente no estilete do afídeo, atuando como ponte entre o vetor e o vírion (Wang, Powell *et al.*, 1998). Outra importante função da HC-Pro é a de supressora de silenciamento (Anandalakshmi, Pruss *et al.*, 1998). O silenciamento gênico é induzido como resposta de defesa de plantas a vírus. O dsRNA gerado durante replicação viral é reconhecido e clivado por proteínas da planta pertencentes à família DCL (*Dicer-Like*), gerando siRNAs (*small interference RNAs*) que são incorporados a um complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Baulcombe, 2004). O complexo RISC degrada o mRNA homólogo aos siRNAs, levando à degradação do vírus. Em contrapartida os vírus possuem supressoras de silenciamento, capazes de interferir em algum ponto desta rota impedindo o silenciamento viral e possibilitando uma infecção eficiente (Diaz-Pendon e Ding, 2008). A HC-Pro inibe o acúmulo de siRNAs de 21 nt, porém possui pouco ou nenhum efeito sobre o acúmulo dos siRNAs de 24 nt (Mallory, Reinhart *et al.*, 2002; Dunoyer, Lecellier *et al.*, 2004). Foi proposto que a HC-Pro não atue sobre a biogênese dos siRNAs (Li e Ding, 2006). A HC-Pro também é capaz de reduzir a metilação dos siRNAs virais de 21-22, responsável por aumentar a estabilidade destes siRNA na célula. A metilação dos siRNAs e miRNAs de 24nt não é afetada pela HC-Pro (Ebhardt, Thi *et al.*, 2005).

O *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) pertence ao gênero *Potyvirus* e é amplamente distribuído no Brasil. Foi encontrado inicialmente no estado de São Paulo e no Distrito Federal, infectando plantas de pimentão (*Capsicum annum*), causando mosaico amarelo e deformação foliar (Inoue-Nagata, Fonseca *et al.*, 2002). Desde então, sua ocorrência foi verificada em diferentes estados, infectando plantações de tomate e pimentão (Ávila, Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Truta, Souza *et al.*, 2004; Dianese, Resende *et al.*, 2008). Os sintomas observados em tomate incluem mosaico amarelo e deformação foliar. Em um levantamento realizado em campos de tomate em região produtora em

Taquara no Distrito Federal, 85,2% das 54 amostras coletadas estavam infectadas por PepYMV, demonstrando a alta incidência deste vírus nos campos de tomate da região (Dianese, Resende *et al.*, 2008).

Recentemente, o genoma completo do PepYMV, isolado no Distrito Federal de plantas de pimentão infectadas, foi sequenciado. A análise do genoma mostrou a organização típica de potyvírus, codificando uma poliproteína contendo a sequência de 10 peptídeos maduros e a ORF PIPO. A análise filogenética agrupou o PepYMV dentro do grupo do PVY, estando mais relacionado ao *Pepper mottle virus* (PepMoV), como comumente ocorre com potyvírus da América do Sul (Lucinda, Da Rocha *et al.*, 2012).

Com o objetivo de determinar o perfil de expressão gênica em plantas de tomateiro infectadas pelo PepYMV, foi construída uma biblioteca subtrativa a partir de folhas de tomateiro inoculadas, 72 horas após a inoculação viral. Foram identificados 881 genes como diferencialmente expressos e 53 tiveram a expressão diferencial confirmada por RT-PCR quantitativo ou por análises de macroarranjos (Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009). Dentre os genes identificados, foi demonstrado que ocorre um aumento no acúmulo do mRNA que codifica a *Translationally controlled tumor protein* (TCTP) (Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009), uma proteína envolvida na regulação de diversos processos celulares. Entretanto o papel da TCTP na infecção pelo PepYMV permanece indeterminado.

2.4. *Translationally controlled tumor protein* (TCTP)

A família de proteínas TCTP é amplamente distribuída e conservada entre os eucariotos (Bommer e Thiele, 2004). Ela foi isolada inicialmente de células tumorais de humanos (Chitpatima, Makrides *et al.*, 1988) e está envolvida na regulação de diversos processos celulares importantes como crescimento celular, progressão do ciclo celular e proteção das células contra diferentes condições de estresse e apoptose (Bommer e Thiele, 2004). O gene codificador da TCTP é regulado em nível pós-transcricional, tendo sido relatada a ocorrência de transcritos do gene e ausência da proteína (revisado por Bommer e Thiele, 2004).

Diversos homólogos de TCTP têm sido clonados e caracterizados para um número cada vez maior de organismos (Wang, Zhao *et al.*, 2009; Yubero, Estes *et al.*, 2009; Li, Qiu *et al.*, 2010; Nakkaew, Chotigeat *et al.*, 2010; Qin, Gao *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.

Em *Arabidopsis thaliana*, TCTP é um importante regulador de crescimento e seu *knockout* resultou em profundas alterações fenotípicas. Linhagens carregando inserções de T-DNA no alelo TCTP apresentaram forte redução no crescimento do tubo polínico enquanto linhagens onde a expressão de TCTP foi silenciada por RNA de interferência apresentaram tamanho reduzido em consequência da redução do tamanho celular (Berkowitz, Jost *et al.*, 2008). Em outra linhagem de plantas de *A. thaliana knockout* para a expressão de TCTP, foi observado uma redução no número de células nos tecidos, porém a capacidade de crescimento das células não foi afetada (Brioudes, Thierry *et al.*, 2010). Em plantas transgênicas de dendezeiro (*Elaeis guineenses*) superexpressando TCTP o crescimento dos calos transformados foi maior devido ao aumento do número de células, e não do tamanho celular (Nakkaew, Chotigeat *et al.*, 2010). Em *Drosophila melanogaster*, tanto a divisão celular quanto o crescimento das células são afetados pela redução da expressão de TCTP (Hsu, Chern *et al.*, 2007). Experimentos de complementação interespecífica demonstraram que a TCTP de *Drosophila* é capaz de restaurar o fenótipo de *A. thaliana knockout* para o gene TCTP, tornando-as capazes de se dividir normalmente. A expressão da TCTP de *A. thaliana* em *D. melanogaster* é capaz de restaurar a divisão celular normal, porém não o crescimento celular. Estes resultados demonstram que embora existam diferenças entre as TCTP de plantas e animais, ela atua como um regulador conservado do crescimento mitótico que, em plantas, desacopla o crescimento e a divisão celular (Brioudes, Thierry *et al.*, 2010).

Em arroz (*Oriza sativa*) foi observada a superexpressão da TCTP após a exposição das raízes a alumínio (Ermolayev, Weschke *et al.*, 2003) e após tratamento com uma glicoproteína elicitora isolada do fungo *Magnaporthe grisea*, demonstrando provável atuação na resposta a estresses (Liao, Hu *et al.*, 2009). Em pinhão manso (*Jatropha curcas*) foi demonstrado que os níveis de TCTP são maiores no caule da planta e que a expressão de TCTP está relacionada à formação do embrião. Os níveis de TCTP em pinhão manso também são alterados devido a estresses ambientais, aumentando em raízes expostas a calor e salinidade, em caules submetidos à alta salinidade e em folhas tratadas com ethephon, um regulador de crescimento que atua de forma sistêmica, utilizado para indução do amadurecimento de frutos (Qin, Gao *et al.*, 2010). Plantas de *A. thaliana* superexpressando TCTP apresentaram maior resistência a estresse hídrico, devido ao fechamento mais rápido dos estômatos em resposta a ácido abscísico (ABA) em um mecanismo envolvendo a ligação da TCTP a microtúbulos de maneira dependente de

cálcio. Os autores sugerem que a TCTP esteja envolvida em respostas mediadas por ABA (Kim, Han *et al.*, 2012).

Cao *et al.* (2010) mostraram o envolvimento da TCTP na resposta a diferentes estresses. Plantas transgênicas de couve (*Brassica oleraceae*) silenciadas para TCTP apresentaram um crescimento mais lento e maior susceptibilidade a frio, calor e altas concentrações de sal, condições que induzem a expressão de TCTP em plantas selvagens.

O papel de TCTP em condições de estresses bióticos também tem sido avaliado em diferentes organismos. 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 pelo vírus *White spot syndrome virus* (WSSV) (Tonganunt, Nupan *et al.*, 2008). 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% e apresentaram 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, Nupan *et al.*, 2008). Em bovinos, um menor nível de expressão de TCTP foi associado a maior resistência a infecções causadas pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que ocorre em *Bos indicus* em relação a *Bos taurus* (Nascimento, Machado *et al.*, 2010).

Estudos de controle do transporte de macromoléculas pelo floema de abóbora mostraram 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, Suzui *et al.*, 2005). A saída seletiva de macromoléculas dos elementos de tubo crivado já foi relatada para RNA (Foster, Lough *et al.*, 2002; Zhu, Qi *et al.*, 2002) e para proteínas de movimento viral (Itaya, Ma *et al.*, 2002). Desta forma, é razoável propor que TCTP possa estar envolvida no processo de controle de saída seletivo do floema destas macromoléculas, regulando o transporte viral.

Além disso, foi demonstrado em mamíferos que TCTP interage com os fatores de alongação da tradução eEF1A e eEF1B diminuindo a taxa de síntese proteica (Cans, Passer *et al.*, 2003). Considerando que infecção por potyvírus também diminui a taxa de síntese de proteínas do hospedeiro, é possível que essa diminuição seja mediada por TCTP.

Em plantas de *N. benthamiana* silenciadas por VIGS (*Virus Induced Gene Silence* – silenciamento gênico induzido por vírus) para o gene TCTP, o desenvolvimento de sintomas pela infecção por PepYMV é reduzido em relação a plantas não silenciadas (Bruckner, 2010). Em plantas transgênicas de tomate silenciadas para o gene TCTP foi verificado um menor acúmulo de PepYMV em relação a plantas não transformadas aos 21 dias após a inoculação viral (Cascardo, 2011). Estes resultados indicam que o aumento da expressão da TCTP durante os primeiros estágios da infecção por PepYMV deve contribuir para o estabelecimento da infecção viral, entretanto o mecanismo permanece indeterminado.

2.5. Silenciamento gênico induzido por vírus (*VIGS – Virus Induced Gene Silence*)

O silenciamento gênico pós-transcricional é um processo que ocorre em todos os eucariotos, como forma de regulação da expressão gênica e como resposta de defesa a vírus e transposons (Baulcombe, 2004). É induzido pela formação de um RNA de fita dupla (dsRNA), que é reconhecido e clivado por enzimas com atividade de RNase III chamadas Dicer em animais e DCL (*Dicer-like*) em plantas, gerando pequenos RNAs de 21 a 25nt (Park, Cosgrove *et al.*, 2002; Tang, Reinhart *et al.*, 2003). Os pequenos RNAs são incorporados em um complexo de silenciamento denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), que degrada o RNA homólogo ao RNA incorporado (Tang, 2005). Intermediários de replicação formando estruturas de dsRNA são gerados durante o ciclo de diversos vírus, levando a degradação de RNAs virais por meio do silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS). Sendo assim, os vírus codificam proteínas capazes de suprimir o silenciamento, possibilitando o estabelecimento da infecção em hospedeiros compatíveis (Diaz-Pendon e Ding, 2008).

Em plantas, VIGS tem sido utilizado como ferramenta para estudos funcionais de genes envolvidos em diversos processos (Waterhouse e Helliwell, 2003; Burch-Smith, Schiff *et al.*, 2006; Becker e Lange, 2010). Devido à facilidade do uso de VIGS diversos vírus foram atenuados e modificados para o desenvolvimento de vetores virais para o silenciamento de espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas (Kumagai, Donson *et al.*, 1995; Kjemtrup, Sampson *et al.*, 1998; Ruiz, Voinnet *et al.*, 1998; Ratcliff, Hernandez Martin *et al.*, 2001; Liu, Schiff, Marathe *et al.*, 2002; Bruun-Rasmussen, Moller *et al.*, 2007; Igarashi, Yamagata *et al.*, 2009; Kurth, Peremyslov *et al.*, 2012). Fragmentos de cerca de 400nt, correspondentes a sequência codificadora parcial do gene que se deseja

silenciar, são clonados no vetor viral para a indução de silenciamento. Após a inoculação do vetor, este se replica e infecta a planta. A infecção da planta pelo vetor viral dispara o silenciamento, levando ao reconhecimento e clivagem do vetor viral pelas DCL e consequente produção de siRNAs (*small interference RNAs*) correspondentes ao vetor e ao gene clonado nele. Os siRNAs gerados direcionam o silenciamento dos mRNAs homólogos a eles e a consequência é o silenciamento tanto do vetor quanto do gene endógeno da planta. Esta técnica é capaz de reduzir drasticamente os níveis de genes endógenos na planta, no entanto a ausência completa da expressão não ocorre (Angell e Baulcombe, 1999).

O *Tobacco rattle virus* (TRV) (Ratcliff, Hernandez Martin *et al.*, 2001; Liu, Schiff, Marathe *et al.*, 2002) é o vetor de silenciamento mais utilizado devido à baixa severidade dos sintomas induzidos pelo vetor viral, à capacidade de infectar grandes áreas adjacentes à célula inicialmente infectada e de silenciar a expressão de genes em diferentes pontos de crescimento (Ratcliff, Hernandez Martin *et al.*, 2001). Seu genoma é composto por dois RNAs de fita simples sentido positivo, RNA1 e RNA2. O vetor descrito por Liu *et al.* (2002) consiste em um clone infeccioso do TRV precedido de um promotor 35S duplicado e contendo um terminador NOS. O sítio múltiplo de clonagem está inserido no RNA2 do TRV, do qual foram retiradas as proteínas 2b e 2c, necessárias para a transmissão por nematóides e dispensáveis para a infecção. Cada clone infeccioso está inserido em um T-DNA de *A. tumefaciens*. O TRV é eficaz no silenciamento de genes de uma ampla gama de hospedeiros, como *Arabidopsis thaliana* (Burch-Smith, Schiff *et al.*, 2006), tomate (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) (Liu, Schiff e Dinesh-Kumar, 2002), *N. benthamiana* (Ratcliff, Hernandez Martin *et al.*, 2001) e pimentão (*Capsicum annum*) (Chung, Seong *et al.*, 2004). Em experimentos anteriores foi observado que a infecção pelo vetor TRV vazio causa sintomas mais severos do que a infecção pelo vetor TRV com um fragmento clonado (Bruckner 2010). Wu *et al.* (2011) relataram que a clonagem de fragmentos no vetor reduz os sintomas gerados, sendo 400 nt o tamanho ótimo para o fragmento clonado.

Vetores virais desenvolvidos recentemente como o *Apple latent spherical virus* (ALSV) (Igarashi, Yamagata *et al.*, 2009), capaz de infectar plantas de soja (*Glycine max*), o *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) (Bruun-Rasmussen, Moller *et al.*, 2007), capaz de infectar várias monocotiledôneas de importância, como aveia (*Avena sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), cevada (*Hordeum vulgare*) e arroz e o *Grapevine leafroll-associated*

70 virus-2 (GLRaV-2) (Kurth, Peremyslov *et al.*, 2012), capaz de infectar videiras (*Vitis vinífera*) estão permitindo a ampliação do uso desta técnica em diversas espécies vegetais.

Entre as vantagens do uso de VIGS em relação à transformação gênica, se destacam a maior rapidez e a possibilidade de análise de genes em larga escala, além de poder ser aplicada seletivamente em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. De fato, a indução de VIGS tem sido amplamente utilizada em estudos de análise funcional de genes (Ahn, Kim *et al.*, 2004; Kim, Lim *et al.*, 2007; Yang, Zhang *et al.*, 2009; Komatsu, Hashimoto *et al.*, 2010).

O silenciamento de grande parte dos genes estudados não gera alterações morfológicas evidentes nas plantas. Diferentes genes repórteres são utilizados para a comprovação do silenciamento, entre eles, o gene que codifica a fitoeno desaturase (PDS – *Phytoene Desaturase*) é o mais utilizado. A fitoeno desaturase é uma enzima da via biossintética de carotenóides que protegem a clorofila de oxidação pela exposição à luz (Kumagai, Donson *et al.*, 1995), de forma que o silenciamento do gene PDS gera regiões esbranquiçadas que podem atingir a folha inteira, sendo facilmente visualizadas (Becker e Lange, 2010). Outro gene comumente utilizado é o ChII, que codifica subunidade I da magnésio quelatase. O fenótipo gerado pelo seu silenciamento é o amarelecimento devido à perda da clorofila (Tuttle, Idris *et al.*, 2008).

O papel de proteases dependente de cálcio na organogênese de *N. benthamiana* foi comprovado por meio de VIGS utilizando-se um vetor viral baseado no TRV (Ahn, Kim *et al.*, 2004). O papel dos genes SGT1 e RAR1, requeridos para hipersensibilidade na necrose sistêmica gerada pelo *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) em *N. benthamiana* também foi demonstrado pela utilização de VIGS (Komatsu, Hashimoto *et al.*, 2010). Yang *et al.*, (2009) demonstraram por meio de VIGS o papel das proteínas ribossomais RPS2, RPS6, RPL7, RPL13 e RPL19 na infecção de *N. benthamiana* pelos vírus *Turnip mosaic virus* (TuMV), TMV e *Tomato bushy stunt virus* (TBSV).

A função de genes envolvidos em diferentes respostas de defesa também foi comprovada por VIGS. Silenciando um ortólogo de EDS1 por meio do vetor TRV em *N. benthamiana*, mostrou-se que EDS1 é requerido para a resistência mediada pelo gene *N*, que confere resistência ao TMV, mas não é requerida para a resistência mediada por outros dois genes, *Pto* e *Rx*, que conferem resistência a *Pseudomonas syringae* e PVX, respectivamente (Peart, Cook *et al.*, 2002). O envolvimento de componentes da via de sinalização MAP cinase e de fatores de transcrição na resistência a TMV mediada pelo

gene *N* foi determinado utilizando-se VIGS induzido pelo vetor TRV. O silenciamento de MEK1/NQK1 e de NTF6/NRK1, dois genes envolvidos na sinalização dependente de MAP cinase, e dos fatores de transcrição WRKY1-WRKY3 e MYB1, atenua a resistência ao TMV mediada pelo gene *N* (Liu, Schiff *et al.*, 2004). Recentemente foi demonstrado o papel de uma proteína do hospedeiro, a fibrilarina, na interação *Umbravirus-Nicotiana benthamiana* por meio de VIGS induzido pelo vetor viral TRV. Em plantas silenciadas para a fibrilarina, o movimento sistêmico do vírus foi inibido e a replicação viral no sítio inicial de infecção não foi afetada, mostrando que para esse grupo de vírus a fibrilarina é essencial para o movimento de longa distância (Kim, Macfarlane *et al.*, 2007). Dezoito genes envolvidos na infecção de *N. benthamiana* pelo geminivírus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) foram identificados por VIGS, sendo 7 potencialmente envolvidos em respostas de defesa da planta e 11 necessários para o estabelecimento da infecção viral (Lozano-Duran, Rosas-Diaz *et al.*, 2011).

2.6. Ferramentas para estudo de interação proteína-proteína

A elucidação do papel de fatores do hospedeiro na infecção viral e do mecanismo exato pelo qual estes participam do ciclo de infecção passa pela identificação de interações específicas entre fatores virais e do hospedeiro e pela comprovação da funcionalidade destas interações.

As interações proteína-proteína são essenciais para diversos processos biológicos que ocorrem nas células. Estas interações podem ser estáveis ou transientes, ocorrer entre duas proteínas de forma direta ou indireta, envolvendo a formação de complexos proteicos. Várias enzimas envolvidas em processos básicos do metabolismo atuam em complexos. Diversas técnicas têm sido utilizadas para a identificação de interações proteína-proteína envolvidas em diferentes processos biológicos. As técnicas de “high-throughput” permitem a busca massiva por interações específicas com uma dada proteína. Entre estas técnicas, destacam-se o ensaio de duplo híbrido e os ensaios de purificação por afinidade, associada à espectrometria de massas.

O ensaio de duplo híbrido foi desenvolvido por (Fields e Song, 1989) e desde então tem sido amplamente utilizado. O método baseia-se na fusão de uma das proteínas em estudo com o domínio de ativação e da outra proteína com o domínio de ligação ao DNA, de um mesmo fator de transcrição. A interação física entre as duas proteínas em estudo leva à interação entre os domínios do fator de transcrição, que se torna funcional ativando

um gene repórter. Em geral, os domínios de ativação e de ligação ao DNA do fator de transcrição Gal4 de leveduras são utilizados (Sobhanifar, 2003), porém outros fatores transcripcionais como o LexA também podem ser utilizados (Van Criekinge e Beyaert, 1999). Em geral, mais de um gene repórter está presente no mesmo plasmídeo, permitindo a confirmação da interação pela expressão de ambos. Uma série de genes repórteres da interação codificam enzimas da biossíntese de aminoácidos que estão ausentes na estirpe de levedura utilizada e cuja expressão reverte um fenótipo de auxotrofia. Genes envolvidos na biossíntese de histidina, uracila e adenina são comumente utilizados. O gene que codifica a β -galactosidase também é utilizado como gene repórter da interação, e sua expressão permite a quantificação da força de interação por meio de ensaios de atividade da enzima (Van Criekinge e Beyaert, 1999).

A técnica de duplo-híbrido permite a verificação de interação de uma proteína específica com uma biblioteca de cDNA por meio de *screening*. Ela é capaz de identificar interações entre duas proteínas, porém não permite a identificação de interações que envolvem mais de uma proteína ou de interações indiretas por meio da formação de complexos protéicos (Lalonde, Ehrhardt *et al.*, 2008).

Um grande número de interações proteína-proteína em diversos organismos já foram identificadas por ensaios de duplo-híbrido (Suter, Auerbach *et al.*, 2006). Entre as vantagens desta técnica estão a facilidade e rapidez dos ensaios, bem como o não requerimento da expressão prévia de grandes quantidades de proteína *in vitro* e a detecção de interações fracas entre as proteínas. As interações são analisadas *in vivo* em um modelo eucarioto (Sobhanifar, 2003). Uma vantagem interessante do duplo-híbrido é a possibilidade de se medir a força das interações pela atividade da enzima β -galactosidase ou pela adição de quantidades crescentes de 3-aminotriazol (3AT), um inibidor competitivo da enzima HIS3 (Vidal, Braun *et al.*, 1996). Os ensaios de duplo-híbrido também permitem uma análise funcional de interações já identificadas pela inserção de mutações nas proteínas, identificando assim domínios e resíduos essenciais para a interação (Waters, Scriver *et al.*, 2001; Sanchez-Duran, Dallas *et al.*).

A técnica é facilmente aplicada e permite a análise rápida de uma série de interações *in vivo*. No entanto existem algumas limitações. Falso-negativos são comumente encontrados quando proteínas de membrana são analisadas. A inserção da proteína em membranas pode impedir que o fator de transcrição chegue ao núcleo, onde o gene repórter é ativado (Lalonde, Ehrhardt *et al.*, 2008). Em algumas proteínas, alterações

pós-traducionais que ocorrem na célula de origem não ocorrem em leveduras, e são essenciais para a interação (Fields e Sternglanz, 1994). Falso-positivos também podem ocorrer quando uma das proteínas em estudo é capaz de ativar sozinha a transcrição do gene repórter, ou quando mutações ocorridas na levedura levam à sobreposição da auxotrofia. Em outros casos, a superexpressão das proteínas pode levar a ocorrência de interações que não ocorrem no organismo, onde estas proteínas se encontram em baixas concentrações. A localização sub-celular das proteínas também pode fazer com que interações positivas encontradas em um ensaio de duplo-híbrido não ocorram devido a não ocorrência destas proteínas no mesmo compartimento na célula (Revisado por Sobhanifar, 2003).

As técnicas de purificação por afinidade podem ser realizadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. São capazes de identificar diversas proteínas que interagem formando complexos protéicos, por meio da espectrometria de massas. Uma das limitações destas técnicas é que durante a obtenção dos extratos protéicos, proteínas que estavam compartimentalizadas em diferentes organelas celulares se misturam, podendo formar interações que não ocorrem no organismo em estudo (Lalonde, Ehrhardt *et al.*, 2008).

A técnica de purificação por afinidade em tandem (TAP – *Tandem affinity purification*) tem sido utilizada para isolar complexos protéicos de células de leveduras (Gavin, Bosche *et al.*, 2002), insetos (Forler, Kocher *et al.*, 2003), humanos (Gingras, Aebersold *et al.*, 2005) e plantas (Rohila, Chen *et al.*, 2004; Rubio, Martinez-Gomez *et al.*, 2005; Rohila, Chen *et al.*, 2006). Nesta técnica, a proteína alvo é expressa fusionada a uma etiqueta composta por um domínio da proteína A de *Staphylococcus aureus*, um sítio de clivagem da protease do TEV e um domínio de ligação a calmodulina (CBP - *calmodulin-binding protein*) (Rigaut, Shevchenko *et al.*, 1999). Os complexos protéicos são purificados em duas etapas seguidas de cromatografia de afinidade, visando aumentar a especificidade das ligações. Inicialmente, a proteína A se liga a Sepharose IgG e os complexos são liberados da coluna pela clivagem pela protease do TEV. Uma nova etapa de purificação ocorre pela ligação de CBP a calmodulina, com posterior eluição das proteínas utilizando-se EGTA.

Rohila *et al.*, (2006) expressaram 41 cinases etiquetadas em arroz, e purificaram complexos protéicos interagindo com 23 delas. Em um estudo visando identificar interações entre a Nib do TuMV e proteínas de *A. thaliana*, a expressão da Nib fusionada a

TAP mostrou que esta interage com as proteínas Hsp70 e PABP2, sendo estas interações essenciais para a infecção viral (Dufresne, Thivierge *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolado Viral e inoculação mecânica

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 0,1% de bissulfito de sódio. As plantas infectadas são mantidas em casa de vegetação.

3.2. Material vegetal

Plantas de *N. benthamiana*, foram germinadas e, após aproximadamente 15 dias, transferidas para câmara de crescimento com temperatura (22 °C) e fotoperíodo (14 h) controlados. As plantas foram mantidas nestas condições por pelo menos cinco dias antes da agroinfiltração.

3.3. Silenciamento do gene *TCTP*

Para a indução de silenciamento de *TCTP*, um fragmento de aproximadamente 400 nt do gene foi amplificado por PCR a partir de cDNA de tomate e clonado no RNA2 do vetor viral TRV descrito por Liu et. al. (2002), gerando a construção TRV2-*TCTP* (Bruckner, 2010). Duas construções foram usadas como controle. A primeira, utilizada como controle fenotípico do silenciamento, consiste em um fragmento de 400 nt do gene *PDS* clonado no RNA2 do TRV, gerando a construção TRV2-*PDS* (Bruckner, 2010). Como controle do experimento, uma sequência de 400 nt do gene *GFP* foi clonada no RNA2 do TRV, utilizando os primers *GFP F EcoRI* (5' GAA TTC ATG GTG AGC AAG GGC G 3') e *GFP R EcoRI* (5' CCT TGA ATT CGA TGC CCT TCA GCT C 3'), gerando a construção TRV2-*GFP*. O *GFP* constitui um gene exógeno e esta construção tem como objetivo a observação de eventuais sintomas gerados pelo vetor viral interrompido por um fragmento de DNA que não induz silenciamento.

Os plasmídeos recombinantes foram inicialmente transformados em *E. coli* DH5 α pelo método do choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). Em seguida, foram transformados em *A. tumefaciens* estirpe C58C1 pelo método do choque térmico descrito por (Brasileiro e Carneiro, 1998).

Para indução do silenciamento gênico, culturas de agrobactéria, estirpe C58C1, transformadas cada uma das construções foram cultivadas em meio LB com antibióticos apropriados até atingir a OD₆₀₀ de 0,6. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm e resuspendidas em tampão de agroinfiltração (MES 10mM, MgCl₂ 10mM e acetoseringona 200μM), ajustando-se a OD₆₀₀ para 1,2. Cada suspensão de agrobactéria transformada com as diferentes construções clonadas no RNA2 do TRV foi misturada com igual volume de uma suspensão de agrobactérias transformadas com o RNA1 do TRV (TRV-RNA1). As misturas foram agroinfiltradas na face abaxial de folhas de *N. benthamiana*, cultivadas conforme descrito no item 1.2, utilizando-se seringas estéreis sem agulha. Dez plantas foram agroinfiltradas com a mistura entre TRV-RNA1 e TRV2-TCTP, seis com a mistura entre TRV-RNA1 e TRV2-PDS e seis com a mistura entre TRV-RNA1 e TRV2-GFP. Seis plantas não foram agroinfiltradas e seis foram agroinfiltradas somente com agrobactérias não transformadas.

Após o aparecimento e estabelecimento do fenótipo de foto-oxidação que evidencia o silenciamento do gene PDS (aproximadamente duas semanas após a agroinfiltração), as plantas foram inoculadas mecanicamente com o PepYMV, conforme descrito no item 1.1. Em cada tratamento foram mantidas três plantas não inoculadas, utilizadas como controles. Imediatamente antes da inoculação viral, discos foliares de 1,5 cm foram coletados em folhas jovens de todas as plantas e utilizados para análise do silenciamento antes da inoculação viral. Setenta e duas horas após a inoculação viral (72 hpvi), foram coletados discos foliares adjacentes aos coletados anteriormente. Para avaliar o efeito do silenciamento na infecção sistêmica, folhas jovens de todas as plantas foram coletadas 14 dias após a inoculação viral (14 hpvi). Todo material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

3.4. Expressão transiente de proteínas virais em *N. benthamiana*

Para expressão transiente das proteínas virais em plantas, a sequência codificadora de cada uma das proteínas virais foi clonada em pK7WG2 (Karimi, et al 2002), gerando as construções pK7WG2-P1, pK7WG2-HC-Pro, pK7WG2-P3, pK7WG2-6K1, pK7WG2-CI, pK7WG2-6K2, pK7WG2-NIa, pK7WG2-NIb, pK7WG2-CP, pK7WG2-Pipo (Cascardo 2011).

Células de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101, foram transformadas com cada uma das construções conforme descrito no item 1.3. As culturas de *A. tumefaciens*

transformadas foram cultivadas em meio LB com antibióticos apropriados até atingirem a OD₆₀₀ de 0,6. Posteriormente, células foram centrifugadas a 10.000 rpm e resuspendidas no tampão de agroinfiltração descrito no item 1.3, ajustando-se OD₆₀₀ para 0,1. As culturas foram agroinfiltradas na face abaxial das folhas de *N. benthamiana*, conforme descrito no item 1.2. Cada proteína foi expressa em três plantas diferentes. Em cada planta, foram escolhidas duas folhas similares em tamanho e posição. Uma delas foi agroinfiltrada para a expressão de uma única proteína e a outra coletada antes da agroinfiltração, sendo utilizada para neutralizar eventuais diferenças na expressão inicial de TCTP entre as plantas. Como controles, três plantas foram agroinfiltradas com *A. tumefaciens* GV3101 transformada apenas com pK7WG2, três não foram agroinfiltradas e três foram inoculadas mecanicamente com PepYMV. As folhas agroinfiltradas ou inoculadas com o PepYMV foram coletadas 72 horas após a agroinfiltração. Todo material coletado foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

A expressão de proteínas virais e a infecção pelo PepYMV em folhas de *N. benthamiana* foram confirmadas por RT-PCR convencional, utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para cada uma das proteínas virais descrito por Cascardo (2011) e a enzima GoTaq (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.5. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), conforme as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) e sua qualidade foi verificada pela razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0%. Um micrograma de RNA total foi tratado com duas unidades da enzima DNase I (Promega). O RNA tratado foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando-se Oligo(dT), e a transcriptase reversa Super Script III (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. RT-PCR quantitativo

A expressão de TCTP nos experimentos de VIGS e de expressão das proteínas virais foi quantificada por qRT-PCR, utilizando-se o método comparativo de Ct ($\Delta\Delta\text{CT}$), descrito por Livak and Schmittgen (2001). Os oligonucleotídeos qTCTPNb F (5' TAC AAG GAT GGT GCA ACT GAT CC 3') e qTCTPNb R (5' CTA GCA CTT GAC CTC CTT CAA GC 3'), específicos para a TCTP de *N. benthamiana* foram desenhados a partir de sequência específica (TC23446) depositada no Gene Index Project (The Gene Index Databases, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA 02115 (URL: <http://www.danafarber.org/>) [acessada em 01/2011]). Para normalizar a reação, os oligonucleotídeos específicos para o gene que codifica a histona 2b (H2b) de *N. benthamiana* H2b2 F (5'GAGAAGCTGGCTCAGGAATC 3') e H2b2 R (5' CACAAGCCTCACAGCAGTCT 3') foram desenhados a partir da sequência completa de cDNA depositada no GenBank (EF189156.1). Para quantificar o acúmulo relativo do TRV, os oligonucleotídeos qTRV2a F (5' TGCAGTGGCGGGTGTTACAA 3') e qTRV2a R (5' GTCGAGCCAGTGTTTCGCCTT 3') foram desenhados para amplificar um fragmento do RNA2 do TRV, a partir da sequência completa depositada no GenBank (AF406991). Todos os oligonucleotídeos para qRT-PCR foram desenhados utilizando-se o programa GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design (GenScript USA Inc.) disponível em <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>. A amplificação de um único fragmento foi checada por eletroforese em gel de poliacrilamida (8,0%) e por análise da curva de dissociação. A eficiência de reação de cada par de oligonucleotídeos foi determinada conforme descrito por Pfaffl, (2001) e Vandesompele, De Preter *et al.* (2002), sendo de aproximadamente 100% para todos pares utilizados.

A carga viral do PepYMV foi determinada por quantificação absoluta, utilizando oligonucleotídeos específicos descritos por (Bruckner, 2010). Uma curva padrão foi obtida por regressão dos valores de Ct, usando 3×10^0 a 3×10^6 cópias de um plasmídeo contendo sequência codificadora da proteína CP do PepYMV. A carga viral foi determinada por interpolação, na curva padrão, dos valores de Ct de cada amostra analisada (Rutledge e Cote, 2003).

Todas as reações foram feitas em triplicata, no termociclador CFX96 Real-Time System (Bio-Rad), utilizando o reagente “Fast SYBR Green Master Mix” (Applied Biosystems) em um volume final de 10 μL por reação. Em cada reação foram utilizados

400 ng de cDNA para quantificação relativa e 12 ng de cDNA para a quantificação absoluta.

3.7. Ensaio de duplo-híbrido

Para avaliar a ocorrência de interações entre as proteínas virais e a TCTP, foi realizado um ensaio de duplo híbrido em leveduras. Para expressão em leveduras, as sequências codificadoras das proteínas virais e da TCTP foram previamente clonadas no vetor de entrada pENTR11 (Invitrogen) por Cascardo (2011) e transferidas para os vetores adequados utilizando a enzima LR clonase (invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A TCTP foi clonada em pDEST32 (Invitrogen) e as proteínas do PepYMV em pDEST22 (Invitrogen), gerando as construções pDEST32-TCTP, pDEST22-P1, pDEST22-HC-Pro, pDEST22-P3, pDEST22-6K1, pDEST22-CI, pDEST22-6K2, pDEST22-NIa, pDEST22-NIb, pDEST22-CP e pDEST22-Pipo. O controle positivo, pDEST32-NIG foi gentilmente cedido pela Profa. Dra Elizabeth Fontes - Laboratório de Biologia Molecular de Plantas/BIOAGRO/UFV. A proteína NIG foi utilizada como controle positivo, devido a sua capacidade de transativar o promotor reconhecido por Gal4 independente da ocorrência de interação.

As construções pDEST32-TCTP, pDEST-NIG e pDEST32 foram transformadas em *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4_, LYS2::GAL1 UAS-GAL1TATAHIS3, MEL1GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ) usando o método do acetato de lítio (Geitz & Woods, 1993).

Os transformantes foram selecionados em meio SD sem leucina e os transformantes para pDEST32-TCTP foram confirmados por PCR. Leveduras transformadas com pDEST-32-TCTP foram co-transformadas com as construções pDEST22, pDEST22-P1, pDEST22-HC-Pro, pDEST22-P3, pDEST22-6K1, pDEST22-CI, pDEST22-6K2, pDEST22-NIa, pDEST22-NIb, pDEST22-CP e pDEST22-Pipo. Leveduras transformadas com pDEST32 e com pDEST32-NIG foram transformadas somente com pDEST22 e utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Os co-transformantes foram selecionados em meio SD sem leucina e triptofano, e confirmados por PCR utilizando primers específicos descritos por Cascardo (2011). Interações entre proteínas virais e a TCTP foram analisadas pelo crescimento em meio SD sem leucina, triptofano e histidina.

3.8. Identificação *in vitro* de proteínas que interagem com a TCTP durante a infecção.

Para expressão *in vitro* da TCTP de tomate, foi utilizado o plasmídeo pRSET-TCTP, que contém a sequência codificadora da TCTP fusionada a uma cauda de histidina (Alfenas-Zerbini, dados não publicados). O clone pRSET-TCTP foi utilizado para expressar a TCTP fusionada a uma cauda de histidina em *E. coli* BL21::DE3. A proteína foi extraída em tampão de ressuspensão (fosfato de sódio 50 mM pH8,0, NaCl 300 mM, EDTA 0,5 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, Tween 20 0,1% e glicerol 10%) por sonicações sucessivas. A suspensão foi centrifugada por 30 minutos a 30.000g e o sobrenadante foi utilizado para a purificação. A TCTP foi purificada por meio da ligação da cauda de histidina com a resina Ni⁺NTA (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, a proteína foi dialisada em tampão renaturante (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10%, DTT 1mM e PSMF 1mM) e adicionada novamente a uma coluna de cromatografia carregada com resina Ni⁺NTA. Um grama de folhas de *N. benthamiana* foi macerado em nitrogênio líquido e as proteínas totais foram extraídas com 10 ml do tampão de extração descrito por Rohila et al (2004), porém sem IGEPAL (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 2,5 mM, benzamida 2 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, NaF 20 mM, fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF) 1mM, coquetel de protease (Sigma) 1%, leupeptina (Sigma) 10 μ M e 3,4-dichloroisocoumarina (Sigma) 10 μ M). O extrato foi adicionado a uma coluna carregada previamente com a TCTP-His ligada à resina Ni⁺NTA, para a ligação de proteínas da planta que possivelmente interajam com a TCTP. Após lavagens com tampão Na₂HCO₃ 0,1 M pH 9,0, os complexos proteicos foram eluídos com 3mL de imidazol 250mM em Na₂HCO₃ 0,1M pH9,0, recolhendo-se alíquotas de 0,5 mL. A presença de proteínas nas diferentes frações foi verificada por eletroforese em gel SDS PAGE 12%. As frações que apresentaram alta concentração de proteínas foram misturadas e precipitadas com 0,1% de ácido tricloroacético (TCA). Este procedimento foi realizado para dois extratos, um de planta sadia e outro de planta infectada com PepYMV, 10 dias após a inoculação viral.

Extratos de *N. benthamiana* infectadas e não infectadas foram analisados também 72 horas após a inoculação viral. Para estes extratos, o procedimento de purificação de proteínas por afinidade com a proteína TCTP *in vitro* foi realizado como descrito anteriormente, porém foi adicionado 0,1% de SDS (sodium dodecyl sulfato) aos tampões de lavagem e eluição. O procedimento foi realizado para dois extratos, um de planta de *N.*

benthamiana sadia e outro de planta de *N. benthamiana* infectada com PepYMV, 72 horas após a inoculação viral. Após a eluição, a presença de proteínas nas diferentes frações do eluato foi verificada por SDS PAGE. As frações que apresentaram alta concentração de proteínas foram misturadas, precipitadas com 0,1% de ácido tricloroacético (TCA), lavadas com acetona 100% e centrifugadas por 20 minutos a 30.000g. O precipitado foi novamente lavado com acetona 80%, centrifugado por 20 minutos a 30.000g e resuspendidos em acetonitrila 50%. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel SDS PAGE 12%. As bandas nitidamente observadas foram excisadas do gel e descoradas com sucessivas lavagens em acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,8.

3.9. Identificação *in vivo* de proteínas que interagem com a TCTP durante a infecção

Uma suspensão de *A. tumefaciens* GV3101 transformada com pNTAPi-TCTP (Cascardo, 2011) foi agroinfiltrada em folhas de *N. benthamiana* com aproximadamente 2 meses após a germinação, para expressão transiente da proteína etiquetada, conforme descrito no item 3.4. Após a agroinfiltração, metade das plantas foram mecanicamente inoculadas com o PepYMV e após 48 horas as folhas agroinfiltradas foram coletadas, cortadas em pequenos pedaços e utilizadas para o ligação cruzada das proteínas, conforme descrito por Rohila et al. (2004). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

Os complexos proteicos foram extraídos e purificados como descrito por Rohila et al. (2006), com pequenas modificações. Sessenta gramas de folhas de *N. benthamiana* foram maceradas em nitrogênio líquido e as proteínas totais extraídas com 180 ml do tampão de extração de proteínas (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, IGEPAL (Sigma) 0,1%, EDTA 2,5 mM, benzamidina 2 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, NaF 20 mM, PMSF 1mM, coquetel de protease 1%, leupeptina 10μM e 3,4-dichloroisocoumarina 10 μM). Os extratos foram filtrados em 3 camadas de gaze e centrifugados duas vezes a 30000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi misturado com 160 μl da resina IgG Sepharose™ Fast Flow beads (GE Healthcare) e a mistura foi incubada a 4°C por 2 horas sob agitação lenta. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 200 g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as esferas precipitadas foram lavadas com 30 ml de tampão de extração sem os inibidores de protease. As esferas lavadas foram carregadas em coluna de cromatografia poly-prep (Bio-Rad) e lavadas com 10 ml do tampão de clivagem de TEV (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, IGEPAL 0,1%, EDTA 0,5 mM e DTT

1 mM). As proteínas etiquetadas foram clivadas com 150 µl do tampão de clivagem do TEV contendo 150 U da protease AcTEV (Invitrogen) e 1 µM do inibidor de protease E-64 durante 1 h a 16°C. A concentração final de CaCl₂ presente no eluato foi ajustada para 2 mM e em seguida ele foi diluído em 3 volumes tampão de ligação a calmodulina (β-mercaptoetanol 10 mM; Tris-HCl 10 mM pH8.0; NaCl 150 mM; acetato de magnésio 1 mM; imidazol 1 mM; CaCl₂ 2mM e 0.1% IGEPAL) e incubado com 100 µl de Calmodulin Sepharose™ 4B beads (GE Healthcare) por uma hora a 4°C sob agitação lenta. As esferas foram carregadas em uma nova coluna de cromatografia poly-prep (BioRad) e lavadas com 30 ml de tampão de ligação a calmodulina sem IGEPAL. Os complexos proteicos foram eluídos em tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, acetato de magnésio 1 mM, imidazol 1 mM e EGTA 2 mM). Este procedimento foi realizado para dois extratos expressando a TCTP etiquetada, um com folhas infectadas e outro com folhas não infectadas.

3.10. Espectrometria de massa

Após a excisão do gel e descoloração das bandas, as amostras purificadas *in vitro* 72 hpvi foram submetidas à eletroforese SDS PAGE 12%. As bandas excisadas do gel e previamente descoradas foram tripsinizadas conforme descrito por Shevchenko, Tomas *et al.* (2006), utilizando a enzima Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade (Promega). As demais amostras purificadas *in vivo* e *in vitro* (10 dpvi) foram precipitadas com 0,1% de TCA, lavadas com acetona 100% e centrifugadas por 20 minutos a 30.000 g. O precipitado foi novamente lavado com acetona 80% e centrifugado por 20 minutos a 30.000 g. Posteriormente, as proteínas precipitadas foram secas em Speed Vac (Eppendorf) e clivadas com 1 µg de Tripsina conforme o protocolo de digestão em solução descrito por Kinter and Sherman (2000). Após digestão por 12 horas, as amostras foram secas em Speed Vac e analisadas por espectrometria de massa acoplada a HPLC (nanoAcquity), utilizando o espectrômetro Ion-Trap Amazon (Bruker).

Os peptídeos identificados por espectrometria de massas foram analisados utilizando o programa MASCOT MS/MS Ions Search, disponível em <http://www.matrixscience.com>. Foram utilizados o banco de dados de plantas superiores (*Viridiplantae*) e o de vírus do NCBI (NCBIInr 20120714). Foram considerados como presentes nas amostras os peptídeos nos quais os fragmentos preditos correspondentes a todos os aminoácidos da sequência do peptídeo foram identificados. A identificação das

características funcionais e possíveis funções das proteínas foram baseadas em resultados de Blastp e identificação de domínios conservados pelo banco de dados CDD (*Conserved Domains Database*), disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

4. RESULTADOS

4.1. A redução na expressão de TCTP leva a um menor acúmulo viral nos estágios iniciais da infecção.

Para analisar o efeito do silenciamento do gene *TCTP* no processo de infecção viral, plantas de *N. benthamiana* tiveram a expressão de *TCTP* silenciada por VIGS (*Virus Induced Gene Silence*) (TRV-TCTP). Como controle negativo, um grupo plantas foi submetido à agroinfiltração com uma construção para silenciamento de *GFP* (TRV-GFP). Em um segundo grupo, a agroinfiltração foi realizada somente com *A. tumefaciens* C58C1 e em um terceiro grupo as plantas não foram agroinfiltradas. Como controle positivo do silenciamento um grupo de plantas foi submetido à agroinfiltração para silenciar a expressão do gene *PDS* (TRV-PDS).

As plantas agroinfiltradas com TRV-PDS foram utilizadas como marcador fenotípico do silenciamento pela observação do fenótipo de foto-oxidação decorrente do silenciamento do gene *PDS*. O silenciamento se iniciou entre 8 e 10 dias após a agroinfiltração, e foi observado em todas as plantas agroinfiltradas com TRV-PDS. Quatorze dias após a agroinfiltração, o silenciamento se apresentou bem estabelecido em todas as plantas TRV-PDS (Figura 1) e, com base no silenciamento de *PDS*, se assumiu que o silenciamento de *TCTP* nas plantas TRV-TCTP também estava ocorrendo. Todas as plantas agroinfiltradas apresentaram uma pequena redução de tamanho em relação às plantas não agroinfiltradas. Entre plantas C58C1, TRV-GFP e TRV-TCTP, não foi observada nenhuma diferença fenotípica em decorrência do silenciamento de *TCTP* ou da infecção pelo TRV (Figura 1).

Discos de folha de aproximadamente 1,5 cm foram coletados de folhas jovens 14 dias após a agroinfiltração, para quantificação relativa dos níveis de TCTP antes da inoculação com PepYMV (0 hpvi). Inicialmente, a expressão de TCTP foi analisada nos controles, e foi observada uma redução de aproximadamente 50% na expressão de TCTP tanto nas plantas TRV-GFP quanto nas C58C1, em relação às plantas não agroinfiltradas (NA) (dados não mostrados). Plantas TRV-GFP foram escolhidas como controle para as próximas análises devido à presença tanto da bactéria quanto do vetor viral neste controle.

Todas as plantas agroinfiltradas com TRV-TCTP apresentaram uma redução média na expressão de TCTP para 0,15 em relação ao controle TRV-GFP, que apresentou a expressão de 1,05 (Figura 2), mostrando que a indução do silenciamento foi eficiente.

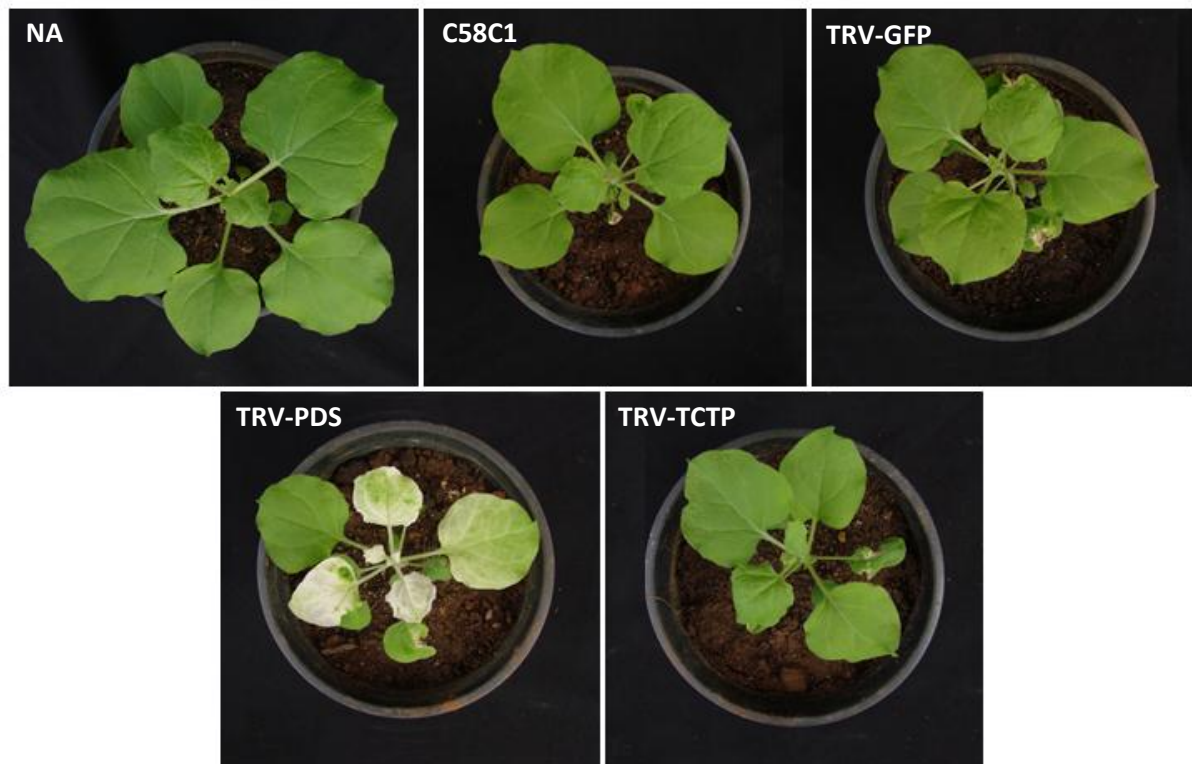


Figura 1: Fenótipo das plantas silenciadas duas semanas após a agroinfiltração. NA, plantas não agroinfiltradas; C58C1, plantas infiltradas com *A. tumefaciens*, estirpe C58C1; TRV-GFP, plantas infiltradas com *A. tumefaciens*, estirpe C58C1, contendo o TRV- RNA1 e o TRV-RNA2 contendo um fragmento do gene *GFP*; TRV-PDS, plantas infiltradas com *A. tumefaciens*, estirpe C58C1, contendo o TRV- RNA1 e o TRV-RNA2 contendo um fragmento do gene *PDS*; TRV-TCTP, plantas infiltradas com *A. tumefaciens*, estirpe C58C1, contendo o TRV- RNA1 e o TRV-RNA2 contendo um fragmento do gene *TCTP*

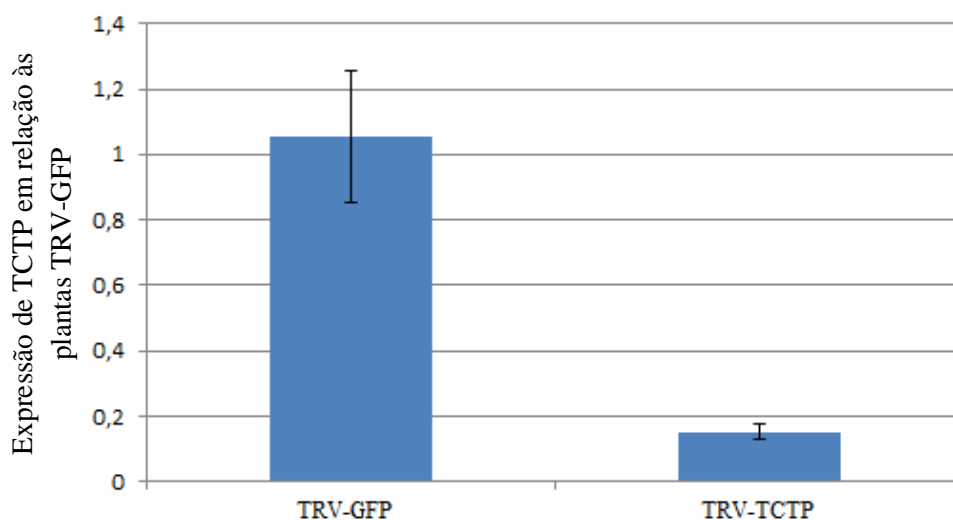


Figura 2: Expressão relativa de TCTP em plantas silenciadas duas semanas após a agroinfiltração, antes da inoculação com PepYMV. TRV-GFP – Média da expressão de TCTP em seis plantas TRV-GFP. TRV-TCTP – Média da expressão de TCTP de 10 plantas TRV-TCTP. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Para analisar o efeito do silenciamento de *TCTP* nos estágios iniciais da infecção pelo PepYMV, discos foliares de cerca de 1,5 cm, adjacentes às regiões das folhas onde foram coletados os discos para a avaliação do silenciamento antes da inoculação com o PepYMV (0 hpvi), foram coletados 72 horas após a inoculação viral (72 hpvi). Os discos coletados 72 hpvi foram utilizados para quantificar a expressão de *TCTP* e o acúmulo de PepYMV. O silenciamento de *TCTP* não foi alterado nas plantas inoculadas, apresentando os níveis de 0,12 tanto em folhas infectadas (TRV-TCTP I) como em folhas não infectadas (TRV-TCTP NI) (Figura 3A), permitindo a análise do efeito da redução de *TCTP* no acúmulo viral no início da infecção. A expressão de *TCTP* em plantas TRV-TCTP foi induzida em plantas infectadas (TRV-GFP I) apresentando um valor de 1,85, quase duas vezes a expressão de 1,003, encontrada nas plantas TRV-GFP não infectadas (TRV-GFP NI) (Figura 3A). Estes resultados mostram que a expressão de *TCTP* é induzida pela infecção do PepYMV, corroborando os resultados observados por Alfenas-Zerbini et al., (2009).

O acúmulo viral foi determinado por qRT-PCR, usando o método de quantificação absoluta. A carga viral foi de 27311 cópias do genoma viral em plantas não silenciadas (TRV-GFP) e de 15006 cópias do genoma viral em plantas silenciadas (TRV-TCTP) em

400 ng de cDNA. O acúmulo do PepYMV foi menor nas plantas silenciadas para *TCTP* do que nas plantas controle (figura 3B). Estes resultados corroboram os obtidos por Cascardo (2011) utilizando uma linhagem transgênica de tomate silenciada para *TCTP* e sugerem que o aumento nos níveis de *TCTP* durante a infecção viral contribui para seu estabelecimento, uma vez que a sua redução leva a diminuição do acúmulo viral nas plantas silenciadas.

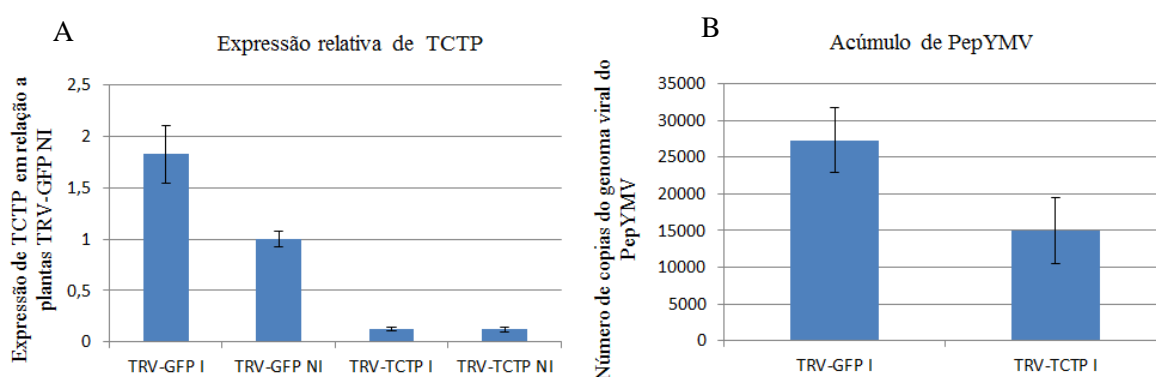


Figura 3: Efeito do silenciamento de TCTP em folhas inoculadas. **A)** Expressão de TCTP 72hpvi. TRV-TCTP I, média da expressão de TCTP de sete plantas TRV-TCTP inoculadas com PepYMV; TRV-TCTP NI, média da expressão de TCTP de três plantas TRV-TCTP não inoculadas com PepYMV; TRV-GFP I, média da expressão de TCTP de três plantas TRV-GFP inoculadas com PepYMV; TRV-GFP NI, média da expressão de TCTP de três plantas TRV-GFP não inoculadas com PepYMV. **B)** Acúmulo de PepYMV 72hpvi. TRV-GFP, média da carga viral de três plantas TRV-GFP inoculadas com PepYMV; TRV-TCTP, média da carga viral de sete plantas TRV-TCTP inoculadas com PepYMV. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Plantas sistemicamente infectadas foram analisadas 14 dias após a inoculação viral (dpvi). Todas as plantas inoculadas desenvolveram sintomas típicos da infecção pelo PepYMV (figura 4) e a infecção foi detectada por ELISA indireto em todas as plantas inoculadas (dados não mostrados), mostrando que apesar do silenciamento inicial, a redução de TCTP não foi capaz de impedir a infecção sistêmica.

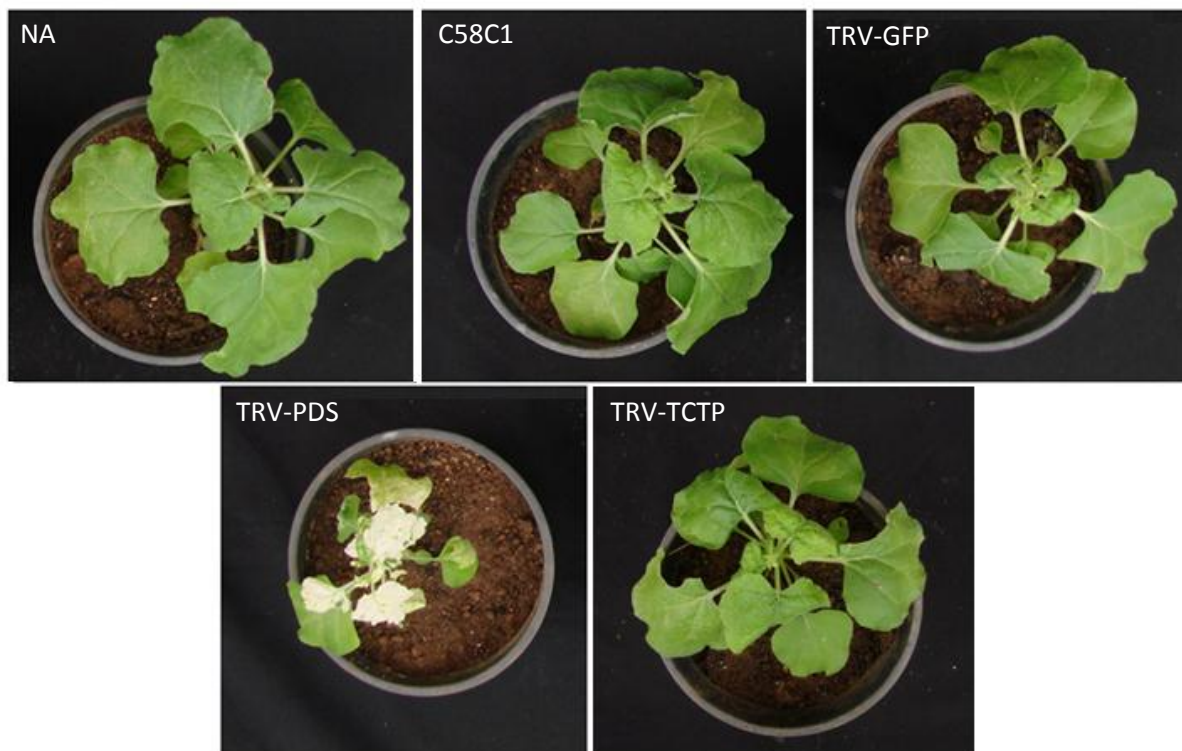


Figura 4: Sintomas da infecção por PepYMV em plantas sistemicamente infectadas 14 dpvi. NA, plantas não agroinfiltradas; C58C1, plantas infiltradas com *A. tumefaciens*, estirpe C58C1; TRV-GFP, plantas infiltradas com *A. tumefaciens*, estirpe C58C1, contendo o TRV- RNA 1 e o TRV-RNA2 contendo um fragemnto do gene GFP; TRV-PDS, plantas infiltradas com *A. tumefaciens*, estirpe C58C1, contendo o TRV- RNA 1 e o TRV-RNA2 contendo um fragemnto do gene PDS; TRV-TCTP, plantas infiltradas com *A. tumefaciens*, estirpe C58C1, contendo o TRV- RNA 1 e o TRV-RNA2 contendo um fragemnto do gene TCTP

Folhas jovens das plantas silenciadas e das plantas controle foram coletadas 14 dpvi e utilizadas para quantificação do silenciamento de *TCTP* e da carga viral. O silenciamento de *TCTP* foi alterado em plantas infectadas (TRV-TCTP I) aumentando para 1,17, valor semelhante ao valor de 1,05 obtido nas plantas TRV-GFP NI. Nas plantas TRV-GFP infectadas houve um aumento na expressão de *TCTP* para 3,49, mostrando que *TCTP* permanece induzida na infecção sistêmica. Plantas TRV-TCTP não infectadas apresentaram os níveis de silenciamento de 0,14, semelhante ao observado para estas plantas a 72 hpvi, mostrando que a supressão do silenciamento ocorre devido a presença do PepYMV.

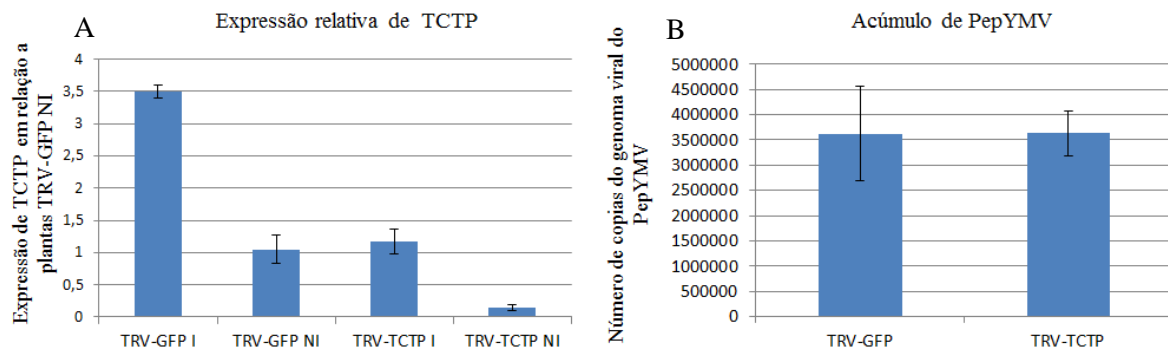


Figura 5: Efeito do silenciamento de TCTP em folhas infectadas sistemicamente. **A)** Expressão de TCTP 14 dpvi. TRV-TCTP I – média da expressão de TCTP de sete plantas TRV-TCTP inoculadas com PepYMV. TRV-TCTP NI - média da expressão de TCTP de três plantas TRV-TCTP não inoculadas com PepYMV. TRV-GFP I - média da expressão de TCTP de três plantas TRV-GFP inoculadas com PepYMV. TRV-GFP NI - média da expressão de TCTP de três plantas TRV-GFP não inoculadas com PepYMV. **B)** Acúmulo de PepYMV 14dpvi. TRV-GFP – média da carga viral de três plantas TRV-GFP inoculadas com PepYMV. TRV-TCTP – média da carga viral de sete plantas TRV-TCTP inoculadas com PepYMV. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

A diminuição dos níveis de silenciamento observada a 14 dpvi pode ser o resultado de um aumento na expressão de *TCTP* induzido pela infecção viral, ou ainda é possível que com o estabelecimento da infecção, a HC-Pro, supressora de silenciamento do PepYMV esteja suprimindo o silenciamento de ambos os vírus e portanto suprimindo o silenciamento da *TCTP* induzido pelo TRV.

Para testar se esta reversão do silenciamento se dá pela ação da HC-Pro, o acúmulo de TRV foi quantificado pelo método $\Delta\Delta C_t$ em plantas infectadas e não infectadas pelo PepYMV. Tanto nas plantas TRV-GFP quanto nas plantas TRV-TCTP foi observado um aumento de 8 a 10 vezes no acúmulo de TRV nas plantas infectadas pelo PepYMV em relação as não infectadas (Figura 6). O mesmo aumento no acúmulo do TRV foi observado em ambos os tratamentos. Os níveis de *TCTP* foram 12,25 em plantas TRV-GFP inoculadas com PepYMV; 1,17 em plantas TRV-GFP não inoculadas com PepYMV; 13,19 em plantas TRV-TCTP inoculadas com PepYMV e 1,63 em plantas TRV-TCTP não inoculadas com PepYMV. O aumento de TRV foi estatisticamente igual nos dois tratamentos, mostrando que a presença do PepYMV leva a um aumento no acúmulo de TRV, provavelmente pela supressão de seu silenciamento.

O acúmulo de PepYMV também foi analisado nestas amostras e os valores obtidos foram de 3624916 cópias virais em plantas TRV-GFP inoculadas com PepYMV e de 3632638 cópias virais em plantas TRV-TCTP, inoculadas com PepYMV, mostrando não haver diferença no acúmulo viral entre estes dois tratamentos, uma vez que as plantas TRV-TCTP não estavam mais silenciadas para TCTP.

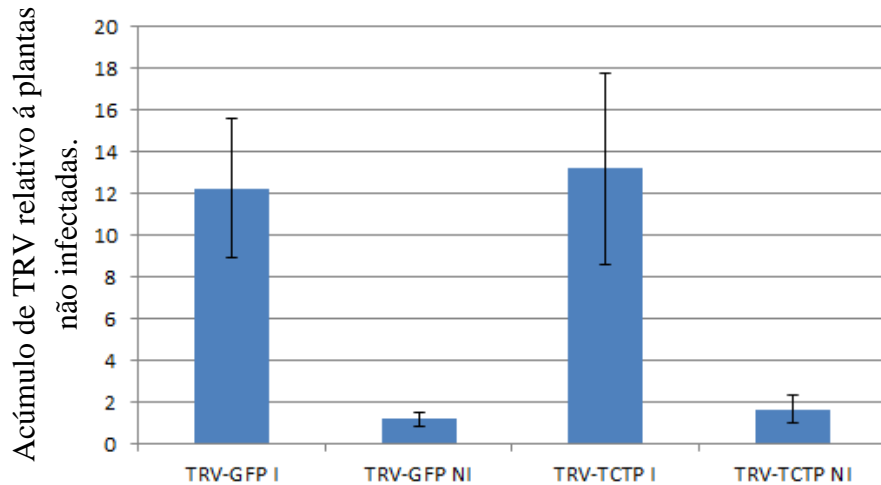


Figura 6: Acúmulo relativo de TRV em plantas infectadas e não infectadas 14 dpvi. TRV-GFP I – média do acúmulo de TRV em três plantas TRV-GFP inoculadas com PepYMV. TRV-GFP NI - média do acúmulo de TRV em três plantas TRV-GFP não inoculadas com PepYMV. TRV-TCTP I – média do acúmulo de TRV em sete plantas TRV-TCTP inoculadas com PepYMV. TRV-TCTP NI - média do acúmulo de TRV em sete plantas TRV-TCTP não inoculadas com PepYMV. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

4.2. A expressão transitória de P3 e CP induz a expressão de TCTP, enquanto a N1b reduz sua expressão em *N. benthamiana*

Para compreender melhor os mecanismos que induzem a expressão de *TCTP* durante a infecção viral, as regiões codificadoras correspondente a cada uma das proteínas do PepYMV foram clonadas separadamente no vetor de expressão pK7WG2 e agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana*. As folhas agroinfiltradas foram coletadas 72 horas após a agroinfiltração e a presença de mRNA correspondente a cada proteína viral foi confirmada por RT-PCR. Foi possível expressar todas as proteínas virais nas folhas de *N. benthamiana*, com exceção da proteína CI. Amostras nas quais a expressão das

proteínas foram confirmadas foram utilizadas para quantificação da expressão de *TCTP* por qRT-PCR. Para cada amostra, uma folha de tamanho e idade similar foi coletada antes da agroinfiltração e utilizada como controle para neutralizar o efeito de variações de expressão inerentes a cada planta.

Plantas agroinfiltradas com vetor vazio (GV3101) apresentaram uma redução de cerca de 50% na expressão de *TCTP* em relação a plantas não agroinfiltradas (NA) (Figura 7 e Tabela 1). Dessa forma, plantas agroinfiltradas apenas com o pK7WG2 foram utilizadas como controles para a análise da expressão de *TCTP* em plantas expressando as proteínas virais. A expressão transiente da maioria das proteínas virais não alterou a expressão de *TCTP* em relação a GV3101. Os valores encontrados durante a expressão de cada proteína, relativo às folhas coletadas antes da agroinfiltração, foram 0,415 para a P1, 0,410 para a HC-Pro, 0,718 para a P3, 0,312 para a 6K1, 0,488 para a 6K2, 0,532 para a NIa, 0,289 para a NIB, 0,662 para a CP e 0,616 para a Pipo. Plantas agroinfiltradas com GV3101 tiveram uma expressão de 0,429. As plantas NA tiveram a expressão de 0,869 e as inoculadas com PepYMV, de 1,468. Apenas as proteínas P3 e CP foram capazes de induzir a expressão da *TCTP*, em relação ao controle agroinfiltrado com GV3101. A proteína NIB reduziu a expressão de *TCTP*. A expressão da P3 e da CP levaram a uma expressão de 1,67 e 1,54 vezes a expressão de *TCTP* no controle, respectivamente (Tabela 1). Este aumento é equiparável ao que ocorre em plantas não agroinfiltradas quando inoculadas com o vírus, no qual se observou uma expressão de 1,68 vezes a expressão na planta sadia. A expressão de NIB levou à redução da expressão de *TCTP* para 0,67 vezes a expressão no controle.

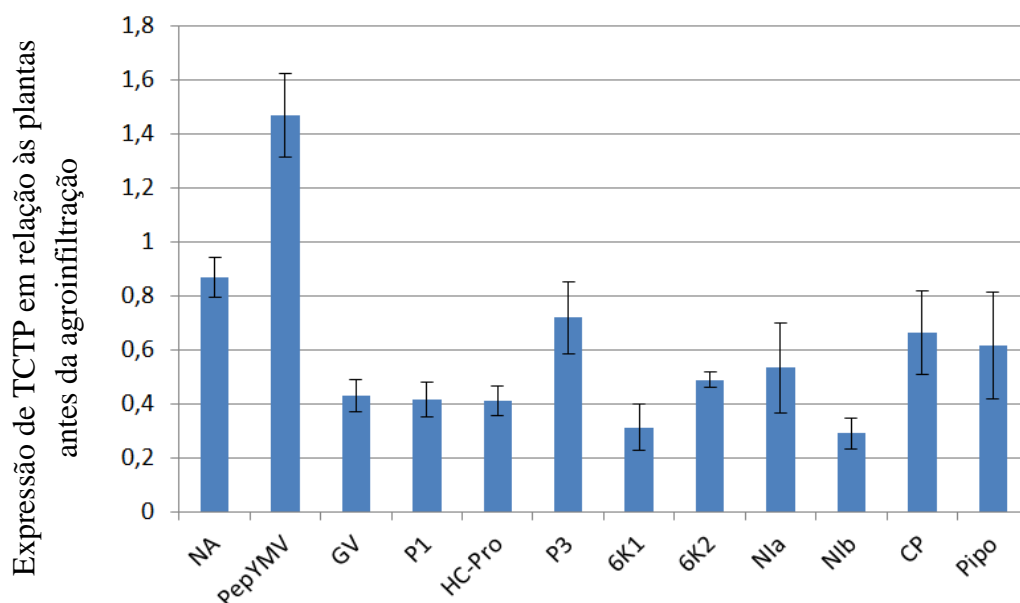


Figura 7: Expressão de *TCTP* em plantas expressando transientemente proteínas do PepYMV, relativa à expressão nas mesmas plantas antes da agroinfiltração. Cada amostra corresponde a três plantas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Tabela 1: Expressão de *TCTP* em relação ao controle agroinfiltrado com GV3101. Os valores foram calculados pela razão entre o valor absoluto de expressão em cada tratamento e o valor absoluto de expressão no controle. A expressão em plantas infectadas com PepYMV é relativa a plantas NA.

	PepYMV*	P1	HC-Pro	P3	6K1	6K2	NIa	NIB	CP	Pipo
Expressão de <i>TCTP</i>	1,688 ± 0,176	0,966 ± 0,155	0,955 ± 0,134	1,674 ± 0,319	0,728 ± 0,207	1,137 ± 0,0689	1,240 ± 0,393	0,674 ± 0,130	1,543 ± 0,372	1,436 ± 0,471

* Expressão relativa a plantas NA.

4.3. A TCTP não interage diretamente com proteínas isoladas do PepYMV

A ocorrência de interações diretas entre a TCTP e as proteínas virais foi verificada por um ensaio de duplo-híbrido. A sequência codificadora da TCTP foi clonada no vetor pDEST32 e cada proteína viral foi clonada no vetor pDEST22. Leveduras AH109 foram inicialmente transformadas com pDEST32, pDEST32-NIG e pDEST32-TCTP. A transformação do pDEST32-TCTP foi confirmada por PCR. Leveduras inicialmente transformadas com PDEST32 ou pDEST32-NIG foram transformadas com pDEST22 e

leveduras transformadas com pDEST32-TCTP foram co-transformadas separadamente com cada uma das proteínas virais clonadas em pDEST22 e também com o pDEST22 vazio. A ocorrência de interação foi analisada pelo crescimento em meio sem histidina, no qual apenas o controle positivo, transformado com pDEST22 e pDEST32-NIG cresceu, mostrando a não ocorrência de interação direta entre a TCTP e proteínas virais separadamente (Figura 8).

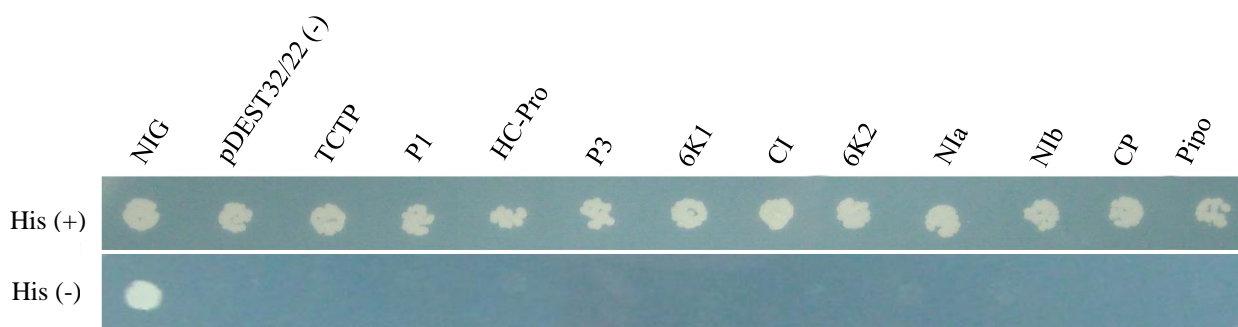


Figura 8: A TCTP não interagiu com proteínas virais pelo ensaio de duplo-híbrido. O crescimento em meio com histidina (His +) mostra a viabilidade de todas as culturas utilizadas. Em meio sem histidina (His -) apenas o crescimento do controle positivo NIG foi observado.

4.4. Identificação *in vitro* de proteínas que interagem com a TCTP durante a infecção

O procedimento de purificação por afinidade com a proteína TCTP *in vitro* foi realizado de duas maneiras: com adição de SDS nos tampões e purificação de bandas de gel, utilizando plantas saudas e infectadas a 72 hpvi ou sem adição de SDS nos tampões, seguido da análise do eluato completo de amostras de plantas saudas e infectadas com PepYMV 10 dpvi.

A identificação de proteínas presentes nas amostras de plantas saudas e infectadas com PepYMV 10 dpvi por espectrometria de massas não foi possível devido a uma alta concentração de sais nas amostras, que mascaram os picos gerados pelos peptídeos, tornando impossível identificá-los. Para solucionar este problema, as amostras deverão ser dessalinizadas em uma coluna de troca iônica e analisadas novamente.

As amostras obtidas a partir de extratos de planta sadia e planta infectada a 72 hpvi foram analisadas por espectrometria de massas e a identificação de peptídeos foi realizada. Nestas amostras, as últimas lavagens foram feitas com 0,1% de SDS, o que impossibilita a

passagem do eluato na coluna de cromatografia e posterior análise no espectrômetro devido à presença do detergente. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e posteriormente purificadas. Para cada amostra, foi observada uma grande quantidade de proteínas, com nove bandas bem definidas e um arraste ao fundo (Figura 9). Bandas nas mesmas posições foram observadas em ambas as amostras. A intensidade entre cada uma delas, no entanto, foi diferente e cada banda pode conter uma mistura de proteínas de massa semelhante. As bandas foram cortadas do gel, descoradas com 50% de acetonitrila em bicarbonato de amônio 25 pH 8,8 mM e tripsinizadas conforme descrito por Shevechenco et. al (2006). Estas lavagens são responsáveis pela retirada do SDS das amostras, que ficam retidas na matriz do gel.

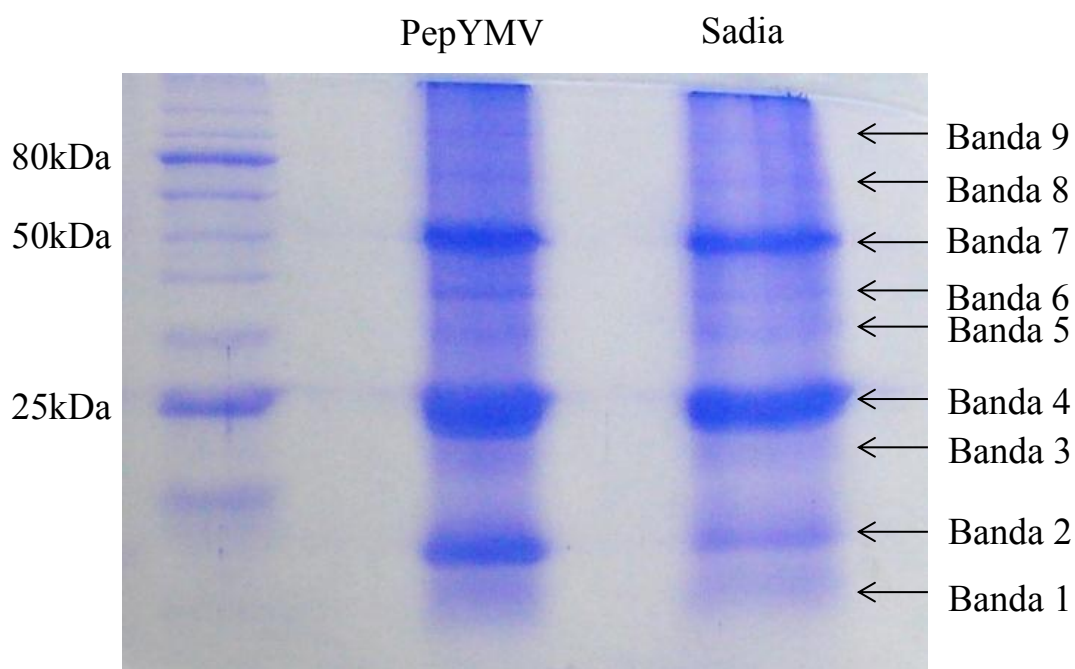


Figura 9: Gel SDS-PAGE utilizado para a excisão de bandas. As bandas cortadas estão indicadas pelas setas na lateral direita da figura. Como marcador de peso molecular foi utilizado o Protein ladder (10-250 kDa) (BIOLabs).

Os peptídeos gerados por espectrometria de massas foram analisados *in silico* utilizando-se o programa MASCOT MS/MS Ions Search. Foram identificadas sequências similares a 30 sequências diferentes depositadas no GenBank. Algumas destas sequências estão descritas como pertencentes a proteínas desconhecidas. Dentre as proteínas identificadas, algumas correspondem a proteínas muito similares, com os mesmos

domínios funcionais. É possível que os peptídeos que levaram à identificação de proteínas muito similares sejam pertencentes a uma mesma proteína de *N. benthamiana* ainda não descrita. Vinte e três proteínas foram observadas tanto nas amostras sadias quanto nas infectadas, cinco foram observadas apenas nas infectadas e duas apenas nas sadias. Nenhuma proteína do PepYMV foi identificada pelas análises de acordo com os critérios utilizados. As proteínas identificadas tanto na amostra de planta sadia quanto na de planta infectada estão listadas na Tabela 2 e as proteínas presentes somente em plantas sadias ou infectadas pelo PepYMV estão listadas na Tabela 3. As proteínas estão nomeadas conforme a descrição encontrada no GenBank para cada número de acesso identificado. As possíveis características funcionais baseiam-se em resultados de Blastp e identificação de domínios conservados pelo banco de dados CDD (*Conserved Domains Database*).

Tabela 2: Proteínas identificadas nas amostras de planta sadia e nas amostras de planta infectada 72 hpvi. A descrição da proteína, número de acesso e organismo correspondem às informações fornecidas pelo GenBank. As características funcionais baseiam-se em resultados de Blastp e identificação de domínios conservados pelo banco de dados CDD (Conserved Domains Database).

Descrição da proteína	N° de acesso (GenBank).	Organismo	Características funcionais
<i>Ribosomal protein S16</i>	NP_054479	<i>N. benthamiana</i>	Proteína da subunidade menor do ribossomo
<i>PR-10 type pathogenesis-related protein</i>	BAJ25783	<i>N. tabacum</i>	Provavelmente possui um domínio de ligação a esteróides e ação de RNase
<i>Chain A, Rational Conversion Of substrate And Product Specificity In A Monoterpene Synthase</i>	2J5C_A	<i>Salvia fruticosa</i>	Pertence a família das terpenociclases, envolvidas na biossíntese de isoprenóides.
<i>6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase precursor, partial</i>	AAD44809	<i>N. tabacum</i>	Proteína envolvida na biossíntese de riboflavinas
<i>PREDICTED: COBW domain-containing protein 2-like isoform 1.</i>	XP_003536775	<i>Glycine max,</i>	Contém o domínio <i>CobW-like</i> homólogo ao envolvido na biossíntese de cobalamina, de função desconhecida em plantas
<i>Predicted protein</i>	XP_002327406	<i>Populus trichocarpa,</i>	Contém o domínio <i>CobW-like</i> homólogo ao envolvido na biossíntese de cobalamina, de função desconhecida em plantas
<i>Predicted protein</i>	BAK01972	<i>Hordeum vulgare</i>	Contém o domínio <i>CobW-like</i> homólogo ao envolvido na biossíntese de cobalamina, de função desconhecida em plantas
<i>Dopamine-responsive protein</i>	AAP45170	<i>Solanum bulbocastanum</i>	Contém o domínio <i>CobW-like</i> homólogo ao envolvido na biossíntese de cobalamina, de função desconhecida em plantas
<i>predicted protein</i>	XP_002503617	<i>Micromonas sp.</i>	Contém o domínio <i>CobW-like</i> homólogo ao envolvido na biossíntese de cobalamina, de função desconhecida em plantas

Tabela 2 (continuação)

Descrição da proteína	N° de acesso (GenBank).	Organismo	Características funcionais
<i>N-Acetyl-transferase</i>	ACF74357	<i>Arachis hypogaea</i>	N-acetiltransferase
<i>Putative vacuolar proton ATPase subunit E, partial</i>	AAF91469	<i>S. lycopersicus</i>	Pertence a superfamília do domínio Fo da ATP sintase.
<i>Urease accessory protein G</i>	CAC33001	<i>Solanum tuberosum</i>	Pertencente a superfamilia das NTPases,
<i>Putative pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit.</i>	ACF17670	<i>Capsicum annuum</i>	Subunidade E da enzima piruvato desidrogenase
<i>Unknown</i>	ABK20905	<i>Picea sitchensis</i>	Provável sorbitol desidrogenase
<i>Sorbitol related enzyme.</i>	NP_001234092	<i>S. lycopersicum</i>	Sorbitol desidrogenase
<i>Hypothetical protein SELMODRAFT_142417</i>	XP_002964498	<i>Selaginella moellendorffii</i>	Aspartato cinase, envolvida na biossíntese de aminoácidos
<i>Abscisic stress ripening protein</i>	AAA86052	<i>Solanum chacoense</i>	Proteína induzida por ABA, estresse hídrico e amadurecimento de frutos
<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>	NP_001234079	<i>S. lycopersicum</i>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
<i>Hypothetical protein VITISV_007074</i>	CAN67081	<i>Vitis vinifera</i>	Proteína PCBP-like. Contém o domínio KH de ligação a ssRNA ou ssDNA. Estão relacionadas à estabilização de mRNA, ativação e silenciamento da tradução
<i>L-ascorbate oxidase</i>	Q40588	<i>N. tabacum</i>	Precursor da L-ascorbato oxidase
<i>Hop-interacting protein TH113</i>	AEW69813	<i>S. lycopersicum</i>	Proteína com o domínio Ricin-B-lectin
<i>Unnamed protein product, partial</i>	CBI24384	<i>Vitis vinifera</i>	Possui um domínio de ligação a RNA RNP, presente em proteínas envolvidas no processamento pós-transcricional, estabilidade e exportação de RNA
<i>Catalase, partial</i>	AAR14052	<i>Solanum tuberosum</i>	Catalase

Tabela 3: Proteínas encontradas em amostras de plantas infectadas pelo PepYMV 72hpvi ou em plantas saudáveis. A descrição da proteína, número de acesso e organismo correspondem às informações fornecidas pelo GenBank. As características funcionais baseiam-se em resultados de Blastp e identificação de domínios conservados pelo banco de dados CDD (Conserved Domains Database).

Proteínas identificadas	Nº de acesso (GenBank)	Organismo	Características funcionais
Proteínas na planta infectada			
<i>Osmotin-like protein precursor</i>	NP_001234714	<i>S. lycopersicum</i>	Taumatina, Proteína relacionada à patogênese tipo 5
<i>Chloroplast carbonic anhydrase</i>	AAY17069	<i>N. benthamiana</i>	Anidrase carbônica
<i>pistil-specific extensin-like protein</i>	ADW66159	<i>Solanum nigrum</i>	Extensina específica de pistilos
<i>Putative pectate lyase, partial</i>	AAB69762	<i>A. thaliana</i>	Pectato liase
<i>hypothetical protein VITISV_009891</i>	CAN77320	<i>Vitis vinifera</i>	Transportador do tipo ABC
Proteínas na planta Saudia			
<i>Peroxidase, putative</i>	ABD65151	<i>Brasica oleraceae</i>	Peroxidase
<i>Hypothetical protein</i>	AAD55482	<i>A. thaliana</i>	Possível transposase

4.5. Identificação *in vivo* de proteínas que interagem com a TCTP durante a infecção.

Proteínas de plantas de *N. benthamiana* saudáveis e infectadas com PepYMV 72 hpvi, expressando a TCTP fusionada à etiqueta TAP foram extraídas e purificadas pela técnica de purificação em tandem descrita por Rohila, Chen *et al.* (2004). As proteínas foram tripsinizadas e analisadas por espectrometria de massas. Assim como nas amostras purificadas *in vitro* que foram diretamente tripsinizadas, uma concentração elevada de sal foi observada como contaminante nas amostras, impossibilitando a identificação de peptídeos presentes nela. A dessalinização deverá ser realizada por cromatografia de troca iônica e as amostras serão novamente analisadas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Silenciamento gênico induzido por vírus e suas limitações na análise de infecções sistêmicas por *Potyvirus*

Neste trabalho, foi demonstrado que o vetor viral TRV foi capaz de induzir o silenciamento de *TCTP* de maneira eficiente. O nível de silenciamento não foi alterado 72 hpvi e foi observado um menor acúmulo do PepYMV nestas plantas. Em folhas sistemicamente infectadas, o acúmulo viral foi o mesmo tanto nas plantas silenciadas como nos controles. Uma das possíveis explicações para este fato poderia ser o envolvimento da *TCTP* apenas nos estágios iniciais da infecção retardando, porém não impedindo, seu estabelecimento. No entanto, o fato de *TCTP* permanecer induzida nas folhas sistemicamente infectadas sugere que ela desempenhe uma função durante toda infecção. A avaliação do silenciamento nestas plantas mostrou uma regressão do silenciamento, tornando a expressão de *TCTP* equiparável à expressão nos controles não infectados. Este aumento poderia ser provocado pela própria indução da *TCTP* pela infecção. O aumento no acúmulo de mRNA da proteína faria com que o silenciamento induzido pelo TRV não fosse capaz de degradar todo o mRNA de *TCTP*, levando a um aumento no seu acúmulo. A explicação mais provável é de que a infecção pelo PepYMV está suprimindo o silenciamento do TRV e conseqüentemente de *TCTP*, uma vez que há um aumento significativo no acúmulo do TRV em plantas infectadas por PepYMV.

O silenciamento gênico induzido por vírus tem sido usado em uma ampla gama de trabalhos para análise funcional de proteínas em diversos processos em plantas. Em estudos de interação planta-patógeno, esta técnica tem sido usada para o estudo de proteínas envolvidas na infecção por fungos (Vossen, Abd-El-Haliem *et al.*) bactérias (Chacravarthy *et al.*, 2010), nematóides (Mao, *et al.* 2011) e vírus (Yang, Zhang *et al.*, 2009; Komatsu, Hashimoto *et al.*, 2010). Proteínas envolvidas em infecções por vírus pertencentes a diferentes famílias já foram estudados utilizando VIGS. No entanto, na maioria dos trabalhos, a análise do silenciamento é feita apenas antes da inoculação viral das plantas. O efeito do silenciamento na infecção viral, comumente é avaliado em infecção local ou em um curto período de tempo (até 5 dias após a inoculação viral) e não em infecções sistêmicas. Considerando que todos os vírus são alvo do silenciamento gênico e possuem supressoras de silenciamento que possibilitam a infecção viral, é

razoável supor que a presença de supressoras em infecções bem estabelecidas suprima o VIGS por TRV.

A proteína 16K, supressora do TRV, é uma supressora fraca (Martin-Hernandez e Baulcombe, 2008). Sua capacidade de supressão é influenciada pelas quantidades de ssRNA e dsRNA utilizados para indução do silenciamento, sendo mais eficiente em baixas concentrações dos RNAs indutores (Martinez-Priego, Donaire *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a 16K interfere no silenciamento a curta e longa distância (silenciamento sistêmico), mas não afeta a produção de siRNAs e miRNAs normalmente gerados na planta. O próprio TRV é alvo do silenciamento, e seu acúmulo na planta reduz drasticamente em *N. benthamiana* nos primeiros 20 dias ao longo da infecção (Donaire, Barajas *et al.*, 2008). Acredita-se que a eficiência do TRV na indução de VIGS resulte do equilíbrio entre indução e supressão do seu silenciamento, mediada pela fraca ação da 16K como supressora (Macfarlane, 2010).

Harries *et al.*, (2008) mostraram que, quando presente em altos níveis, a proteína supressora do TMV, 126K, é capaz de suprimir o silenciamento do gene PDS induzido por TRV em plantas transgênicas de *N. benthamiana* e *N. tabacum* expressando a 126K. Em contrapartida, o silenciamento em plantas induzido pelo TRV não foi afetado pela infecção sistêmica pelo geminivírus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) (Lozano-Duran *et al.*, 2011). A proteína HC-Pro dos potyvírus é considerada uma supressora forte, capaz de se ligar a siRNAs *in vitro* e de interferir em sua metilação (Ebhardt *et al.*, 2005). A metilação dos siRNAs é necessária para sua incorporação no complexo RISC. O modelo atual propõe que a HC-Pro suprime o silenciamento impedindo a montagem dos siRNAs no RISC, suprimindo dessa forma o PTGS (Diaz-Pendon e Ding, 2008). A 126K dos tobamovírus também é capaz de interagir com siRNAs, impedindo sua metilação (Vogler *et al.*, 2007). É provável que assim como a 126K dos tobamovírus, a HC-Pro seja capaz de suprimir o silenciamento do TRV, pois ambas interferem na metilação dos siRNAs. Os geminivírus de um componente genômico, como o TYLCSV, podem possuir 3 diferentes supressoras de silenciamento, C2, C4 e V2, que interferem no PTGS e no TGS (Raja *et al.*, 2010). É provável que devido a diferenças entre os mecanismos induzidos para suprimir o silenciamento de vírus de DNA, C2, C4 e V2 não interferam na supressão do TRV. A reversão do silenciamento de *TCTP* 14 dias após a infecção viral, juntamente com o aumento do acúmulo de TRV em plantas infectadas sistemicamente, corroboram com essa hipótese. Estes resultados demonstram a limitação da técnica para o estudo de infecções

virais sistêmicas, devendo ser testada a capacidade de supressão de silenciamento para cada combinação entre o vetor viral e o vírus em estudo.

5.2. O silenciamento de TCTP reduz o acúmulo viral em folhas inoculadas

Embora não tenha sido possível avaliar o efeito do silenciamento na infecção sistêmica, foi possível observar um menor acúmulo viral nas folhas inoculadas, 72 horas após a inoculação. Os níveis de silenciamento atingidos, no entanto, não foram capazes de impedir a infecção. É possível que a TCTP contribua para a infecção e sua ausência retarde, porém não impeça o vírus de se estabelecer. A manutenção da indução da expressão de *TCTP* em folhas sistemicamente infectadas, no entanto, indica que esta proteína deve exercer alguma função importante também para a infecção sistêmica. Cascardo (2011) avaliou o acúmulo de PepYMV em uma linhagem transgênica de tomate silenciada para a TCTP. Neste caso o silenciamento resultou em menor acúmulo de vírus em plantas sistemicamente infectadas, indicando um papel da proteína na infecção sistêmica. É possível que o silenciamento gênico em plantas transgênicas seja menos afetado pela HC-Pro, uma vez que existem diferenças nas proteínas envolvidas no PTGS induzido por vírus ou por dsRNAs expressos na planta. É possível que inicialmente a expressão de *TCTP* seja induzida como resposta de defesa, uma vez que ela é induzida por diferentes condições de estresse. No entanto, no contexto da infecção, ela favorece o estabelecimento do vírus. O mecanismo de que envolve a TCTP na infecção viral permanece desconhecido e sua elucidação depende da identificação de outros componentes da planta e do vírus envolvidos neste processo.

5.3. A expressão de TCTP é induzida pelas proteínas P3 e CP, e reprimida pela NIb

O mecanismo pelo qual a expressão da proteína é induzido permanece desconhecido. Os resultados obtidos sugerem o envolvimento das proteínas P3 e CP do PepYMV. A proteína P3 é uma das mais variáveis proteínas dos potyvirus.

O aumento da expressão de *TCTP* pelas proteínas P3 e CP ocorre por um mecanismo ainda não identificado. É possível que ambas as proteínas sejam reconhecidas por proteínas da planta que ativam a expressão de *TCTP*. A expressão de *TCTP* é induzida

por uma ampla gama de estresses abióticos como estresse salino, hídrico, calor e frio, sendo possivelmente uma resposta geral a determinados tipos de estresse.

Em células de mamífero foi demonstrado que a expressão de *TCTP* é regulada pela concentração de íons cálcio no retículo em níveis transcricionais e pela concentração de cálcio no citoplasma em níveis pós-transcricionais. NSP4, uma glicoproteína de rotavírus foi utilizada por ser capaz de desestabilizar o equilíbrio de cálcio na célula e induziu a expressão de *TCTP* (Xu et al.,1999). Diversas proteínas virais, entre elas a CP do TMV e do *Cocksfoot mottle virus* (CfMV), um *Sobemovirus* que infecta plantas, possuem sítios de ligação a cálcio e desestabilizam o equilíbrio relacionado a cálcio nas células (Revisado por Zhou, 2009). É possível que a indução de *TCTP* em potyvírus seja causada por um desbalanceamento do cálcio nas células, causado pela infecção. Kim et al. (2012) identificaram, por meio de ferramentas de bioinformática, três possíveis elementos responsivos a ABA no promotor de *TCTP* de *A. thaliana*. Foi demonstrado que o tratamento com ABA aumenta os níveis intracelulares de cálcio (Gehring et al., 1990). A ação de ABA por sua vez é mediada pelo cálcio e depende da presença do íon (Skriver e Mundy, 1990). É possível que estes dois sinalizadores atuem de maneira relacionada na expressão de *TCTP* pela infecção viral.

Nossos resultados demonstraram que a proteína N1b foi capaz de reduzir a expressão de *TCTP* nas plantas. A proteína N1b é a RdRp viral, e desconhece-se que sua expressão possa reprimir a expressão gênica. A N1b interage com diversas proteínas virais e sua interação com alguns componentes celulares já foi demonstrada. Um exemplo é a interação direta da N1b do TuMV com a Hsp70 e PABP, que provavelmente fazem parte do complexo de replicação viral e regulam a atividade da N1b durante a replicação (Dufresne et al., 2008). O mecanismo pelo qual a N1b afetou a expressão de *TCTP* reduzindo o acúmulo do seu RNA mensageiro é desconhecido, e seu significado permanece indeterminado. Ainda que esta alteração tenha ocorrido expressando-se a N1b isoladamente, durante a infecção viral prevalece o aumento da expressão de *TCTP*.

O efeito da expressão das proteínas CI e P3N-PIPO na expressão de *TCTP* não foi avaliado e a possibilidade de que estas proteínas desencadeiem algum efeito na expressão de *TCTP* não pode ser descartada.

5.4. A TCTP não interagiu com proteínas isoladas do PepYMV

Pelo ensaio de duplo híbrido, não foram verificadas interações entre a TCTP e as proteínas virais testadas. A possibilidade de que falso-negativos tenham ocorrido devido a enovelamento incorreto de proteínas virais, ligação de proteínas com a membrana ou a ausência de modificações pós-traducionais essenciais é improvável, uma vez que este sistema já foi utilizado para a identificação de interações envolvendo proteínas de potyvírus em diversos trabalhos (Merits, Guo *et al.*, 1999; Yambao, Masuta *et al.*, 2003; Lin, Shi *et al.*, 2009; Shen, Wang *et al.*, 2010). Nestes trabalhos, foram encontradas interações envolvendo todas as proteínas virais testadas, exceto 6K1 e 6K2, que possuem um domínio de interação com membrana. A P3N-PIPO não foi testada. Ensaio de duplo-híbrido envolvendo TCTP já identificaram diferentes interações envolvendo esta proteína, sendo portanto improvável que ela apresente problemas relacionados a falso negativos (Yoon, Jung *et al.*, 2000; Cans, Passer *et al.*, 2003).

É possível que o mecanismo que envolve a TCTP durante a infecção viral não envolva interações diretas e sim indiretas com o vírus, por meio de outros componentes celulares ainda não determinados. É possível também, que ocorram interações envolvendo mais de uma proteína viral, ou proteínas do hospedeiro que juntamente com proteínas virais são capazes de interagir com a TCTP. Outra possibilidade é de que a TCTP interaja com intermediários formados durante o processamento da poliproteína, uma vez que a clivagem pela protease NIa ocorre de maneira sequencial com afinidades diferentes da protease aos diferentes sítios de clivagem. A proteólise em alguns sítios, como entre a 6K2 e a NIa, só ocorre ao final da replicação viral (Carrington e Dougherty, 1988; Dougherty, Carrington *et al.*, 1988). Foi demonstrado que a TCTP não interage com o domínio PIPO isolado, porém a interação com a P3N-PIPO, forma funcional da proteína, ainda deverá ser testada e a possibilidade de interação não pode ser descartada. Outra possibilidade é que a TCTP interaja com o RNA viral e não com as proteínas em si, embora a ligação de TCTP a RNA não tenha sido relatada.

5.5. Análise de interações entre TCTP e outras proteínas por espectrometria de massas

Como o genoma de *N. benthamiana* não está completamente sequenciado e várias das sequências disponíveis para este organismo não estão presentes no GenBank, é

necessário supor que proteínas homólogas às identificadas em outras plantas estão presentes nos extratos vegetais. Algumas proteínas, em geral classificadas como desconhecidas ou proteínas putativas, foram encontradas em diferentes espécies e apresentaram os mesmos domínios descritos pelo GenBank, provavelmente tratando-se de uma mesma proteína. Este é o caso de proteínas contendo domínios *CobW-like* homólogos a domínios envolvidos na biossíntese de cobalamina e cuja função em plantas é desconhecida (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer, Anderson *et al.*, 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011). Este domínio foi encontrado em cinco proteínas identificadas separadamente. As proteínas encontradas tanto em amostras de plantas saudias quanto de infectadas pelo PepYMV foram enzimas do metabolismo primário, metabolismo de açúcares e de aminoácidos, proteínas de ligação a ácidos nucleicos, uma bomba de prótons e algumas proteínas envolvidas em resposta a estresses. É possível que exista uma diferença na abundância destas proteínas entre os extratos de planta sadia e infectada. No entanto a metodologia utilizada não permite inferir sobre a quantidade de proteínas presentes em cada uma das amostras. O procedimento de excisão de proteínas do gel pode levar a perda de proteínas de uma amostra em relação à outra. É possível que, com a análise das amostras tripzinizadas diretamente após a eluição das proteínas, seja possível analisar de forma relativa à quantidade de cada proteína de acordo com a intensidade dos espectros gerados. Como estas proteínas foram encontradas em ambas as amostras, iremos focar nossa discussão nas proteínas encontradas apenas em plantas infectadas ou saudias.

Entre as proteínas presentes apenas nas amostras de plantas infectadas foram observadas proteínas bastante diferentes funcionalmente. A proteína *Osmotin-like* pertence à subfamília TLP-PA (*Thaumatin-like*) (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer, Anderson *et al.*, 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011). Estas proteínas possuem homólogos em animais, plantas e fungos. Em plantas, são comumente identificadas como alergênicos presentes em frutos. São consideradas proteínas relacionadas à patogênese do tipo 5, possuindo atividade antifúngica, e estão envolvidas em defesa hospedeira e processos relacionados ao desenvolvimento. Possuem a expressão induzida por estresses bióticos como ataque de patógenos, e abióticos como seca e frio. Algumas TLPs hidrolisam beta-1,3-glucanos, comumente presentes em parede celular de fungos (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer, Anderson *et al.*, 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011).

A anidrase carbônica pertence à superfamília beta-CA, composta por enzimas multiméricas com atividade de anidrase carbônica presentes em plantas superiores, algas, fungos e procariotos (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer, Anderson *et al.*, 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011). A anidrase carbônica catalisa a conversão reversível de dióxido de carbono em ácido carbônico por meio de hidratação, em um mecanismo envolvendo zinco. São enzimas amplamente distribuídas, envolvidas em processos fundamentais como fotossíntese, respiração, equilíbrio do pH celular e transporte de íons (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer, Anderson *et al.*, 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011).

A proteína *pistil-specific extensin-like protein* de *Solanum nigrum* possui identidade menor ou igual a 60% com outras proteínas depositadas no GenBank. Ela pertence à superfamília *Pollen proteins Ole e I like* (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer, Anderson *et al.*, 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011). As extensinas são proteínas de parede celular, altamente glicosiladas e abundantes. São induzidas em situações de estresse e estão relacionadas ao fortalecimento da parede em resposta a danos mecânicos. As extensinas específicas de pistilo tem sua expressão tecido-específica, induzida durante o desenvolvimento do pistilo e não são induzidas por condições de estresse (Goldman, Pezzotti *et al.*, 1992). A presença desta proteína em um extrato vegetal obtido de folhas é questionável. É possível que outra proteína contendo este peptídeo não tenha sido identificada por não estar presente no banco de dados.

Outra enzima encontrada apenas em plantas infectadas foi a pectato liase. Esta enzima é uma pectinase envolvida na degradação de pectina e esta envolvida com metabolismo e transporte de carboidratos (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer, Anderson *et al.*, 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011). Já foi relatado o envolvimento desta proteína na infecção de *A. thaliana* por *Erysiphe cichoracearum* como necessária para a susceptibilidade da planta ao fungo (Vogel, Raab *et al.*, 2002). Em *Pseudomonas viridiflava*, uma pectato liase atua como fator de virulência a *A. thaliana*, e seu gene está presente em ilhas de patogenicidade (Jakob, Kniskern *et al.*, 2007). A função destas proteínas com infecções virais não foi relatada, mas pode estar envolvida no remodelamento da parede celular.

A proteína classificada como hipotética de *Vitis vinifera* apresentou características de um transportador de membrana do tipo ABC. Foram identificados domínios transmembrana típicos da família de transportadores ABC e domínios de ligação a ATP

encontrados em transportadores ABC expressos na membrana interna de mitocôndrias, envolvidos em multirresistência a drogas e resistência a estresse oxidativo (Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011). Devido à proteína específica não ter sido caracterizada, podemos supor que provavelmente trata-se de uma permease dependente de ATP do tipo ABC.

A primeira proteína identificada apenas nos extratos de planta sadia foi uma peroxidase putativa de *Brasica oleraceae*. Ela possui domínios de peroxidase secretória pertencente à classe 3 da superfamília de peroxidases de plantas dependentes do grupo heme. Os membros desta superfamília possuem uma molécula heme como grupo prostético e catalisam uma reação de múltiplos passos envolvendo o peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons. As peroxidases da classe 3 são encontradas no espaço extracelular ou nos vacúolos e tem sido implicadas em desintoxicação por peróxido de hidrogênio, catabolismo de auxina, biossíntese de lignina e resposta a estresses (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer, Anderson *et al.*, 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011).

A segunda proteína identificada apenas em plantas sadias está classificada como proteína hipotética de *A. thaliana*. Ela possui um domínio de ligação a DNA de dedo de zinco, presente em proteínas de ligação a cromatina e em transposases, um domínio de função desconhecida encontrado como parte do domínio RNase H de elementos transponíveis putativos e um domínio de dimerização da superfamília hAT, encontrados na região C-terminal de transposases (Marchler-Bauer e Bryant, 2004; Marchler-Bauer, Anderson *et al.*, 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.*, 2011). Devido aos domínios presentes é possível que a proteína identificada seja uma transposase.

De acordo com os critérios utilizados, não foram identificadas proteínas virais entre as proteínas do extrato de plantas infectadas que se ligaram à TCTP. Este resultado corrobora com o observado no ensaio de duplo híbrido, mostrando que não há interação direta entre a TCTP e as proteínas virais. Uma possibilidade é que a TCTP não interaja com o vírus e sim com o RNA viral. Outra possibilidade é o favorecimento da infecção pela TCTP ocorra de maneira indireta e não envolva a interação com nenhum componente viral. No entanto, a possibilidade de que a 72 hpvi a quantidade de proteínas virais ser insuficiente para a identificação pela espectrometria de massa não deve ser descartada. A não interação entre a TCTP e proteínas virais deverá ser confirmada em uma nova análise envolvendo um extrato de folhas sistemicamente infectadas, nas quais o acúmulo viral e consequente presença de proteínas viral é maior.

As proteínas encontradas somente em plantas saudáveis ou infectadas não nos dão um indício claro do envolvimento da TCTP na infecção viral. Nenhuma interação direta entre as proteínas identificadas e a TCTP foi observada anteriormente e a ocorrência de interação precisa ser confirmada. Algumas destas proteínas possuem homólogos que foram identificados como diferencialmente expressos em plantas de tomate infectadas com PepYMV 72 horas após a infecção (Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009). Uma proteína PR5 de tomate foi identificada na biblioteca subtrativa como induzida pela infecção por PepYMV e esta possui o mesmo domínio TLP-PA presente na proteína *Osmotin-like*, podendo corresponder a mesma proteína identificada em nossos experimentos. Outra proteína induzida pela infecção identificada em nossos extratos foi uma peroxidase pertencente à classe 3 da superfamília de peroxidases de plantas dependentes do grupo heme. É interessante notar que embora ela seja induzida pela infecção sua presença foi verificada apenas nos extratos de plantas saudáveis. É possível que algum mecanismo impeça a interação desta proteína com a TCTP. Uma proteína com possível função de pectato liase foi reprimida pela infecção por PepYMV 72 horas após a infecção (Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009). Uma proteína de mesma função foi encontrada nas amostras de plantas infectadas e pode estar interagindo com a TCTP nestas plantas. Um transportador do tipo ABC também foi reprimido pela infecção viral (Alfenas-Zerbini, Maia *et al.*, 2009) e é possível que este corresponda a proteína com domínios de transportador do tipo ABC encontrada em plantas infectadas e que esta esteja interagindo com a TCTP. É provável que a TCTP interaja com algumas destas proteínas podendo neutralizar respostas de defesa e participar de mecanismos que contribuem para a infecção. A ocorrência de interações entre a TCTP e as proteínas da planta identificadas precisa ser confirmada e novos estudos precisam ser realizados para elucidar a o envolvimento destas proteínas no processo de infecção pelo PepYMV.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados confirmam que a indução de *TCTP* favorece a infecção pelo PepYMV, uma vez que seu silenciamento reduz o acúmulo viral. O silenciamento por VIGS não foi capaz de impedir a infecção, mesmo que altos níveis de silenciamento tenham sido obtidos. O mecanismo viral que induz a expressão de *TCTP*, bem como o mecanismo que envolve esta proteína na infecção, permanecem indeterminados. É provável que a *TCTP* interaja de maneira indireta com as proteínas virais, envolvendo a formação de complexos proteicos. Diversas proteínas foram purificadas por ensaios de afinidade com a *TCTP*, e podem exercer uma função no processo de infecção. Estudos adicionais deveriam ser realizados para elucidar a função desta proteína na infecção por PepYMV.

7. REFERÊNCIAS

- Abdul-Razzak, A., T. Guiraud, *et al.* Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. Molecular Plant Pathology, v.10, n.1, JAN, p.109-113. 2009.
- Ahn, J.W., M. Kim, *et al.* Phytocalpain controls the proliferation and differentiation fates of cells in plant organ development. Plant Journal, v.38, n.6, June 01, 2004, p.969-981. 2004.
- Alfenas-Zerbini, P., I. G. Maia, *et al.* Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. Molecular Plant-Microbe Interactions, v.22, p.352-361. 2009.
- Allison, R., R. E. Johnston, *et al.* The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. Virology, v.154, p.9-20. 1986.
- Anandalakshmi, R., G. J. Pruss, *et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, v.95, p.13079-13084. 1998.
- Andersen, K. e I. E. Johansen. 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, v.241, p.304-311. 1998.
- Angell, S. M. e D. Baulcombe. Potato virus X amplicon mediated silencing of nuclear genes. Plant Journal, v.20, p.357-362. 1999.
- Aoki, K., N. Suzui, *et al.* Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. Plant Cell, v.17, n.6, Jun, p.1801-1814. 2005.
- Aparicio, F., C. L. Thomas, *et al.* Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. Plant Physiol, v.138, n.1, May, p.529-36. 2005.
- Arbatova, J., K. Lehto, *et al.* 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, v.79, OCT, p.2319-2323. 1998.
- Ávila, A. C., A. K. Inoue-Nagata, *et al.* Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. Horticultura Brasileira, v.22, n.3, jul-set, p.655 - 658. 2004.
- Babu, M., A. G. Gagarinova, *et al.* Association of the transcriptional response of soybean plants with soybean mosaic virus systemic infection. J Gen Virol, v.89, n.Pt 4, Apr, p.1069-80. 2008.
- Baebler, S., H. Krecic-Stres, *et al.* PVY(NTN) elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. Molecular Plant Pathology, v.10, p.263-275. 2009.
- Basso, J., P. Dallaire, *et al.* Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. Journal of General Virology, v.75, n.OV, p.3157-3165. 1994.
- Baulcombe, D. RNA silencing in plants. Nature, v.431, p.356-363. 2004.
- Becker, A. e M. Lange. VIGS--genomics goes functional. Trends in Plant Science, v.15, n.1, Jan, p.1-4. 2010.

- Berger, P. H., M. J. Adams, *et al.* Family *Potyviridae*. In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo, *et al* (Ed.). Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. Family *Potyviridae*, p.819-841
- Berkowitz, O., R. Jost, *et al.* Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, v.20, p.3430-3447. 2008.
- Bock, K. R. e M. Conti. Cowpea aphid-borne mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, v.134. 1974.
- Bommer, U. A. e B. J. Thiele. The translationally controlled tumour protein (TCTP). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.36, n.3, 2004/3, p.379-385. 2004.
- Brasileiro, A. C. M. e V. T. C. Carneiro, Eds. Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, p.176ed. 1998.
- Brioudes, F., A. M. Thierry, *et al.* Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v.107, n.37, Sep 14, p.16384-9. 2010.
- Bruckner, F. P. Silenciamento gênico induzido por vírus dos genes TCTP, SNF1 e Suba: análise por RT-PCR quantitativo e efeito na infecção de N. benthamina pelo PepYMV. (Monografia). Departamento de Bioquímica e biologia molecular, Universidade Federal de Viçosa Viçosa, 2010.
- Bruun-Rasmussen, M., I. S. Moller, *et al.* The same allele of translation initiation factor 4E mediates resistance against two potyvirus spp. in *Pisum sativum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, v.20, n.9, SEP, p.1075-1082. 2007.
- Burch-Smith, T. M., M. Schiff, *et al.* Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. Plant Physiology, v.142, n.1, Sep, p.21-27. 2006.
- Cans, C., B. J. Passer, *et al.* 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, v.100, p.13892-13897. 2003.
- Carrington, J. C. e W. G. Dougherty. 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, v.85, 1988, p.3391-3395. 1988.
- Carrington, J. C. e D. D. Freed. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. Journal of Virology, v.64, n.4, APR, p.1590-1597. 1990.
- Carrington, J. C., D. D. Freed, *et al.* Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. EMBO Journal, v.9, p.1347-1353. 1990.
- Cascardo, R. S. Estudo do envolvimento das proteínas SI-GAL83 e TCTP na infecção de hospedeiros suscetíveis pelo potyvírus Pepper yellow mosaic virus (PepYMV). (Tese). Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011. 75 p.
- Catoni, M., L. Miozzi, *et al.* Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by *Tomato spotted wilt virus* reveals organ-specific transcriptional responses. Mol Plant Microbe Interact, v.22, n.12, Dec, p.1504-13. 2009.
- Chen, C. e Z. Chen. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. Plant Molecular Biology, v.42, p.387-396. 2000.

- Cheng, Y. Q., Z. M. Liu, *et al.* HC-Pro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. Journal of General Virology, v.89, AUG, p.2046-2054. 2008.
- Chitpatima, S. T., S. Makrides, *et al.* Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. Nucleic Acids Research, v.16, n.5, Mar 25, p.2350. 1988.
- Chung, B. Y., W. A. Miller, *et al.* An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v.105, n.15, Apr 15, p.5897-902. 2008.
- Chung, B. Y. W., W. A. Miller, *et al.* An overlapping essential gene in the Potyviridae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.105, n.15, APR 15, p.5897-5902. 2008.
- Chung, E., E. Seong, *et al.* A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annum* L. cv. Bukang). Molecules and Cells, v.17, n.2, Apr 30, p.377-80. 2004.
- Cotton, S., R. Grangeon, *et al.* Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. Journal of Virology, v.83, n.20, OCT 15, p.10460-10471. 2009.
- Cronin, S., J. Verchot, *et al.* Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. Plant Cell, v.7, n.5, p.549-559. 1995.
- Cui, X., T. Wei, *et al.* The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. Virology, v.397, n.1, Feb 5, p.56-63. 2010.
- Culver, J. N. e M. S. Padmanabhan. Virus-induced disease: Altering host physiology one interaction at a time. Annual Review of Phytopathology, v.45, p.221-43. 2007.
- Dianese, E. C., R. O. Resende, *et al.* High incidence of Pepper yellow mosaic virus in tomatoes in productive areas of Brazil's Federal District. Tropical Plant Pathology, v.33, n.1, JAN-FEB, p.67-68. 2008.
- Diaz-Pendon, J. A. e S. W. Ding. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. Annual Review of Phytopathology, v.46, p.303-326. 2008.
- Dipiero, R. M., J. A. M. Rezende, *et al.* Transmissão do Passionfruit woodiness virus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. Neotropical Entomology, v.35, n.1, p.139-140. 2006.
- Dolja, V. V., R. Haldeman Cahill, *et al.* Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. Virology, v.206, n.2, p.1007-1016. 1995.
- Dolja, V. V., R. Haldeman, *et al.* Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. EMBO Journal, v.13, n.6, MAR 15, p.1482-1491. 1994.
- Donaire, L., D. Barajas, *et al.* Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. Journal of Virology, v.82, n.11, Jun, p.5167-77. 2008.
- Dougherty, W. G., J. C. Carrington, *et al.* Biochemical and mutational analysis of a plant virus cleavage site. EMBO Journal, v.7, p.1281-1287. 1988.
- Dufresne, P. J., K. Thivierge, *et al.* Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. Virology, v.374, n.1, APR 25, p.217-227. 2008.

- Dunoyer, P., C. H. Lecellier, *et al.* Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. Plant Cell, v.16, p.1235-250. 2004.
- Ebhardt, H. A., E. P. Thi, *et al.* Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.102, n.38, SEP 20, p.13398-13403. 2005.
- Eiamtanasate, S., M. Juricek, *et al.* C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum. Virus Genes, v.35, n.3, Dec, p.611-7. 2007.
- Ermolayev, V., W. Weschke, *et al.* Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. Journal of Experimental Botany, v.54, p.2745-2756. 2003.
- Escaler, M., M. A. Aranda, *et al.* Pea embryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. Virology, v.267, n.2, p.318-25. 2000.
- Fauquet, C. M., M. A. Mayo, *et al.*, Eds. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, p.1259ed. 2005.
- Fellers, J., J. Wan, *et al.* *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. Journal of General Virology, v.79, p.2043-2049. 1998.
- Fields, S. e O. K. Song. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature, v.340, p.245-246. 1989.
- Fields, S. e R. Sternglanz. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. Trends in Genetics, v.10, n.8, Aug, p.286-92. 1994.
- Forler, D., T. Kocher, *et al.* An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. Nature Biotechnology, v.21, n.1, Jan, p.89-92. 2003.
- Foster, T. M., T. J. Lough, *et al.* A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex. Plant Cell, v.14, n.7, p.1497-508. 2002.
- Gallie, D. R., R. L. Tanguay, *et al.* The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. Gene, v.165, n.2, p.233-238. 1995.
- Gandia, M., A. Conesa, *et al.* Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*. Virology, v.367, n.2, 2007/10/25, p.298-306. 2007.
- Gavin, A. C., M. Bosche, *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature, v.415, n.6868, Jan 10, p.141-147. 2002.
- Gibbs, A. e K. Ohshima. Potyviruses and the digital revolution. Annual Review of Phytopathology, v.48, p.205-23. 2010.
- Gingras, A. C., R. Aebersold, *et al.* Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. The Journal of physiology, v.563, n.Pt 1, Feb 15, p.11-21. 2005.
- Goldman, M. H., M. Pezzotti, *et al.* Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. Plant Cell, v.4, n.9, Sep, p.1041-51. 1992.
- Golem, S. e J. N. Culver. *Tobacco mosaic virus*-induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant-Microbe Interactions, v.16, n.8, p.681-688. 2003.
- Haldeman-Cahill, R., J. A. Daros, *et al.* Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. Journal of Virology, v.72, n.5, p.4072-4079. 1998.

- Havelda, Z., E. Varallyay, *et al.* Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. Plant Journal, v.55, n.2, JUL, p.278-288. 2008.
- Hillung, J., J. M. Cuevas, *et al.* Transcript Profiling of Different Arabidopsis thaliana Ecotypes in Response to Tobacco etch potyvirus Infection. Frontiers in microbiology, v.3, p.229. 2012.
- Hong, Y. e A. G. Hunt. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. Virology, v.226, n.1, p.146-151. 1996.
- Hsu, Y. C., J. J. Chern, *et al.* Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. Nature, v.445, n.7129, Feb 15, p.785-8. 2007.
- Igarashi, A., K. Yamagata, *et al.* Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, Arabidopsis thaliana, cucurbits, and legumes. Virology, v.386, n.2, APR 10, p.407-416. 2009.
- Inoue-Nagata, A. K., M. E. N. Fonseca, *et al.* Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. Archives of Virology, v.147, p.849-855. 2002.
- Itaya, A., F. S. Ma, *et al.* Plasmodesma-mediated selective protein traffic between "symplasmically isolated" cells probed by a viral movement protein. Plant Cell, v.14, n.9, SEP, p.2071-2083. 2002.
- Jakob, K., J. M. Kniskern, *et al.* The role of pectate lyase and the jasmonic acid defense response in Pseudomonas viridiflava virulence. Molecular Plant-Microbe Interaction, v.20, n.2, Feb, p.146-58. 2007.
- Kasschau, K. D. e J. C. Carrington. Requirement of HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. Virology, v.209, n.1, p.268-273. 1995.
- Kasschau, K. D., S. Cronin, *et al.* Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. Virology, v.228, n.2, p.251-262. 1997.
- Kim, K. J., J. H. Lim, *et al.* Functional study of Capsicum annuum fatty acid desaturase 1 cDNA clone induced by Tobacco mosaic virus via microarray and virus-induced gene silencing. Biochemical and Biophysical Research Communications, Jul 26. 2007.
- Kim, S. H., S. Macfarlane, *et al.* 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, v.104, n.26, Jun 26, p.11115-20. 2007.
- Kim, Y. M., Y. J. Han, *et al.* Overexpression of Arabidopsis translationally controlled tumor protein gene AtTCTP enhances drought tolerance with rapid ABA-induced stomatal closure. Molecules and Cells, v.33, n.6, Jun, p.617-26. 2012.
- King, A. M. Q., M. J. Adams, *et al.* Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012.
- Kjemtrup, S., K. S. Sampson, *et al.* Gene silencing from DNA carried by a geminivirus. Plant Journal, v.14, n.1, p.91-100. 1998.
- Klein, P. G., R. R. Klein, *et al.* Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. Virology, v.204, p.759-769. 1994.
- Komatsu, K., M. Hashimoto, *et al.* Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. Molecular Plant-Microbe Interaction, v.23, n.3, Mar, p.283-93. 2010.

- Kumagai, M. H., J. Donson, *et al.* Cytoplasmatic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v.92, p.1679-1683. 1995.
- Kurth, E. G., V. V. Peremyslov, *et al.* Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine. Journal of Virology, v.86, n.11, Jun, p.6002-9. 2012.
- Laín, S., M. T. Martin, *et al.* 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, v.65, n.1, JAN, p.1-6. 1991.
- Lalonde, S., D. W. Ehrhardt, *et al.* Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. Plant Journal, v.53, n.4, Feb, p.610-35. 2008.
- Lellis, A. D., K. D. Kasschau, *et al.* Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. Current Biology, v.12, n.12, p.1046-1051. 2002.
- Léonard, S., D. Plante, *et al.* Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. Journal of Virology, v.74, p.7730-7737. 2000.
- Li, C., L. Qiu, *et al.* The first molluscan TCTP in *Venerupis philippinarum*: molecular cloning and expression analysis. Fish Shellfish Immunology, v.29, n.3, Sep, p.530-3. 2010.
- Li, F. e S. W. Ding. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. Annual Review of Microbiology, v.60, p.503-531. 2006.
- Liao, J. Y., C. C. Hu, *et al.* Full-length sequence analysis of a distinct isolate of *Bidens* mottle virus infecting sunflower in Taiwan. Archives of Virology, v.154, n.4, APR, p.723-725. 2009.
- Liao, M., Y. Li, *et al.* Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach. Proteomics, v.9, n.10, May, p.2809-19. 2009.
- Lin, L., Z. Luo, *et al.* Interaction between potyvirus P3 and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) of host plants. Virus Genes, v.43, n.1, Aug, p.90-2. 2011.
- Lin, L., Y. H. Shi, *et al.* Protein-protein interactions in two potyviruses using the yeast two-hybrid system. Virus Research, v.142, n.1-2, JUN, p.36-40. 2009.
- Liu, Y., M. Schiff, *et al.* Virus-induced gene silencing in tomato. Plant Journal, v.31, n.6, p.777-86. 2002.
- _____. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. Plant Journal, v.30, n.4, p.415-29. 2002.
- Liu, Y. L., M. Schiff, *et al.* Involvement of MEK1, MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. Plant Journal, v.38, n.5, JUN, p.800-809. 2004.
- Lozano-Duran, R., T. Rosas-Diaz, *et al.* Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach. PLoS One, v.6, n.7, p.e22383. 2011.
- Lucas, W. J. Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. Virology, v.344, p.169-184. 2006.
- Lucinda, N., W. B. Da Rocha, *et al.* Complete genome sequence of pepper yellow mosaic virus, a potyvirus, occurring in Brazil. Archives of Virology, v.157, n.7, Jul, p.1397-401. 2012.

- Macfarlane, S. A. Tobraviruses--plant pathogens and tools for biotechnology. Molecular Plant Pathology, v.11, n.4, Jul, p.577-83. 2010.
- Mahajan, S., V. V. Dolja, *et al.* 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, v.70, n.7, p.4370-4379. 1996.
- Maia, I. G. e F. Bernardi. Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. Journal of General Virology, v.77, n.pt.5, p.869-877. 1996.
- Mallory, A. C., B. J. Reinhart, *et al.* A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v.99, n.23, p.15228-33. 2002.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, *et al.* CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. Nucleic Acids Research, v.37, n.Database issue, Jan, p.D205-10. 2009.
- Marchler-Bauer, A. e S. H. Bryant. CD-Search: protein domain annotations on the fly. Nucleic Acids Research, v.32, n.Web Server issue, Jul 1, p.W327-31. 2004.
- Marchler-Bauer, A., S. Lu, *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. Nucleic Acids Research, v.39, n.Database issue, Jan, p.D225-9. 2011.
- Martin-Hernandez, A. M. e D. C. Baulcombe. Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. Journal of Virology, v.82, n.8, Apr, p.4064-71. 2008.
- Martinez-Priego, L., L. Donaire, *et al.* Silencing suppressor activity of the Tobacco rattle virus-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. Virology, v.376, n.2, Jul 5, p.346-56. 2008.
- Maule, A. J., C. Caranta, *et al.* Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. Molecular Plant Pathology, v.8, n.2, Mar, p.223-31. 2007.
- Merits, A., D. Guo, *et al.* Biochemical and genetic evidence for interactions between potato a potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. Virology, v.263, p.15-22. 1999.
- Michon, T., Y. Estevez, *et al.* The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. The FEBS Journal, v.273, n.6, Mar, p.1312-22. 2006.
- Murphy, J. F., P. G. Klein, *et al.* Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. Virology, v.220, n.2, p.535-538. 1996.
- Nakkaew, A., W. Chotigeat, *et al.* Molecular cloning and expression of EgTCTP, encoding a calcium binding protein, enhances the growth of callus in oil palm (*Elaeis guineensis*, Jacq). Songklanakarin Journal of Science and Technology, v.32, n.6, Nov. - Dec. 2010, p.561-569. 2010.
- Naqvi, A. R., M. Sarwat, *et al.* Differential expression analyses of host genes involved in systemic infection of Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV). Virus Research, v.160, n.1-2, Sep, p.395-9. 2011.
- Nascimento, C. S., M. A. Machado, *et al.* Differential expression of genes in resistant versus susceptible Gyr x Holstein cattle challenged with the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Genetics and Molecular Research, v.9, n.4, p.1974-9. 2010.

- Nicaise, V., S. German-Retana, *et al.* The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. Plant Physiology, v.132, n.3, Jul, p.1272-82. 2003.
- Nicolas, O., S. W. Dunnington, *et al.* Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco. Virology, v.237, n.2, p.452-459. 1997.
- Niepel, M. e D. R. Gallie. Identification and characterization of the functional elements within the *Tobacco etch virus* 5' leader required for cap-independent translation. Journal of Virology, v.73, p.9080-9088. 1999.
- Pacheco, R., A. Garcia-Marcos, *et al.* Comparative analysis of transcriptomic and hormonal responses to compatible and incompatible plant-virus interactions that lead to cell death. Molecular Plant-Microbe Interactions, v.25, n.5, May, p.709-23. 2012.
- Park, J. H., M. S. Cosgrove, *et al.* A core nucleosome surface crucial for transcriptional silencing. Nature Genetics, v.32, n.2, p.273-9. 2002.
- Peart, J. R., G. Cook, *et al.* An *EDS1* orthologue is required for *N*-mediated resistance against *Tobacco mosaic virus*. Plant Journal, v.29, n.5, p.569-79. 2002.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, v.29, n.9, May 1, p.e45. 2001.
- Pompe-Novak, M., K. Gruden, *et al.* *Potato virus Y*-induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology, v.67, n.3-5, 2006/9/2005-October, p.237-247. 2006.
- Qin, X., F. Gao, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein (TCTP) from *Jatropha curcas* L. Molecular Biology Reports, v.38, n.5, Jun, p.3107-12. 2010.
- Rajamaki, M. L., J. Kelloniemi, *et al.* A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. Virology, v.342, n.1, Nov 10, p.88-101. 2005.
- Ratcliff, F., A. Hernandez Martin, *et al.* *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. Plant Journal, v.25, n.2, p.237-245. 2001.
- Restrepo-Hartwig, M. A. e J. C. Carrington. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. Journal of Virology, v.68, n.4, APR, p.2388-2397. 1994.
- Riechmann, J. L., S. Lain, *et al.* The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. Journal of General Virology, v.70, p.2785-2789. 1989.
- Riedel, D., D. E. Lesemann, *et al.* Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus. Archives of Virology, v.143, n.11, p.2133-58. 1998.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, *et al.* A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nature Biotechnology, v.17, n.10, Oct, p.1030-1032. 1999.
- Robaglia, C. e C. Caranta. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. Trends in Plant Science, v.11, n.1, Jan, p.40-45. 2006.

- Rodríguez-Cerezo, E., E. D. Ammar, *et al.* Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. Journal of General Virology, v.74, n.SEP, SEP, p.1945-1949. 1993.
- Rodríguez-Cerezo, E., K. Findlay, *et al.* The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. Virology, v.236, p.296-306. 1997.
- Rohila, J. S., M. Chen, *et al.* Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. Plant Journal, v.38, p.172-181. 2004.
- _____. Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. Plant Journal, v.46, n.1, Apr, p.1-13. 2006.
- Rojas, M. R., F. M. Zerbini, *et al.* Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. Virology, v.237, n.2, p.283-295. 1997.
- Rubio, M., P. Martínez-Gómez, *et al.* Evaluation of resistance to sharka (Plum pox virus) of several Prunus rootstocks. Plant Breeding, v.124, n.1, FEB, p.67-70. 2005.
- Ruiz, M. T., O. Voinnet, *et al.* Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell, v.10, p.937-946. 1998.
- Rutledge, R. G. e C. Cote. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. Nucleic Acids Research, v.31, n.16, Aug 15, p.e93. 2003.
- Sambrook, J. e D. Russell. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3^a ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344 p.
- Sanchez-Duran, M. A., M. B. Dallas, *et al.* Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO-conjugating enzyme is required for viral infection. Journal of Virology, v.85, n.19, Oct, p.9789-800. 2012.
- Schaad, M. C., P. E. Jensen, *et al.* Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. EMBO Journal, v.16, n.13, p.4049-4059. 1997.
- Schaad, M. C., A. D. Lellis, *et al.* VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. Journal of Virology, v.71, n.11, p.8624-8631. 1997.
- Senthil, G., H. Liu, *et al.* Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. Journal of General Virology, v.86, n.Pt 9, Sep, p.2615-25. 2005.
- Shen, W., P. Yan, *et al.* Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of Papaya ringspot virus interacts with papaya calreticulin. Molecular Plant Pathology, v.11, n.3, May, p.335-46. 2010.
- Shen, W. T., M. Q. Wang, *et al.* Protein interaction matrix of Papaya ringspot virus type P based on a yeast two-hybrid system. Acta Virologica, v.54, n.1, p.49-54. 2010.
- Shevchenko, A., H. Tomas, *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nature Protocols, v.1, n.6, p.2856-60. 2006.
- Shukla, D. D., C. W. Ward, *et al.* The Potyviridae. Wallingford, UK: CAB International. 1994. 516 p.
- Simón-Buela, L., H. S. Guo, *et al.* Cap-independent *leaky scanning* as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. Journal of General Virology, v.78, n.10, p.2691-2699. 1997.

- Sobhanifar, S. Yeast Two Hybrid Assay: A Fishing Tale. BioTeach Journal v.1. 2003.
- Suter, B., D. Auerbach, *et al.* Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. Biotechniques, v.40, n.5, May, p.625-44. 2006.
- Tang, G., B. J. Reinhart, *et al.* A biochemical framework for RNA silencing in plants. Genes & Development, v.17, n.1, Jan 1, p.49-63. 2003.
- Tang, G. L. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. Trends in Biochemical Sciences, v.30, n.2, FEB, p.106-114. 2005.
- Teycheney, P. Y., R. Aziz, *et al.* 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, v.81, p.1121-1126. 2000.
- Tonganunt, M., B. Nupan, *et al.* The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) infection. Fish & Shellfish Immunology, v.25, n.5, p.633-637. 2008.
- Truta, A. A. C., A. R. R. Souza, *et al.* Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. Fitopatologia Brasileira, v.29, p.160-168. 2004.
- Tuttle, J. R., A. M. Idris, *et al.* Geminivirus-mediated gene silencing from Cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. Plant Physiology, v.148, n.1, SEP, p.41-50. 2008.
- Urcuqui-Inchima, S., I. G. Maia, *et al.* Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. Virology, v.268, p.104-111. 2000.
- Van Criekinge, W. e R. Beyaert. Yeast Two-Hybrid: State of the Art. Biological Procedures Online, v.2, Oct 4, p.1-38. 1999.
- Vandesompele, J., K. De Preter, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, v.3, n.7, Jun 18, 2002.
- Verchot, J. e J. C. Carrington. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. Journal of Virology, v.69, n.6, p.3668-3674. 1995.
- Vidal, M., P. Braun, *et al.* Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v.93, n.19, Sep 17, p.10321-6. 1996.
- Vijayapalani, P., M. Maeshima, *et al.* Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. PLoS Pathogens, v.8, n.4, Apr, p.e1002639. 2012.
- Vogel, J. P., T. K. Raab, *et al.* PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis. Plant Cell, v.14, n.9, Sep, p.2095-106. 2002.
- Vossen, J. H., A. Abd-El-Haliem, *et al.* Identification of tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase-C (PI-PLC) family members and the role of PLC4 and PLC6 in HR and disease resistance. Plant Journal, v.62, n.2, Apr, p.224-39. 2010.
- Wang, G. G., J. K. Song, *et al.* Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. Nature, v.459, n.7248, JUN 11, p.847-U6. 2009.
- Wang, R. Y., G. Powell, *et al.* Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. Journal of General Virology, v.79, p.1519-1524. 1998.

- Wang, S., X. F. Zhao, *et al.* Molecular cloning and characterization of the translationally controlled tumor protein from *Fenneropenaeus chinensis*. Molecular Biology Reports, v.36, n.7, Sep, p.1683-93. 2009.
- Waterhouse, P. M. e C. A. Helliwell. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. Nature Reviews. Genetics., v.4, n.1, p.29-38. 2003.
- Waters, P. J., C. R. Scriver, *et al.* Homomeric and heteromeric interactions between wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase subunits: evaluation of two-hybrid approaches for functional analysis of mutations causing hyperphenylalaninemia. Molecular Genetics and Metabolism, v.73, n.3, Jul, p.230-8. 2001.
- Wei, T. Y. e A. M. Wang. 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, v.82, n.24, DEC 15, p.12252-12264. 2008.
- Wen, R. H. e M. R. Hajimorad. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. Virology, v.400, n.1, Apr 25, p.1-7. 2010.
- Whitelam, G. C. e W. Cockburn. Antibody expression in transgenic plants. Trends in Plant Science, v.1, p.268-272. 1996.
- Whitham, S. A., S. Quan, *et al.* Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. Plant Journal, v.33, n.2, Jan, p.271-83. 2003.
- Wittmann, S., H. Chatel, *et al.* 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, v.234, n.1, p.84-92. 1997.
- Yambao, M. L., C. Masuta, *et al.* The central and C-terminal domains of VPg of Clover yellow vein virus are important for VPg-HCPro and VPg-VPg interactions. Journal of General Virology, v.84, n.Pt 10, Oct, p.2861-9. 2003.
- Yang, C., R. Guo, *et al.* Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. Molecular Plant-Microbe Interactions, v.20, n.4, p.358-370. 2007.
- Yang, C. L., C. Q. Zhang, *et al.* Differential requirement of ribosomal protein S6 by plant RNA viruses with different translation initiation strategies. Virology, v.390, n.2, AUG 1, p.163-173. 2009.
- Yang, Y. e D. F. Klessig. Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, v.93, p.14972-14977. 1996.
- Yoon, T., J. Jung, *et al.* Identification of the self-interaction of rat TCTP/IgE-dependent histamine-releasing factor using yeast two-hybrid system. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.384, n.2, Dec 15, p.379-82. 2000.
- Yubero, N., G. Estes, *et al.* Molecular cloning, expression analysis and chromosome localization of the Tpt1 gene coding for the pig translationally controlled tumor protein (TCTP). Molecular Biology Reports, v.36, n.7, Sep, p.1957-65. 2009.
- Zerbini, F. M. e E. M. Zambolim. A família Potyviridae. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.7, p.1-66. 1999.
- Zhu, Y., Y. Qi, *et al.* Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. Plant Physiology, v.130, n.1, p.138-46. 2002.