

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA VEGETAL

**Estudo das interações entre proteínas de
Groundnut ringspot virus (*Bunyaviridae*:
Tospovirus)**

RAYANE NUNES LIMA

Orientador: Dr. Renato de Oliveira Resende

Brasília, 2014.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA VEGETAL

**Estudo das interações entre proteínas de
Groundnut ringspot virus (*Bunyaviridae*:
Tospovirus)**

RAYANE NUNES LIMA

Orientador: Dr. Renato de Oliveira Resende

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília, 2014.

RAYANE NUNES LIMA

**Estudo das interações entre proteínas de
*Groundnut ringspot virus (Bunyaviridae:
Tospovirus)***

Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende (Orientador)
(CEL-UnB)**

**Prof. Dr. Fernando Lucas de Melo
(CEL-UnB)**

**Dra. Marília Santos Silva
(Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia)**

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Família <i>Bunyaviridae</i>	7
1.2 Gênero <i>Tospovirus</i>	8
1.2.1 Importância econômica.....	8
1.2.2 Taxonomia e Diversidade	8
1.2.3 Interação Vírus-Vetor	11
1.2.4 Morfologia da Partícula e Genoma Viral.....	12
1.2.5 Transcrição e Replicação	13
1.2.6 NSs: Supressão do mecanismo de Silenciamento gênico da planta ...	14
1.2.7 NSm: Movimento viral a longa distância e célula-a-célula.....	15
1.2.8 Proteínas não estruturais como genes de avirulência	16
1.3 Interações Proteína-Proteína	17
1.3.1 Ferramentas para o estudo das Interações Proteicas.....	17
1.3.2 Modelagem Molecular por Homologia Estrutural.....	18
1.3.3 Interações proteína-proteína para Tospovírus	19
2. HIPÓTESE CIENTÍFICA	20
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivos gerais	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 RT-PCR para amplificação dos genes N e NSm de GRSV	22
4.2 Clonagem dos genes N e NSm no vetor pGEM [®] -T <i>easy</i>	23
4.3 Clonagem dos genes N e NSm no vetor pENTR2B	23
4.4 Clonagem dos genes N E NSm nos vetores pSITE	23
4.5 Ensaios de Fluorescência Bimolecular Complementar (BiFC)	24
4.6 Modelagem Estrutural por Homologia Molecular.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5. 1 Amplificação dos genes N e NSm de GRSV e clonagem nos vetores de destino pSITE	25
5. 2 Interação entre as proteínas N e NSM de GRSV <i>in planta</i>	26
5. 3 Modelagem Estrutural por Homologia da Proteína N de GRSV	28
5. 4 Resíduos de aminoácidos estratégicos são conservados entre os Tospovírus	31
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	44
LISTA DE FIGURAS	45
LISTA DE TABELAS	46
AGRADECIMENTOS	47

RESUMO

Groundnut ringspot virus (GRSV) pertence ao gênero *Tospovirus*, o único da família de arbovírus *Bunyaviridae* capaz de infectar vegetais, sendo transmitido por tripes (*Thysanoptera: Thripidae*) de maneira circulativa propagativa. O genoma dos tospovírus é constituído por três segmentos de RNA fita simples denominados RNA S (*Small*), RNA M (*Medium*) e RNA L (*Large*). O RNA L codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); o RNA S codifica a proteína do nucleocapsídeo (N) e a proteína supressora do silenciamento gênico (NSs); e o RNA M codifica a proteína precursora das glicoproteínas Gn e Gc e a NSm, proteína de movimento viral célula-a-célula. As interações proteicas entre N e NSm são importantes para a disseminação da infecção viral na planta. Para a movimentação viral em plantas infectadas é necessária a oligomerização da proteína NSm, que forma túbulos que penetram os plasmodesmas celulares e promovem a passagem dos ribonucleocapsídeos virais de uma célula a outra. Os ribonucleocapsídeos são formados pela RNA polimerase viral (RdRp) e pelos segmentos de RNA (S, M e L) envolvidos pela nucleoproteína (N), que se oligomeriza para encapsidar todo o RNA viral. O presente trabalho investigou, pela primeira vez, as interações entre a proteína N e NSm de GRSV através da técnica de Fluorescência Bimolecular Complementar, bem como evidenciou a localização subcelular citoplasmática de cada interação. Um modelo tridimensional para a proteína N de GRSV foi construído *in silico*, por modelagem estrutural por homologia molecular, a partir das estruturas secundária e terciária da proteína N de LACV (*La Crosse virus; Orthobunyavirus*), e os domínios funcionais para a interação N x N e interação N x RNA foram definidos. A proteína N de GRSV apresenta um braço N-terminal (aa 1-32), um braço C-terminal (aa 224-258) e uma região globular com uma cavidade contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e positivos para a interação com o RNA. O alinhamento de sequências de aminoácidos da proteína N de todos os Tospovírus já caracterizados mostrou que os resíduos de aminoácidos preditos como chave para a conformação e interação da proteína N são conservados entre as espécies. Juntas, essas evidências abrem caminho para novos estudos acerca das interações proteicas a fim de elucidar o movimento célula-a-célula do GRSV e de outros Tospovírus.

Palavras-chave: *Tospovirus*, Fluorescência Bimolecular Complementar.

ABSTRACT

Groundnut ringspot virus (GRSV) belongs to the genus *Tospovirus*, the only plant-infecting genus of the family *Bunyaviridae*, being transmitted by thrips (Thysanoptera: Thripidae) in a circulative propagative manner. The genome of tospoviruses consists of three single stranded RNA segments, termed S RNA (small) M RNA (Medium) and L RNA (Large). The L RNA encodes an RNA dependent RNA polymerase (RdRp). The S RNA encodes the nucleocapsid protein (N) and a gene silencing suppressor protein (NSs). The M RNA encodes the precursor protein of the Gn and Gc glycoproteins and the NSm protein, a viral cell-to-cell movement protein. Protein interactions between N and NSm are important to the viral infection spread in the plant. The NSm oligomerizes to form tubules that penetrate through plasmodesmata allowing the passage of viral ribonucleocapsids promoting cell-to-cell viral movement. The ribonucleocapsids are formed by the viral RNA polymerase (RdRp) and the RNA segments (S, M and L) surrounded by the nucleoprotein (N), which oligomerizes to encapsidate the viral RNA. This study investigated for the first time, homotypic and heterotypic interactions between N and NSm of the GRSV by Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) in planta and showed the cytoplasmic subcellular localization of each interaction. A three-dimensional model for N GRSV protein was constructed in silico, by molecular homology modeling, from secondary and tertiary protein structures of N LACV (*La Crosse virus; Orthobunyavirus*) and the functional domains for N x N interaction and N x RNA interaction were defined. N GRSV protein presents an N-terminal arm (aa 1-32), a C-terminal arm (aa 224-258) and a globular region with a groove containing hydrophobic and positive amino acid residues for interaction with RNA. The alignment of amino acid sequences of the N protein of all characterized tospoviruses has shown that the amino acid residues important to protein fold and interaction of the N protein are conserved among all species. Together, this evidence allows further studies about the protein interactions involved to the cell-to-cell movement for GRSV and for other tospoviruses.

Keywords: *Tospovirus*, BiFC

1. INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA *BUNYAVIRIDAE*

Estabelecida oficialmente em 1975, *Bunyaviridae* é a maior família de arbovírus (*arthropod-borne virus*) de RNA, com aproximadamente 350 espécies descritas (Walter et al., 2011) e está dividida em cinco gêneros: *Hantavirus*, *Orthobunyavirus*, *Phebovirus*, *Nairovirus*, que infectam humanos e animais e *Tospovirus*, que infecta plantas (Guu et al., 2012) (Fig.1). Todos os gêneros acima são transmitidos por vetores artrópodes (i.e. carrapatos, tripes, anófeles, flebótomos), com exceção dos *Hantavirus* que são transmitidos através de partículas aerossóis presentes nas excretas de roedores (Muridae) infectados (Jonsson et al., 2010). As famílias mais próximas filogeneticamente à *Bunyaviridae* são a *Arenaviridae* e a *Orthomyxoviridae* (Fauquet et al., 2005).

O gênero *Hantavirus* é responsável pela hantavirose humana, doença emergente fulminante causadora da síndrome pulmonar por hantavírus (SPH) e da febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) (Ma Y et al., 2013). O gênero *Orthobunyavirus* é de grande importância epidemiológica na América Central e na América do Sul, pois causa a febre do Oropoche, cefalites e meningite em humanos (Bowden et al., 2013). *Phebovirus* estão relacionados com altas taxas de indução de abortos em ruminantes e podem causar cegueira, febre hemorrágica e desordens neurológicas em humanos (Lihoradova et al., 2013). O gênero *Nairovirus* possui membros responsáveis por infecções muitas vezes assintomáticas em animais domésticos e em humanos é responsável pela agressiva febre hemorrágica do Congo e da Criméia (Bente et al., 2013). Os *Tospovirus* serão detalhadamente abordados no próximo tópico.

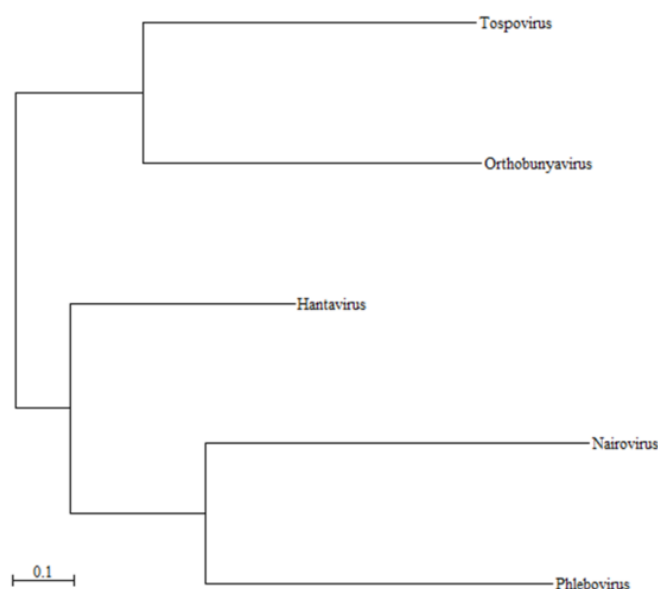


Figura 1: Árvore filogenética de *Bunyaviridae* baseada na sequência de aminoácidos da proteína N da espécie tipo de cada gênero. Números de acesso do *GenBank* das sequências utilizadas: *Phebovirus* [EF530207]; *Hantavirus* [JN712306]; *Orthobunyavirus* [NC001927]; *Tospovirus* [DQ915948] e *Nairovirus* [NC004157]. A árvore foi construída com o programa PhyML utilizando-se o modelo GTR e *bootstrap* de 1000 replicatas.

Os bunyavírus apresentam partículas virais pleomórficas medindo entre 80 a 120 nm de diâmetro e genoma dividido em três segmentos de RNA fita simples (ssRNA) com orientações de senso negativo e orientações ambisenso de acordo com cada gênero. Os segmentos de RNA são designados, de acordo com seus tamanhos, em RNA L (*large*), RNA M (*medium*) e RNA S (*small*) (Pappu et al., 2009). O tamanho de cada segmento e os genes codificados também variam entre os cinco diferentes gêneros, porém, é consenso entre eles a presença das quatro proteínas estruturais: RNA polimerase, nucleoproteína e duas glicoproteínas (Fauquet et al., 2005).

Nos *Tospovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phebovirus* e *Hantavirus* está presente uma ORF (*Open Reading Frame*) no RNA S para a proteína não estrutural denominada NSs, que em *Tospovirus* possui função de supressora do silenciamento gênico

(de Rond et al., 2013) e nos *Hantavirus*, *Pheblovirus* e *Orthobunyavirus* auxilia na evasão do sistema imune inato atuando como antagonista do interferon do hospedeiro (Kalveram et al., 2013; van Knippenberg et al., 2010). No RNA M está presente uma ORF para a NSm, proteína não estrutural de movimento no *Tospovirus* e de função ainda não bem elucidada para *Orthobunyavirus* e *Pheblovirus*, mas que parece estar relacionada com o grau de virulência e montagem da partícula (Shi et al., 2006).

1.2 GÊNERO *TOSPOVIRUS*

1.2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Os Tospovírus são encontrados em todos os continentes e infectam uma grande variedade de cultivares de hortaliças, grãos e plantas ornamentais economicamente importantes como crisântemo, íris, cebola, tomate, pimentão, alface, abobrinha, melancia, batata, amendoim, soja e feijão (Pappu et al., 2009; Oliveira et al., 2012; Zhou et al., 2011).

Os sintomas iniciais apresentados pelas plantas infectadas são anéis cloróticos, anéis necróticos, distorções folheares e bronzeamento, já os sintomas mais severos da infecção resultam em necroses caulinares, redução da produtividade devido à morte da planta ou perda do valor agregado dos frutos comerciais (Wilson, 2001; Latham & Jones, 1997). O “Vira-cabeça” do tomateiro e o “sapeco” da cebola são exemplos de doenças causadas pelos tospovírus nas condições brasileiras (Fig. 2). Esses vírus são transmitidos por tripses (*Thysanoptera: Thripidae*) de forma circulativa propagativa e nenhuma evidência de transmissão vertical de tospovírus através de sementes foi encontrada. Prejuízos em todo o mundo já foram estimados em aproximadamente um bilhão de dólares por ano e em 2011, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a espécie tipo do gênero, foi classificada em segundo lugar no *ranking* de vírus de plantas com grande impacto na agropecuária mundial (Scholthof et al., 2011).



Figura 2: **Sintomas causados pela infecção por *Tospovirus***. A: necroses folheares em plantas de cebola causados pela doença “sapeco”. B: curvamento do ponteiro e bronzeamento causado pela doença do “vira-cabeça do tomate”. C: Tomate apresentando anéis cloróticos concêntricos característicos de infecção por Tospovírus. (Fotos do acervo pessoal de Renato de Oliveira Resende)

1.2.2 TAXONOMIA E DIVERSIDADE

Em 1915, o primeiro tospovírus foi isolado em tomateiro na Austrália e posteriormente foi caracterizado e denominado *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Brittlebank, 1919; Samuel et al., 1930). Estudos moleculares indicaram que esse vírus pertencia à família *Bunyaviridae* e um gênero de vírus de plantas foi então criado (Francki et al., 1991). O nome do gênero *Tospovirus* é derivado dessa espécie de referência: “**TO**mato

SPOTTED WILT VIRUS". No Brasil, a ocorrência de tospovírus foi relatada em amendoim em 1941 e então denominada "mancha anular do amendoim" (Costa, 1941).

O critério de classificação taxonômica é baseado na morfologia da partícula, na sorologia e análise comparativa da identidade das sequências das proteínas do nucleocapsídeo (N), e no espectro de hospedeiros de cada possível espécie. Sendo a identidade de sequência da proteína N entre dois tospovírus menor que 90%, os isolados são considerados espécies distintas (Fauquet et al., 2005).

Atualmente já foram identificadas vinte e nove espécies de tospovírus, sendo oito espécies aceitas e vinte e uma ainda consideradas espécies tentativas (Tabela 1) (Fauquet et al., 2005). No Brasil há uma grande diversidade de tospovírus, com a presença de isolados de TSWV, GRSV, ZLCV, TCSV, CSNV, IYSV e BeNMV, identificados em diversas culturas em todo território nacional.

Na árvore filogenética das espécies (fig. 3) é possível diferenciar dois clados principais, um clado que representa o grupo dos vírus Americanos e um clado que representa o grupo Euro-asiático. A classificação dos clados não corresponde à distribuição geográfica dos tospovírus; TSWV, INSV, IYSV, dentre outros, estão distribuídos mundialmente, provavelmente devido à ampla distribuição de seus vetores *Frankliniella occidentalis* e *Thrips tabaci* (Riley et al., 2011) e/ou intercâmbio de material vegetal infectado.

Tabela1: Espécies aceitas e espécies tentativas para o Gênero *Tospovirus*.

Espécie	Acrônimo	Número de acesso do GenBank (Sequência da proteína do Nucleocapsídeo)
<i>Tomato spotted wilt virus</i> ^a	TSWV	DQ915948
<i>Groundnut ringspot virus</i> ^a	GRSV	AF251271
<i>Tomato chlorotic spot virus</i> ^a	TCSV	S54325
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> ^a	CSNV	AF067068
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> ^a	ZLCV	AF067069
<i>Impatiens necrotic spot virus</i> ^a	INSV	D00914
<i>Bean necrotic mosaic virus</i> ^b	BeNMV	NC018071
<i>Soybean vein necrosis virus</i> ^c	SVNaV	HQ728387
<i>Iris yellow spot virus</i> ^a	IYSV	AB378751
<i>Pepper necrotic spot virus</i> ^d	PNSV	HE584762
<i>Melon yellow spot virus</i> ^a	MYSV	NC008300
<i>Tomato necrosis virus</i> ^a	TNeV	AY647437
<i>Watermelon silver mottle virus</i> ^a	WSMoV	NC003843
<i>Peanut yellow spot virus</i> ^a	PYSV/GYSV*	AF013994
<i>Groundnut bud necrosis virus</i> ^a	GBNV/PBNV*	NC003619
<i>Capsicum chlorosis virus</i> ^a	CaCV	NC008301
<i>Tomato necrotic ringspot virus</i> ^e	TNRV	FJ946835
<i>Hippeastrum chlorotic ringspot virus</i>	HCRV	KC290943
<i>Polygonum ringspot virus</i> ^a	PolRSV	EF445397
<i>Tomato yellow ring virus</i> ^a	TYRV	DQ810195
<i>Calla lily chlorotic spot virus</i> ^f	CCSV	AY867502
<i>Physalis silver mottle virus</i> ^a	PSMV	AB038343
<i>Peanut chlorotic fanspot virus</i> ^a	PCSFV/GCSFV*	AF080526
<i>Watermelon bud necrosis virus</i> ^a	WBNV	EU249351
<i>Tomato zonate spot virus</i> ^a	TZSV	NC010489
<i>Melon severe mosaic virus</i> ^a	MSMV	EU275149
<i>Alstroemeria necrotic streak virus</i> ^g	ANSV	GQ478668
<i>Pepper chlorotic spot virus</i> ^h	PCSV	KF383956
<i>Lisianthus necrotic ringspot virus</i> ⁱ	LNRV	AB852525

As espécies aceitas estão estilizadas em itálico. * Os autores consideram ou *peanut* ou *groundnut* para amendoim. Referências: ^a: Pappu et al., 2009; ^b: Oliveira et al., 2012; ^c: Zhou et al., 2011; ^d: Torres et al., 2012; ^e: Seepiban et al., 2011; ^f: Liu et al., 2012; ^g: Hassani-Mehraban et al., 2010; ^h: Cheng et al., 2014; ⁱ: Shimomoto et al., 2014.

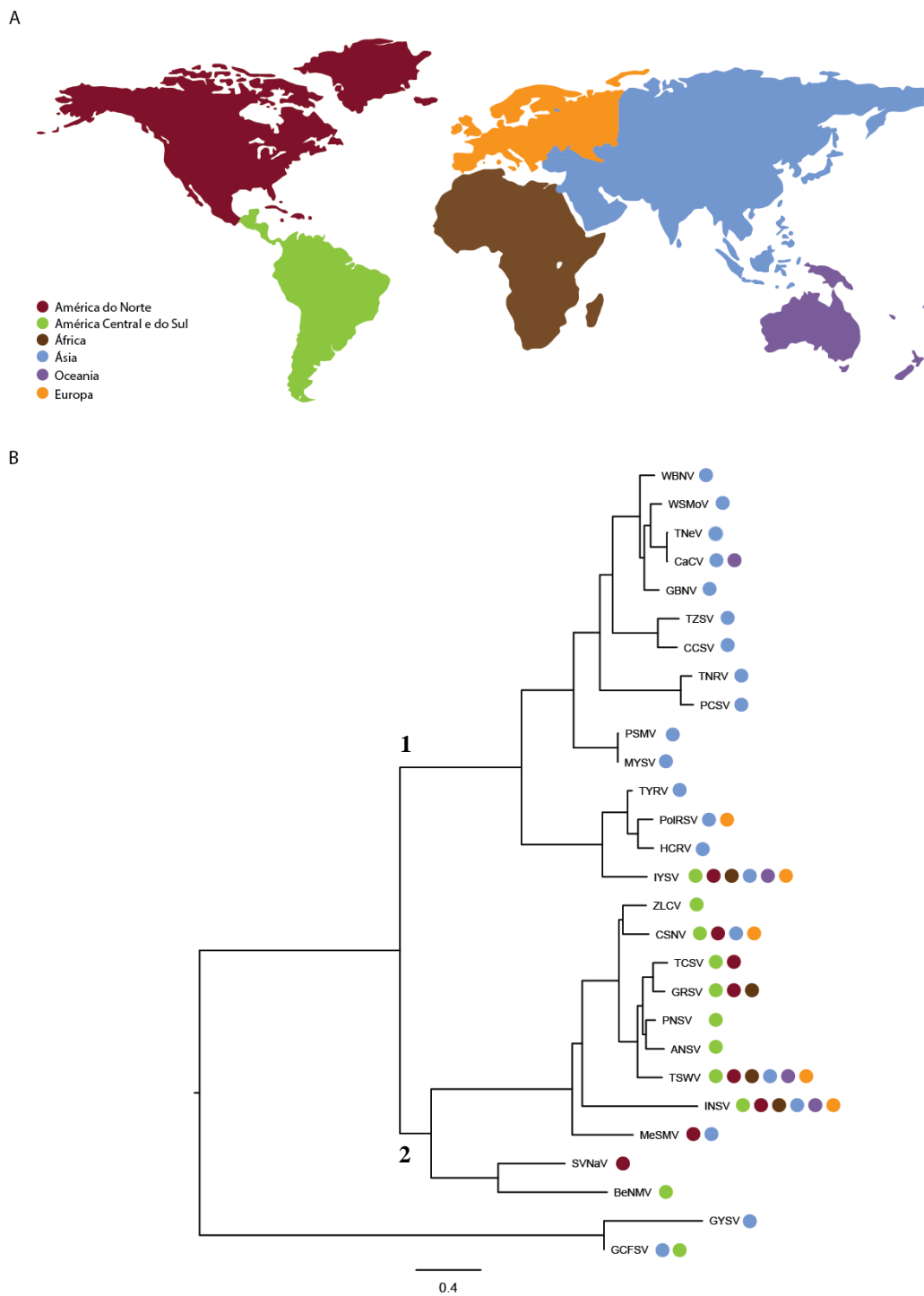


Figura 3: **Relação filogenética e distribuição global dos Tospovírus.** **A:** Mapa bidimensional representando seis regiões geográficas dispostas em cinco continentes terrestres. **B:** Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos da proteína N de todas as espécies de Tospovírus caracterizadas até o momento. Na árvore filogenética observa-se a formação de dois clados principais, o clado de vírus

euroasiáticos (1) e o clado de vírus americanos (2). As distribuições geográficas de cada espécie estão representadas pelos círculos coloridos de acordo com cada região em destaque no mapa acima. A árvore foi construída com o programa PhyML utilizando-se o modelo GTR e *bootstrap* de 1000 replicatas.

1.2.3 INTERAÇÃO VÍRUS-VETOR

Os Tospovírus são transmitidos por insetos vetores conhecidos popularmente como tripes (Thysanoptera: Thripidae). Já foram descritas aproximadamente 5.500 espécies de tripes distribuídas por todos os continentes (Morse, 2006), no entanto, apenas 15 espécies foram identificadas como vetores de *Tospovirus* até o momento (Tabela 2).

A transmissão ocorre de maneira persistente e circulativa-propagativa. O tripe adquire o vírus apenas no estágio larval, ao se alimentar de folhas ou outros tecidos de plantas infectadas. Insetos adultos não conseguem adquirir o vírus e não há transmissão vertical de adultos contaminados para a prole, ou seja, cada geração de tripes só adquire o tospovírus no estágio larval e através da alimentação (Wijkamp et al., 1996).

O ciclo infectivo ocorre da seguinte maneira: um inseto adulto deposita seus ovos na folha de uma planta infectada por tospovírus; após eclodir do ovo, a larva (1º e 2º estágios) se alimenta das folhas infectadas e adquire o *Tospovirus*, que possui capacidade de se replicar em órgãos associados com o sistema digestório do inseto (Nagata et al., 2002; Whitfield et al., 2005). O vírus então se replica no intestino médio, se movimenta para células musculares viscerais e alcança as glândulas salivares (Nagata et al., 2002). Os tripes atingem a idade adulta em apenas duas semanas, passando pelos estágios de larva, pré-pupa e pupa, assim, o inseto adulto proveniente da larva infectada, transmite o tospovírus para plantas sadias pela saliva, ao se alimentar da seiva elaborada do floema (Wijkamp et al., 1996).

Apesar de ainda não estar completamente elucidada, uma evidente interação mutualística entre o vetor e o tospovírus é existente. Estudos entre os modelos TSWV e *Frankliniella occidentalis* mostraram que não há efeitos patológicos visíveis em células do tripe após a aquisição do vírus (Wijkamp et al., 1996), sugerindo que uma célula hospedeira funcional é mais vantajosa para se estabelecer a infecção do vírus no tripe. Além disso, o vírus pode alterar o comportamento alimentar do vetor. Tripes machos infectados por TSWV tiveram a sua frequência de picadas de prova aumentadas em três vezes, comparados com tripes machos não infectados. Essa alteração no comportamento alimentar do tripe resulta no aumento da probabilidade de inoculação do vírus na planta (Stafford et al., 2011).

Os tospovírus contribuem para favorecer a sobrevivência e a disseminação do tripe interferindo nas defesas da planta e atuando na proteção do tripe contra predadores naturais. A sobrevivência juvenil e a taxa de desenvolvimento do tripe foram maiores em plantas de pimenta infectadas por TSWV do que plantas sadias (Belliure et al., 2005). Com o aumento no tamanho das larvas e rápida passagem pelos estágios juvenis, os vetores ganharam um curto período de vulnerabilidade à predação, pois larvas de tripes maiores estão protegidas de duas espécies de ácaros predadores: *Neoseiulus cucumeris* e *Iphiseius degenerans* (Belliure et al., 2008).

Tospovírus também parecem favorecer outros artrópodes não vetores. Surpreendentemente, *Tetranychus urticae*, um ácaro não vetor de tospovírus, mostrou preferência e aumento de fecundidade em plantas de tomateiro infectadas por TSWV em comparação com plantas sadias. É possível que outros artrópodes herbívoros não vetores também explorem as mudanças na fisiologia das plantas infectadas por tospovírus, como a repressão das defesas da planta contra herbivoria e o maior teor de aminoácidos livres (Nachappa et al., 2013).

Tabela 2: Espécies de Tripes e Tospovírus associados.

Tripes (Thysanoptera: Thripidae)	Tospovírus (<i>Bunyaviridae: Tospovirus</i>)	Referências
<i>Frankliniella occidentalis</i>	GRSV, TSWV, TCSV, GBNV, CSNV, ANSV, INSV	Wijkamp et al.,1996; Hassani-Mehraban et al., 2010
<i>Frankliniella gemina</i>	GRSV, TSWV	Borbón et al., 1999
<i>Frankliniella schultzei</i>	GRSV, TSWV, TCSV, CSNV, GBNV	Wijkamp et al.,1996
<i>Frankliniella intonsa</i>	TSWV, TCSV	Wijkamp et al.,1996
<i>Frankliniella bispinosa</i>	TSWV	Wijkamp et al.,1996
<i>Frankliniella cephalica</i>	TSWV	Ohnish et al., 2006
<i>Frankliniella fusca</i>	TSWV	Wijkamp et al.,1996
<i>Frankliniella setosus</i>	TSWV	Wijkamp et al.,1996
<i>Frankliniella zucchini</i>	ZLCV	Wijkamp et al.,1996
<i>Thrips tabaci</i>	TSWV, TYRV, IYSV	Wijkamp et al.,1996
<i>Thrips palmi</i>	GBNV, WSMoV, MYSV, WBNV, TNRV, CCSV	Wijkamp et al.,1996; Seepiban et al., 2011; Liu et al., 2012
<i>Scirtothrips dorsalis</i>	GCSFV, GBNV, PYSV	Wijkamp et al.,1996
<i>Ceratothripoides claratis</i>	CaCV, TNRV	Premachandra et al., 2005; Seepiban et al., 2011
<i>Dictyothrips betae</i>	PolRSV	Ciuffo et al., 2010
<i>Sericothrips variabilis</i>	SVNaV	Zhou et al., 2013

1.2.4 MORFOLOGIA DA PARTÍCULA E GENOMA VIRAL

A partícula viral dos tospovírus é esférica e como o vírus “brota” a partir do retículo endoplasmático e/ou do Golgi do Tripes e da célula vegetal, ele leva consigo um envelope lipídico formado pela membrana dessas organelas. Posteriormente, as glicoproteínas são exteriorizadas, envolvendo toda a partícula (Fig.4a) (Fauquet et al., 2005). Cada partícula pode variar de 80 a 120 nm de diâmetro, de acordo com o número de segmentos encapsidados. Para *Rift Valley fever virus* (RVFV) a proporção média de segmentos L, M e S é de 1: 4: 4 respectivamente (Gauliard et al., 2006); para Tospovírus, a estequiometria média dos segmentos encapsidados ainda é desconhecida.

O genoma trisegmentado de RNA apresenta cinco fases abertas de leitura que codificam seis proteínas virais, sendo que quatro delas são estruturais, ou seja, estão presentes na partícula viral madura, N, Gc, Gn e RdRp e duas são proteínas não estruturais, pois não estão presentes na partícula, a NSs e a NSm. O RNA L codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); o RNA S codifica a proteína do nucleocapsídeo (N) e a proteína com função de supressora do silenciamento gênico (NSs) e o RNA M codifica a proteína precursora das glicoproteínas Gn/Gc e a NSm, proteína de movimento viral célula-a-célula via plasmodesma (Fig. 4c) (Fauquet et al., 2005).

O envelope lipídico, com as glicoproteínas imersas, circunda os três ribonucleocapsídeos (RNPs) que são formados pelo RNA viral (L, M e S), envolvido e protegido pela proteína N com a presença de moléculas de RNA polimerase na extremidade de cada ribonucleocapsídeo (Fig. 4b). As extremidades 3' (UCUCGUUA) e 5' (AGAGCAAU) do RNA são conservadas e apresentam nucleotídeos complementares, o que favorece a ligação não covalente dessas extremidades, formando assim, uma molécula de ribonucleocapsídeo (RNP) pseudocircular, potencialmente importante no reconhecimento da polimerase viral para os processos de replicação e transcrição (van Knippenberg et al., 2005). Os segmentos M e S apresentam uma região intergênica rica em nucleotídeos adenina e uracila e, por consequência, forma-se nessa região um grampo (*hairpin*), estrutura importante na regulação da transcrição e da replicação (Fig. 4c) (Fauquet et al., 2005).

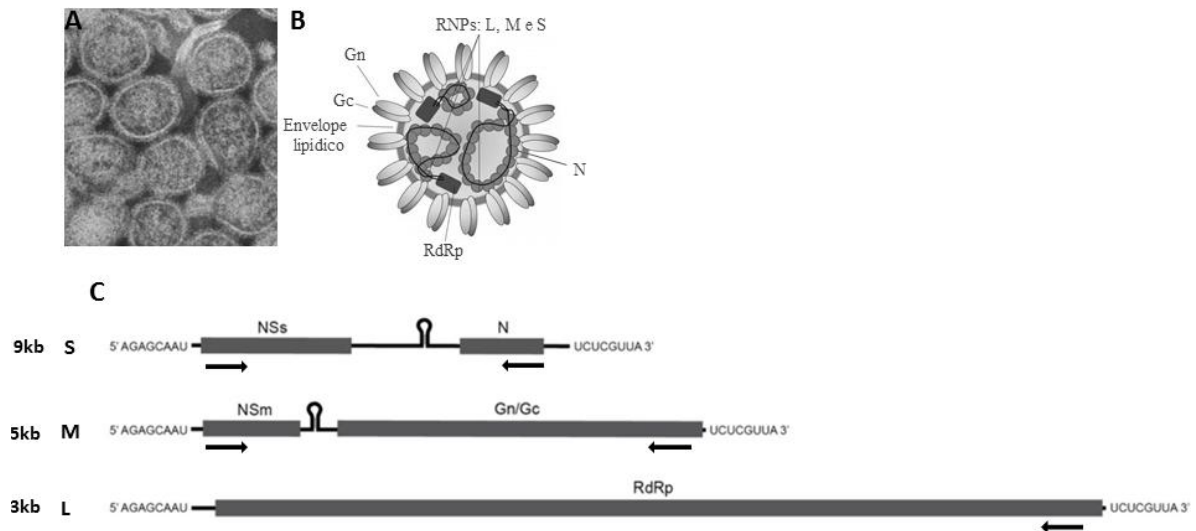


Figura 4: **Partícula e Genoma de Tospovírus**. **A**: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas pleomórficas de Tospovírus (Foto do acervo pessoal de Renato de Oliveira Resende); **B**: Ilustração da partícula viral representando a disposição do envelope lipídico, dos ribonucleocapsídeos L, M e S e das proteínas estruturais N, Gn, Gc e RdRp (ilustração adaptada de <http://www.bunyavirus.org>); **C**: Esquema representativo com os tamanhos aproximados do genoma de Tospovírus, evidenciando as ORFs para as proteínas virais, a sequência intergênica com a formação do *hairpin* e os oito nucleotídeos complementares presentes nas extremidades dos segmentos.

1.2.5 TRANSCRIÇÃO E REPLICAÇÃO

Apesar dos tospovírus poderem ser artificialmente propagados para a planta por inoculação mecânica, naturalmente, o tospovírus somente infecta a planta após a picada de prova de um tripses contaminado que se alimenta da seiva do floema. Ao entrar na célula vegetal, os ribonucleocapsídeos virais (RNPs) ficam expostos no citoplasma, os processos de replicação, transcrição e tradução se iniciam e novas partículas são formadas (Adkins, 2000).

Os RNAs recém-replicados são envolvidos pela proteína N juntamente com pequenas quantidades de proteína L, formando novos RNPs. Estes RNPs são transportados para as células vizinhas pela ajuda da NSm, que forma estruturas tubulares que adentram o plasmodesma facilitando assim a translocação de RNPs virais pela rota simplástica da planta (Kormelink et al, 1994; Storms et al, 1995). Deste modo, a infecção viral se propaga para os tecidos vizinhos e o vírus se estabelece em outras regiões da planta suscetível, resultando em uma infecção sistêmica. As partículas dos tospovírus formadas são acumuladas em vesículas e não são secretadas pela célula vegetal devido à barreira física rígida imposta pela parede celular.

Os ribonucleocapsídeos são utilizados como moldes para a transcrição e replicação, portanto, o RNA genômico dos tospovírus não são infectivos se não estiverem associados às moléculas de N e RdRp (Adkins, 2000). A proteína N também regula o momento da passagem da transcrição para replicação e vice versa, porém, o mecanismo pelo qual a RdRp acessa o RNA viral encapsulado ainda é desconhecido.

A RdRp do tospovírus utiliza o mecanismo de *cap-snatching* para iniciar a transcrição dos RNAs virais. A RdRp viral mobiliza o RNA mensageiro maduro proveniente do núcleo da célula do hospedeiro e cliva-o entre 12 e 18 nucleotídeos *downstream* à capa 5' metilguanossina. Essas pequenas sequências são utilizadas como iniciadores para a transcrição dos RNAs mensageiros do vírus (van Knippenberg et al., 2005; Frédéric et al., 2013). Esses RNAs mensageiros virais não são poliadenilados, mas em suas extremidades 3'UTR existe um *hairpin* (van Knippenberg et al., 2005).

O segmento L possui apenas uma ORF que codifica para a RNA polimerase viral no senso negativo; logo, é produzida uma molécula de RNA complementar de senso positivo que

servirá de molde para a replicação. Os segmentos S e M possuem estratégia ambisense, as ORFs para as proteínas NSs e NSm estão no RNA viral complementar (vcRNA) enquanto que as ORFs para o precursor das glicoproteínas e para a N estão presentes na fita viral (vRNA). Após a tradução, o precursor das glicoproteínas é clivado proteoliticamente para produzir as duas glicoproteínas maduras Gn e Gc (Fauquet et al., 2005; van Knippenberg et al., 2005) (fig.5).

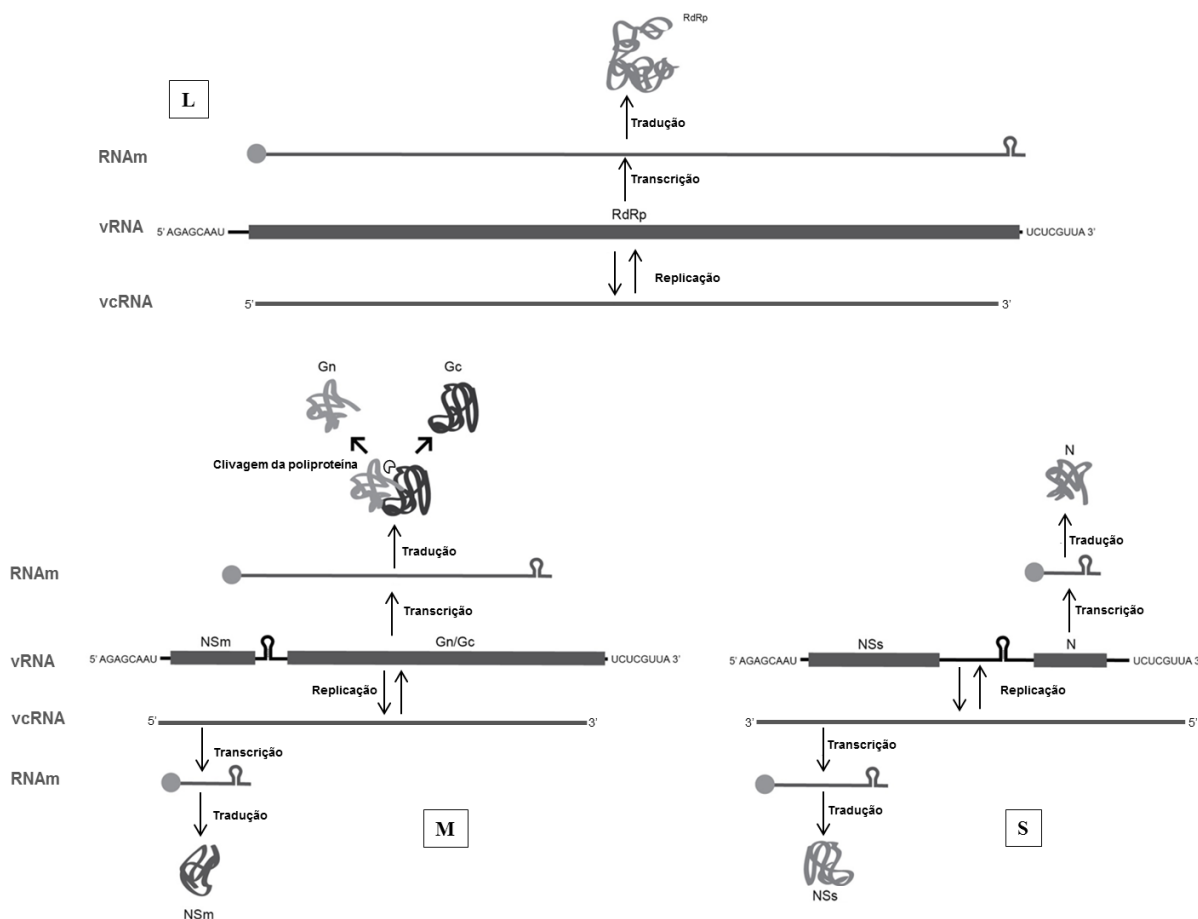


Figura 5: **Estratégias ambisense e de senso negativo para a expressão de proteínas de Tospovírus.** VRNA= RNA viral; vcRNA= fita de RNA complementar à vRNA; RNAm= RNA mensageiro viral. Os quadrados escuros representam as ORFs para as proteínas. No RNAm, o círculo cinza representa o 5'cap da região 5'UTR enquanto que na região 3'UTR está representado o *haipin*. A semi-lua representa a protease do hospedeiro, que cliva a o precursor das glicoproteínas formando as glicoproteínas Gn e Gc. Por convenção, todos os RNAm virais estão posicionados no sentido 5'-3'.

1.2.6 NSs: SUPRESSÃO DO MECANISMO DE SILENCIAMENTO GÊNICO DA PLANTA

O Silenciamento de RNA é um sistema de defesa antiviral inato de plantas (Roth et al., 2004). Para neutralizar esse sistema de defesa, a maioria dos vírus expressam proteínas supressoras que agem em diferentes etapas do processo de silenciamento. Essas proteínas supressoras virais têm evoluído independentemente, são estruturalmente diferentes e podem estar envolvidas em uma série de outras funções básicas para a replicação, o movimento e a encapsidação (Burguán & Havelda, 2011).

A NSs foi a primeira proteína supressora de silenciamento gênico descrita para vírus de RNA negativo (Takeda et al., 2002). Análises bioquímicas das NSs de alguns tospovírus mostraram que essa proteína possui afinidade para moléculas pequenas de RNA (*small RNA*)

como siRNA (*small interfering RNA*) e miRNA (*microRNA*). Além disso, demonstrou que TSWV NSs, INSV NSs e GRSV NSs possuem afinidade para moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) longas enquanto a TYRV NSs não possui essa afinidade (Kormelink et al., 2011).

Schnettler et al. (2010) demonstrou que a NSs interfere na resposta do sistema imune inato da planta sequestrando siRNAs e dsRNA longos, evitando, assim, o recrutamento do complexo RISC. Lokesh et al. (2010) mostrou que a NSs de GBNV possui atividades de NTPase e fosfatase que podem estar envolvidas na remoção do 5' fosfato de moléculas de dsRNA, prevenindo a clivagem dessas moléculas em siRNAs pela atuação da enzima DICER.

De Rond et al., (2014) observou que a porção N-terminal (133 aminoácidos) da NSs é importante para a função de silenciamento gênico e pode ser a região candidata chave para a possível interação da NSs com a proteína Argonauta1. Uma mutação no motivo GW/WG, correspondentes aos aminoácidos 17 e 18, levou à perda da atividade de silenciamento gênico em plantas expressando GFP.

Zhai et al. (2013), através de mutações de ponto sítio dirigidas na NSs de TSWV e expressão transiente em plantas de *Nicotiana benthamiana* 16C, encontrou dois motivos conservados entre os Tospovírus, envolvidos na supressão do silenciamento gênico: GKV/T (aminoácidos 181-183) e YL (aminoácidos 412 e 413). As mutações K182A e L413A induzidas nesses domínios eliminaram a atividade supressora da NSs.

Além da função de supressora de silenciamento gênico, a NSs aumenta a tradução de transcritos virais; essa função parece ser ainda mais efetiva na presença adicional da proteína N. Também foi postulado que a NSs possui uma função equivalente à da proteína PABP (proteína de ligação à cauda poli-A), sendo capaz de aumentar essa tradução se ligando ao *hairpin* da região 3' não traduzida dos dsRNAs transcritos e codificados pela região intergênica dos segmentos S e M (Geerts-Dimitriadou et al., 2012).

1.2.7 NSm: MOVIMENTO VIRAL CÉLULA-A-CÉLULA E A LONGA DISTÂNCIA NA PLANTA

A NSm é a proteína de movimento (MP) dos tospovírus (Kormelink et al., 1994), cuja função é promover o movimento viral de uma célula a outra pelos plasmodesmas, uma vez que as células vegetais possuem parede celular que bloqueia os processos de entrada e saída de vírus por endocitose e brotamento respectivamente (Ritzenthaler, 2011).

A NSm possui motivos encontrados na “superfamília de proteínas de movimento 30K”: o motivo P/D-L na região N-terminal, o motivo-D na porção central e o resíduo-G na porção C-terminal da proteína (Silva et al., 2001).

Existem dois modelos que explicam como o vírus se movimenta célula-a-célula através de RNPs. O primeiro modelo é baseado na movimentação do TMV (*Tobacco mosaic virus*), que consiste na passagem, pelo plasmodesma, do complexo RNA-MP através do retículo endoplasmático. O segundo modelo, baseado na movimentação do CPMV (*Cowpea mosaic virus*) consiste no movimento guiado do RNP através de túbulos, formados pela polimerização da MP e que atravessam o plasmodesma, aumentando o limite de exclusão da mesma (Benitez-Alfonso et al., 2010).

Os tospovírus movimentam-se através do segundo modelo descrito acima. O diâmetro de restrição do plasmodesma é de 50nm (Bell & Oparka, 2011) enquanto que o diâmetro da partícula do tospovírus varia de 80 a 120nm, portanto, o plasmodesma é limitante para a passagem da partícula completa, devendo então se movimentar através de moléculas menores como os ribonucleocapsídeos (RNPs) e a NSm se multimeriza formando túbulos que transpõem os plasmodesmas e promovem a passagem desses RNPs (Kormelink et al., 1994; Storms et al., 1995; Storms et al., 1998; Lewandowski & Adkins, 2005; Li et al., 2009).

Lewandowski & Adkins (2005) demonstraram que a NSm promove o movimento célula-a-célula e o movimento a longa distância na ausência de qualquer outra proteína do tospovírus e que a NSm foi capaz de translocar o vírus TMV em *Nicotiana benthamiana*.

Li et al. (2009) identificou possíveis regiões na sequência primária de aminoácidos da NSm de TSWV envolvidas com a formação de túbulos, movimento célula-a-célula e movimento a longa distância. A região envolvida no movimento a longa distância está localizada na região C-terminal da NSm, com a participação dos motivos EYKK²⁰⁵⁻²⁰⁸, EEEEE²⁸⁴⁻²⁸⁸ e do resíduo D¹⁵⁴. Já ambas as regiões N-terminal (G¹⁹-S¹⁵⁹) e C-terminal (G²⁰⁹-V²⁸³) da NSm parecem estar ativamente relacionadas com o movimento célula-a-célula e com a formação de túbulos.

Através desses resultados, observa-se que regiões diferentes estão envolvidas nas duas formas de movimento viral, fato já esperado, pois as duas formas de movimento são distintas e provavelmente envolvem interações com componentes celulares diferentes (Li et al., 2009).

A formação de túbulos e o movimento célula-a-célula são intimamente correspondentes. A NSm se polimeriza para a formação de túbulos e estes possibilitam a passagem dos RNPs pelos plasmodesmas, logo é provável que as regiões da NSm sejam similares para as duas funções. Essas regiões podem ser o alvo de futuras pesquisas de interação homotípica NSm-NSm. Além disso, nada se sabe sobre a atuação da proteína NSm no movimento dos tospovírus a longa distância.

1.2.8 PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS COMO GENES DE AVIRULÊNCIA

De acordo com a teoria de gene-a-gene, estabelecida por Flor (1942), para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência. A proteína codificada pelo gene de avirulência (Av) é reconhecida pela proteína codificada pelo gene de resistência (R) da planta ativando uma cascata de transdução de sinais que ativam genes envolvidos na resposta de hipersensibilidade (RH). A RH é rápida e localizada no sítio de infecção do vírus, levando à morte programada das células ao redor da infecção evitando, dessa maneira, que o vírus se torne sistêmico (Agrios, 2004). Porém, se o vírus não possuir o gene de avirulência ou a planta não possuir o gene de resistência, este reconhecimento Av-R não ocorre, resultando em interação compatível e levando à suscetibilidade da planta hospedeira.

As proteínas não estruturais NSs e NSm de Tospovírus foram independentemente caracterizadas como genes de avirulência para os dois genes de resistência a tospovírus respectivamente: o gene Tsw, encontrado em pimenta (*Capsicum chinense*) (de Rond et al., 2013) e o gene Sw-5, encontrado em tomate (*Solanum peruvianum*) (López et al., 2011). O gene Sw-5 confere resistência a TSWV, TCSV e GRSV (Boiteux & de B. Giordano, 1993; Stevens et al., 1992) e o gene Tsw confere resistência apenas à TSWV. A resistência é evidenciada através da resposta de hipersensibilidade, que impede a propagação sistêmica do vírus (Boiteux & Ávila, 1994) (Fig.6).

Vários isolados de Tospovírus que quebram a resistência dos genes Tsw e do gene Sw-5 já foram caracterizados e analisados (Cho et al., 1996; Aramburu & Marti, 2002; Rogero et al., 2002). A análise das sequências de aminoácidos da NSm de isolados virais sugere que a resistência conferida pelo gene Sw-5 pode ser quebrada pela substituição do aminoácido C (cisteína) por Y (tirosina) na posição 118 (C118Y) e pela substituição da T (treonina) por N (asparagina) na posição 120 (T120N). Uma análise filogenética revelou que a mutação C118Y ocorreu independentemente três vezes por evolução convergente nos isolados estudados que quebram a resistência, enquanto que a mutação T120N foi um evento único. A análise das taxas de mudanças não sinônimas e sinônimas dos códons individuais mostrou que a substituição C118Y está sobre seleção positiva (López et al., 2011).

No caso do *Tsw*, mutações na região N-terminal da NSs levou à perda da função de estímulo da resposta de hipersensibilidade. O resíduo T79 e o motivo GW estão relacionados com a supressão de silenciamento, porém, também estão diretamente envolvidos com a atividade de avirulência (de Rond et al., 2014).

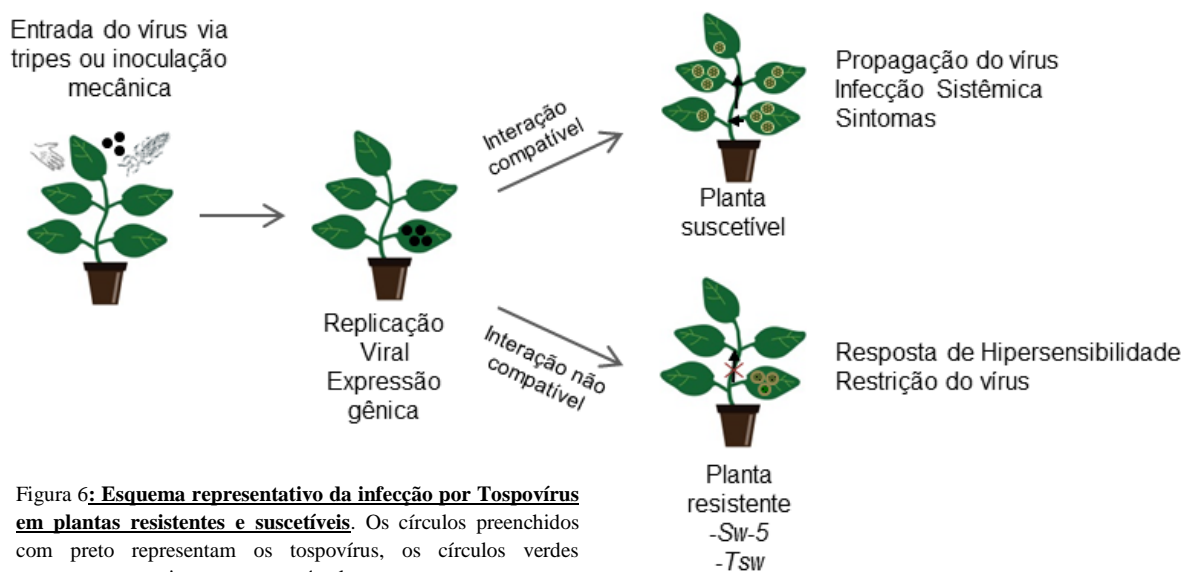


Figura 6: **Esquema representativo da infecção por Tospovírus em plantas resistentes e suscetíveis.** Os círculos preenchidos com preto representam os tospovírus, os círculos verdes representam os sintomas e os círculos marrons representam a resposta de hipersensibilidade. As setas pretas indicam o movimento viral.

1.3 INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

1.3.1 FERRAMENTAS PARA O ESTUDO DAS INTERAÇÕES PROTEICAS

As interações entre as próprias proteínas do vírus e entre proteínas virais e proteínas do hospedeiro são essenciais e obrigatórias para o sucesso de uma infecção. Todos os vírus recrutam proteínas do hospedeiro para sua entrada, replicação, tradução, evasão do sistema imune e disseminação na célula e as proteínas virais se associam para a transcrição, montagem do capsídeo e para o movimento (Brizard et al., 2006). Para a identificação dessas interações proteína-proteína em tospovírus, diferentes técnicas moleculares vêm sendo utilizadas, tais como: Sistema duplo híbrido em levedura, *Pull-down* e Fluorescência Bimolecular Complementar (BiFC).

O sistema de duplo híbrido em levedura é uma técnica para estudo, *in vivo*, da interação e consiste em transformar uma levedura com dois vetores de expressão de proteínas candidatas à interação com os dois domínios de ativação da proteína ativadora da transcrição GAL4. O domínio N-terminal da GAL4 é denominado DNA-B (DNA *binding domain*) e o domínio C-terminal é denominado AD (*activating domain*). A proteína de estudo fundida ao DNA-B é denominada “isca” e as proteínas da biblioteca de cDNAs fusionadas ao domínio AD são denominadas de “presas”. O processo de transcrição não ocorre se as proteínas candidatas não se interagem, porém, se as duas proteínas interagem-se, os domínios AD e DNA-B se aproximam, ficando funcionais e promovendo a transcrição, seguida da expressão do gene repórter. O fenótipo da transcrição pode ser observado em placa de cultura com o fungo (Chen et al., 2011).

Além do sistema de duplo híbrido em levedura, o *Pulldown* e a Fluorescência Bimolecular Complementar (BiFC) são importantes e eficazes técnicas que permitem o estudo

de interações proteicas *in vitro* e *in vivo*. A Fluorescência Bimolecular Complementar é uma técnica para estudo *in vivo*, que consiste na fusão de duas proteínas candidatas à interação a dois fragmentos não fluorescentes, um N-terminal e outro C-terminal, de uma proteína fluorescente (ex: GFP, EYFP). Estes fragmentos são reunidos quando as duas proteínas candidatas fusionadas a eles interagem-se, recuperando-se a fluorescência (Citovsky et al., 2008). O *pull-down* é uma ferramenta de pesquisa *in vitro* que permite isolar as proteínas das células hospedeiras que interagem com a proteína de interesse. A “isca” é feita fusionando a proteína de interesse a uma cauda de GST, HA ou cauda de 6xHis utilizando um vetor de expressão. Em seguida a proteína recombinante é purificada e imobilizada em uma coluna de cromatografia específica, onde o extrato de proteínas celulares candidatas é colocado e translocado na coluna. A interação é visualizada através de *Western blot* com os anticorpos específicos para cada proteína (Huang et al., 2012).

1.3.2 MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA ESTRUTURAL

Quando a estrutura tridimensional de uma proteína ainda não foi determinada, modelos virtuais podem ser elaborados por comparação da similaridade entre as sequências primárias de aminoácidos da proteína de interesse e as proteínas com estruturas já resolvidas e depositadas no PDB (*Protein Data Bank*). Essa análise comparativa para a construção de modelos estruturais é conhecida como modelagem molecular por homologia estrutural (Deane & Blundell, 2001). A qualidade dos modelos estruturais gerados por modelagem, dependem do grau de similaridade entre as sequências entre a proteína com estrutura resolvida e a proteína a qual se deseja modelar.

A estratégia de modelagem baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua sequência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na sequência, em geral, resultam em, apenas, sutis modificações na estrutura tridimensional (Nayeem, et al., 2006). Se pelo menos uma sequência homóloga para qual a estrutura tridimensional resolvida esteja disponível é encontrada, o método de escolha para predição da estrutura tridimensional de uma proteína-alvo é a modelagem por homologia. Quanto mais estruturas cristalizadas estiverem disponíveis no PDB, melhor o resultado e a confiabilidade dos dados, pois várias estruturas podem ser comparadas para determinação das regiões estruturalmente conservadas para a modelagem da proteína-alvo (Broer et al., 2003).

Recentemente, a proteína N de diversas espécies de bunyavírus animais foram cristalizadas (Tabela 3) e suas estruturas tridimensionais caracterizadas, abrindo um novo caminho para o estudo comparativo das estruturas das proteínas N dentro da família *Bunyaviridae*.

Tabela 3: Relação das espécies da família *Bunyaviridae* que já possuem a estrutura tridimensional da proteína N elucidadas.

Espécie	Gênero	Referência
<i>La Crosse virus</i> (LaCV)	<i>Orthobunyavirus</i>	Reguera et al. (2013)
<i>Bunyawera virus</i> (BUNV)	<i>Orthobunyavirus</i>	Ariza et al. (2013)
<i>Schmallenberg virus</i> (SBV)	<i>Orthobunyavirus</i>	Ariza et al. (2013); Dong et al. (2013)
<i>Leanyer virus</i> (LEAV)	<i>Orthobunyavirus</i>	Niu et al. (2013)
<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i> (CCHFV)	<i>Nairovirus</i>	Guo et al. (2012)
<i>Rift Valley fever virus</i> (RVFV)	<i>Phlebovirus</i>	Raymond et al. (2012)

1.3.3 INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA PARA TOSPOVÍRUS

Comparado aos vírus animais da mesma família e a outros vírus de plantas, poucas proteínas do hospedeiro que interagem com as proteínas dos Tospovírus foram caracterizadas. Uhrig et al. (1999) mostraram por ensaios com sistema de duplo híbrido em levedura que a proteína N se polimeriza formando multímeros e Richmond et al. (1998) mostraram que N se liga a moléculas de RNA. Soellick et al. (2000) demonstraram *in vitro*, através do sistema de duplo híbrido em levedura, que a proteína de movimento NSm de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) interage com a proteína do nucleocapsídeo N, com moléculas de RNA fita simples e com uma proteína da família DnaJ (número de acesso do *GenBank*: AF191497). Essas associações são importantes para o movimento célula-a-célula do ribonucleocapsídeo através dos plasmodesmas. Também utilizando o sistema de duplo híbrido em levedura e microscopia confocal, Paape et al. (2006) identificaram em *Arabidopsis thaliana* uma proteína denominada At-4/1 (número de acesso do *GenBank*: AY212284) pertencente a uma nova família de proteínas celulares, localizadas no plasmodesma, responsáveis pelo movimento intra/intercelular de moléculas. Essa proteína se associa à NSm de TSWV, fornecendo mais evidências para elucidar a via de dispersão viral célula-a-célula.

Em dois estudos com o uso de microscopia confocal, Snippe et al. (2007) e Ribeiro et al. (2009), demonstraram *in vivo*, a co-localização entre as proteínas N e as glicoproteínas Gn e Gc de TSWV, sugerindo uma possível interação entre essas proteínas para a montagem das partículas virais, porém, por BiFC, Dietzgen et al. (2012) não encontrou interação entre as proteínas N, Gn e Gc de INSV, deixando em aberto, as discussões a respeito da natureza dessas interações para a montagem das partículas.

Os ensaios de BiFC realizados por Dietzgen et al. (2012), com as proteínas de INSV, não demonstraram interações proteína-proteína entre as NSs com ela mesma e nem com as outras proteínas virais; também não demonstraram interações de homo/hetero-multimerização entre as glicoproteínas Gn e Gc ou entre as glicoproteínas e as outras proteínas virais, mas confirmaram as interações N-N, N-NSm e NSm-NSm de INSV em concordância com os trabalhos antecessores realizados com TSWV.

Recentemente, Feng et al. (2013) identificaram uma nova função de tráfego intracelular independente de microtúbulo, para a proteína N de TSWV. Através de ensaios de microscopia confocal de fluorescência, foi observado que os agregados de proteína N estavam em constante movimento pelo citoplasma. Esses agregados co-localizaram com filamentos de actina, sugerindo uma interação direta entre essas duas proteínas para o movimento intracelular com a atuação da miosina XI-K como proteína motora.

2. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os tospovírus compartilham com os vírus animais muitos aspectos relacionados com a infecção viral. Uma infecção viral bem sucedida requer interações adequadas entre as proteínas virais e as proteínas de um hospedeiro. Essas interações proteína-proteína alteram toda a rotina da célula para promover a transcrição e replicação do genoma do vírus, a formação dos ribonucleocapsídeos, o movimento célula a célula, o movimento sistêmico, o desenvolvimento de sintomas da doença, a montagem da partícula viral e a supressão dos mecanismos de defesa do sistema imune inato do hospedeiro. As proteínas virais também interagem entre si podendo formar oligômeros, como no caso das proteínas N e NSm de Tospovírus.

A proteína N é uma proteína estrutural que forma oligômeros que circundam o RNA para compor o ribonucleocapsídeo (RNP). A NSm é a proteína que se polimeriza formando túbulos cuja a função é promover o movimento dos RNPs.

Uma vez que as células vegetais possuem parede celular (barreira física à entrada e saída de vírus por endocitose e brotamento), a propagação da infecção viral célula-a-célula em plantas ocorre através da rota simplástica via plasmodesmas, que são canais de comunicação citoplasmática seletiva intercelular. Para Tospovírus, o modelo hipotético proposto para propagação célula-a-célula fundamenta-se na passagem dos ribonucleocapsídeos através de túbulos que transpassam os plasmodesmas. Esses túbulos são formados por polímeros de NSm que possivelmente se ligam à proteína N presente no RNP, para promover a sua passagem de uma célula a outra.

A existência das interações proteicas N x N, Nsm x NSm e N x NSm já foram demonstradas em diversos estudos, porém, as minúcias e o efeito dessa interação ainda não foram elucidados, fazendo-se necessário a implementação de técnicas modernas que ajudem na caracterização dessas interações para que o processo de movimento viral do tospovírus, a curta e a longa distância seja desvendado.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste estudo é analisar a natureza das interações N x N, N x NSm e NSm x NSm utilizando as proteínas de *Groundnut ringspot virus* (GRSV), um tospovírus de grande importância epidemiológica e econômica no Brasil e próximo filogeneticamente de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a espécie tipo e mais estudada do gênero.

O primeiro objetivo foi explorar e validar o uso dos vetores de BiFC para investigar as interações homotípicas e heterotípicas das proteínas N e NSm de GRSV em plantas de *Nicotiana benthamiana*.

O segundo objetivo foi elucidar a estrutura terciária tridimensional da proteína N a fim de iniciar as investigações a respeito dessas interações e as consequências para o processo de movimento viral célula-a-célula.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Identificar e validar os parâmetros para o uso dos vetores recombinantes pSITE-N/NSm na Microscopia de Fluorescência Confocal;
- II. Analisar as características das interações entre as proteínas N e NSM de GRSV na célula vegetal;

- III. Prever a estrutura tridimensional da proteína N de GRSV por modelagem por homologia estrutural e identificar, *in silico*, os domínios funcionais para interação N-N e interação da N com moléculas de RNA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES N E NSm DE GRSV

Folhas de *Datura stramonium* infectadas mecanicamente com *Groundnut ringspot virus* (SA-05) foram utilizadas para extração de RNA total de acordo com as recomendações do fabricante usando o reagente comercial TRIzol[®] da Invitrogen[™] (Cat. No. 15596-018).

Os cDNAs para os genes N e NSm foram sintetizados (*primers* NSm-R-X-SC, NSm-R-X-SN e *primers* N-R-X-SC, N-R-X-SN Tabela 4) utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os genes N (777pb) e NSm (912 pb) foram amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando-se a *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (Invitrogen[™]) (Tabela 5), com a utilização dos pares de *primers* específicos listados na Tabela 4. Adaptando a técnica de clonagem e o vetor de destino, a cada gene foram inseridos nucleotídeos para manutenção da ordem de leitura e sítios de restrições para *BamHI* e *XhoI*.

Tabela 4: Pares de *Primers* utilizados para a amplificação dos genes N e NSm de GRSV.

IDENTIFICAÇÃO	ORIENTAÇÃO	SEQUÊNCIA 5'-3'	SÍTIO DE RESTRIÇÃO INTRODUZIDO	TEMPERATURA DE ANELAMENTO °C
F-NSm-SITE-2B	SENDO	<u>GGATCC</u> TATGTTGACACTTTTCGGC	<i>BamHI</i>	58,9
NSm-R-X-SC	ANTISENDO	<u>CTCGAGT</u> CTTATATTTTCGTCCACAAACG	<i>XhoI</i>	59,5
NSm-R-X-SN	ANTISENDO*	<u>CTCGAGT</u> CTATTTTCGTCCACAAACGA	<i>XhoI</i>	59,6
F-N-SITE-2B	SENDO	<u>GGATCC</u> TATGTCTAAGGTCAAGCTCA	<i>BamHI</i>	56,1
N-R-X-SC	ANTISENDO	<u>CTCGAGT</u> CTCATGCAACACCAGCAAT	<i>XhoI</i>	62,4
N-R-X-SN	ANTISENDO*	<u>CTCGAGT</u> CTGCAACACCAGCAATCTT	<i>XhoI</i>	61,7

* códon de parada retirado

Tabela 5: Etapas do PCR utilizado para amplificação dos genes N e NSm de GRSV.

	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
	Desnaturação Inicial	94	1 min
35 ciclos	Desnaturação	94	30s
	Anelamento	T*	30s
	Extensão	72	1 min
	Extensão Final	72	5 min
	Estoque	12	∞

T*: Temperatura média para cada par de *primer* utilizado.

Os produtos das PCR foram aplicados em gel de agarose (AMRESCO[®]) 1% submetido à eletroforese com tampão de corrida TBE 0,5x (45mM de Tris-borato; 1mM de EDTA), corados em solução de brometo de etídeo (0,5µg/ml) e analisados no programa *Alpha Innotech AlphaImager[®] Mini*.

Os fragmentos com tamanho esperado foram extraídos do gel com lâmina de bisturi e purificados seguindo instruções do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

4.2 CLONAGEM DOS GENES N E NSm NO VETOR pGEM[®]-T EASY (PROMEGA)

Os genes N e NSm amplificados com a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (Invitrogen[™]) foram ligados no vetor de entrada para produtos de PCR pGEM[®]-T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

A ligação entre os insertos N e NSm e o vetor pGEM[®]-T Easy foi feita com a utilização da T4 DNA Ligase (Promega) permanecendo *overnight* a 4°C.

E. coli da linhagem DH5 α (Invitrogen) eletrocompetentes foram transformadas com as ligações de acordo com Sambrook & Russel (2000).

Os plasmídeos recombinantes [pGEM-N e pGEM -NSm] foram obtidos de acordo com as instruções contidas no protocolo do vetor pGEM[®]-T Easy.

4.3 CLONAGEM DOS GENES N E NSm NO VETOR DE ENTRADA PARA GATEWAY pENTR2B (INVITROGEN[™])

Os plasmídeos recombinantes foram isolados e purificados com o *kit* comercial Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

Esses plasmídeos foram submetidos à dupla digestão com as enzimas *BamHI* (NEB) e *XhoI* (NEB), *overnight*, a 37°C, de acordo com as recomendações fornecidas pela NEB através do aplicativo *Double Digest Finder* (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>).

Os produtos das reações de digestão foram aplicados em gel de agarose 1% e os insertos liberados foram purificados seguindo instruções do *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

Os insertos N e NSm digeridos e purificados foram submetidos à reação de ligação, com a enzima T4 DNA ligase, com o vetor pENTR2B também previamente digerido com *BamHI* e *XhoI*.

4.4 CLONAGEM DOS GENES N E NSm NOS VETORES pSITE

O vetor pENTR2B é um vetor de entrada para a recombinação via sistema *Gateway[®]* (Invitrogen). Todos os vetores recombinados [pENTR2B-N e pENTR2B-NSm] foram utilizados para essa reação *Gateway* com vetores pSITE (Tabela 6) de acordo com as recomendações do protocolo *Gateway[®] LR Clonase[®] II enzyme mix*. Os vetores pSITE (Martin et al., 2009) foram utilizados para fundir as proteínas N e NSm de GRSV às porções N e C terminais da proteína fluorescente EYFP (proteína fluorescente amarela) para os ensaios de BiFC. Os vetores recombinados (N/NSM-pSITEs) foram utilizados para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (GV1301).

Tabela 6: Vetores para BiFC.

Vetor	Construção	Acesso no <i>GenBank</i>
pSITE-nEYFP-C1	35S+nEYFP+Proteína	GU734651
pSITE-cEYFP-C1	35S+cEYFP+Proteína	GU734652
pSITE-cEYFP-N1	35S+Proteína+cEYFP	GU734649
pSITE-nEYFP-N1	35S+Proteína+nEYFP	GU734648

4.5 ENSAIOS DE FLUORESCÊNCIA BIMOLECULAR COMPLEMENTAR (BiFC)

Os ensaios de BiFC foram executados de acordo Citovsky et al. (2008) e Martin et al. (2009). Plantas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas na parte abaxial da folha com uma seringa de 1 ml contendo uma suspensão de agrobactérias transformadas com os vetores N/NSm-pSITE adequados para cada tratamento. Todos os tratamentos foram co-infiltrados com a proteína supressora HC-PRO clonada no vetor binário pMOG8000, com OD(600nm) de 0,2.

Essa suspensão foi obtida centrifugando-se 5 ml de uma cultura de agrobactérias crescidas por 12 horas a 28°C. Posteriormente, o precipitado foi ressuscitado em tampão de agroinfiltração (Goodin et al., 2002) (MES 10mM; MgCl₂ 10mM; *acetosyringone* 150 µM; pH 5.6) e a suspensão foi ajustada para uma densidade ótica (OD 600nm) de 0.4.

Três dias após a agroinfiltração (3 d.p.i), porções das folhas de plantas agroinfiltradas de cada tratamento, foram coletadas e transferidas para lâminas de vidro contendo água destilada. Essas lâminas foram analisadas em microscópio confocal a *laser* (Leica TCS SP5) para visualização e localização, *in vivo*, das expressões transientes das proteínas de GRSV fusionadas às porções do EYFP. As moléculas de EYFP fusionadas às proteínas N ou NSm foram excitadas no espectro de 514 nm. As observações foram feitas utilizando-se lentes objetivas de 40x.

4.6 MODELAGEM ESTRUTURAL POR HOMOLOGIA MOLECULAR

As sequências de aminoácidos das proteínas N de GRSV e N de LACV utilizadas no alinhamento foram obtidas a partir das sequências dos nucleotídeos disponíveis no *GenBank* com os respectivos números de acesso: AF251271 e GU206123 . O alinhamento entre as sequências de aminoácidos da N de GRSV e da N de LACV foi submetido no programa de Modelagem Estrutural Comparativa de proteínas: “MODELLER” (<http://salilab.org/modeller/>). O modelo obtido foi avaliado através dos parâmetros de validação do programa “ERRAT” (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/ERRAT/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES N E NSm DE GRSV E CLONAGEM NOS VETORES DE DESTINO pSITE

Após a PCR, os dois fragmentos de N (792pb) e NSm (927pb) de GRSV foram obtidos (Fig.7A) e inseridos no vetor de entrada para produtos de PCR pGEM-T *easy* (3015pb). Após a ligação, os vetores pGEM-T *easy* recombinantes confirmados por sequenciamento foram digeridos com enzimas *Bam*HI e *Xho*I, obtendo-se os insertos de N e NSm digeridos e o vetor pGEM-T *easy* vazio (3015pb) (Fig7B). Os insertos de N e NSm liberados foram ligados no vetor de entrada para o sistema Gateway pENTR2B também previamente digerido (~2400pb). Após dupla digestão com *Bam*HI e *Xho*I, foram obtidos dois fragmentos, o maior que corresponde ao pENTR2B vazio (2400kb) e o menor, correspondente aos insertos ou de NSm ou de N de GRSV (Fig.7C).

Apenas os vetores pENTR2B recombinados com os genes N e NSm de GRSV, com presença de códon de parada, foram submetidos à reação de recombinação *Gateway* com os vetores pSITE-C1 (~12kb). Após os procedimentos de clonagem foram obtidos os vetores pSITE/cYFP+NSm, pSITE/nYFP +NSm, pSITE/cYFP+N e pSITE/nYFP+N. Todos esses vetores foram confirmados por digestão com *Bam*HI e *Xho*I (Fig.7D) e por sequenciamento “Sanger” utilizando-se *primers* universais e/ou *primers* específicos para cada vetor. A Figura 7 esquematiza os resultados obtidos através da estratégia adotada para realizar as consecutivas clonagens até a obtenção dos vetores pSITE recombinados com a proteína N e a NSM de GRSV.

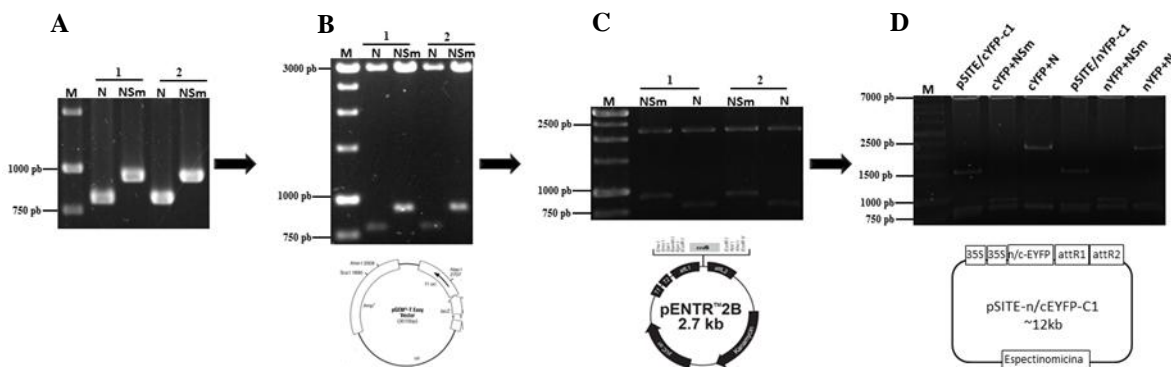


Figura 7: Estratégia de clonagem das proteínas N e NSm de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) nos vetores pSITE-C1. Os amplicons possuem sítio de restrição para *Bam*HI na extremidade 5' e sítio de restrição para *Xho*I na extremidade 3'. 1: genes com a ORF completa; 2: genes com o códon de parada retirado. M: Marcador 1kb DNA ladder (FERMENTAS). A: amplificação dos genes N e NSm por RT-PCR. B: Digestão dupla com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I dos vetores pGEM-T *easy* recombinantes para liberação dos insertos N e NSm digeridos. C: Digestão dupla com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I dos vetores pENTR2B recombinantes para confirmação da ligação. D: Digestão dupla com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I dos vetores pSITE recombinantes para confirmação da reação de recombinação *Gateway* via LR clonase.

As ampliações dos genes NSm e N com o códon de parada ausente foram realizadas com o intuito final de se obter vetores pSITE-N1 recombinados com esses genes, pois todas as construções entre os fragmentos de EYFP e os genes N e NSm iriam ser testadas para se identificar as melhores combinações para visualização das interações. Porém, as reações de ligação *Gateway* entre os vetores pENTR2B-N²/NSm² não foram realizadas, pois durante o processo de obtenção dos clones, Dietzgen et al. (2012) observaram as interações homo/heterotípicas entre as proteínas de INSV utilizando-se os vetores pSITE-C1 e pSITE-

N1 e validaram o uso dos vetores pSITE-C1 como o mais adequado para a observação das interações dessas proteínas *in vivo*. Portanto, apenas foram realizadas as ligações entre os vetores pSITE-C1 e os vetores pENTR2B-N¹/NSm¹.

5.2 INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS N E NSm DE GRSV IN PLANTA

Diversos trabalhos já citados no tópico 1.3.3 mostraram as localizações e as interações das proteínas de TSWV ou INSV em células vegetais, no entanto, é a primeira vez que ensaios de localização subcelular e interação proteína-proteína foram realizados para GRSV, o principal tospovírus infectando hortaliças no Brasil.

Shen & Chou (2010) elaboraram um programa *in silico* de predição da sub-localização de proteínas virais em células infectadas denominado Virus-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/virus-multi/>), e todas as proteínas de GRSV foram submetidas à análise por este programa (Tabela 7). De maneira semelhante ao observado experimentalmente para outros tospovírus, as proteínas de GRSV tiveram localização predita no citoplasma, sem predição de localização nuclear, o que é esperado, pois o vírus se replica no citoplasma celular. Porém, Dietzgen et al. (2012) observou indícios de localização subcelular nuclear da Gc de INSV e mais estudos acerca da distinta localização e função dessa proteína tanto de INSV, como de outros tospovírus, são de grande interesse.

Tabela 7. Localização subcelular predita *in silico* das proteínas de GRSV.

Proteína	Localização
N	Citoplasma
NSm	Citoplasma, Membrana celular
NSs	Citoplasma, Membrana celular, Retículo endoplasmático
RdRp	Citoplasma, Membrana celular
Gn	Citoplasma, Membrana celular
Gc	Citoplasma

Predição gerada pelo programa Virus-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/virus-multi/>)

As proteínas N e NSm de GRSV foram testadas para as interações homotípicas (N-N, NSm-NSm) e heterotípicas (N-NSm) em todas as combinações disponíveis com os vetores para BiFC, pSITE-C1. Todos os controles de fluorescência para explorar a viabilidade dos vetores e da técnica foram realizados como observado na Figura 8.

De acordo com os princípios da técnica de BiFC, as combinações entre proteínas candidatas à interação fusionadas à mesma porção do fragmento não fluorescente de EYFP (nEYFP ou cYFP) não podem resultar em resgate da fluorescência e de fato, não foi observada emissão de fluorescência amarela nas combinações mostradas abaixo (Fig.8, E-P).

Micrografias de células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana* sadias (Fig. 8, Q-T) e agroinfiltradas com agrobactérias (GV3101) não transformadas com os vetores (Fig.8, A-D) também foram feitas para constatar que essas células vegetais não emitem autofluorescência na faixa visível do amarelo quando excitadas a 514nm.

Utilizando as combinações entre as proteínas N e NSm fusionadas com ambos os fragmentos de EYFP (cYFP e nYFP), as interações homotípicas e heterotípicas entre as proteínas N e NSm foram detectadas. Todas essas interações ocorreram no citoplasma, na periferia celular (Fig. 9).

A interação homotípica N-N pode ser visualizada através da formação de agregados distribuídos no citoplasma (Fig.9A). A interação homotípica NSm-NSm ocorreu ao longo de

toda a periferia celular com bastante intensidade (Fig.9C), já a interação heterotópica NSm-N também ficou distribuída pela periferia celular, porém, ocorreu com menor intensidade, comparado à interação NSm-NSm. Também foi possível observar pequenos pontos com sinal de fluorescência mais intenso (Fig.9B).

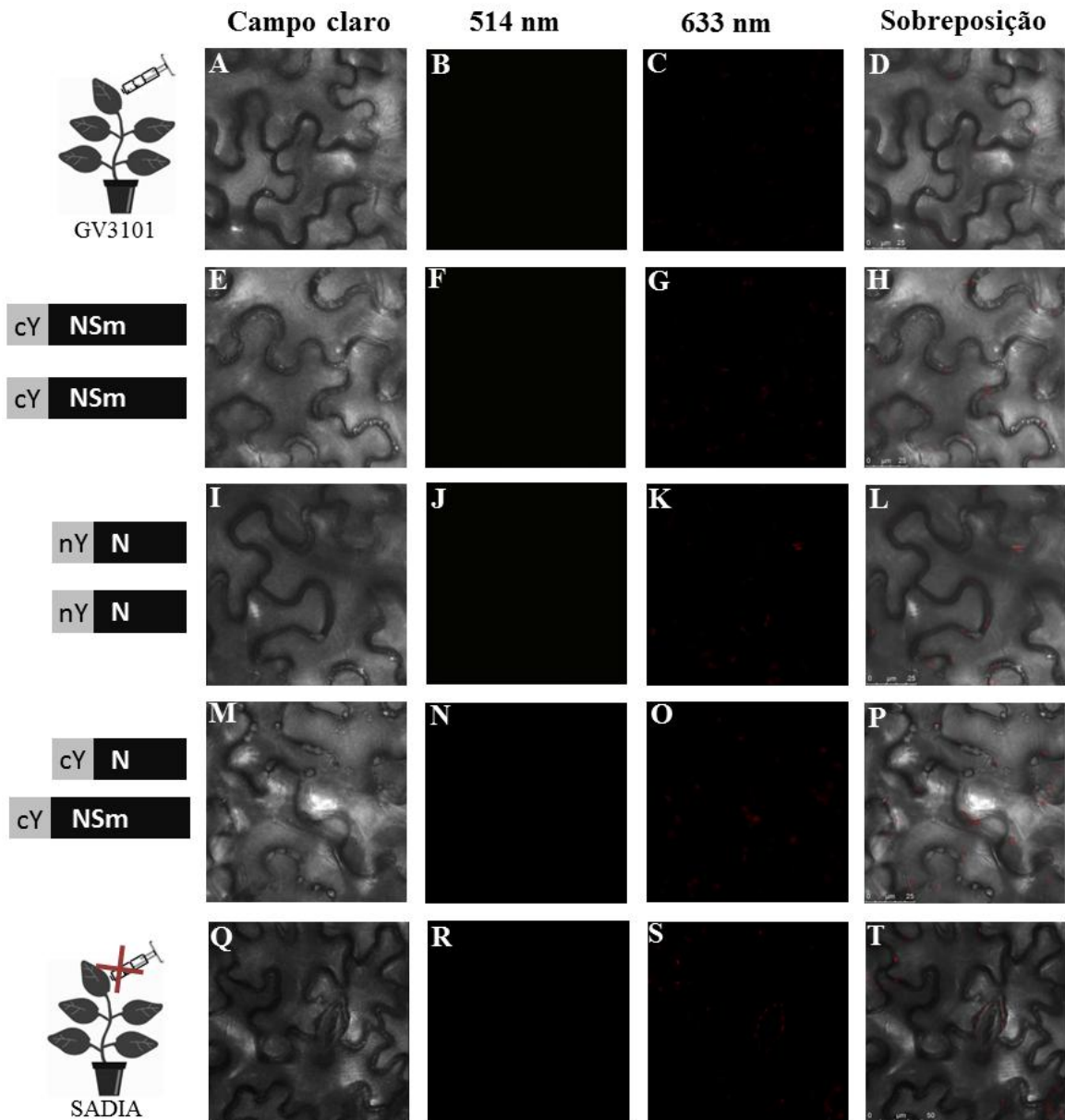


Figura 8: **Micrografias de Fluorescência Confocal de células epidérmicas de *Nicotiana benthamiana* para controles negativos de interação por BiFC.** (A-D) células epidérmicas de folhas agroinfiltradas apenas com solução de agrobactérias GV3101; (Q-T) células epidérmicas de folhas de *Nicotiana benthamiana* sadias não agroinfiltradas; (E-H), (I-L) e (M-P) mostram células epidérmicas de folhas co-infiltradas com os vetores de mesma porção da molécula de EYFP. nY: nYFP; cY: cYFP. D, H, L, P e T são as sobreposições das imagens obtidas com o campo claro, com laser de 514nm e com laser de 633 nm. C, G, K, O e S evidenciam a autofluorescências dos cloroplastos no espectro de luz vermelho.

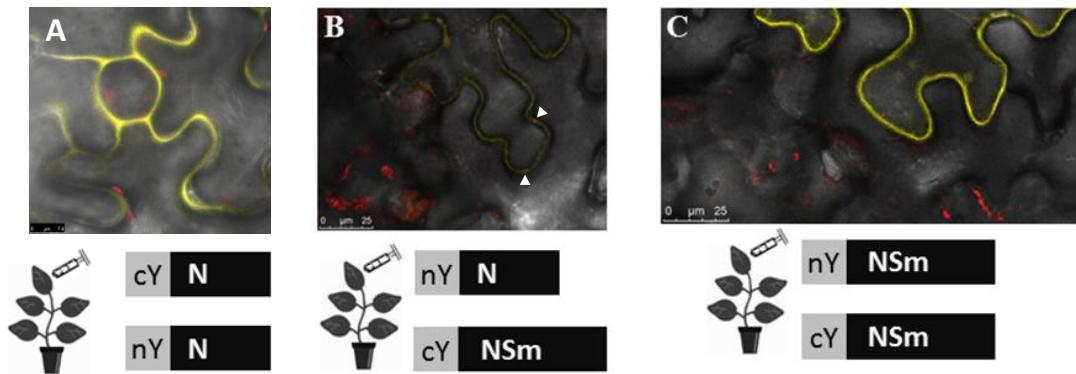


Figura 9: **Micrografias de Fluorescência Confocal de sobreposição de células epidérmicas de *Nicotiana benthamiana*.** A e C apresentam as interações homotípicas proteínas N e NSm de *Groundnut ringspot virus* (GRSV). B apresenta as interações heterotípicas entre as proteínas N e NSm. nY: nYFP; cY: cYFP. Setas brancas indicam pontos de acúmulo com sinal de fluorescência mais intenso em B.

As interações homotípicas e heterotípicas observadas para as proteínas N e NSm de GRSV confirmam as interações observadas para TSWV e INSV (Urigo et al., 1999; Soellick et al., 2000; Zilian & Maiss, 2011; Dietzgen et al., 2012). As interações N x NSm e NSm x NSm localizaram-se por toda a periferia celular, com a presença de alguns pontos com fluorescência mais intensa que podem estar associados com o plasmodesma e a interação N x N ocorreu formando-se agregados no citoplasma que podem estar interagindo com o retículo endoplasmático como observado por Feng et al. (2013). Futuros ensaios de localização utilizando-se marcadores específicos para plasmodesma e retículo endoplasmático elucidarão o comportamento subcelular das proteínas N e NSm de GRSV.

A técnica de BiFC permitirá futuros estudos entre as próprias proteínas virais N e NSm e entre essas proteínas virais com proteínas das plantas hospedeiras, agregando novas informações para o entendimento do movimento viral célula-a-célula e sistêmico.

5.3 MODELAGEM ESTRUTURAL POR HOMOLOGIA DA PROTEÍNA N DE GRSV

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas N de GRSV e o *La Crosse virus* (LACV) um *Orthobunyavirus* mostrou que elas possuem uma identidade de aproximadamente 20% (dados não mostrados) e surpreendentemente, os resíduos de aminoácidos importantes para a formação da estrutura tridimensional da proteína N de LACV são similares na proteína N de GRSV, fornecendo evidências para a montagem da estrutura tridimensional e análises dos domínios funcionais da proteína N de GRSV a partir da proteína N de LACV (Fig.10).

A partir do modelo tridimensional da proteína N de LACV, foi possível construir um modelo tridimensional para proteína N de GRSV pela técnica de modelagem estrutural por homologia (Fig.11).

A proteína N de GRSV possui quatorze alfa-hélices e uma folha beta. O braço N-terminal é composto pelos aminoácidos 1 a 32 e o braço C-terminal é composto pelos aminoácidos 224 a 258. Os outros aminoácidos (33-223) estão enovelados formando uma estrutura globular com uma cavidade formada por aminoácidos hidrofóbicos e positivos que interagem com o RNA (Fig.11). Os resíduos de aminoácidos de GRSV marcados em amarelo são candidatos para o domínio de interação com o RNA: F23, Q61, T92, R94, R95, P125, L126, Y184, L190, G191, K192 (Fig.11).

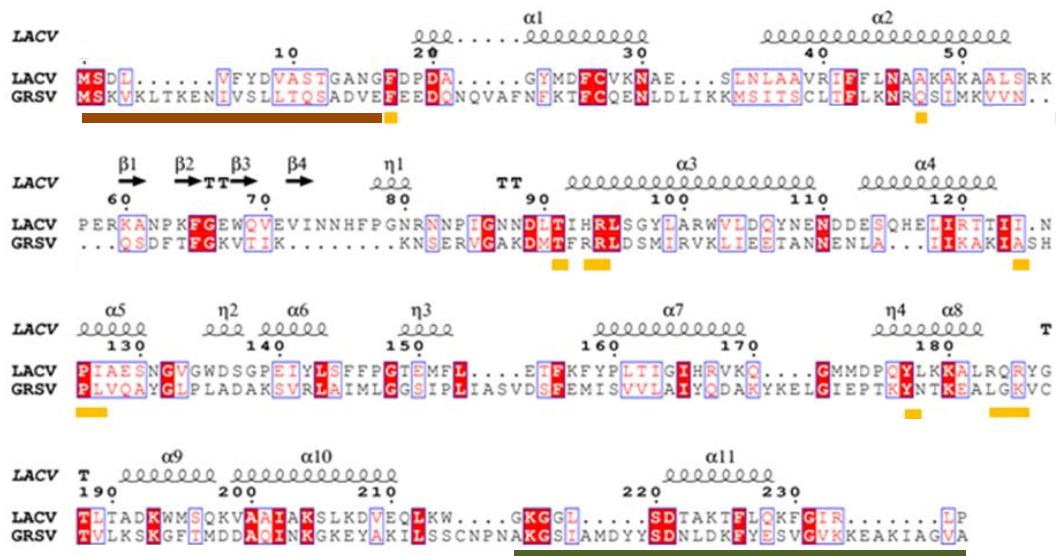


Figura 10: **Alinhamento representativo das sequências da N de La Crosse virus (LACV) e de Groundnut ringspot virus (GRSV).** A estrutura secundária da N de LACV está mostrada acima e os resíduos de aminoácidos e domínios importantes estão indicados de acordo com a função em: Amarelo: ligação à RNA; marrom: domínio N-terminal; verde: domínio C-terminal. Resíduos altamente conservados entre as duas espécies estão sombreados de vermelho e escritos em branco e os resíduos com as mesmas características estão escritos de vermelho e destacados em azul. O alinhamento foi feito através do programa ClustalW e a figura foi gerada pelo programa ESPript (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

Richmond et al. (1998) mostraram que a proteína N de TSWV não se liga a dsRNA *in vitro*, mas se liga a ssRNA de forma não específica e bastante estável. A associação N-RNA é formada até mesmo em condições de altas concentrações de sais e com tratamentos com RNase. O mesmo comportamento foi observado para as proteínas N de outros bunyavírus já caracterizadas (Reguera et., 2013; Ariza et al., 2013; Dong et al., 2013 e Niu et al., 2013). A N protege o RNA viral por completo, pois não se liga à sequencias específicas do RNA. A proteína N forma oligômeros e a cavidade de interação ao RNA de cada subunidade encapsida e protege o RNA completamente, até mesmo os nucleotídeos que estão entre os monômeros da N, potencialmente impedindo o acesso de qualquer outra proteína ou substância ao RNA. Essa forte interação entre N e o RNA explica porque os ribonucleocapsídeos são insensíveis à ribonucleases ou às altas concentrações de sais.

Em todos os casos de interação N-RNA estudados, o RNA está inacessível ao solvente, indicando que para ser transcrito pela polimerase, este precisa estar pelo menos dissociado parcialmente da proteína N (Reguera et al., 2014)

Em ensaios de duplo híbrido em levedura com deleção das extremidades N e C terminais da proteína N de TSWV, Uhrig et al. (1999) identificou que as porções terminais N (1-39 aminoácidos) e C (233-248 aminoácidos) são importantes para a multimerização da proteína N estabelecendo que essa interação entre os monômeros de N ocorre pelo modelo “head-to-tail” com a interação entre o domínio N-terminal de uma N com o domínio C terminal da N adjacente via forças hidrofóbicas.

Kainz et al. (2004) a partir de mutações de substituição por Alanina e utilizando o sistema de duplo híbrido em levedura, também confirmaram os resultados obtidos por Uhrig et al. (1999) e identificaram três regiões na sequência primária de aminoácidos, importantes para a interação N-N: região 42-56, região 132-152 e 233-258. Este trabalho propõe que as regiões 42-56, 132-152 e 233-258 são regiões de superfícies para a interação dos monômeros.

Os trabalhos citados reforçam e validam os resultados obtidos na modelagem por homologia para a proteína N de GRSV.

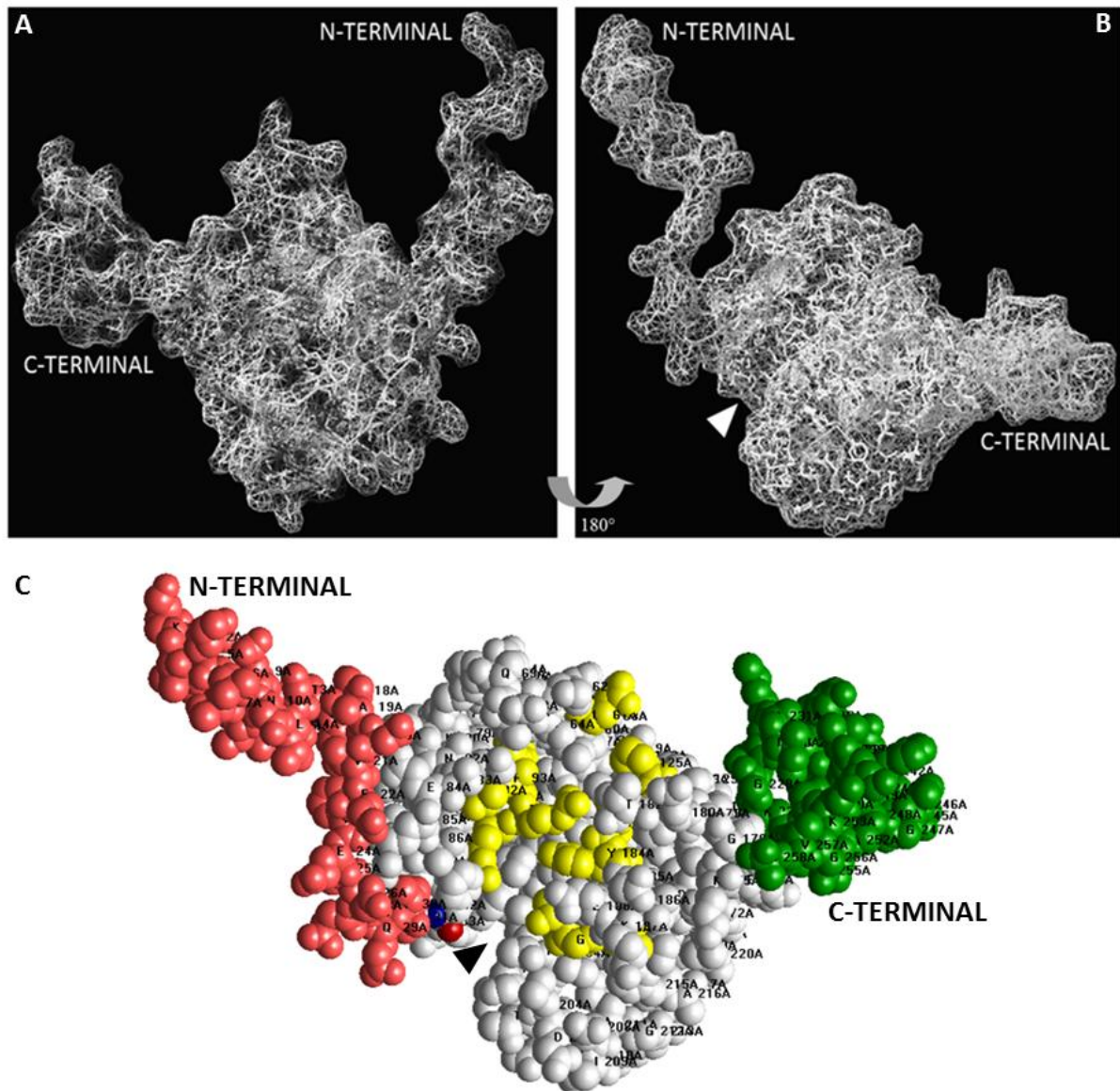


Figura 11: **Estrutura tridimensional da proteína N de *Groundnut ringspot virus***. A: Estrutura tridimensional da proteína N de GRSV mostrando a região globular com os braços N e C terminais da proteína. Imagens obtidas através do programa Swiss-PDB Viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>). B: Giro de 180° no eixo horizontal evidenciando a cavidade de interação com o RNA (cabeça de seta branca). C: Imagem da estrutura tridimensional da proteína N obtida através do programa MVM (<http://www.zmmsoft.com/>) evidenciando os aminoácidos que compõem o braço N-terminal (vermelho), o braço C-terminal (verde) e os aminoácidos candidatos à interação com o RNA (amarelo) presentes na cavidade.

5.4 RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS ESTRATÉGICOS SÃO CONSERVADOS ENTRE OS TOSPOVÍRUS

A partir das semelhanças encontradas entre os resíduos de aminoácidos das duas sequências acima, um alinhamento entre todas as sequências de aminoácidos da proteína N de todas as espécies do gênero *Tospovirus* caracterizados até o momento foi realizado.

O alinhamento das sequências das proteínas N mostrou que vários dos aminoácidos similares entre GRSV e LACV são conservados entre os tospovírus (Fig.12). Na porção N-terminal, estão presentes três resíduos de fenilalanina (F32, F34 e F37) que são importantes para estabilizar o braço N-terminal da proteína N. Já o braço C-terminal da proteína N é estabilizado pelo resíduo de prolina (P224), também conservado em todas as espécies já

caracterizadas. Para TSWV, a partir do alinhamento de sequências da N de TSWV, observa-se que a proteína possui os mesmos resíduos de aminoácidos P224, F32, F34 e F37 nas regiões C e N terminais, da mesma forma como mostrado para GRSV.

Alguns resíduos de aminoácidos que estão presentes na cavidade da região globular da proteína N são conservados entre todas as espécies e são fortes candidatos para futuros estudos de interação da proteína N e de RNA virais para formação dos ribonucleocapsídeos.

```

GCFSV -----MSKTK-VKNDKELFESLSR-NAKIELS-----QE QANFTFKKFFSENN SKV-
GYSV -----MSTKGVIK-VKNDRELFESLSK-NAKVELE-----QE QISFTFKAFFDNKSSKV-
LNRV -----MAVE--LNDANVKHILEGGEGVIE PKNKPASRDSAFKDFEFCVAYGN-V-
IYSV -----MSTVR--VKPSEIEKLLSGGDVDV VIESD--E-TEGFNFKNFVLANEG-V-
HCRV -----MSTAR--LSKANVEKLLAGGEADVE IEAE--E-TTGFNFKEFVLANGN-V-
Po1RSV -----MSTTG--LSKENVEKLLAGGDADVE IEAE--E-TAGFNFKQFVTDNSK-M-
TYRV -----MSTAR--VSKENIEKLLAGGEADV VIEAE--E-TAGFNFKEFVLANKA-M-
PCSV -----MSNVRKTL SNEKIKELLAGGDADIE IELD--EATPGFSFSK FYDDNKADIF
TNRV -----MSNVRKTL SNEKIKELLAGGEADIE IELD--EATPGFSFSK FYDENKQDIF
MYSV -----MSTVA-KLTKEKIQELL SGGKSEVE IETE--ESTEGFNH SFFTDVRDEV-
PSMV -----MSTVA-KLTKEKIQELL SGGKSEVE IETE--ESTEGFNH SFFADVRDEV-
WBNV -----MSNVK-QLTDKKIKDLLAGGAADVE IETE--DATPGFSFKS FYDNNKD-V-
GBNV -----MSNVK-QLTEKKIKELLAGGSADVE IETE--DSTPGFSFKAFYDTNKN-L-
CaCV -----MSTVR-QLTEKKIRELLAGGTADVE IETD--DSTPGFSFKAFYDSNKS-V-
TNeV -----MSTVR-QLTEKKIRELLAGGTADVE IETD--DSTPGFSFKAFYDSNKN-V-
WSMoV -----MSNVK-QLTEKKIKELLAGGTADVE IETE--DSTPGFSFKAFFYNNKN-I-
CCSV -----MSNVR-GLTQQKIKDLLAGGKADVE IDSE--EQLGFNFST FYESNKTGA-
TZSV -----MSNVR-SLTQQKVQELLAGGKADVE IDTD--DQTQGF SFA SFYEENKAKA-
INSV -----MNKAK--ITKENIVKLLTQ-SDSLE FEET--QNEGSFNFTDFFTNNRE-KI
MeSMV -----MSKVK--LTKDNI IKLLSS-NAEIE FEEE--QNQSTFQFDTFFDANVE-KL
TSWV -----MSKVK--LTKENIVALLTQ-NKDLE FEED--QNLVAFNFKTFCL ENLD-QI
ANSV -----MSKAK--LTRENI INLLTQ-SAEVE FEEE--QNQA AFNFQNFQCDNLD-LV
PNSV -----MSKVK--LTKENI IALLTQ-SAEVE FEED--QNQTAFNFKTFCHDNLD-LL
GRSV -----MSKVK--LTKENIVSLLTQ-SADVE FEED--QNQVAFNFKTF CQENLD-LI
TCSV -----MSKVK--LTKDNI ISLLTQ-AGEIE FEED--QNQA AFNFKTF CQENLD-SI
CSNV -----MSKVK--LTKENIVALLTQ-AGEVE FEEE--QSQIAFNFQSF CNDNLD-QI
ZLCV -----MSKVK--LTKENIVALLTQ-ATEVE FEEE--QNQTAFNFKTSYEGNLK-LI
BeNMV -----MGSNALK--LNAENLKKLLLF-NDEVE FE---QQSTGFK FVDFCKAHEK---
SVNaV MPQTAGPSNAKPAK--ITESNLAKLLKF-EEDIE FE---KNSTGFK FSEFYKTHMG---

```

. : : * : . . * *

```

GCFSV -EISDENMILFINNSNMKAIGRESSVSKYLGHSIVK-----SSPGVNEFTWSRMDSL
GYSV -ELTEANMVLYINSANRLKLIGKENNAKTFLNINIVK-----SSPGVDEFTWSRLDSV
LNRV -AIKLAGMASLLRRRESIVDLFK-KDTLKL GATVYKL---PENRNNPGPN DWTAGRFESEF
IYSV -QMTFNNGYTILRNRA GIYKTIK-TGKFTFQGKTI VI---PSANVSPNQDDWT FRRLEGF
HCRV -KMTFNNGYTILRNRA AIYKMVK-AGNFKFQGKPIV---PNATSNPGQDDWT FRRLEGF
Po1RSV -KMTFNNGYTILRNRA AIYKMVK-AGHFKFQGKSIV---PSSTSSPGQDDWT FRRLEGF
TYRV -KMTFNNGYTILRNRA GIYKMVK-AGQFKFQGNPIV---PSATVSAGQDDWT FRRLEGF
PCSV GKFTFNNGITILKSRKQIFAACK-NNQFVFCGKQIAQ---NSDNA--DEKTWTFKRTEAV
TNRV GKFTFNNGITILKSRKQIFAACK-SNQFVFCGKQIAQ---NSDTA--DEKTWTFKRTEAV
MYSV -KLNYNNGITILKSRKQVYAACK-SGNYKFCGKKIVA---SGDNV--GPNDWTFKRTEAV
PSMV -KLNYNNGITILKSRKQVYAACK-SGNYKFCGKKIVA---SGDNV--GPNDWTFKRTEAV
WBNV -EITFTTCLNILKCRKQIFAACK-NGKYNFCGKNIVA---TTAQV--GPDDWTFKRTEAF
GBNV -EITFTNCLNILKCRKQIFAACK-SGKYVFCGKTI VA---TNTDV--GPDDWTFKRTEAF
CaCV -EMTFTNCLNILKCRKQIFAACK-SGKYKFCDKTIVS---TAADV--GPDDWTFKRTEAL
TNeV -EMTFTNCLNILKCRKQIFAACK-SGKYKFCDKTIVS---TAADV--GPDDWTFKRTEAL
WSMoV -EITFTNCLNILKCRKQIFAACK-SGKYNFCGKNIVA---TSVDV--GPEDWTFKRTEAF
CCSV -EFTFTTGINILKCRKQVFAACK-SGKYEFCGKKVVA---TTDEV--SATDWT FKRTEAF
TZSV -DFTYNTGINILKCRKQVFAACK-NGKYEFCGHKIVA---SSADV--SATDWT FKRTEAF
INSV QNMTTASCLSFLKNRQSIMRVIK-SADFTFGSVTIK KTRNNSERV--GVNDMTFRRLDAM
MeSMV KNMTVMSCLTFLKNRQSIMKVVK-QADFTFNGITIKK---SKPKI--EPKDMTFRRLDAM
TSWV KKMSIISCLTFLKNRQSIMKVIK-QSDFTFGKITIKK---TSDRI--GATDMTFRRLDSL
ANSV KKMSITSCLTFLKNRQSIMKVIK-QSDFTFGKITIKK---TSERI--GATDMTFRRLDSM
PNSV KKMNITSCLTFLKNRQSIMKVVK-QIDFTFGKITIKK---TSERI--GATDMTFRRLDSM
GRSV KKMSITSCLTFLKNRQSIMKVVN-QSDFTFGKVTIKK---NSERV--GAKDMTFRRLDSM
TCSV KKMSITSCLTFLKNRQSIMKVVN-QSDFTFGKITIKK---NSGRV--GANDMTFRRLDSM
CSNV KNMNLISCLTFLKNRQSIMKVVK-QSDFTFGKITIKK---NSDRI--GPNDMTFRRLDSL
ZLCV KNMSITSCLTFLKNRQSIMKVVK-QSDFNFGKVTIKK---VSDKI--GPNDMTFRRLDSM
BeNMV DKFNPTSALTFLKNRKAIYSLCK-ASTFNYGVYEIKK---G-DKA--TDTDFTFKRLDAF
SVNaV RKFYASALTFLKNRKAIVMCK-KGTFNFDGQTVKL---SVE SG--DDNSFTFKRLDSF

```

: : : . * * : . .

GCFSV IRMKYIERVKD----YGDDRMKAENAK-LTNWLLLEVFNLHTDAMSPRDEVIFKVVTGGNL
 GYSV IRMKYIDRIKD----YNEEKLKAE SAK-LNNWLLLEIFNLK--QMSPKDEVIFKVITGGDL
 LNRV IRYRICLKAE-----SDKELAKTSIEILQDTPLAYIYGLKSMPINDTDDMKLIACFSLRL
 IYSV IRARMLVELIE---TKDEKEKQKMYEKICGLPLVSAYGLKPSKFHATTARIMLTGGPL
 HCRV IRAKMFMEILLA---VENSTEQQKMYEKLCDLPMVNAYGLKPSPRFDATTARVMLTLGGPL
 PoIRSV IRAKMFMELIN---MENAVEQQKMYEKLCLELPMVNAYGLKPSKFDPTTARVVLTGGPL
 TYRV IRAKMFMELIA---VENASEQQKMYEKLCLELPMVNAYGLKPSKFDATTARVMLTLGGPL
 PCSV LRVLM SKMVEE---CTTQKLQQDMYTKLMSLPMVIAYGLNVPNFDVAATRMLLCVGGPL
 TNRV LRVLM AKMVEE---CTTQKLQQDMYSKLSLPMVIAYGLNVPNFDSCATRMLLCVGGPL
 MYSV IRTLMSIAEK---TENEEKQKMYEKAMQLPLVAAYGLTVPAKFDMTALRMLCIGGPL
 PSMV IRTLMSIAEK---TENEEKQKMYEKAMQLPLVAAYGLTVPAKFDMTALRMLCIGGPL
 WBNV IRTKMVSMVEK---STNENAKQEMYTKIMELPLVAAYGLNVPAAAYDSCALRMMLCIGGPL
 GBNV IRTKM ASMVEK---SKNDAAKQEMYNKIMELPLVAAYGLNVPASFDTCALRMMLCIGGPL
 CaCV IRVKMINMIEK---NKNEAAKQEMYSKVMELPLVAAYGLNIPASFDSALRMMLCIGGPL
 TNeV IRVKMINMIEK---NKNEAAKQEMYSKVMELPLVAAYGLNIPASFDSALRMMLCIGGPL
 WSMoV IRTKIVSMVEK---SKNEAARQEMYGKIMELPLVAAYGLNVPASYDSCALRMMLCIGGPL
 CCSV IRAKLISMVEH---TTDEATKKLMYTKAMELPLVVAYGLNVPAEFHYAALRMLCIGGPL
 TZSV IRTLISMAEH---ATDETTKKQMYIKAMELPLVAAYGLNVPVDFNSSAIRMLCIGGPL
 INSV VRVHLVGM-----KDNGSALTEAINSLP SHPLIASYGLATT---DLKSCVLGVLLGGSL
 MeSMV IRAKMIEFT-----AKD-EALEI IKVKISSHPLVMAYSLDVN---DAKSARIACLGGSL
 TSWV IRVRLVEET-----GNS-ENLNTIKSKIASHPLIQAYGLPLD---DAKSVRLA IMLGGSL
 ANSV IRVKLIQET-----ANA-VNLDAIKTKIASHPLVQAYGLPLN---DAKSVRLA IMLGGSI
 PNSV IRVKLIEET-----ANA-ENLAIKTKIASHPLVQAYGLPLT---DAKSVRLA IMLGGSI
 GRSV IRVKLIEET-----ANN-ENLAI IKAKIASHPLVQAYGLPLA---DAKSVRLA IMLGGSI
 TCSV IRVKLIEET-----GKA-ENLAI IKSKIASHPLVQAYGLPLT---DAKSVRLA IMLGGSI
 CSNV IRVKLIGRT-----KSD-EDLNTIKSKIASHPLVQAYGLSLN---DAKSVRLA IMLGGSL
 ZLCV IRVKPIEAT-----AND-ENLSAIRSKIASHPLVQAYGLSLT---NAKSVRLA IMLGGSI
 BeNMV LRVKLLTHCTKIWDGTDPAQTALCSELAKIPIVKAYGLEVS---DKQKCYIAIVLGGNL
 SVNaV LRVKMLEHNFAVFDGTNEEAKQSLCNDLATIPLVQAYGLTVK---DKMSAKLAIMIGGSL
 : * : : * . . :

GCFSV NHLMGFKTTFAHAFAIANYQH KRSEELGIK--NFDTKAQLDRMVVIGERCSLLPSPTPKT
 GYSV NHLMCFKTTFAHAFAIANYQH KRAEQLGIT--NFDTKAQLDRMIVIGERNGLVPSNVPLA
 LNRV NHLASMPKTCRHAMAVAIYRYHCKDMV---RKEFHDTETLERVCTVAKATGFVFDDEFYR
 IYSV TLMASLDIFAAAAALPLAYFQNVKKEALGIS--RFSTYEQLCKVARVMAAKEFKFTEKYKK
 HCRV PLMASLDKFAAAAFPLAYFQNVKKEAQQIN--KFSTYEQLCKIARVMATKEFVFTGTAKE
 PoIRSV PLMASLDKFAAAAFPLAYFQNVKKEALGIN--KFSTYEQLCKIARVMATKEFTFTGASKA
 TYRV PLMASLDKFAATAFPLAYFQNVKKEALGIS--KFSTYEQLCKIARVMATKEFTFTGVSKD
 PCSV PLLSSLAPMAPITFPLAYFQNVKQNLGIK--NFSTYEQLCKVARVCDAAQIEFKGDVEK
 TNRV PLLSSLPAMAPIAFSLAYFQNVKQNLGIK--NFSTYEQLCKVARVCDAAQVEFTGDLLK
 MYSV SLLASLHSLCPVVLPLAYFQNVKKEQLGIK--NFSTYEQICKIARVMSASNMTFKKEFDE
 PSMV SLLASLHSLCPVVLPLAYFQNVKKEQLGIK--NFSTYEQICKIARVMSASNMTFKKEFDE
 WBNV PLLSSLTGLAPVIFPLAYYQNVKKEKLGK--NFSTYEQVCKVAKVLSASQIEFKGEMDK
 GBNV PLLSSMTGLAPIIFPLAYYQNVKKEKLGK--NFSTYEQVCKVAKVLSASQIEFKNELEE
 CaCV PLLSSIKGLAPIIFPLAYYQNVKKEKLGK--NFSTYEQVCKVAKVLSASQVEFKEDLDK
 TNeV PLLSSIKGLAPIIFPLAYYQNVKKEKLGK--NFSTYEQVCKVAKVLSASQVEFKEDLDK
 WSMoV PLLSSIRGLAPIIFPLAYYQNIKKEKLGK--NFSTYEQVCKVAKVLSASQVEFKDLDLV
 CCSV PLLSSLPGLAPVCFPLAYFQNVKKEQLGIK--NFSTYEQICKVAKVLSAASVEFADKTKE
 TZSV PLLSSVPGLAPVCFPLAYFQNVKKEQLGIK--NFSTYEQICKVAKVLSAASVEFTEKTQE
 INSV PLIASVNLNFEIAALVPAIYQDAKHVELGIDMSKFSKREAVGKVCTVLKSKGYSMNSVEIG
 MeSMV PLLASIPHYEAIICLVAVYQDAKSQELGIDQKKYDTKEAIGKVCTVLKSKGYVMDNDQLE
 TSWV PLIASVDSFEMISVVLAIYQDAKYKDLGIDPKKYDTREALGKVCTVLKSKAFEMNEDQVK
 ANSV PLIASVDSFEMISIVLAIYQDAKCKDLGINPKKYDTKEALGKVCTVLKSKGFSMDDTQVT
 PNSV PLIASVDSFEMISIVLAIYQDAKCKDLGIDPKKYDTKEAIGKVCTVLKSKGFLMDESQVN
 GRSV PLIASVDSFEMISVVLAIYQDAKYKELGIEPTKYNTKEALGKVCTVLKSKGFTMDDAQIN
 TCSV PLIASVDSFEMISIIILAIYQDAKYKDLGIEPSKYNTKEALGKVCTVLKSKGFTMDEAQIQ
 CSNV PLIASVESFEMISVVLAIYQDSKHKELGIDEKKYDTKEALGKVCTVLKSKGFAIDEQOME
 ZLCV PLIASVDSFEMISVVLAIYQDSKHKELGIDLKKYDTTEALGKVCSVLSKGFIDDAQME
 BeNMV SLLASLPGCEVACFALAI FQDLKKNELGIK--SDFDTKDQAGRVAAVLDAKNFVFGEPENE
 SVNaV PLLASITGCEAYCFGLAIFQDLKKEQLGIV--NFDTKAQAARVASVLDKAGFKFTEEKNO
 : . . * :: : : :

```

GCFSV      LIESYF---RNAVFKAKSDSKDQSSKYNDLQNAIAA---VNFEVPWRQVMLYQVLNIYLL
GYSV       LINQYF---KNAIPRVKTAERDQSSKYEELQAAIGS---GEL*-----
LNRV       IVLKFR---NAKIISTGAQ--AVMEYHGSIKKAIESLGGTFNYTPSHRTIRGAEG---G
IYSV       IFDETIKILTDCTPGTSGAA--SLIKFNEQIKILEGAFGKI--VEDIGESSKPKTP---S
HCRV       IFEETIKILNDCTPGTTGAA--SLNKFNEQIKALENVFGKI--VDDNEASSSKPRS---A
Po1RSV     IFEETIKILNDCTPGTAGAA--SLNKFNEQIKALEAVFGKI--VDDNAGSSKPRP---A
TYRV       IFEETIKILNDCTPGTAGAA--SLNKFNEQIKALESAFGKI--VDDNGAGSSKPKP---S
PCSV       LFNSATDVLKSSTPGTASSV--SLKKYSEQISYLEKAFSAKAVVDDFGSNSASTSK--PT
TNRV       LFESATAILKTSSPGTASSI--SLKKYSEQIAHLEKAFGSKPVIDDFGNSVSTSK--PT
MYSV       LFKSCVKILADCKPGTTSGI--SLKIYNEQVQFMEQAFKSSLVVDGMGESSKSKA---SSS
PSMV       LFKSCVKILADCKPGTTSGI--SLKIYNEQVQFMEQAFKSSLVVDGMGESSKSKA---SSS
WBNV       MFKSAVELLSKSNPGTASSI--SLKKYDDQVKYMDRIFNSSLSMDDYGEHSHKSSK--A-
GBNV       MFKSAVKLLSESNPGTASSI--SLKKYDEQVKYMDKAFSASLSMDDYGEHSHKSSK--KA-
CaCV       LFKQAVKLLSESNPGTASSI--SLKKYDEQVKYMDKVF SANLSVDDYGEHSHKSSK--P-
TNeV       LFKQAVKLLSESNPGTASSI--SLKKYDEQVKYMDKVF SANLSVDDYGEHSHKSSK--L-
WSMoV     MFKQAVKILSESNPGTASSI--SLKKYEDQVKYMDRVF SANLSVDDYGDHSHKSSK--P-
CCSV       LFDSTVKLLGDSSPGTAGAI--SLHKYNSQLKQMEAAFNAKLNVDVDFGQNSKQSSK--KK-
TZSV       LFTSTVKLLGESNPGTAGAI--SLHKYNDQLKQMETAFKSKLNVDVDFGQNSKQAPK--KK-
INSV       KAKQYADILKACSPKAKGLA--AMDHYKEGLTISIYSMFNATIDFGKNSDI*-----
MeSMV     KAKMYAQILSKCDPKLKGDM--AMNHYEAGLKQIYEIFGVSGSKKASTSKVFE-----
TSWV       KGKEYAAAILSSSNPNAKGS I--AMEHYSETLNKIFYEMFGVKKQAILAEL---A*-----
ANSV       KGREYAAAILGSCNPNNAKGSV--AMEHYSEHLNKFYEMFGVKKESKISGV--A*-----
PNSV       KGKEYATILNSCNPNNAKGSV--AMEYSDNLNKFYEMFGVKKKEAKIAGV--A*-----
GRSV       KGKEYAKILSSCNPNNAKGS I--AMDYSDNLDKIFYESVGVKKEAKIAGV--A*-----
TCSV       KGKEYATILSSCNPNNAKGS I--AMEHYSEHLDKFYAMFGVRKEAKISGV--A*-----
CSNV       KGKEYANILKACDPRMKGAI--ALDHYSDSLNKFYEMFGVQKGSKLVPKDLV*-----
ZLCV       KGKEYANILKACDPRMKGAI--AMEHYSETLNKFYNMFGVKKKEKHVPKGVA*-----
BeNMV     KLKKIAGILKEMTPTRRGA--ALTKYAEQLSIIISGVIGVTFEMPGTSKAKES--K----
SVNaV     TLRLIAEILKDMAPQMRGVA--SLEKYNEQIGIISDIIGVHFEMP GKKGK--K----

```

:

```

GCFSV      IVKAFLF*-
GYSV       -----
LNRV       SSDS*----
IYSV       KKD--RYN*
HCRV       SKKNQGF*-
Po1RSV     SKKNQGF*-
TYRV       SKKNDAF*-
PCSV       KRGSMSL*-
TNRV       RRGSIGL*-
MYSV       RSKSIEV*-
PSMV       RSKSIEV*-
WBNV       SS-SLEV*-
GBNV       GP-SLEL*-
CaCV       ST-SIEV*-
TNeV       ST-SIEV*-
WSMoV     ST-SLEV*-
CCSV       -SGDLTF*-
TZSV       SSNDLSF*-
INSV       -----
MeSMV     ----I*---
TSWV       -----
ANSV       -----
PNSV       -----
GRSV       -----
TCSV       -----
CSNV       -----
ZLCV       -----
BeNMV     -NHGFMS*-
SVNaV     -SKEFSV*-

```

Figura 12: **Alinhamento das sequências da proteína N (nucleocapsídeo) de diversos tospovírus.** Os prováveis braços N-terminais estão sombreados em marrom, os braços C-terminais estão sombreados em verde e os resíduos de aminoácidos candidatos à interação com o RNA estão sombreados de amarelo. Os resíduos de Fenilalanina conservados estão sombreados em azul e o resíduo de prolina está sombreado em roxo. O alinhamento foi feito através do programa ClustalO com as sequências descritas na Tabela 1.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, interações homotípicas e heterotípicas para as proteínas N e NSm de GRSV foram visualizadas pela primeira vez em células de *Nicotiana benthamiana* através da técnica de BiFC e a estrutura tridimensional da proteína N de um tospovírus foi predita, possibilitando futuros estudos de interações proteína-proteína direcionados para elucidar a infecção do tospovírus pela planta hospedeira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adkins, S. (2000). Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Molecular plant pathology* 1, 151-157.
- Agrios, G.N. (2004) *Plant Pathology*. 5.ed.Elsevier academic Press. 922p
- Aramburu, J. & Marti, M. (2003). The occurrence in north-east Spain of a variant of tomato spotted wilt virus (TSWV) that breaks resistance in tomato containing the SW-5 gene. *Plant Pathology*. 52:407.
- Ariza, A., Tanner SJ, Walter CT, Dent KC, Shepherd DA, Wu W, Matthews SV, Hiscox JA, Green TJ, Luo M, Elliott RM, Fooks AR, Ashcroft AE, Stonehouse NJ, Ranson NA, Barr JN, Edwards TA. (2013). Nucleocapsid protein structures from orthobunyaviruses reveal insight into ribonucleoprotein architecture and RNA polymerization. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jun;41(11):5912-26.
- Bell, K., and Oparka, K. (2011). Imaging plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 9-25.
- Belliure, B., Janssen, A., Maris, P.C., Peters, D., and Sabelis, M.W. (2005). Herbivore arthropods benefit from vectoring plant viruses. *Ecology Letters* 8, 70-79.
- Belliure, B., Janssen, A., and Sabelis, M.W. (2008). Herbivore benefits from vectoring plant virus through reduction of period of vulnerability to predation. *Oecologia* 156, 797-806.
- Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C., and Maule, A.J. (2010). Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 23, 1403-1412.
- Bente, D.A., Forrester, N.L., Watts, D.M., McAuley, A.J., Whitehouse, C.A., and Bray, M. (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral research* 100, 159-189.
- Bowden, T.A., Bitto, D., McLees, A., Yeromonahos, C., Elliott, R.M., and Huiskonen, J.T. (2013). Orthobunyavirus ultrastructure and the curious tripodal glycoprotein spike. *PLoS pathogens* 9, e1003374.
- Boiteux, L.S. & Giordano, L.B. (1993). Genetics basis of resistance against two tospovirus species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica*. 71:151-154.
- Brittlebank, C.C. (1919) *Tomato diseases*. J. Agric. Victoria, 17, 231–235.
- Brizard, J.P., Carapito, C., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., and Brugidou, C. (2006). Proteome analysis of plant-virus interactome: comprehensive data for virus multiplication inside their hosts. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 2279-2297.
- Broer, B.M., Gurrath, M., and Holtje, H.D. (2003). Molecular modelling studies on the ORL1-receptor and ORL1-agonists. *Journal of computer-aided molecular design* 17, 739-754.
- Burgyan, J., and Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in plant science* 16, 265-272.

- Chen, X.H., Xiang, H.Y., Wang, Z., Zhang, Y.J., Han, C.G., Li, D.W., Yu, J.L., and Cheng, Y.Q. (2011). Studies on interaction of cucurbit aphid-borne yellow virus proteins using yeast two-hybrid system and bimolecular fluorescence complementation. *Acta virologica* 55, 235-241.
- Cheng, Y.H. et al. (2014). Identification, characterization and detection of a new tospovirus on sweet pepper. *Annals of Applied Biology*. V 164,(1):107–115.
- Cho, J.J et al. (1996). Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to tomato spotted wilt virus in vegetables. *Acta horticulturae*. 431: 367-378.
- Citovsky, V., Gafni, Y., and Tzfira, T. (2008). Localizing protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in planta. *Methods (San Diego, Calif)* 45, 196-206.
- Ciuffo, M., G. C. Mautino, L. Bosco, M. Turina, and L. Tavella. (2010). Identification of *Dictyothrips betae* as the vector of *Polygonum ring spot virus*. *Annals of Applied Biology* 157: 299–307.
- Costa, A.S. (1941) Uma moléstia de vírus de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). A mancha anular. *O Biológico*, v.7, p.249-251.
- Deane CM, Kaas Q, Blundell TL. (2001). SCORE: predicting the core of protein models. *Bioinformatics*. 17(6):541-50.
- de Borbón, C. M., O. Gracia, and L. De Santis. (1999). Survey of Thysanoptera occurring on vegetable crops as potential *Tospovirus* vectors in Mendoza, Argentina. *Revista de Sociedad Entomológica Argentina* 58: 59–66.
- de Oliveira AS, Melo FL, Inoue-Nagata AK, Nagata T, Kitajima EW, Resende RO. (2012). Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus *Tospovirus*. *PLoS One*. 2012;7(6)
- de Ronde, D., Butterbach, P., Lohuis, D., Hedil, M., van Lent, J.W., and Kormelink, R. (2013). Tsw gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the Tomato spotted wilt virus. *Molecular plant pathology* 14, 405-415.
- de Ronde D, Pasquier A, Ying S, Butterbach P, Lohuis D, Kormelink R. (2014). Analysis of Tomato spotted wilt virus NSs protein indicates the importance of the N-terminal domain for avirulence and RNA silencing suppression. *Mol Plant Pathol*. 15(2):185-95.
- Dietzgen, R.G., Martin, K.M., Anderson, G., and Goodin, M.M. (2012). In planta localization and interactions of impatiens necrotic spot tospovirus proteins. *The Journal of general virology* 93, 2490-2495.
- Dong H, Li P, Böttcher B, Elliott RM, Dong C. (2013). Crystal structure of Schmallenberg orthobunyavirus nucleoprotein-RNA complex reveals a novel RNA sequestration mechanism. *RNA*. 2013 Aug;19(8):1129-36.

Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (2005) *Virus taxonomy: eight report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic, New York, p 116.

Feng Zhike, Xiaojiao Chen, Yiqun Bao, Jiahong Dong, Zhongkai Zhang and Xiaorong Tao. (2013). Nucleocapsid of Tomato spotted wilt tospovirus forms mobile particles that traffic on an actin/endoplasmic reticulum network driven by myosin XI-K. *New Phytologist*.

Flor H.H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopath* 32: 653-669

Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. D. & Brown, F. (1991). Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology Supplementum* 2, 1-450.

Frédéric Picard-Jean, Maude Tremblay-Létourneau, Elizabeth Serra, Christina Dimech, Helene Schulz, Mathilde Anselin, Vincent Dutilly e Martin Bisailon. (2013) RNA 5'-end Maturation: A Crucial Step in the Replication of Viral Genomes. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* : "Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications", livro editado por Victor Romanowski, ISBN 978-953-51-1207-5.

Gauliard, N., Billecocq, A., Flick, R., and Bouloy, M. (2006). Rift Valley fever virus noncoding regions of L, M and S segments regulate RNA synthesis. *Virology* 351, 170-179.

Geerts-Dimitriadou, C., Lu, Y.Y., Geertsema, C., Goldbach, R., and Kormelink, R. (2012). Analysis of the Tomato spotted wilt virus ambisense S RNA-encoded hairpin structure in translation. *PloS one* 7, e31013.

Goldbach, R. and Peters, D. (1994) Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Semin. Virol* 5, 113–120.

Goodin, M.M., Dietzgen, R.G., Schichnes, D., Ruzin, S., and Jackson, A.O. (2002). pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 31, 375-383.

Guo, Y., Wang, W., Ji, W., Deng, M., Sun, Y., Zhou, H., Yang, C., Deng, F., Wang, H., Hu, Z., *et al.* (2012). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 5046-5051.

Guu, T.S., Zheng, W., and Tao, Y.J. (2012). Bunyavirus: structure and replication. *Advances in experimental medicine and biology* 726, 245-266.

Hassani-Mehraban, A., Botermans, M., Verhoeven, J.T., Meekes, E., Saaijer, J., Peters, D., Goldbach, R., and Kormelink, R. (2010). A distinct tospovirus causing necrotic streak on *Alstroemeria* sp. in Colombia. *Archives of virology* 155, 423-428.

Holtje, H.D.; Sippl, W.; Rognan, D.; Folkers, G. (2003). Introduction to comparative protein modeling. In *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH.

- Huang, Y.W., Hu, C.C., Liou, M.R., Chang, B.Y., Tsai, C.H., Meng, M., Lin, N.S., and Hsu, Y.H. (2012). Hsp90 interacts specifically with viral RNA and differentially regulates replication initiation of Bamboo mosaic virus and associated satellite RNA. *PLoS pathogens* 8, e1002726.
- Jonsson, C.B., Figueiredo, L.T., and Vapalahti, O. (2010). A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical microbiology reviews* 23, 412-441.
- Kainz, M., Hilson, P., Sweeney, L., Derose, E., and German, T.L. (2004). Interaction Between Tomato spotted wilt virus N Protein Monomers Involves Nonelectrostatic Forces Governed by Multiple Distinct Regions in the Primary Structure. *Phytopathology* 94, 759-765.
- Kalveram B, Ikegami T. (2013). Toscana virus NSs protein promotes degradation of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol. Apr; 87(7): 3710-8.*
- Kormelink, R. et al.(1994) Expression and subcellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology.* 200:56-65.
- Kormelink, R., Garcia, M.L., Goodin, M., Sasaya, T., and Haenni, A.L. (2011). Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus research* 162, 184-202.
- Latham, L.J. & Jones, R.A.C. (1997). Occurrence of tomato spotted wilt virus in native flora, weeds and horticultural crops. *Australian journal of Agricultural research.* 48:359-369.
- Lewandowski, D.J., and Adkins, S. (2005). The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virology* 342, 26-37.
- Li, W., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E., and Adkins, S. (2009). Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390, 110-121.
- Lihoradova, O.A., Indran, S.V., Kalveram, B., Lokugamage, N., Head, J.A., Gong, B., Tigabu, B., Juelich, T.L., Freiberg, A.N., and Ikegami, T. (2013). Characterization of Rift Valley fever virus MP-12 strain encoding NSs of Punta Toro virus or sandfly fever Sicilian virus. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2181.
- Liu, Yating, Xiuping Lu, Long Zhi, Yuanxian Zheng, Xuejiao Chen, YueXu, Fajing Wu e Li. (2012). Calla lily chlorotic spot virus from Spider Lily (*Hymenocallis littoralis*) and Tobacco (*Nicotiana tabacum*) in the South-west of China. *Journal of Phytopathology.*
- Lokesh, B., Rashmi, P.R., Amruta, B.S., Srisathiyarayanan, D., Murthy, M.R., and Savithri, H.S. (2010). NSs encoded by groundnut bud necrosis virus is a bifunctional enzyme. *PloS one* 5, e9757.
- Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F., and Rubio, L. (2011). Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *The Journal of general virology* 92, 210-215.
- Ma, Y., Wang, J., Yuan, B., Wang, M., Zhang, Y., Xu, Z., Zhang, C., Zhang, Y., Liu, B., Yi, J., et al. (2013). HLA-A2 and B35 restricted hantaan virus nucleoprotein CD8+ T-cell

epitope-specific immune response correlates with milder disease in hemorrhagic fever with renal syndrome. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2076.

Martin, K., Kopperud, K., Chakrabarty, R., Banerjee, R., Brooks, R., and Goodin, M.M. (2009). Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 59, 150-162.

Morse, J.G., and Hoddle, M.S. (2006). Invasion biology of thrips. *Annual review of entomology* 51, 67-89.

Nachappa, P., Margolies, D.C., Nechols, J.R., Whitfield, A.E., and Rotenberg, D. (2013). Tomato spotted wilt virus benefits a non-vector arthropod, *Tetranychus urticae*, by modulating different plant responses in tomato. *PloS one* 8, e75909.

Nagata T, Inoue-Nagata AK, van Lent J, Goldbach R, Peters D. (2002). Factors determining vector competence and specificity for transmission of Tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol.* 2002 Mar;83(Pt 3):663-71.

Nayeem, A., Sitkoff, D., and Krystek, S., Jr. (2006). A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein science : a publication of the Protein Society* 15, 808-824.

Niu F, Shaw N, Wang YE, Jiao L, Ding W, Li X, Zhu P, Upur H, Ouyang S, Cheng G, Liu ZJ. (2013). Structure of the Leanyer orthobunyavirus nucleoprotein-RNA complex reveals unique architecture for RNA encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(22):9054-9.

Ohnishi, J., H. Katsuzaki, S. Tsuda, T. Sakurai, K. Akutsu, and T. Murai. (2006). *Frankliniella cephalica*, a new vector for Tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 90: 685.

Paape, M., Solovyev, A.G., Erokhina, T.N., Minina, E.A., Schepetilnikov, M.V., Lesemann, D.E., Schiemann, J., Morozov, S.Y., and Kellmann, J.W. (2006). At-4/1, an interactor of the Tomato spotted wilt virus movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19, 874-883.

Pappu, H.R., Jones, R.A., and Jain, R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus research* 141, 219-236.

Premachandra, W. T., C. Borgemeister, E. Maiss, D. Knierim, and H. M. Poehling. (2005). *Ceratophrisoides claratris*, a new vector of a *Capsicum chlorosis virus* isolate infecting tomato in Thailand. *Phytopathology* 95: 659–663.

Raymond, D.D., Piper, M.E., Gerrard, S.R., Skiniotis, G., and Smith, J.L. (2012). Phleboviruses encapsidate their genomes by sequestering RNA bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 19208-19213.

Reguera J, Malet H, Weber F, Cusack S. (2013). Structural basis for encapsidation of genomic RNA by La Crosse Orthobunyavirus nucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(18):7246-51.

- Reguera J, Cusack S, Kolakofsky D. (2014). Segmented negative strand RNA virus nucleoprotein structure. *Curr Opin Virol*.
- Ribeiro, D., Borst, J.W., Goldbach, R., and Kormelink, R. (2009). Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. *Virology* 383, 121-130.
- Richmond, K.E., Chenault, K., Sherwood, J.L., and German, T.L. (1998). Characterization of the nucleic acid binding properties of tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein. *Virology* 248, 6-11.
- Riley, D. G., Shimat V. Joseph, Rajagopalbabu Srinivasan, & Stanley Diffie. (2011) Thrips Vectors of Tospoviruses. *J. Integ. Pest Mngmt.* 1(2).
- Ritzenthaler, C. (2011). Parallels and distinctions in the direct cell-to-cell spread of the plant and animal viruses. *Current opinion in virology* 1, 403-409.
- Roggero, P. et al. (2002). Field isolates of tomato spotted wilt virus overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant disease.* 86: 950-954.
- Roth BM, Pruss GJ, Vance VB (2004) Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* 102: 97–108.
- Sambrook, J. et al. (2000). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuel, G.; Bald, J.G.; Pittman, H.A. (1930). Investigations on "spotted wilt" of tomatoes, Australia. *Commonw. Counc. Sci. Ind.res.Bull.* 44:8-11.
- Schnettler, E., Hemmes, H., Huismann, R., Goldbach, R., Prins, M., and Kormelink, R. (2010). Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *Journal of virology* 84, 11542-11554.
- Scholthof, K.B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., *et al.* (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 12, 938-954.
- Seepiban C, Gajanandana O, Attathom T, Attathom S. (2011). Tomato necrotic ringspot virus, a new tospovirus isolated in Thailand. *Arch Virol.* 156(2):263-74.
- Shi, X., Kohl, A., Leonard, V.H., Li, P., McLees, A., and Elliott, R.M. (2006). Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *Journal of virology* 80, 8089-8099.
- Shimomoto, Y., Kobayashi, K., Okuda, M. (2014) Identification and characterization of Lisianthus necrotic ringspot virus, a novel distinct tospovirus species causing necrotic disease of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Journal of General Plant Pathology.* 1345-2630.
- Shen HB, Chou KC. (2010). Virus-mPLOC: a fusion classifier for viral protein subcellular location prediction by incorporating multiple sites. *J Biomol Struct Dyn.* (2):175-86.

Silva, M.S.; Martins, C.R.F.; Bezerra, I.C.; Nagata, T.; De àvila, A.C.; Resende, R.O. (2001). Sequence diversity of NSm movement protein of Tospoviruses. *Archives of Virology*. 146:1267-1281.

Snippe, M., Smeenk, L., Goldbach, R., and Kormelink, R. (2007a). The cytoplasmic domain of tomato spotted wilt virus Gn glycoprotein is required for Golgi localisation and interaction with Gc. *Virology* 363, 272-279.

Snippe, M., Willem Borst, J., Goldbach, R., and Kormelink, R. (2007b). Tomato spotted wilt virus Gc and N proteins interact in vivo. *Virology* 357, 115-123.

Soellick, T., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.W., and Schreier, P.H. (2000). The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2373-2378.

Stafford, C.A., Walker, G.P., and Ullman, D.E. (2011). Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 9350-9355.

Stevens, M.R et al. (1992). Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*. 59: 9-17.

Storms, M.M.H et al. (1995). The nonstructural NSm protein of Tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insects cells. *virology*. 214: 485-493.

Storms, M.M.H et al. (1998). A comparison of two methods of microinjection for assessing altered plasmodesmal gating in tissues expressing viral movement proteins. *Plant J*. 13: 131-140.

Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., and Okuno, T. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS letters* 532, 75-79.

Torres R, Larenas J, Fribourg C, Romero J. *Arch Virol*.(2012) Pepper necrotic spot virus, a new tospovirus infecting solanaceous crops in Peru. 157(4):609-15.

Uhrig, J.F., Soellick, T.R., Minke, C.J., Philipp, C., Kellmann, J.W., and Schreier, P.H. (1999). Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: identification and characterization of two interacting domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 55-60.

van Knippenberg I, Carlton-Smith C, Elliott RM. (2010). The N-terminus of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein is essential for interferon antagonism. *J Gen Virol* 2002-6.

Walter, C.T., and Barr, J.N. (2011). Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *The Journal of general virology* 92, 2467-2484.

Whitfield, A.E. et al. (2005). Tospovirus-Thrips interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 459-489.

Wijkamp, I. et al. (1993). Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology*. 74: 341-349.

Williams, M.G., Shirai, H., Shi, J., Nagendra, H.G., Mueller, J., Mizuguchi, K., Miguel, R.N., Lovell, S.C., Innis, C.A., Deane, C.M., *et al.* (2001). Sequence-structure homology recognition by iterative alignment refinement and comparative modeling. *Proteins Suppl* 5, 92-97.

Wilson, C.R. (2001). Resistance to infection and translocation of Tomato spotted wilt virus in potatoes. *Plant Pathology*. 50:402-410.

Zhai, Y., Bag, S., Mitter, N., Turina, M., and Pappu, H.R. (2013). Mutational analysis of two highly conserved motifs in the silencing suppressor encoded by tomato spotted wilt virus (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Archives of virology*.

Zhou J, Kantartzi SK, Wen RH, Newman M, Hajimorad MR, Rupe JC, Tzanetakis IE. (2011). Molecular characterization of a new *Tospovirus* infecting soybean. *Virus Genes*. Oct;43(2):289-95

Zhou J, Tzanetakis IE. (2013). Epidemiology of soybean vein necrosis-associated virus. *Phytopathology*.103(9):966-71.

Zilian E, Maiss E. (2011). An optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system for the detection of protein-protein interactions in planta. *J Virol Methods*. 174(1-2):158-65.

ABREVIACOES E SMBOLOS

°C	graus <i>Celsius</i>
x g	velocidade de sedimentação gravitacional
Amp (R)	gene de resistência a ampicilina
att	do inglês, <i>attachement sites</i>
BiFC	Fluorescência Bimolecular Complementar
cDNA	DNA sintetizado a partir de um molde de RNA
DNA	desoxirribonucleato
d.p.i.	dias pós infiltração
g	grama
Km(R)	gene de resistência  canamicina
kb	quilo-pares de bases
LB	meio de cultura Luria-Bertani
µg	microgramas
µg/ml	microgramas por mililitro
min	minutos
M	molar
µl	microlitros
ml	mililitros
µm	micrmetros
µM	micromolar
mM	milimolar
M-MLV	do inglês , <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MSC	do inglês, <i>multiple cloning site</i>
ng	nanogramas
ORF	do inglês, <i>open reading frame</i>
pb	pares de base
pH	concentração de ion hidroxônio livre
RNA	ribonucleato
RNP	ribonucleocapsídeo
s	segundos
ssDNA	desoxirribonucleato de fita simples
ssRNA	ribonucleato de fita simples
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UTR	região não traduzida
vRNA	fita de RNA viral
vcRNA	fita de RNA complementar  fita viral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética de <i>Bunyaviridae</i> baseada na sequência de aminoácidos da proteína N da espécie tipo de cada gênero.	7.
Figura 2: Sintomas causados pela infecção por <i>Tospovirus</i>	8.
Figura 3: Relação filogenética e distribuição global dos Tospovírus.....	10.
Figura 4: Partícula e Genoma de Tospovírus. A: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas pleomórficas de Tospovírus.	13.
Figura 5: Estratégias ambisenso e de senso negativo para a expressão de proteínas de Tospovírus.....	14.
Figura 6: Esquema representativo da infecção por Tospovírus em plantas resistentes e suscetíveis.	17.
Figura 7: Estratégia de clonagem das proteínas N e NSm de GRSV nos vetores pSITE-C1.....	25.
Figura 8: Micrografias de Fluorescência Confocal de células epidérmicas de <i>Nicotiana benthamiana</i> para controles negativos de interação por BiFC.	27.
Figura 9: Micrografias de Fluorescência Confocal de sobreposição de células epidérmicas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	28.
Figura 10: Alinhamento representativo das sequências da N de LACV e de GRSV.	29.
Figura 11: Estrutura tridimensional da proteína N de GRSV.....	30.
Figura 12: Alinhamento das sequências da proteína N de diversos tospovírus.	34.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies aceitas e espécies tentativas para o Gênero <i>Tospovirus</i>	9.
Tabela 2: Espécies de Tripes e <i>Tospovirus</i> associados.	12.
Tabela 3: Relação das espécies da família <i>Bunyaviridae</i> que já possuem a estrutura tridimensional da proteína N elucidadas.	18.
Tabela 4: Pares de <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos genes N e NSm de GRSV.....	22.
Tabela 5: Programa utilizado para amplificação dos genes N e NSm de GRSV.	22.
Tabela 6: Vetores para BiFC.	23.
Tabela 7: Localização subcelular predita <i>in silico</i> das proteínas de GRSV.	26.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Dr. Renato de Oliveira Resende pela oportunidade, pela confiança e por todo o apoio e motivação durante todo o trabalho.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais Lazaro Lindolfo Lima e Nara Lucia Nunes Lima, que acreditam nos meus sonhos e me ajudam a realizá-los com muito esforço e dedicação. Também agradeço aos meus irmãos, Jussara, Renata, Rafael e Roane; meus avós, Sinval, Diva, Ana e Gabriel; e a todos os meus tios e meus primos pelo apoio e carinho, em especial Edna Nunes e Gabriella Nunes.

Agradeço ao Victor Ceresa, pelo estímulo, pelo apoio, pela paciência e todo o esforço em me divertir nos momentos mais difíceis e cansativos dessa jornada.

Agradeço aos meus amigos “brasilienses” e “coromandelenses” por todo o apoio e paciência nesse período de “abandono” e “sumiço”. Não vou citar todos, vocês sabem que são importantes!

Agradeço aos companheiros de laboratório dos grupos orientados pelo Professor Dr. Bergman Ribeiro, Professor Dr. Tatsuya Nagata e Professor Dr. Fernando Melo.

Agradeço à família adquirida “Renatetes”. Passamos tanto tempo juntas que rimos, brigamos, fofocamos, estudamos e isso é muito divertido. Em especial, às minhas filhocas Anna Fernanda, Daniela e Maria Carolina e aos meus amigos Athos, Mikhail, Raphael, Mariana e Raul.

Em especial agradeço ao Miguel Andrade pela paciência e disponibilidade em me ajudar a elaborar as figuras da introdução e ao Professor Dr. João Alexandre Barbosa e seu aluno Muhammad Faheem pelo empenho e disponibilidade para a construção do modelo tridimensional da proteína N de *Groundnut ringspot virus*.

Agradeço ao Sr. Fábio pela disposição em cuidar das plantas que são tão importantes para o nosso trabalho e ao Sr. Figueiredo, que sempre esteve de prontidão para nos auxiliar na compra dos reagentes e na manutenção de nossos equipamentos.

Agradeço ao CNPq, CAPES e FAP-DF pelo suporte financeiro e à Universidade de Brasília pela infraestrutura para a realização dos experimentos.