



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

Estabelecimento de um sistema de genética reversa para *Pepper mild mottle virus* e uso da capa proteica como apresentador de epítomos

Bruna Rayane Teodoro Junqueira

Brasília, 2014



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

Estabelecimento de um sistema de genética reversa para *Pepper mild mottle virus* e uso da capa proteica como apresentador de epítomos

Bruna Rayane Teodoro Junqueira

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

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

Brasília, 2014

Dissertação de autoria de Bruna Rayane Teodoro Junqueira, intitulada “Estabelecimento de um sistema de genética reversa para *Pepper mild mottle virus* e uso da capa proteica como apresentador de epítomos”, apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em 28 de fevereiro de 2014, aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata
Biologia Celular – UnB (Orientador)

Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini Júnior
Fitopatologia - UFV

Prof. Dr. Elíbio Leopoldo Rech Filho
EMBRAPA - Cenargen

Dra. Anelise Franco Orílio (Suplente)
Biologia Celular - UnB

Brasília
2014

Àqueles que acreditaram em mim.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter permitido que eu chegasse até aqui. Gostaria de manifestar minha gratidão aos meus familiares em especial meus pais Eudes e Marlúcia, pelo amor e carinho, e por sempre terem me incentivado, desde a minha primeira demonstração de curiosidade. Depois de alguns anos, mesmo não sabendo mais o conhecimento teórico para me auxiliar em uma tarefa de casa, nunca deixaram de me estimular, para que um dia eu aprendesse a ‘andar com as próprias pernas’. A Leila e Paulo pela paciência em me ouvir e pelas palavras sábias. Não poderia deixar de faltar os meus sinceros agradecimentos àquele que foi meu mestre e orientador, Tatsuya, pelos inúmeros esquemas e rabiscos em qualquer papel que estivesse ao alcance e por ter despertado minha sede de conhecimento pela virologia. Acima de tudo agradeço por ter me ensinado o que é a essência de um cientista e a amar a ciência. Sou muito grata à Alice pela paciência e dedicação me orientando para adquirir uma melhor habilidade em escrever cientificamente e por ter gentilmente cedido plantas e anticorpo. Cada colega de laboratório me auxiliou de alguma maneira, dos mais íntimos aos menos íntimos, sejam eles dos laboratórios de baculovirologia, virologia vegetal, enzimologia, microscopia eletrônica, etc. Ao meu noivo Gabriel peço desculpas pelas ausências e pelas conversas enfadonhas de biologia molecular, mas sou grata por você ter estado mais uma vez ao meu lado.

RESUMO

Pepper mild mottle virus (PMMoV) é um tobamovírus que possui genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva. O vírion é composto pelo genoma envolvido por múltiplas cópias da proteína do capsídeo (CP). A fim de construir clones infectivos de PMMoV para desenvolver vetor de expressão de proteína heteróloga, duas estratégias simplificadas foram avaliadas, a primeira baseada na produção *in vitro* de transcritos infectivos e a segunda com o uso de vetor binário para agroinoculação. Primeiramente, o cDNA de PMMoV foi clonado no vetor pCR4-TOPO e, posteriormente, subclonado em pUC19, sob o comando do promotor T7 para a realização da transcrição *in vitro*. Os transcritos foram inoculados em folhas de *Nicotiana benthamiana* e após três semanas mostraram sintomas de mosaico e distorção foliar, indicações diretas da recuperação do vírus com este procedimento. A recuperação de vírus e infecção foi confirmada por DIBA usando anticorpo policlonal anti-PMMoV e microscopia eletrônica de transmissão. A segunda estratégia consistiu na clonagem do genoma no vetor binário derivado de pTRV2-MCS contendo o plasmídeo pCAMBIA 0390 modificado, pela técnica de *overlap-extension PCR*. A clonagem foi confirmada a partir da análise do padrão de digestão por enzima de restrição e sequenciamento. *Agrobacterium tumefaciens* foi transformada com a construção pCAMBIA-PMMoV e folhas de *N. benthamiana* foram inoculadas para avaliar a recuperação do vírus. As plantas agroinoculadas apresentaram sintomas típicos de PMMoV em folhas inoculadas e folhas acima. A infecção foi confirmada por DIBA usando anticorpo policlonal anti-PMMoV. A possibilidade da adição de epítomos na capa proteica do vírus como ferramenta biotecnológica foi avaliada, inserindo genes de epítomo do vírus da dengue no clone agroinfectivo. Essa estratégia poderá fornecer uma ferramenta de apresentação de epítomos na superfície da CP em partículas montadas de PMMoV em grande escala. Um peptídeo de 24 aminoácidos contendo dois epítomos em *tandem* localizado nos domínios I/II da proteína E de DENV-1 foi inserido em duas posições distintas no gene *cp*: um entre os aminoácidos 59/60 e outro entre os aminoácidos 154/155. Após a inoculação, não apareceram sintomas de PMMoV e não foi possível detectar CP modificada em ambas as construções, apesar da confirmação dos clones por sequenciamento. Provavelmente a adição de 24 aminoácidos em *cp* interferiu no padrão de dobramento e na sua propriedade de automontagem. O tamanho do epítomo para *display* deverá ser avaliado no futuro.

Palavras-chave: tobamovirus, *Pepper mild mottle virus*, transcrição *in vitro*, vetor binário, capa proteica, apresentação de epítomos

ABSTRACT

Pepper mild mottle virus (PMMoV) is a tobamovirus and consists of a monopartite single-stranded RNA genome in a positive polarity. The virion forms nucleoproteins in rod-shaped rigid particles. Aiming to construct infectious PMMoV clones for expressing heterologous proteins, two distinct strategies were attempted. The first strategy was based on *in vitro* infectious transcripts and the second on binary vector for agro-infiltration. The cDNA of PMMoV was cloned into pCR4-TOPO and subcloned into pUC19 under the T7 promoter for *in vitro* transcription. Transcripts were inoculated in *Nicotiana benthamiana* leaves. After three weeks plants showed typical PMMoV symptoms, such as mosaic and distortion. The virus recovery, hence infection, was confirmed by DIBA using polyclonal antibody raised against PMMoV and electron microscopy. The PMMoV complete genome and the binary plasmid, derived from pTRV2-MCS (modified pCAMBIA 0390) were fused by overlap-extension PCR. Selected clones were confirmed by restriction digestion profile and DNA sequencing. *N. benthamiana* plants were agroinoculated with *A. tumefaciens* harvesting pCAMBIA-PMMoV clones. Plants showed symptoms similar to those from wild type virus both in inoculated and upper leaves. Infection was confirmed by DIBA. The use of coat protein as epitope display platform tool was evaluated by inserting an epitope from Dengue virus 1 in the agroinfectious clone pCAMBIA-PMMoV. This strategy can be applied for epitope display on the CP surface in PMMoV particles in large scale. A peptide of 25 amino acids containing two epitopes *in tandem* (domains I/II E protein from DENV-1) was inserted in two different positions in the *cp* gene; between amino acids 59/60 and 154/155. After agroinoculation it was not possible to detect CP carrying the epitope in both constructions, however DNA sequencing confirmed the epitope presence. Probably the 25-amino acid insertion in the *cp* gene led to incorrect CP folding and to unfavorable self-assembly. The epitope length will be evaluated for future display studies.

Key-words: tobamovirus, *Pepper mild mottle virus*, *in vitro* transcription, binary vector, coat protein, epitope display.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das dimensões do vírion de um tobamovírus.	18
Figura 2. Representação da organização genômica de PMMoV.	19
Figura 3. Progressão temporal do ciclo de replicação de um tobamovírus.	22
Figura 4. Representação esquemática do ciclo de infecção natural de <i>A. tumefaciens</i> .	24
Figura 5. Representação esquemática da proteína E de DENV.	30
Figura 6. Esquema do desenho dos iniciadores para clonagem do cDNA genômico de PMMoV em vetor pCR4TOPO.	33
Figura 7. Representação dos plasmídeos construídos contendo cDNA genômico de PMMoV.	36
Figura 8. Representação dos vetores binários utilizados neste trabalho.	38
Figura 9. Esquema da posição dos iniciadores para <i>overlap-extension PCR</i> .	40
Figura 10. Representação esquemática do fluxo de clonagens para construir clone infectivo apresentando epítipo pela capa proteica.	44
Figura 11. Sequência primária de aminoácidos.	45
Figura 12. Amplificação do cDNA de PMMoV por PCR.	47
Figura 13. Perfil de restrição do clone pCR4-PMMoV com EcoRI.	48
Figura 14. Perfil de restrição dos clones pUC19-PMMoV com enzima de restrição EcoRI.	49
Figura 15. Análise sorológica e de microscopia eletrônica de extrato de folha de <i>N. benthamiana</i> inoculada com transcrito de PMMoV.	50
Figura 16. Amplificação do cDNA de PMMoV e pCAMBIA-p35S-ribo e <i>overlap-extension PCR</i> desses fragmentos.	51
Figura 17. Confirmação do perfil por digestão com enzimas de restrição de clones pCAMBIA-PMMoV.	52
Figura 18. Amplificação de CP por PCR de colônias de <i>A. tumefaciens</i> contendo clones pCAMBIA-PMMoV.	53
Figura 19. Sintomas induzidos pela agroinoculação de pCAMBIA-PMMoV em folhas de <i>N. benthamiana</i> .	54
Figura 20. DIBA de extrato de plantas agroinoculadas com pCAMBIA-PMMoV.	55
Figura 21. Construção do plasmídeo intermediário pGEM-3411/6471PMMoV.	56
Figura 22. Inserção do epítipo no plasmídeo pGEM-3411/6471PMMoV por PCR de	57

colônias.

Figura 23. Perfil de pCAMBIA-PMMoV tratada por enzimas de restrição cuja sequência de CP teve epítipo DENV-1 adicionado. 58

Figura 24. PCR de colônias de *A. tumefaciens* para confirmação da transformação com pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e -154/155. 59

Figura 25. DIBA realizado com extrato de plantas agroinoculadas com pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e -154/155. 60

Figura 26. SDS-PAGE e *Western blotting* dos extratos de folhas de *N. benthamiana* agroinoculadas com pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e -154/155.. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho.	34
Tabela 2. Parâmetros utilizados na amplificação de PMMoV e pCAMBIA 0390-p35S-ribo.	39
Tabela 3. Parâmetros utilizados para a realização de <i>overlap-extension PCR</i> de PMMoV com pCAMBIA 0390-p35S-ribo.	41
Tabela 4. Parâmetros utilizados na PCR de colônias de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 transformadas por eletroporação com o plasmídeo pCAMBIA-PMMoV.	42
Tabela 5. Epítomos apresentados por CP de tobamovírus <i>in planta</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>g</i>	Velocidade de sedimentação gravitacional
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
cDNA	DNA sintetizado a partir de um RNA
CP	Proteína do capsídeo
DIBA	<i>Dot Immunobinding Assay</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
For	<i>Primer forward</i>
g	Gramas
gRNA	RNA genômico
h	Horas
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilo Dalton
Kpb	kilo pares de base
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
μ g	Microgramas
min	Minutos
M	Molar
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Miniprep	Mini preparação (extração de DNA plasmidial)
μ L	Microlitro
mL	Militros
MP	Proteína de movimento
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium chloride</i>
ng	Nanogramas
ORF	Leitura de fase aberta
PAGE	Gel de eletroforese de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase

pb	Pares de base
pH	Concentração de íon hidrogênio livre
Rev	<i>Primer reverse</i>
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa – Reação em cadeia da polimerase
Ti	Indutor de tumor
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sgRNA	RNA subgenômico
SOC	Caldo de Hanahan com adição de 20% de glicose
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UTR	Região não traduzida
X-Gal	5-bromo-4-cloro-indol- β -D-galctopiranosídeo

ÍNDICE

Agradecimentos	5
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
ÍNDICE.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Pepper mild mottle virus</i>	15
1.2 Genética reversa: inoculação de transcrito <i>in vitro</i> e agroinoculação	22
1.3 Utilização de CP como apresentador de epítomos	26
1.4 Epítipo de <i>Dengue virus 1</i>	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Isolado de PMMoV utilizado para o estudo e preparação de plantas infectadas.....	32
4.2 RT-PCR e clonagem de cDNA genômico de PMMoV em vetor pCR4-TOPO.....	32
4.3 Subclonagem de cDNA genômico de PMMoV em pUC19.....	35
4.4 Transcrição <i>in vitro</i> , inoculação e detecção de PMMoV por MET e DIBA	36
4.5 <i>Overlap-extension PCR</i> de PMMoV com vetor binário.....	37
4.6 Ensaio de agroinoculação de pCAMBIA-PMMoV	41
4.7 Ensaio de inoculação em plantas indicadoras.....	42
4.8 Uso de PMMoV para apresentação de epítipo da Dengue.....	43
5.....	47
RESULTADOS	47
5.1 RT-PCR de PMMoV e clonagem em pCR4-TOPO e pUC19 para transcrição <i>in vitro</i>	47
5.2 Construção do clone agroinfectivo pCAMBIA-PMMoV	50
5.3 Inoculação de PMMoV recuperados em diferentes plantas indicadoras.....	55
5.4 Inserção do gene do epítipo de vírus da Dengue no gene <i>cp</i> de PMMoV.....	56
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	66
PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	82
Permissão do uso de figuras.....	82
Artigo publicado.....	85

1. INTRODUÇÃO

Vírus de plantas vem sendo amplamente empregados como alternativa para expressão transiente de proteínas, em especial, os vírus de RNA de fita simples senso positivo, devido às informações disponíveis e polaridade viral. A partir do genoma viral, por transcrição reversa, o cDNA é obtido e manipulado para atingir o objetivo que pode ser de expressão de proteínas a vetores de indução de silenciamento gênico. Nele são inseridas sequências auxiliares de replicação e expressão.

Existem duas metodologias para construção de clones infectivos, em que a sequência viral está sob o comando de promotores de reconhecimento por RNA polimerase de bacteriófagos ou de plantas. Na transcrição *in vitro* emprega-se o promotor da RNA polimerase de bacteriófago. Essa é uma técnica clássica de obtenção de transcritos, rápida, porém onerosa. No caso dos promotores de reconhecimento pela RNA polimerase de planta, uma das principais metodologias é a construção de clones agroinfectivos, que em geral requerem mais passos de clonagem devido ao tamanho e instabilidade da sequência, embora a produção em larga escala seja mais fácil, já que a manipulação de bactérias requer menos cuidados comparada a de transcritos.

Para a validação de um clone viral infectivo em planta, o primeiro passo é a construção de clone com modificações mais simples para a transcrição *in vitro*, enquanto são realizadas as modificações mais complexas para desenvolver um clone agroinfectivo.

O clone agroinfectivo obtido, devido à facilidade de manipulação e produção em escala pode ser utilizado para expressão heteróloga de proteínas. Neste estudo, após a otimização dos procedimentos para a construção e obtenção de clones infectivos do vírus *Pepper mild mottle virus*, foi feita uma tentativa para a expressão de parte da proteína estrutural da dengue utilizando vetor binário. A seguir é apresentada uma revisão bibliográfica sobre o assunto.

1.1 *Pepper mild mottle virus*

Tobamovirus é um gênero de vírus não envelopado que infectam plantas e pertence à família *Virgaviridae* (Adams *et al.*, 2009), cuja espécie tipo é *Tobacco mosaic virus* (TMV). Adkins (2002) e Lartey e colaboradores (1996) afirmaram que as espécies que compõem o gênero *Tobamovirus* podem ser mais bem classificadas quando a gama de hospedeiros é

considerada. Existem três subgrupos bem aceitos, solanáceas (I), cucurbitáceas ou legumes (II) e brássicas (III). Recentemente dois novos subgrupos foram propostos, malváceas (IV) e cactáceas (V) (Rhee *et al.*, 2014). O gênero *Tobamovirus* possui trinta e três espécies relatadas até o momento (ICTV, <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Ictv/fs_tobam.htm>, 7/1/2014) dentre elas *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), que pertence ao subgrupo I.

Devido a sua capacidade de infectar diferentes plantas comestíveis (*Capsicum* sp.) e pela sua alta estabilidade, ao ser ingerido por animais PMMoV permanece infectivo, mesmo após passar pelo trato gastrointestinal. Esse vírus foi detectado por microscopia eletrônica em amostras fecais humanas (Colson *et al.*, 2010), predominando nas sequências obtidas pela técnica de análise metagenômica de viroma de fezes, sendo mais abundante que os vírus causadores de gastroenterites em humanos (Zhang *et al.*, 2006).

Essa característica o levou a ser proposto como indicador de qualidade da água ambiental por ter origem alimentar e não ser um patógeno humano confirmado (Rosario *et al.*, 2009). O formato, composição e quantidade de vírion por planta infectada, somado à alta estabilidade da partícula, levaram os tobamovírus a serem utilizados como matéria prima em nanobiotecnologia, sendo promissores componentes em escala nanométrica (Kobayashi *et al.*, 2010).

Os sintomas causados em plantas pela infecção por tobamovírus podem variar de acordo com a estirpe e com a presença de genes de resistência na planta hospedeira, entre eles necrose, distorção foliar, mosaico nas folhas, caule e fruto; porém em plantas de pimentão PMMoV causa sintomas leves (UC IPM, <<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r604100711.htmL#SYMPTOMS>> 6/1/2014; Oliveira *et al.*, 2010).

Em plantas do gênero *Capsicum* foi encontrada uma família gênica *l* que confere resistência contra tobamovírus. Os genes *l* pertencem à grande família gênica *r*. Essa família gênica é responsável pela expressão de genes de resistência a doenças em plantas (Tomita *et al.*, 2008). Genes relacionados à família *r* possuem domínios semelhantes, sendo eles os domínios: rico em leucina (*Leucine-rich repeat*; LRR) e de ligação a nucleotídeos (*Nucleotide-binding*; NB). Os genes *l* existem na forma de quatro alelos, L¹, L², L³ e L⁴ (Boukema, 1980). Esses genes são traduzidos em proteínas L cujas identidades de aminoácidos variam entre 97,5 % - 98,9 % e possuem 1328 aminoácidos (Tomita *et al.*, 2011). O mecanismo de ação dessas proteínas não é completamente elucidado, mas sabe-se que elas restringem a infecção viral à lesão local, que é caracterizada por resposta de hipersensibilidade (Mizumoto *et al.*, 2012).

Em contrapartida, os tobamovírus são classificados em cinco patótipos, que são população de patógenos que possuem características patogênicas em comum (Glossário Embrapa Arroz e Feijão, <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrigadoNoroesteMG/glossario.htm>>, 6/3/2014), de acordo com o padrão de infecção e resistência manifestada pelo hospedeiro via genes *l*, sendo eles P₀, P₁, P₁₂, P₁₂₃ e P₁₂₃₄. P₀ são os vírus incapazes de infectar sistemicamente uma planta que carrega os genes *l*, dentre eles *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV). *Paprika mild mottle virus* (PaMMV), que pertencente ao patótipo P₁, infectar sistemicamente plantas com gene L¹. Já PMMoV pertence ao patótipo P₁₂ e infecta sistemicamente plantas com L¹ e L². Há relatos da ocorrência em campo de variantes de PMMoV que podem quebrar a resistência de plantas com L³ ou L⁴, sendo classificados como patótipos P₁₂₃ ou P₁₂₃₄ (Mizumoto *et al.*, 2012).

PMMoV é um dos patógenos mais importantes de origem viral para o gênero *Capsicum*, que incluem plantas de pimentão e pimentas. Essas culturas figuram entre as dez hortaliças mais importantes do Brasil e se destacam pelo aproveitamento na alimentação humana, de forma direta ou em pó como flavorizante ou corante (Fernandes *et al.*, 1997).

O vírion das espécies que compõem esse gênero possui formato de bastão rígido com simetria helicoidal de 300 a 310 nm de comprimento e 18 nm de diâmetro (Namba e Stubbs, 1986) (Fig. 1). O vírus é constituído de RNA genômico (gRNA) em uma única fita na polaridade positiva arranjada helicoidalmente no canal cilíndrico cujo raio aproximado é de quatro nm (Zaitlin, 2011).

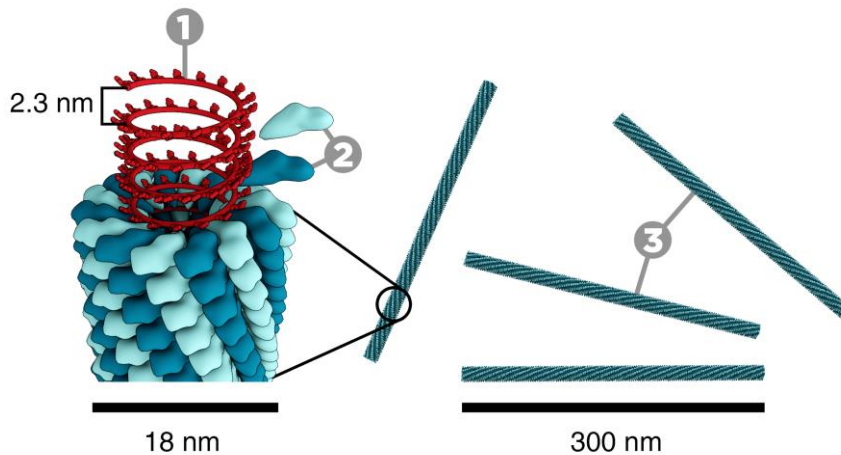


Figura 1. Representação esquemática das dimensões do vírion de um tobamovírus. 1: RNA genômico; 2: proteínas do capsídeo; 3: vírion. Fonte: *Tobacco mosaic virus*, Wikipedia. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tobacco_mosaic_virus>. Acessado em: 29 de janeiro de 2014.

O genoma de PMMoV possui 6356 nucleotídeos e quatro fases abertas de leitura (*Open Reading Frames*; ORF), sendo apenas as ORF1 e ORF2 traduzidas a partir do RNA genômico (gRNA), enquanto as ORF3 e ORF4 são traduzidas a partir de RNA subgenômico (sgRNA) (Alonso *et al.*, 1991).

Oliveira e colaboradores (2010) anotaram a organização genômica de PMMoV BR-DF01. As regiões não traduzidas (*Untranslated Regions*; UTRs) são delimitadas pelos nucleotídeos 1 a 69 e 5683 a 6356 (5' e 3' UTR, respectivamente). A primeira ORF localizada entre os nucleotídeos 70 e 3423 codifica a proteína 126 K e termina com um códon de parada âmbar (UAG). Este pode ser ignorado pelos ribossomos (*ribosomal read-through*) gerando a segunda ORF que se estende até o nucleotídeo 4908 e codifica a proteína 183 K, a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A terceira ORF codifica a proteína de movimento viral (MP ou 30 K) compreendida entre os nucleotídeos 4909 a 5682. A quarta e última ORF codifica a capa proteica (CP ou 17 K) e está localizada entre os nucleotídeos 5685 e 6158. A figura 2 mostra a organização genômica de PMMoV.

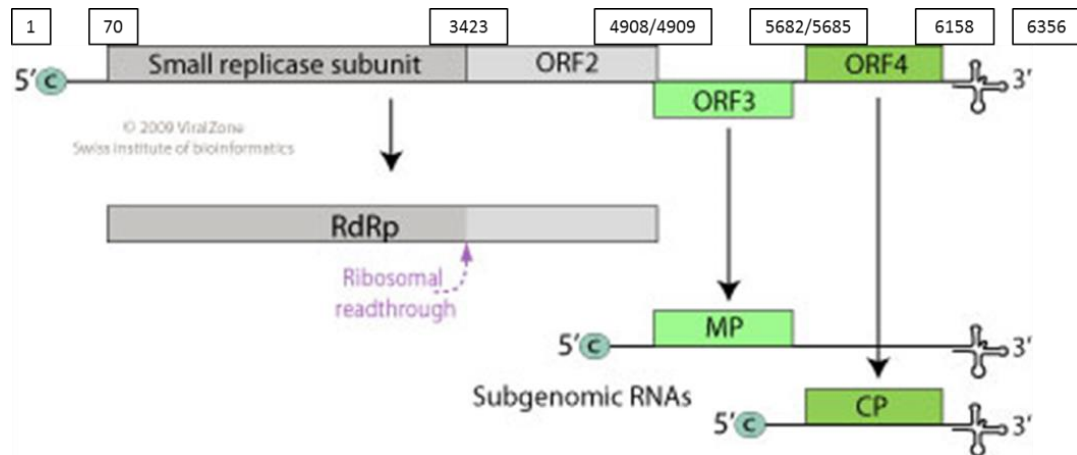


Figura 2. Representação da organização genômica de PMMoV. C: 5' cap; Nucleotídeos 1 a 69: 5' UTR; 70 a 3423: 126 K; 70 a 4908: RNA polimerase dependente de (RNA RdRp); 4909 a 5682: proteína de movimento (MP); 5685 a 6158: capa proteica (CP); 6159 a 6356: 3' UTR. Modificado de ViralZone *Swiss Institute of Bioinformatics*. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/51.html>. Acessado em: 7 de janeiro de 2014.

5' cap é uma estrutura gerada pela ligação 5'-5' de trifosfatos entre uma cadeia de sete metilguaninas (m7G) e a extremidade de um RNA mensageiro (mRNA) eucariótico (Alberts *et al.*, 2008). Alguns vírus, inclusive os tobamovírus, evoluíram e adquiriram essa estrutura, como forma de proteção, transporte e interação com iniciadores de tradução. Para vírus possuidores dessa estrutura e cuja replicação é citoplasmática, a catálise de 5' CAP é feita no citoplasma e não no núcleo, como ocorre com os mRNAs eucarióticos (Efimov *et al.*, 2001). Em PMMoV os domínios catalíticos responsáveis pela síntese de cap estão presentes na proteína 126 K (Dunigan e Zaitlin, 1990). Segundo Christensen e colaboradores (2009), em tobamovírus, 5' cap é necessário para o ancoramento do gRNA a complexos de retículo endoplasmático liso, que são o sítio de replicação viral (Heinlein *et al.*, 1998), e com isso iniciar a tradução da polimerase a partir do gRNA.

A 5' UTR tem importância regulatória no que diz respeito ao controle da expressão gênica em nível traducional (Fan *et al.*, 2012). Ela não interfere na estabilidade do transcrito e é comparável à sequência *Shine-Dalgarno* (SD) de procariontos (Galli e Kado, 1989). Nela encontra-se a sequência líder ômega (Ω), cuja característica é ser *enhancer* ou potencializadora em *cis* da tradução, e é afetada pela fonte e concentração de ribossomos (Avila-Rincon *et al.*, 1989). Devido à alta influência traducional, essa sequência já foi testada em vários sistemas de expressão, porém detectou-se que ela é espécie dependente, sendo sua atividade mais expressiva em dicotiledôneas, moderada em oócitos de *Xenopus sp.*, células de

mamífero em cultura e monocotiledôneas, e não detectável em leveduras (Gallie e Walbot, 1992).

A proteína traduzida pela ORF1 possui peso molecular de 126 kDa, por isso é também chamada de 126 K. Como funções podem-se destacar a constituição do complexo de replicação viral (*Viral Replication Complex*; VRC), acumulação viral, movimento célula-a-célula e potencializar a síntese de RNA viral (Ding *et al.*, 2004). Além dessas funções, 126 K tem maior capacidade de suprimir o silenciamento de RNA comparada a outras proteínas supressoras (Souza *et al.*, 2013). O silenciamento de RNA é um mecanismo de defesa da planta contra uma infecção viral. Como supressora, atua após a formação de siRNA (*small interfering RNAs*) (Vogler *et al.*, 2007), por impedimento da utilização dos siRNAs pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced Silencing Complex*; RISC) (Kubota *et al.*, 2003), e não inibindo a atividade de enzimas cujas funções são anteriores à formação do mesmo (Ding *et al.*, 2004).

Devido ao seu grande tamanho, a proteína a 126 K possui múltiplos domínios, entre eles, o domínio guanililtransferase, catálise de 5' CAP (Dunigan e Zaitlin, 1990); metiltransferase (MET), importante para a formação do CAP e movimento a longa distância (Knapp *et al.*, 2005); e domínio helicase (HEL) (Kadare e Haenni, 1997), responsável pelo desnovelamento de híbridos de ácidos nucleicos (Koonin, 1991). Wang e colaboradores (2012) demonstraram que além das funções já conhecidas, os domínios MET/HEL isolados possuem capacidade de silenciamento de RNA.

A proteína 183 K é a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que é a ORF2 traduzida por *read-through* do códon de parada de 126 K (Pelham, 1978). Além do domínio RdRp, essa proteína também possui os domínios MET/HEL (Goregaoker e Culver, 2002).

A replicação e movimento dos vírus de RNA senso positivo estão intimamente relacionadas, o que aumenta a eficiência e especificidade do movimento viral (Tilsner e Oparka, 2012). Proteínas de movimento (MP), pertencentes à família 30 K, se ligam a ácidos nucleicos de maneira randômica. Em tobamovírus, sua principal função é a de aumentar o tamanho do diâmetro do plasmodesma (*Size Exclusion Limit*; SEL), de forma que o VRC tenha acesso a uma nova célula (Niehl e Heinlein, 2011). A MP é traduzida relativamente cedo no ciclo viral, e isso se deve ao fato do promotor regular temporalmente a expressão, enquanto a CP é expressa mais tardiamente (Lehto *et al.*, 1990).

A CP é a proteína traduzida a partir da ORF4, cujo peso molecular é 17 kDa. O ribossomo traduz essa proteína a partir do sgRNA. Classicamente sua principal função é estrutural na formação do vírion, porém outras funções não estruturais têm sido elucidadas,

como auxílio na montagem do VRC, regulação da replicação, tradução e modificações pós-traducionais e quebra de resistência conferida pelos genes *l* de *Capsicum* (Genda *et al.*, 2007; Ivanov e Makinen, 2012). Assim que o vírus entra em uma célula, acontece um processo chamado de desmontagem co-traducional, em que as subunidades de CP se desassociam na medida em que ocorre a exposição do primeiro códon de iniciação (Shaw, 1999). A CP contribui para o movimento do vírus a longa distância, embora o movimento pelo plasmodesma seja de forma não encapsidada. A ausência de CP impossibilita a transmissão do vírus entre plantas na natureza (Holt e Beachy, 1991).

A 3' UTR está envolvida no processo de replicação viral e ligação a dímeros da CP para início da montagem da partícula (Gulyaev *et al.*, 1994). Sua estrutura terciária adquire um dobramento complexo, adquirindo um formato molecular semelhante a RNA transportador aceptor de histidina (tRNA^{His}) (Adams *et al.*, 2009), o qual somado a outros fatores de iniciação de tradução garante a eficiência de recrutamento dos mesmos, de maneira análoga à realizada pela cauda de poli-A (Gallie e Walbot, 1990).

Segundo Liu e Nelson (2013) e Scholthof (2000), o vírus entra na célula por meio de danos mecânicos na parede celular e membrana plasmática, logo sua transmissão é mecânica e o sítio de replicação e tradução é o citoplasma. Ele se movimenta, intracelularmente por intermédio de filamentos de actina e miosina (Christensen *et al.*, 2009), e intercelularmente pelo plasmodesma, na forma de VRC, composto por gRNA associado a MPs e replicase (126/183K) (Kawakami *et al.*, 2004) (Fig. 3).

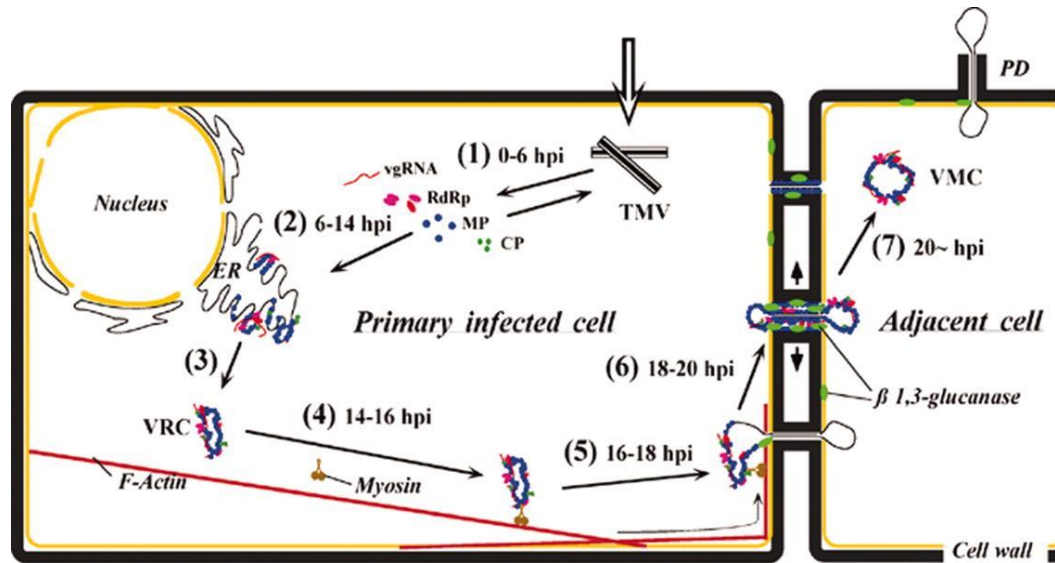


Figura 3. Progressão temporal do ciclo de replicação de um tobamovírus. O vírus entra na célula por meio de danos mecânicos, inicia-se a tradução do gRNA em RdRp, MP e CP (MP e CP são traduzidos por sgRNA). (1); MP se associa ao retículo endoplasmático perinuclear e citoplasmático para formar o VRC (2); (3 e 4) VRC cresce em tamanho e se associa à actina e miosina para se movimentar pela célula por meio do citoesqueleto; (5) VRC se movimenta pela periferia da célula até ficar adjacente ao plasmodesma; (6) O plasmodesma é modificado e tem seu diâmetro aumentado pela ação de MPs e VRC; e (7) VRC migra de uma célula primária para outra adjacente e o ciclo se inicia. Fonte: Kawakami *et al.*, 2004.

1.2 Genética reversa: inoculação de transcrito *in vitro* e agroinoculação

Genética reversa é um conceito que surgiu a partir da descoberta da transcriptase reversa, enzima que permitiu a manipulação de RNA (sequência parental) por intermédio da fita complementar de DNA (cDNA) (Walpita e Flick, 2005). O cDNA é uma cópia passível de manipulação e a transcrição dessa cópia gera sequências de RNA (progênie).

Na década de 80, uma importante invenção científica abriu as portas para o desenvolvimento de inúmeras técnicas de manipulação de vírus de RNA. Ahlquist e colaboradores (1984) estabeleceram um sistema de manipulação do cDNA de *Brome mosaic virus* (BMV), no qual o vírus pode ser recuperado por transcrição *in vitro*, já que o mesmo possuía promotor de reconhecimento da RNA polimerase de *Escherichia coli*. Dois anos mais tarde, o mesmo sistema foi aplicado ao TMV (Meshi *et al.*, 1986), e a partir da década de 1990, os cientistas começaram a empregar o promotor da RNA polimerase dos bacteriófagos SP6, T3 e T7 para a produção dos clones infectivos (Holt e Beachy, 1991). A troca de

promotores deveu-se ao fato do uso de promotores de RNA polimerase de *E. coli* resultarem em menor quantidade de transcritos e em síntese de RNAs parciais (Boyer e Haenni, 1994).

Muitos modelos foram estabelecidos a partir dos experimentos pioneiros, embora a grande maioria empregue o pT7, por ele ser o mais estudado e poder ser incorporado pelo iniciador (*primer*) senso numa reação de PCR (Weiland e Dreher, 1989). Existem passos universais no emprego dessa técnica: após o cDNA ser polimerizado pela transcriptase reversa, a partir do molde gRNA, insere-se uma sequência contendo o promotor por PCR, seguido da etapa de transcrição *in vitro* e inoculação em planta suscetível (Yoon *et al.*, 2001).

Mesmo que o cDNA correspondente ao genoma do vírus seja clonado, numa abordagem completa (*full-length*), Boyer e Haenni (1994) apontam vários fatores que podem limitar a atividade biológica dos vírus resultantes, como: não ser possível amplificar o genoma de alguns vírus em uma única fita de cDNA devido à presença de estruturas secundárias complexas no gRNA; heterogeneidade de transcritos; incorporação de mutações nas 5' e 3' UTR; e dificuldade de manipular o RNA.

Boyer e Haenni (1994) discutem que a heterogeneidade de transcritos, causada por populações de RNAs com tamanhos e sequências diferentes, tem duas consequências. Uma delas leva à provável formação de vírus não infectivos devido ao fato dos RNAs parciais competirem, com os completos, pela maquinaria de replicação e fatores celulares. Por outro lado, mutações pontuais podem favorecer a formação de RNAs mais infectivos que o próprio tipo selvagem.

Para contornar o problema da presença de nucleotídeos não virais na 3' UTR, a técnica *run-off* seria uma solução. Nela insere-se um sítio de restrição logo após o último nucleotídeo viral, restando poucos ou nenhum nucleotídeo não viral. Dzianott e Bujarski (1989) utilizaram uma estratégia inovadora, com a inserção de uma sequência com atividade ribozima do satélite de *Tobacco ringspot virus* para a retirada da sequência não viral por auto clivagem.

Uma grande limitação relatada é a instabilidade do cDNA viral em bactérias. Vários exemplos (Bedoya e Daròs, 2010; Rice *et al.*, 1989; Sumiyoshi, 1992) citam o sucesso na obtenção do cDNA do genoma completo, porém quando propagado em bactéria, mutações, principalmente deleções, eram frequentemente observadas, e os transcritos *in vitro* não eram infectivos.

Em vírus de plantas, uma estratégia de inoculação de clones tem se destacado e é amplamente utilizada, tendo como pontos fortes a facilidade de inoculação e sem a necessidade da síntese de transcritos. Essa técnica, conhecida como agroinoculação, consiste na inoculação de cDNA contendo o genoma viral completo, sob o comando do promotor 35S

(p35S) de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e terminador da nopalina sintase (TNos). O genoma é flanqueado pelas regiões denominadas borda direita e esquerda do T-DNA (Fig. 4), clonado em um vetor binário. A inoculação consiste na introdução dessas construções em *Agrobacterium tumefaciens* que são colocadas em contato com as plantas, utilizando a capacidade do plasmídeo integrar a região flanqueada pelas bordas direita e esquerda no DNA genômico do hospedeiro. Isso resulta na transcrição do genoma viral dentro da célula e com isso permite a infecção (Hellens e Mullineaux, 2000).

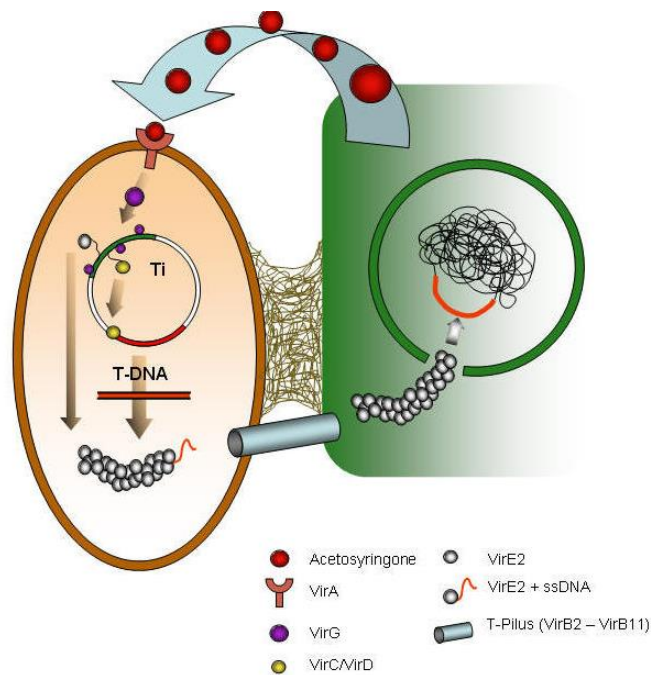


Figura 4. Representação esquemática do ciclo de infecção natural de *A. tumefaciens*. Uma vez que a parede celular sofre danos mecânicos, sinais são enviados pelas células adjacentes (bolinhas vermelhas). Essas moléculas induzem a expressão de genes de virulência (genes em verde), que induzirão por sua vez a ativação do T-DNA (região em vermelho), que será transportado e protegido pelos genes *vir*, até que haja a inserção do T-DNA no genoma nuclear da planta. Reprodução com permissão de Frandsen (2010), com modificações.

Vetores binários são geralmente maiores que 10 kb (Murai, 2013). Dessa forma a clonagem do cDNA viral, cujo tamanho é normalmente superior a 6 kb (Zaccomer *et al.*, 1995), resulta em plasmídeos grandes e instáveis. Geralmente a segmentação do genoma viral se faz necessária para o sucesso nas clonagens (Liu e Kearney, 2010; Yoon *et al.*, 2001; Delfosse *et al.*, 2013) porém aumentam o risco da geração de clones não infectivos.

Em se tratando de plantas que não são adequadas para o processo de agroinoculação, o bombardeamento do clone infectivo com partículas metálicas, em geral tungstênio, pode ser uma alternativa viável (Lico *et al.*, 2008). A expressão de proteínas heterólogas alcançou elevada eficiência quando o cDNA infectivo foi bombardeado em plantas susceptíveis (Gal-On *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2013). A maior vantagem desse sistema é que os plasmídeos empregados são menores como pUC (2600 bp) e pBlueScript (2958 bp). Apenas há a necessidade da inserção de uma sequência promotora e terminadora reconhecidas pela polimerase da planta, sendo a manipulação desses plasmídeos menos complexa comparada a outras metodologias.

Similar ao bombardeamento, porém mais simples é a metodologia descrita por Dalsgaard e colaboradores (1997) em que clone infectivo de *Cowpea mosaic virus* (CPMV) foi diretamente inoculado em plantas na forma de DNA. O DNA do vírus estava flanqueado por promotor e terminador de reconhecimento pela planta e após inoculação direta pode ser recuperado com sucesso. O clone CPMV construído era uma quimera, sendo que a CP apresentava um epítipo neutralizante de parvovírus. Quando inoculado em animais o extrato de planta inoculada foi capaz de gerar anticorpos contra o epítipo de parvovírus.

Algumas estratégias são descritas para aumentar a estabilidade de plasmídeos contendo cDNA viral, como por exemplo, o uso de plasmídeo de baixo número de cópias (Almazán *et al.*, 2000), cromossomos artificiais bacterianos (Lai, 2000), e incubação para crescimento bacteriano em temperatura inferior a 37 °C (Liao, 1991). A instabilidade de um plasmídeo pode acarretar deleções de partes essenciais do genoma viral que inviabilizam a infectividade do clone (Al-Allaf *et al.*, 2013; Bedoya e Daròs, 2010; Boyer e Haenni, 1994; Lai, 2000; Satyanarayana *et al.*, 2003).

A adição de íntrons nas ORFs virais, principalmente na RdRp, mostrou-se como uma solução para redução da toxicidade do cDNA viral em *E. coli* e melhorou a taxa de transcrição em plantas (Johansen, 1996). Nesse processo, ocorre um fenômeno semelhante ao processamento do mRNA eucariótico: o íntron é deletado via *splicing* restaurando a ORF e com isso a toxicidade dos cDNAs genômicos de vírus inseridos pode ser resolvida (López-Moya e García, 2000; Yamshchikov *et al.*, 2001).

Clones infectivos de PMMoV já foram relatados. Os primeiros trabalhos que usaram cDNA infectivo de PMMoV, datam de 1997, quando Kirita e colaboradores determinaram a sequência nucleotídica de um isolado viral e analisaram a gama de hospedeiros e sintomas induzidos pelo vírus. Esse estudo permitiu que outros grupos, como Tsuda e colaboradores (1998) pudessem estudar os mecanismos de resistência dos genes *I* de plantas do gênero

Capsicum e quais aminoácidos eram responsáveis pelos fenótipos induzidos pelos diferentes patótipos de PMMoV. Hagiwara e colaboradores (2002) modificaram o clone infectivo de PMMoV com o principal objetivo de gerar vírus atenuados que pudessem servir de proteção cruzada (pré-imunização) dos cultivares. Entretanto, todos os trabalhos citados utilizaram o cDNA infectivo baseado em transcrição *in vitro*.

Com o passar dos anos, a busca por modelos que explicassem o mecanismo responsável pela resistência a infecções virais e fenômeno da quebra de resistência foi intensificada. Ichiki e colaboradores (2005) utilizaram cDNAs de PMMoV com a inoculação de transcritos *in vitro*, para avaliar o efeito de mutações no genoma viral, para a seleção de isolados de PMMoV que causavam sintomas mais atenuados que o isolado original. Hamada e colaboradores (2002, 2007) mostraram a influência de mutações de CP na quebra da resistência do tipo L³ por um cDNA infectivo de PMMoV, provando assim, que o gene responsável pela indução de uma resposta imunológica na planta é o *cp*.

Apesar de já existirem protocolos que descrevem a produção de clones infectivos de PMMoV, oriundos de transcrição *in vitro* ou por agroinoculação (Tomita *et al.*, 2011), não se tem relatos do uso dos mesmos para fins biotecnológicos. Já para outros tobamovírus, como TMV, existem plataformas de expressão de proteínas heterólogas *in planta*. As metodologias de construção de clones infectivos de PMMoV utilizaram da segmentação do genoma para conseguir a clonagem correta.

1.3 Utilização de CP como apresentador de epítomos

O desenvolvimento de metodologias de produção de clones infectivos de diferentes vírus possibilitou o surgimento de um ramo em virologia que está sobreposto com biotecnologia e imunologia, cada um com diferentes propósitos, de detecção de antígenos à produção de vacinas e imunização.

O uso de vírus de planta como carregadores de peptídeos imunogênicos ou para uso como potenciais vacinas é uma ferramenta útil e atraente, principalmente devido à incapacidade desses vírus infectarem humanos e animais. Somado às essas características, existe o fato de alguns vírus de planta, como os tobamovírus, se acumularem em altas quantidades no hospedeiro, de forma tão abundante que vírions cristalizados podem ser visualizados por microscopia de luz (Creager, 1999).

A estrutura tridimensional da proteína CP de TMV está depositada no *Protein Data Bank* (PDB, <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2TMV>>, 10/1/2014).

A CP é conservada entre todos os tobamovírus, o que possibilita extrapolar a função e o mecanismo de ação de um vírus para outro, além de direcionar o desenho racional da inserção de epítomos, já que a CP de PMMoV não está depositada no PDB.

É essencial que a inserção dos epítomos a serem expressos em proteínas de fusão seja realizada em fase de leitura da ORF e a estrutura proteica básica não pode ser alterada. As principais metodologias de expressão visam a expressão da proteína heteróloga em fusão com CP. Namba e colaboradores (1989) demonstraram, a partir da resolução da estrutura tridimensional de CP de TMV, três posições potenciais de inserção de epítomos sem haver perda da função biológica da proteína: as extremidades N e C e uma região de *loop* (aminoácidos 59 a 65). Esses são os principais sítios de inserção de peptídeos de interesse biotecnológico e farmacêutico.

A CP possui algumas características que a tornam uma proteína interessante para a expressão de epítomos imunogênicos, a alta quantidade de CP em células infectadas. Ressaltando que há um alto nível de acúmulo de partículas de tobamovírus no hospedeiro, que pode chegar a 10 mg por grama de folha fresca (Bendahmane *et al.*, 1999). Siegel e colaboradores (1987) demonstraram que CP é uma das proteínas mais abundantes em protoplastos, durante uma infecção por tobamovírus, cerca de 70 % da composição proteica é CP em menos de dois dias pós-inoculação.

O uso de CP para apresentar epítomos se tornou uma metodologia promissora, mas complexa, na qual é possível destacar a variedade de abordagens que surgiram com o advento da genética reversa de vírus de RNA de planta polaridade positiva. Chandran e colaboradores (2010) expressaram, em *E. coli*, *Virus-Like Particles* (VLPs) de uma quimera de tymovírus, que possuíam um epítomo de parvovírus canino para imunização de cachorros. A fusão dos epítomos foi posicionada no N-terminal da CP. Hema e colaboradores (2007) utilizaram uma metodologia muito semelhante, porém o epítomo foi do *Foot and mouth disease virus* (FMDV).

Os trabalhos pioneiros que demonstraram o uso de CP como carregador de epítomos expressaram a CP quimera em bactérias, no qual o epítomo era adicionado em fase de leitura para não afetar a expressão da mesma. Outros grupos sofisticaram a técnica levando a expressão de CP para seu sistema natural que é *in planta*. Nesse sistema utiliza-se vetor viral e a transcrição *in vitro* geralmente está sob o comando do pT7. Utilizando TMV, tem-se exemplos de trabalhos que inocularam os transcritos em *N. tabacum* ou *N. benthamiana*, como Staczek *et al.* (2000) cujo epítomo era proveniente de *Pseudomonas aeruginosa*; Wu e

colaboradores (2003) e Jiang e colaboradores (2006) de FMDV e Fujiyama e colaboradores (2006) de poliovírus.

Para genes de expressão complexa, pode-se utilizar a técnica do *read-through*. Essa técnica utiliza um códon de parada âmbar na extremidade 3' do gene *cp*, possibilitando a formação da CP original e também uma fração com a proteína quimérica (Turpen *et al.*, 1995). Essa estratégia pode contribuir para o movimento sistêmico e para a produção de partículas viáveis. Borovsky e colaboradores (2006) refinaram esse modelo e expressaram um peptídeo fusionado com CP, cuja atividade era matar larvas de *Aedes aegypti*.

Yamaya e colaboradores (1988) foram os primeiros a transformar uma planta com o genoma completo de TMV, embora tenha sido uma variante atenuada, eles conseguiram provar a expressão das proteínas virais. A partir daí, iniciou-se um processo de busca pelos genes essenciais e não essenciais para a replicação viral. Com isso, surgiram versões parciais ou desconstruídas de vírus, a fim de minimizar o tamanho dos vetores, e maximizar a expressão de proteínas heterólogas.

Gleba e colaboradores (2004) demonstraram a possibilidade de desconstruir um vetor viral utilizando TMV, o MagnIcon®. Esse vetor possui dois módulos, um 5' e um 3'. O módulo 5' é responsável pela replicação enquanto o 3' é o de clonagem do gene de interesse. Os dois módulos possuem uma região de recombinação que restaura a sequência em uma única fita.

Nas versões desconstruídas, o gene *cp* é deletado completamente, e *mp* parcialmente. Para compensar a falta de movimento de vírus, a planta inteira é infiltrada por pressão negativa, processo chamado de *magniffection* (Gleba *et al.*, 2007). Além disso, por predição *in silico*, esse grupo identificou duas regiões ricas em timina e sítios críticos de *splicing* na RdRp, características responsáveis pela diminuição da eficiência de transcrição. Para resolver essa limitação, eles fizeram inserção de íntrons, provenientes de *Arabidopsis thaliana*, em 19 posições nos genes *rdrp* e *mp*, e quatro posições para o gene repórter, *gfp*. Além disso, foram feitas 97 mutações silenciosas de nucleotídeos nas regiões ricas em timina da *rdrp*, o que garantiu uma eficiência elevada de transcrição nuclear (Marillonnet *et al.*, 2005). Mais de 50 produtos de diferentes origens, humana, animal, vegetal, bacteriana e viral já foram produzidos utilizando essa plataforma (Gleba *et al.*, 2005).

1.4 Epítipo de *Dengue virus 1*

Pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, o *Dengue virus* (DENV) possui quatro sorotipos 1 a 4 que causam doenças em seres humanos, sendo transmitidos pelos mosquitos do gênero *Aedes*, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Gluber, 1998). Atualmente um quinto sorotipo foi proposto, embora não existam relatos de infecção em humanos o vírus se encontra na natureza e multiplica-se em animais selvagens (Mackay, <<http://virologydownunder.blogspot.com.au/2013/10/denv-5-virus-from-jungle-comes-to-humans.html>> 29/1/2014; Normile, <<http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>>, 29/1/2014).

Infecções causadas pelo vírus da dengue são importantes causas de mortalidade e morbidade em muitas áreas tropicais e subtropicais no mundo, sendo que aproximadamente três bilhões de pessoas correm o risco de contrair uma virose causada por DENV anualmente (Kurane, 2007; Thiel *et al.*, 2005).

O *Dengue virus* é um vírus envelopado de RNA de fita simples polaridade positiva. Na extremidade 5' possui CAP e na 3' forma uma estrutura em forma de *loop*. A tradução do RNA genômico resulta em uma poliproteína que é processada em três proteínas estruturais, C prM e E, e sete proteínas não-estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B E NS5 (Thiel *et al.*, 2005; ViralZone, <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/43.html>, 10/1/2014).

A proteína E (Fig. 5) é a maior proteína estrutural, seu peso molecular é 50 kDa. Essa proteína é a hemaglutinina viral e tem por função mediar a ligação aos receptores celulares, permitir a endocitose e a fusão das vesículas dependente de pH, nela se encontram os principais epítomos neutralizantes e é considerada a proteína viral imunodominante (Rocha *et al.* 2012; Thiel *et al.*, 2005).

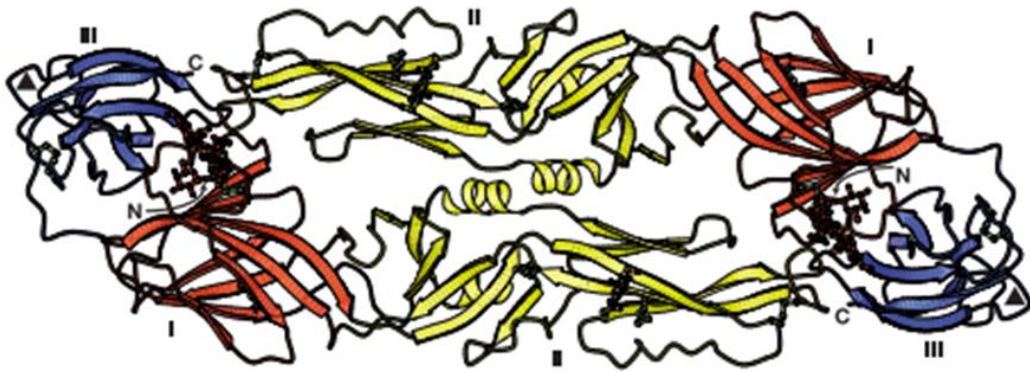


Figura 5. Representação esquemática da proteína E de DENV. Cada monômero possui domínio I (em vermelho), domínio II (em amarelo) e domínio III (em azul). Fonte: Modis *et al.* (2004), com modificações.

A proteína E é um dímero composto por dois monômeros que possuem três domínios cada, como mostra a Figura 5, são eles domínios I, II e III. O domínio III possui estrutura tridimensional semelhante à de imunoglobulinas (*IgG-like*), ele é o responsável pela ligação ao receptor celular. O domínio II tem por função fundir a membrana viral com a celular, fato que ocorre mediante ambiente molecular favorável, e o domínio adquire uma conformação de protrusão. O domínio I faz uma ponte entre os domínios II e III (Kuhn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004).

Embora o domínio III seja o mais utilizado para detecção da proteína E, Maldaner e colaboradores (2013) demonstraram a eficiência imunogênica de um epítipo linear contido entre domínios I/II, e foi o primeiro trabalho a utilizá-los como ferramenta diagnóstica.

Segundo o Ministério da Saúde (2011) e Portal da Saúde (2012), o diagnóstico da dengue no Brasil é realizado por meio da pesquisa de anticorpos IgM por testes sorológicos (ELISA); detecção de vírus diretamente (isolamento viral e RT-PCR); e detecção do antígeno NS1 (proteína não-estrutural 1). A detecção sorológica atualmente encontra problemas relacionados à especificidade e sensibilidade, devido à baixa qualidade de antígeno do DENV. Em vista desses problemas críticos, a busca por sistemas de expressão dos antígenos em quantidade e qualidade é altamente demandada.

Huhtamo e colaboradores (2010) demonstraram que nos primeiros dias de fase febril a detecção do RNA viral é mais viável. Porém, entre 4 a 5 dias após surgimento dos sintomas, o diagnóstico de IgM se torna o método de detecção mais eficiente. A expressão de antígenos de interesse comercial utilizando um vetor viral vegetal em planta é uma possível solução.

Seres humanos quase não possuem anticorpos reagentes para vírus de planta, essa característica aumenta a especificidade no diagnóstico sorológico.

2. JUSTIFICATIVA

Clones infectivos de vírus de RNA por transcrição *in vitro* ou agroinoculação são ferramentas importantes e amplamente empregadas em estudos da biologia molecular do vírus e do hospedeiro. Várias aplicações biológicas podem ser utilizadas por essa metodologia, da compreensão das interações patógeno-hospedeiro à expressão de proteínas heterólogas.

No Brasil essa área é pouco explorada devido às dificuldades na clonagem do cDNA derivado do genoma viral completo e sua propagação em bactérias. Contudo o domínio dessa técnica se faz necessário para impulsionar as pesquisas de virologia molecular básica e aplicada no país.

Com um clone infectivo de PMMoV pode-se explorar a capacidade desse vírus de expressar proteínas heterólogas, possibilitando aplicações farmacêuticas e biotecnológicas. Uma aplicação viável seria no auxílio do diagnóstico de dengue, que é uma doença endêmica no país e o SUS carece de kit diagnóstico nacional específico e sensível. O desenvolvimento de uma metodologia baseada em CP como plataforma de apresentação de epítomos dos domínios I/II da proteína E de DENV-1, pode ser uma promissora ferramenta que auxilie no diagnóstico da dengue.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Construir um plasmídeo sob o comando do promotor T7 contendo cDNA genômico de PMMoV em vetor para transcrição *in vitro* e em vetor binário para agroinoculação sob o comando do promotor p35S, a fim de manter a infectividade viral, e modificar o clone em vetor binário para utilizar a capa proteica (CP) como plataforma de apresentação de epítomo do DENV-1.

3.2 Objetivos específicos

- Amplificar o genoma completo de PMMoV por RT-PCR utilizando RNA total de *Nicotiana benthamiana* infectada com PMMoV BR-DF01;
- Clonar o genoma completo em vetor pCR4-TOPO e pUC19 para realizar transcrição *in vitro* dos clones obtidos;
- Inocular mecanicamente os RNAs transcritos em *N. benthamiana*, avaliar a infectividade e sintomatologia e realizar detecção sorológica da presença do vírus recuperado;
- Clonar o genoma completo de PMMoV em vetor binário por meio da técnica de “*overlap-extension PCR*” para agroinocular os plasmídeos obtidos em *N. benthamiana* e avaliar infectividade;
- Inocular transcritos de PMMoV e agroinocular clone infectivo (em vetor binário) em plantas com diferentes susceptibilidades, para avaliar possíveis diferenças sintomatológicas e biológicas da progênie viral em relação ao parental, tipo selvagem;
- Apresentar epítomos na CP do clone obtido em vetor binário, inserindo um gene do epítomo de DENV-1 domínios I/II da proteína E;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolado de PMMoV utilizado para o estudo e preparação de plantas infectadas

O tobamovírus PMMoV BR-DF01 (GenBank acesso AB550911) mantido em estoque a -80 °C foi utilizado no estudo. O extrato vegetal de planta infectada foi inoculado mecanicamente em folhas jovens de plantas de *Nicotiana benthamiana*, que foram mantidas em casa de vegetação. Três dias após a inoculação foram utilizadas folhas inoculadas para a extração de RNA total.

4.2 RT-PCR e clonagem de cDNA genômico de PMMoV em vetor pCR4-TOPO

As folhas inoculadas foram maceradas em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando o “Plant RNA Reagent” (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA referente ao genoma completo foi sintetizado por transcrição reversa. Na primeira etapa os reagentes utilizados foram: 9,5 µL RNA total; 1 µL de dNTP 10 mM (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); 1 µL de iniciador PMMoV-Eco-MLu Rev 50 µM, essa solução foi incubada a 75 °C por 5 min e após a 4 °C por 3 min. Na segunda etapa foram adicionados à solução anterior 4 µL de tampão First Strand 5 X (Invitrogen); 2 µL de dTT 0,1 M (Invitrogen); 1 µL de RNase Out (40 U/µL) (Invitrogen) e 1,5 µL de SuperScript III (200 U/µL) (Invitrogen), a incubação foi a 50 °C por 60 min seguida de desnaturação a 75 °C por 15 min. Adicionou-se 1 µL de RNase H (2 U/µL) (Invitrogen) e incubou-se a 37 °C por 30 min.

A Tabela 1 lista os iniciadores utilizados nesse trabalho. A enzima transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen), utiliza o iniciador antisseno para sintetizar a primeira fita de DNA complementar (cDNA) a partir de um molde de RNA de fita simples. O iniciador PMMoV-T7-Bam For, cujo desenho foi baseado em Yoon (2001), foi utilizado para PCR em combinação com o iniciador PMMoV-Eco-MLu Rev (Fig. 6) com o de cDNA sintetizado na reação de transcrição reversa.

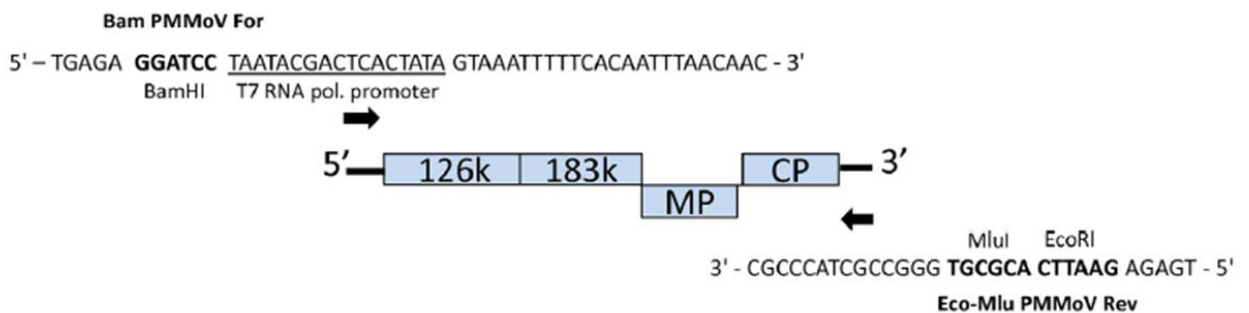


Figura 6. Esquema do desenho dos iniciadores para clonagem do cDNA genômico de PMMoV em vetor pCR4TOPO. O iniciador PMMoV-Eco-MLu Rev foi utilizado para obter o cDNA na RT-PCR.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho.

Iniciador	Sequência (5' → 3')
PMMoV- Bam-T7 For	TGAGAGGATCCTAATACGACTCACTATAGTAAATTTTTTACAATTTAACAAC
PMMoV-Eco-MLu ver	TGAGAGAATTCACGCGTGGGCCGCTACCCGC
PMMoV-gen For	GTAAATTTTTTACAATTTAACAACAACAAC
PMMoV-ribo Rev ¹	GTCAGTGTACTGATATAAGTACAGACT <u>TGGGCCGCTACCCGCGGT</u>
PMMoV-ribo For ¹	<u>AACCGCGGGTAGCGGCCAGTCTGTACTTATATCAGTACACTGAC</u>
pCAMBIA Rev	CCTCTCCAAATGAAATGAACTTC
PMMoV-Sal For	GTGTCGACTCAATAGCAATTACAG
pCAM-Pvu Rev	AACGATCGGGGAAATTCGAG
PMMoV-CP For	GAGAGAGCTCAACAATGGCTTACACAGTTTCCAGT
DI-59/60 For ²	<i>CTTAATACTGAACTTACTAATCCAGCTGTTCTTAGAAC</i> <u>AGTTAGATTCCTGCTACTGG</u>
DI-59/60 Rev ²	<i>AAGTTCAATATCAAGAGTTGGCTTATTCTTAGCCAT</i> <u>AGCGGTCGGAATAGTCTTCCA</u>
DI-154/155 For ²	<i>CTTAATACTGAACTTACTAATCCAGCTGTTCTTAGAAC</i> <u>AACTCCTTAAACATGATGGCATA</u>
DI-154/155 Rev ²	<i>AAGTTCAATATCAAGAGTTGGCTTATTCTTAGCCAT</i> <u>AGCCAGGTGAGTCCACTC</u>

¹A sequência de iniciadores sublinhada é parte da ribozima, que servirá como iniciadora para a polimerase no processo *overlap-extension PCR*.

² A sequência de iniciadores sublinhada corresponde à sequência viral, enquanto sequência em itálico corresponde à sequência do epítipo.

O cDNA referente ao genoma de PMMoV foi amplificado por PCR. O cDNA molde foi proveniente da reação de transcrição reversa (1 µL), os iniciadores utilizados foram (1 µL) PMMoV-Bam-T7 (10 µM) e (1 µL) PMMoV-Eco-MLu (10 µM) (Tabela 1); e (1 µL) de “LongAmp *Taq* DNA polimerase” (2 U/µL) (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). Um passo de desnaturação inicial foi realizado a 94 °C por 1 min, seguido de dois ciclos distintos, sendo os primeiros 12 ciclos de desnaturação a 94 °C por 3 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 65 °C por 7 min; em seguida 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 3 min, anelamento a 60 °C por 1 min e extensão a 65 °C por 8 min. O produto dessa reação foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1 % (p/v) e o DNA eluído com o kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare, Little Chalfond, UK).

Após a etapa de purificação, o cDNA resultante foi ligado ao vetor pCR4-TOPO (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, e transformado em *Escherichia coli* linhagem DH5α (Invitrogen) por eletroporação nas condições: 25 µF de capacitância, 200 Ω de resistência, a 2,5 KV no eletroporador “Bio Rad Gene Pulser” (BioRad, Hercules, CA, USA). Em seguida, as células transformadas foram ressuspensas em 1 mL de meio SOC à temperatura ambiente (Sambrook e Russel, 2001). As células foram incubadas por 1 h a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm. Um volume de 200 µL da cultura celular foi distribuído em placa de petri contendo 20 mL de meio LB ágar ampicilina (50 µg/mL). Após 16 h na estufa a 37 °C, as colônias foram inoculadas em três mL de meio LB líquido ampicilina (50 µg/mL) por 16 h em agitação de 180 rpm a 37 °C.

Dois clones pCR4-PMMoV(2) e (4) foram selecionados a partir do perfil de restrição com a enzima EcoRI (NEB) e os insertos foram sequenciados por *primer walking* (Macrogen Inc., Coréia do Sul). A sequência foi montada utilizando-se o software Staden 4.0 (Staden, 1996).

4.3 Subclonagem de cDNA genômico de PMMoV em pUC19

Um clone pCR4-PMMoV(4) (Fig. 7 A) foi utilizado como molde para a subclonagem em pUC19, para eliminar o promotor T7 oriundo de pCR4-TOPO. Para isso, bactérias transformadas com plasmídeos pCR4-PMMoV ou pUC19 foram crescidas em três mL de LB ampicilina (50 µg/mL) para pUC19 e LB canamicina (50 µg/mL) para pCR4-PMMoV. DNA plasmidial de pCR4-PMMoV e pUC19 foram purificados utilizando o kit “Wizard plus Minipreps DNA purification” (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com orientações do fabricante. Os plasmídeos foram tratados com as enzimas de restrição BamHI (NEB) e MluI

(NEB) para o direcionamento da clonagem. Após tratamento com as enzimas de restrição, pUC19 foi defosforilado com “Calf Intestinal Phosphatase CIP” (NEB) segundo as instruções do fabricante. PMMoV e pUC foram purificados com o kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare), e em seguida PMMoV foi ligado a pUC19 com a enzima “T4 DNA ligase” (NEB) de acordo com orientação do fabricante. Após ligação o plasmídeo resultante, pUC19-PMMoV (Fig. 7 B) foi transformado como previamente descrito.

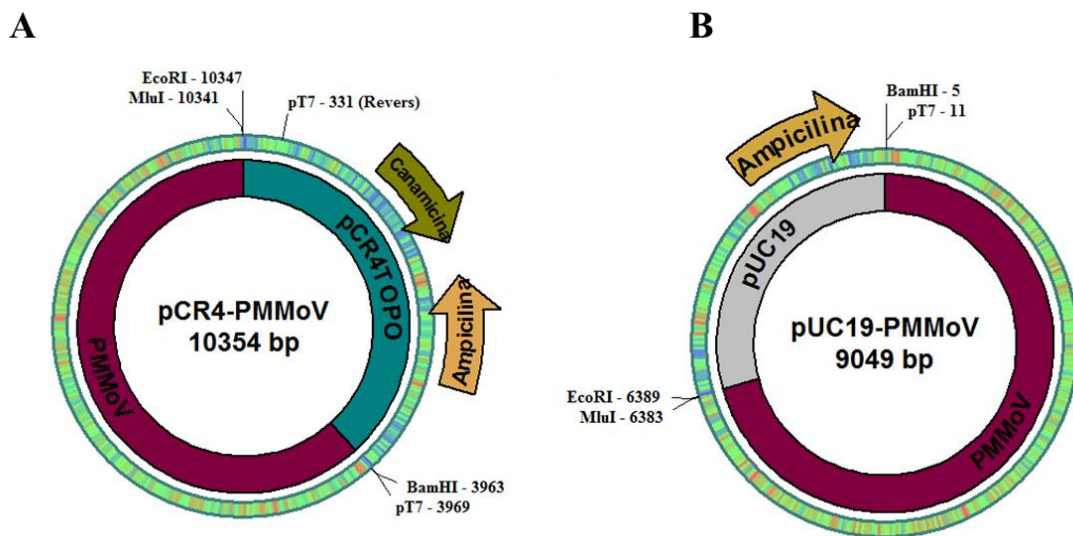


Figura 7. Representação dos plasmídeos construídos contendo cDNA genômico de PMMoV. (A) pCR4-PMMoV, com pT7 inserido pelo primer PMMoV-T7-Bam For, e o mesmo, em orientação reversa presente no plasmídeo pCR4-TOPO. (B) pUC19-PMMoV, construção em que não existe pT7 de pCR4-TOPO, garantindo a inserção do mesmo exclusivamente pelo primer PMMoV-T7-Bam For.

4.4 Transcrição *in vitro*, inoculação e detecção de PMMoV por MET e DIBA

Bactérias contendo o plasmídeo pUC19-PMMoV foram crescidas em 3 mL de LB ampicilina (50 µg/mL), para propagação do plasmídeo, o mesmo foi extraído com o kit “Wizard plus Minipreps DNA purification” (Promega) e tratado com enzima de restrição MluI (NEB) para linearização. A hidrólise do sítio de restrição por MluI resulta em uma extensão da fita 5’ (5’ *overhang*) evitando a transcrição de nucleotídeos adicionais após a extremidade 3’ do RNA viral. pUC19-PMMoV linearizado foi purificado com o kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (Ge Healthcare). A transcrição *in vitro* utilizando

“RiboMax Large Scale RNA production System” (Promega) com o análogo de cap “Ribo m7g Cap Analog” (Promega) foi realizada de acordo com as orientações do fabricante. Os transcritos obtidos foram diluídos 5 X em 10 mM tampão fosfato, pH 7,0, e inoculados em folhas jovens de *N. benthamiana* (4 semanas) levemente polvilhadas com carborundum. Três plantas a serem inoculadas permaneceram no escuro por 2 h, e em seguida foram mantidas em casa de vegetação por até 14 dias. Amostras de folhas apicais não inoculadas foram coletadas e utilizadas para teste sorológico e visualização em microscópio eletrônico.

O teste sorológico “Dot Immunobinding Assay (DIBA)” foi realizado, no qual 0,05 g de massa foliar foi macerada em PBS 1 X numa diluição 40 X (p/v) e diluídas 2 X. Três μ L do sobrenadante (40 X) e da amostra diluída (80 X) foram aplicadas na membrana de nitrocelulose Hybond-C (GE Healthcare), a mesma foi mantida *overnight* a 4 °C para a fixação das proteínas. A membrana foi bloqueada com 20 mL de PBS 1 X, 3 % de leite em pó desnatado e 1 % de Triton X100 por 30 min. Em seguida, a membrana foi incubada por 2 h, sob agitação leve, com uma solução previamente preparada com PBS 1 X, 3 % de leite em pó 1 mL de macerado de *N. benthamiana* sadia, incubada a 70 °C por 15 min e precipitado a 9500 . g por 5 min para a neutralização dos anticorpos inespecíficos, contendo o anticorpo primário policlonal (IgG, a 1mg/mL) contra CP feito em coelho (1:3000) (cedido por Dra. Alice Nagata, Embrapa, CNPH). O anticorpo secundário, anti-coelho conjugado a fosfatase alcalina (1:5000) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), diluído em PBS 1 X e 3 % de leite em pó desnatado, foi utilizado para incubação com a membrana por 1 h sob agitação leve. As incubações foram seguidas de lavagem com PBS 1 X e 0,1 % de Tween20 por três vezes de 3 min cada, antes da revelação que foi feita em 10 mL de tampão alcalino (100 mM de Tris NaCl, 5 mM de MgCl₂, pH 9,5) e os substratos da fosfatase alcalina: 66 μ L de Nitroblue Tetrazolium (NBT) (10 mg/mL) e 33 μ L de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato (BCIP) (10 mg/mL) foram adicionados.

Para visualizar a presença de partículas virais de PMMoV nas plantas inoculadas com os transcritos, tecido foliar foi submetido à contrastação negativa. Folhas sintomáticas foram macerados em 1 % de PTA (*Phosphotungstic acid*; PTA). Telas revestidas com formvar foram colocadas em contato com a solução PTA e extrato de folha por 5 min, e secadas com papel filtro para retirar excesso de água. Para completar o processo de secagem, as telas foram submetidas a vácuo por 30 min, e então visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1011, JEOL, Akishima, Tokyo, Japan).

4.5 Overlap-extension PCR de PMMoV com vetor binário

Para construir um clone passível de agroinoculação utilizou-se o vetor binário pCAMBIA 0390 amplificado a partir do vetor de indução de silenciamento gênico (*Virus Induced Gene Silencing*; VIGS) pTRV2-MCS. Esse vetor possui o RNA 2 do *Tobacco rattle virus*, além do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) duplicado e ribozima do satélite *Subterranean clover mosaic virus* (SCMV). O vetor pTRV2-MCS possui como plasmídeo binário o pCAMBIA 0390 que não possui seleção para plantas, o antibiótico de seleção bacteriana é canamicina, o *polylinker* de pUC19, terminador nopalina sintase (TNoS) e ausência de gene repórter (Fig. 8 A).

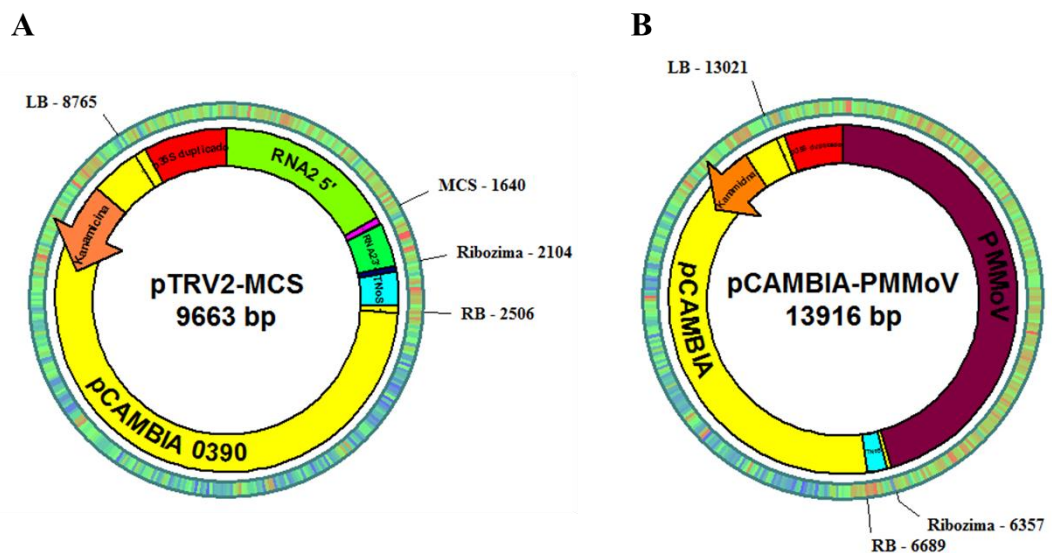


Figura 8. Representação dos vetores binários utilizados neste trabalho. (A) Vetor de indução de silenciamento gênico pTRV2-MCS. RNA 2 de *Tobacco rattle virus* dividido em 5' e 3' (verde) pelo sítio múltiplo de clonagem MCS (magenta); Ribozima originária do satélite *Subterranean clover mosaic virus* (azul escuro); Terminador nopalina sintase (azul claro); Gene de resistência bacteriana à canamicina (laranjado); Promotor duplicado 35S de CaMV (vermelho); Borda direita (RB) e borda esquerda (LB) de recombinação. (B) Clone infectivo pCAMBIA-PMMoV. cDNA genômico de PMMoV (roxo).

A Tabela 2 mostra os parâmetros utilizados para a amplificação de PMMoV e pCAMBIA 0390-p35S-ribo, utilizando foi “Phusion *Taq* DNA Polymerase” (NEB), devido à sua alta taxa de fidelidade. O plasmídeo pCR4-PMMoV foi utilizado como molde para a amplificação do vírus com os iniciadores PMMoV-gen For e PMMoV-ribo Rev (Tabela 1). O pTRV2-MCS foi utilizado como molde para a amplificação do vetor binário pCAMBIA 0390 -p35S-ribo sendo que, os iniciadores utilizados foram PMMoV-ribo For e pCAMBIA Rev

(Tabela 1). Os iniciadores PMMoV-ribo Rev e PMMoV-ribo For compartilham sequências complementares na região da ribozima (Tabela 1). As duas reações foram feitas com 5 μL de tampão HF 5 X (NEB); 2,5 μL de dNTP 2,5 mM (Thermo Scientific); 1 μL de iniciadores senso e antissenso; 1 μL de cDNA molde; 0,25 μL de Phusion *Taq* DNA polymerase (2 U/ μL) (NEB). As temperaturas e tempo de cada passo foram segundo a tabela 3.

Tabela 2. Parâmetros utilizados na amplificação de PMMoV e pCAMBIA 0390-p35S-ribo.

	Etapa	Temperatura/ °C	Tempo
25 ciclos	Desnaturação inicial	98	1 min
	Desnaturação	98	30 seg
	Anelamento	53	10 seg
	Extensão	72	4 min
	Extensão final	72	10 min

Os fragmentos PMMoV e pCAMBIA 0390-p35S-ribo, produtos da reação descrita acima, foram separados por eletroforese e purificados com o kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare). Após a purificação, estes foram usados como molde para a reação *overlap-extension PCR* (Fig. 9), na qual ambas as sequências compartilham uma extremidade comum, parte da sequência ribozima, fazendo assim uma sobreposição que serve como iniciadora para a polimerase.

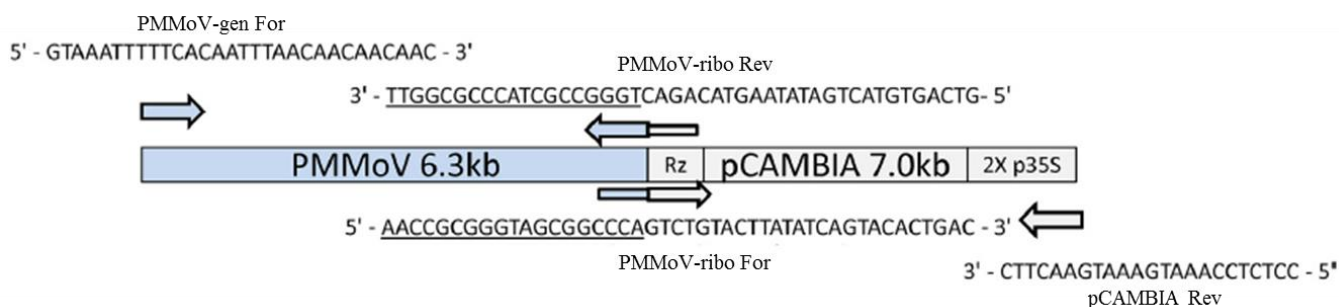


Figura 9. Esquema da posição dos iniciadores para *overlap-extension PCR*. Os iniciadores PMMoV-ribo For e PMMoV-ribo Rev possuem uma região complementar que está sublinhada.

A Tabela 3 mostra os parâmetros utilizados para a fusão de PMMoV a pCAMBIA 0390-p35S-ribo por *overlap-extension PCR*. Na primeira etapa, não há adição de iniciadores porque as regiões de complementariedade, adicionadas previamente pelos iniciadores PMMoV-ribo For e Rev, já servem de iniciadoras. Os DNAs moldes foram utilizados na proporção 1:1, sendo PMMoV (84 ng) e pCAMBIA 0390-p35S-ribo (100 ng). A primeira reação foi feita utilizando 5 μ L de tampão HF 5 X (NEB); 2,5 μ L de dNTP (2,5 mM) (Thermo Scientific); 2 μ L de cDNA de PMMoV; 2,5 μ L de cDNA de pCAMBIA 0390-p35S-ribo e 0,25 μ L de Phusion *Taq* DNA polymerase (2 U/ μ L). A temperatura de anelamento foi 50 $^{\circ}$ C e foram realizados 12 ciclos. O produto final da primeira reação foi denominado pCAMBIA-PMMoV. A segunda reação foi realizada com volume dobrado sendo 9 μ L de tampão HF 5 X (NEB); 5 μ L de dNTP (2,5 mM) (Thermo Scientific); 1 μ L de iniciador PMMoV-gen (10 μ M); 1 μ L de iniciador pCAMBIA Rev (10 μ M); e 0,5 μ L de Phusion *Taq* DNA polymerase (2 U/ μ L) (NEB). A temperatura de anelamento foi elevada para 53 $^{\circ}$ C e foram realizados 25 ciclos.

Tabela 3. Parâmetros utilizados para a realização de *overlap-extension PCR* de PMMoV e pCAMBIA 0390-p35S-ribo.

	Etapa	Temperatura °C	Tempo
12 ciclos	Desnaturação inicial	98	30seg
	Desnaturação	98	10 seg
	Anelamento	50	1 min
	Extensão	72	7 min
	Extensão final	72	10 min
25 ciclos	Desnaturação inicial	98	30 seg
	Desnaturação	98	10 seg
	Anelamento	53	1 min
	Extensão	72	7 min
	Extensão final	72	10 min

O fragmento pCAMBIA-PMMoV resultante foi separado em gel de agarose 0,8 % e submetido à purificação com o kit “QIAEX II Gel Extraction” (Qiagen, Hilden, Alemanha), fosforilado com “T4 Poly Nucleotide Kinase PNK” (NEB) e circularizado com “T4 DNA ligase” (NEB), ambas as reações realizadas de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo resultante, pCAMBIA-PMMoV (Fig. 8 B) foi transformado por eletroporação (como previamente descrito) em diferentes cepas de *E. coli*: DH5 α , DH10B, OminiMax e STBL4, todos do mesmo fabricante, Invitrogen. Avaliaram-se duas temperaturas de crescimento: 37 °C e 30 °C, no último caso, mantidas por até 48 h. Os clones foram selecionados por padrão de restrição com as enzimas KpnI e SacII (NEB) por cortarem o plasmídeo em quatro posições (nt 2640, 4388, 6340 e 12777). As extremidades virais foram sequenciadas por *primer walking* (Macrogen Inc).

4.6 Ensaio de agroinoculação de pCAMBIA-PMMoV

Após a confirmação da clonagem por sequenciamento, o DNA plasmidial foi extraído, e transformado por eletroporação em *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV 3101, como

previamente descrito, com exceção do meio de cultura, que neste caso foi LB3 (Sambrook e Russel, 2001), e a concentração final dos antibióticos foram: 100 µg/mL de canamicina e 25 µg/mL de rifampicina.

PCR de colônias foi feito segundo os parâmetros apresentados pela tabela 4 para confirmação da presença do cDNA de PMMoV em *A. tumefaciens*. A reação foi realizada com 2 µL de tampão 10 X (Uniscience, São Paulo, SP, BR); 2 µL de dNTP (2,5 mM) (Thermo Scientific); 0,8 de MgCl₂ (50 mM) (Uniscience); 0,2 µL do iniciador PMMoV-CP For (10 µM); 0,2 µL do iniciador PMMoV-ribo Rev (10 µM) (Tabela 1) e 0,2 µL *Taq* DNA polymerase (2 U/µL) (Uniscience).

Tabela 4. Parâmetros utilizados na PCR de colônias de *A. tumefaciens* GV3101 transformadas por eletroporação com o plasmídeo pCAMBIA-PMMoV.

	Etapa	Temperatura/ °C	Tempo
20 ciclos	Desnaturação inicial	94	5 min
	Desnaturação	94	30 seg
	Anelamento	55	30 seg
	Extensão	72	1 min
	Extensão final	72	10 min

O protocolo de indução foi modificado de Bucher *et al.* (2003). O meio de cultura utilizado para propagação das agrobactérias transformantes foi LB3, antes do passo de indução elas não foram sedimentadas e a OD₆₀₀ para agroinoculação foi 2,0. Folhas jovens de *N. benthamiana* (4 semanas) foram agroinoculadas com seringa sem agulha e mantidas em casa de vegetação por até 21 dias. A observação dos sintomas e teste sorológico (de acordo com item 4.4) foram realizados para confirmação da infectividade de PMMoV.

4.7 Ensaio de inoculação em plantas indicadoras

Uma vez comprovada a capacidade infectiva dos clones pUC19-PMMoV e pCAMBIA-PMMoV, foi realizado um teste para avaliar se haviam diferenças quanto à patogenicidade entre os clones em comparação com o isolado original, tipo selvagem. As inoculações foram realizadas em três espécies de plantas *Nicotiana benthamiana*, *Capsicum*

chinense PI159236 e *Capsicum annuum* cv Ikeda. Foram utilizadas como fonte viral: (1) o isolado original de PMMoV, PMMoV BR-DF01 mantido a -80 °C; (2) planta infectada com o PMMoV resultante do transcrito de pUC19-PMMoV; (3) planta infectada, após agroinoculação de pCAMBIA-PMMoV.

Em *N. benthamiana* os sintomas de mosaico forte e deformação foliar são característicos de infecção. Plantas de *Capsicum chinense* PI159236 reagem com a formação de lesão local, resposta de hipersensibilidade devido à presença do gene de resistência L³ (Kirita *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2003), e *Capsicum annuum* cv. Ikeda com a formação de sintoma mosqueado leve nas folhas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por até 21 dias e o progresso dos sintomas foi observado.

4.8 Uso de PMMoV para apresentação de epítipo da Dengue

O plasmídeo pCAMBIA-PMMoV possui tamanho superior a 10 kb, por isso escolheu-se criar um vetor intermediário menor para facilitar a manipulação de CP, onde os epítipos foram inseridos. A figura 10 ilustra esquematicamente o fluxo de trabalho para a construção de CP contendo o epítipo.

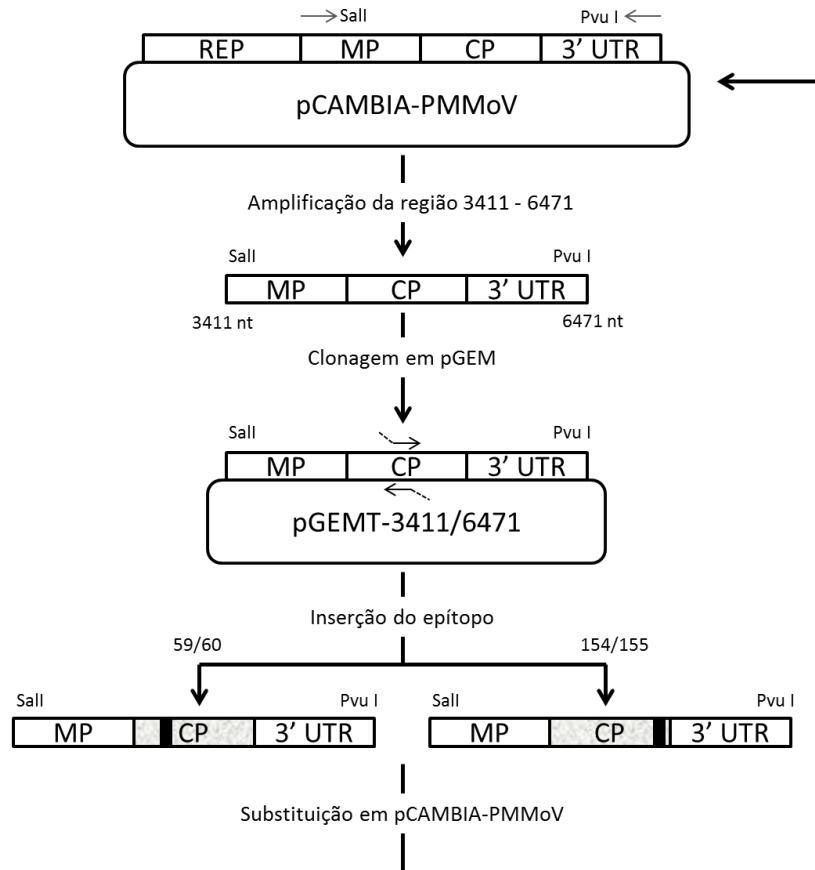


Figura 10. Representação esquemática do fluxo de clonagens para construir clone infectivo apresentando epítipo pela capa proteica. O plasmídeo pCAMBIA-PMMoV serve de molde para a amplificação da região entre os nucleotídeos 3411 a 6471, que possuem sítios de restrição únicos de Sall (borda esquerda) e PvuI (borda direita). O fragmento resultante é então clonado em pGEMT resultando no plasmídeo pGEMT-3411/6471, que é o molde para a adição por mutagênese sítio dirigida do epítipo entre os aminoácidos 59/60 e 154/155. A região flanqueada pelos sítios Sall e PvuI com *cp* contendo o epítipo é então substituída na sequência original.

Na região entre nucleotídeos 3411 a 6471 de pCAMBIA-PMMoV localizam-se as ORFs MP e CP e a 3' UTR viral. Os iniciadores PMMoV-Sal For e pCAM-Pvu Rev (Tabela 1) foram utilizados para a amplificação de 3411-6471, que foi separada em eletroforese, eluída e clonada em pGEM-T easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, gerando o clone pGEM-3411/6471PMMoV.

Namba e colaboradores (1989) demonstraram que CP possui três regiões potenciais para a apresentação de epítipo. As extremidades (N e C) e uma região de *loop* (aminoácidos 59 a 65). As posições entre os aminoácidos 59/60 e 154/155 foram previstas por análise de homologia da sequência de CP de PMMoV com CP de TMV, já que a estrutura terciária está depositada no “Protein Data Bank PDB” e permite análises estruturais de inserção e

modificação do ambiente molecular *in silico*. Dessa forma, selecionaram-se duas posições para inserção da sequência a ser expressa, entre os aminoácidos 59/60 (região de *loop*) e 154/155 (extremidade C).

O epítipo compreendido pelos domínios I/II da proteína E do DENV-1, derivado do multiepítipo *in tandem* desenhado por Maldaner e colaboradores (2013) (Fig. 11 A) possui 24 aminoácidos. Ele foi inserido na CP (Fig. 11 B) nas duas posições já descritas gerando duas proteínas distintas: entre os aminoácidos 59/60 (Fig. 11 C) e 154/155 (Fig. 11 D). O epítipo foi inserido por mutagênese sítio dirigida e os pares de iniciadores DI-59/60 e DI-154/155 (Tabela 1) possuíam cada um, senso e antissenso, 36 dos 72 nucleotídeos do epítipo. Foi realizada a otimização de códons para *N. benthamiana* segundo Nakamura (2007) para adequar os códons ao sistema de expressão. As clonagens foram realizadas como já descrito no item 4.5 e a sequência foi confirmada por digestão e sequenciamento.

A. Multiepítipo DI/II da proteína E de Dengue virus -DENV (Maldaner *et al*, 2013)

```

          DENV-4                      DENV-2
hhhhhhMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRggggMAKNKPTLDEELIKTEAKQPATLR
          DENV-3                      DENV-1
MAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRggggMAKNKPTLDIELLIKTEVTNPAVLR

```

B. PMMoV CP

```

MAYTVSSANQLVYLGSVWADPLELQNLCTSALGNQFQTQQARTTVQQFSDVWKT
IPTATVRFPATGFKVFRYNAVLDLVSALLGAFDTRNRIIEVENPQNPTTAETLDATRR
VDDATVAIRASISNLMNELVRGTGMY NQALFESASGLTWATTP

```

C. PMMoV CP DI 59/60

```

MAYTVSSANQLVYLGSVWADPLELQNLCTSALGNQFQTQQARTTVQQFSDVWKTIP
TAMAKNKPTLDIELLKTEVTNPAVLRVRFPATGFKVFRYNAVLDLVSALLGAFDTR
NRIIEVENPQNPTTAETLDATRRVDDATVAIRASISNLMNELVRGTGMYNQALFESAS
GLTWATTP

```

D. PMMoV CP DI 154/155

```

MAYTVSSANQLVYLGSVWADPLELQNLCTSALGNQFQTQQARTTVQQFSDVWKT
IPTATVRFPATGFKVFRYNAVLDLVSALLGAFDTRNRIIEVENPQNPTTAETLDATRR
VDDATVAIRASISNLMNELVRGTGMYNQALFESASGLTWAMAKNKPTLDIELLKTEV
TNPVLRTP

```

Figura 11. Sequência primária de aminoácidos. (A) Peptídeo multiepítipo de dengue sorotipos 1 a 4 DI/II da proteína E; (B) CP de PMMoV; (C) CP com epítipo DENV-1 domínios I/II de E na posição entre os aminoácidos 59/60; e (D) CP com epítipo DENV-1 domínios I/II de E na posição entre os aminoácidos 154/155.

As bactérias contendo os plasmídeos pGEM-3411/6471PMMoV e pCAMBIA-PMMoV foram crescidas e os DNA plasmidiais foram extraídos (de acordo com item 4.2). Os sítios de restrição SalI e PvuI que flanqueiam a sequência 3411 a 6471 de pCAMBIA-PMMoV foram utilizados para a substituição da sequência original por outra contendo o epítipo de DENV, gerando os plasmídeos pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 ou pCAMBIA-PMMoV-DI-154/155. As transformações em *E. coli* STBL4 foram realizadas conforme item 4.2 e a transformação e indução em *A. tumefaciens* GV3101 conforme item 4.6.

Os clones pCAMBIA-PMMoV-59/60 e -154/155 foram agroinoculados em folhas jovens de *N. benthamiana* (4 semanas) e mantidas em casa de vegetação. Após 14 dias, amostras de folhas inoculadas e sistêmicas foram coletadas e maceradas em tampão PBS 1 X e centrifugadas a 9400 . g por 5 min. O extrato foi submetido ao ensaio sorológico DIBA (de acordo com tópico 4.4) e à eletroforese por gel SDS-PAGE 10 % (Sambrook e Russel, 2001) utilizando o aparelho Mini-Protean® Cell (BioRad). Um dos géis foi corado e fixado com solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e *Coomassie 20 blue* 0,1 % por cerca de 2 horas e descorado com solução de 40 % metanol e 10 % de ácido acético, durante 2 horas, sob leve agitação. O outro gel foi utilizado para transferência das proteínas em membrana de nitrocelulose Hybond-C (GE Healthcare), para detecção de CP por *western blotting*. As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para a membrana de nitrocelulose com o auxílio de um *Transblotter* (BioRad) nas condições: 15 V, 150 mA por 15 min. Após a verificação da confirmação da transferência pelo marcador pré-corado PageRuler (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), a membrana foi submetida ao processo de bloqueio com a solução de PBS 1 X e 3 % de leite em pó desnatado por 40 min sob agitação.

Após a lavagem, a membrana foi incubada por 2 horas com PBS 1 X contendo anticorpo policlonal anti-multiepítipo de DENV feito em camundongo (1:200) (cedido por Dra. Franciele Maldaner) e anti-CP de PMMoV feito em coelho (1:3000) (item 4.4). Três passos de lavagem com PBS 1 X 0,1 % de Tween20 por 3 min foram realizados. A membrana foi incubada, por 1 h, com tampão PBS 1X e 3 % de leite em pó desnatado contendo o anticorpo secundário (anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina) na diluição de 1:5000 (Sigma Aldrich). As lavagens e as revelações foram feitas conforme descrito no item 4.4.

5. RESULTADOS

5.1 RT-PCR de PMMoV e clonagem em pCR4-TOPO e pUC19 para transcrição *in vitro*

O cDNA de PMMoV sintetizado pela transcriptase reversa foi utilizado como molde para a amplificação por PCR, gerando o fragmento denominado pT7-PMMoV de 6396 bp (Fig. 12).

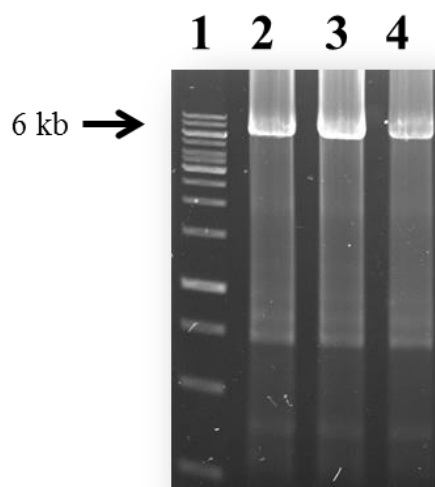


Figura 12. Amplificação do cDNA de PMMoV por PCR. Eletroforese em gel de agarose 1%. Poço 1: Marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); poços 2 a 4: Fragmento de cDNA genômico de PMMoV de 6356 bp.

Após a PCR, o fragmento pT7-PMMoV foi clonado no plasmídeo pCR4-TOPO gerando pCR4-PMMoV (10354 bp). Selecionou-se o plasmídeo recombinante pelo perfil de digestão gerado pela enzima de restrição EcoRI. Várias colônias foram testadas, porém apenas dois clones mostram o perfil esperado. A Figura 13 mostra um dos dois clones pCR4-PMMoV que apresentou o perfil de restrição correto, o qual foi confirmado a partir da presença dos fragmentos pT7-PMMoV (6369 bp) e pCR4-TOPO (3985 bp) (Fig. 13).

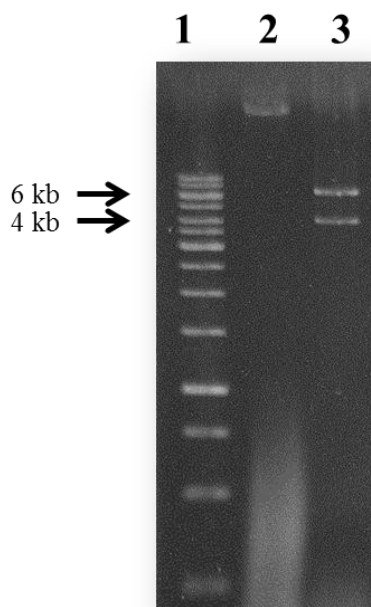


Figura 13. Perfil de restrição do clone pCR4-PMMoV com EcoRI. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o os fragmentos assinalados pelas setas. Poço 1: marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); Poço 2: DNA plasmidial pCR4-PMMoV não digerido; Poço 3: fragmento correspondente a pT7-PMMoV (6369 bp) e pCR4-TOPO (3985 bp).

O plasmídeo pCR4-PMMoV possui duas sequências promotoras T7 (pT7): um inserido pelo iniciador senso na extremidade 5’ viral e outro na orientação reversa proveniente do plasmídeo pCR4-TOPO. Objetivando eliminar o pT7 endógeno de pCR4TOPO, a sequência pT7-PMMoV foi subclonada em pUC19, que não possui esse promotor.

Para a remoção do pT7 endógeno, pCR4-PMMoV foi tratado com as enzimas de restrição BamHI e MluI. O fragmento alvo dessa digestão, pT7-PMMoV, foi separado por eletroforese, eluído e ligado em pUC19, que foi tratado com as mesmas enzimas de restrição. Além disso, pUC foi submetido a defosforilação para evitar que suas extremidades se auto ligassem durante o processo de ligação de pT7-PMMoV a pUC19. O plasmídeo pUC19-PMMoV é o resultado da correta ligação.

A figura 14 mostra a confirmação da clonagem de pT7-PMMoV em pUC19 que foi realizada a partir da digestão de pUC19-PMMoV com a enzima EcoRI. Esta enzima por possuir um sítio único tinha a capacidade de linearizar o plasmídeo, cujo tamanho esperado era 9040 bp. Dois clones foram obtidos com o perfil esperado de digestão enzimática (Fig. 14).

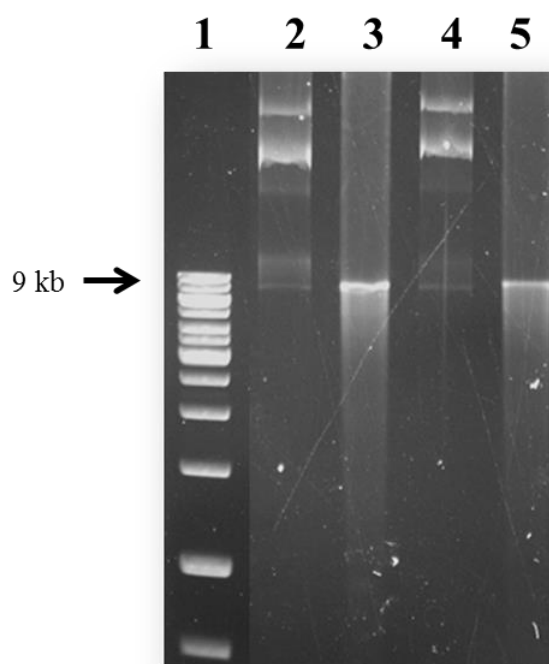


Figura 14. Perfil de restrição dos clones pUC19-PMMoV com enzima de restrição EcoRI. Eletroforese em gel de agarose 1%. Poço 1: marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); Poço 2: DNA plasmidial correspondente ao clone 1 de pUC19-PMMoV não digerido; Poço 3: fragmento correspondente ao clone 1 de pUC19-PMMoV linearizado com EcoRI (9049 bp). Poço 4: DNA plasmidial correspondente ao clone 2 de pUC19-PMMoV não digerido; Poço 5: fragmento correspondente ao clone 2 de pUC19-PMMoV linearizado com EcoRI (9049 bp).

Para a realização da transcrição *in vitro* run-off, os dois clones pUC19-PMMoV foram linearizados e utilizados para a síntese dos transcritos. Os transcritos obtidos foram inoculados em três plantas de *N. benthamiana*. Após 12 dias os sintomas de deformação foliar foram observados em uma planta inoculada com transcritos de PMMoV.

Embora dois clones tenham sido transcritos, apenas foi capaz de induzir em uma planta de *N. benthamiana* o sintoma típico de infecção por PMMoV. O extrato de folhas dessa planta foi submetido às análises sorológicas e de microscopia eletrônica. A Figura 15 mostra o ensaio sorológico e de microscopia eletrônica. O teste sorológico DIBA (Fig. 15 A) foi realizado para a detecção da CP de PMMoV na folha sintomática. A amostra testada reagiu positivamente com o antissoro para PMMoV de modo similar ao controle positivo, planta inoculada com o isolado PMMoV BR-DF01. A micrografia eletrônica (Figura 15 B) mostra agregados de partículas de PMMoV, demonstrando a alta produção de partículas virais de PMMoV.

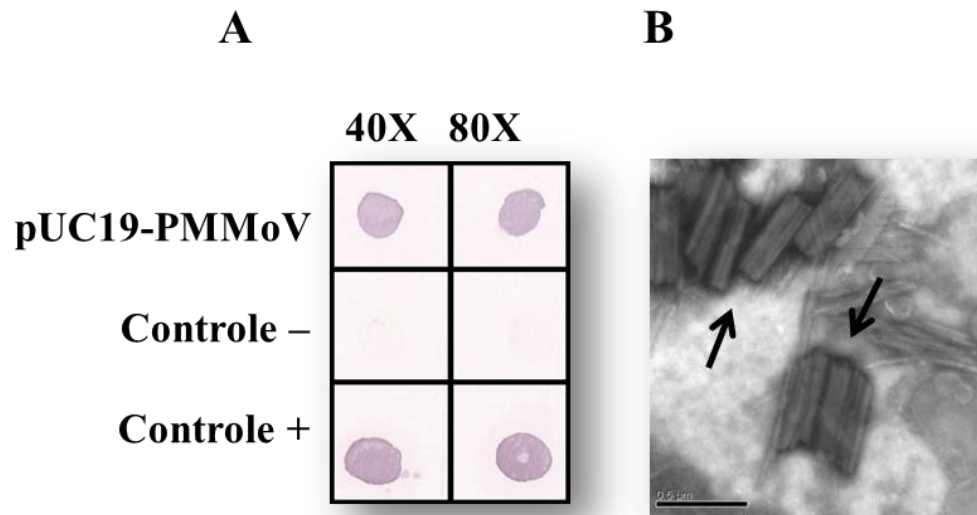


Figura 15. Análise sorológica e de microscopia eletrônica de extrato de folha de *N. benthamiana* inoculada com transcrito de PMMoV. (A) DIBA de extrato de folha inoculada, com as diluições de 40X e 80X (p/v), mostra que extratos foliares inoculados com o transcrito reagiu de forma semelhante ao controle positivo (planta inoculada com PMMoV BR-DF01), e o controle negativo de *N. benthamiana* (não inoculada); (B) Micrografia eletrônica mostrando vírions agregados (setas) em preparação *leaf-dip* de tecido inoculado com o transcrito de PMMoV, escala 0,3 μm .

5.2 Construção do clone agroinfectivo pCAMBIA-PMMoV

Para a construção de clone agroinfectivo de PMMoV, utilizou-se a estratégia de *overlap-extension PCR*. A Figura 16 A mostra os fragmentos amplificados correspondentes ao PMMoV (poço 2) e ao pCAMBIA 0390-p35S-ribo (7560 bp) (poço 3). O fragmento resultante da fusão pCAMBIA-PMMoV (13916 bp) é mostrado pela figura 16 B.

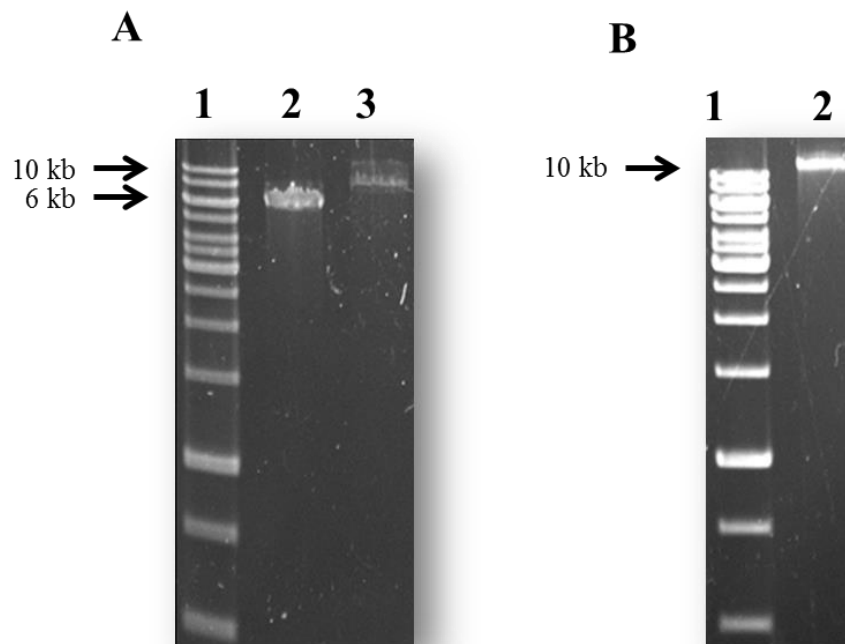


Figura 16. Amplificação do cDNA de PMMoV e pCAMBIA-p35S-ribo e *overlap-extension PCR* desses fragmentos. Eletroforese em gel de agarose 1%. (A) Fragmentos gerados pela amplificação separada de cada cDNA a ser fusionado, as setas indicam os fragmentos obtidos. Poço 1: marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); Poço 2: PMMoV (6356 bp); Poço 3: pCAMBIA-p35S-ribo (7560 bp). (B) Fragmento obtido a partir da *overlap-extension PCR*, indicado por seta. Poço 1: marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); Poço 2: pCAMBIA-PMMoV (13916 bp) gerado pela *overlap-extension PCR*.

O maior desafio foi a obtenção de clones estáveis em *E. coli*. Primeiramente a construção pCAMBIA-PMMoV foi transformada em quatro cepas (DH5 α , DH10B, OminiMax e STBL4), utilizando protocolo de transformação por eletroporação. A temperatura de crescimento inicial foi 37 °C por até 16 h de incubação sob 180 rpm. Porém, quando o padrão de restrição dos clones era analisado com KpnI e SacII, como predito *in silico* (Fig. 17 A), o perfil não correspondia ao esperado. As condições de crescimento foram alteradas para temperatura de 30 °C por até 48 h. STBL4 foi mantida como cepa preferencial devido às recomendações de uso para plasmídeos instáveis, pelo fabricante. STBL4 contendo pCAMBIA-PMMoV tiveram as condições de crescimento modificadas, com isso, sete clones foram selecionados de acordo com o padrão de restrição correto (Fig. 17 B).

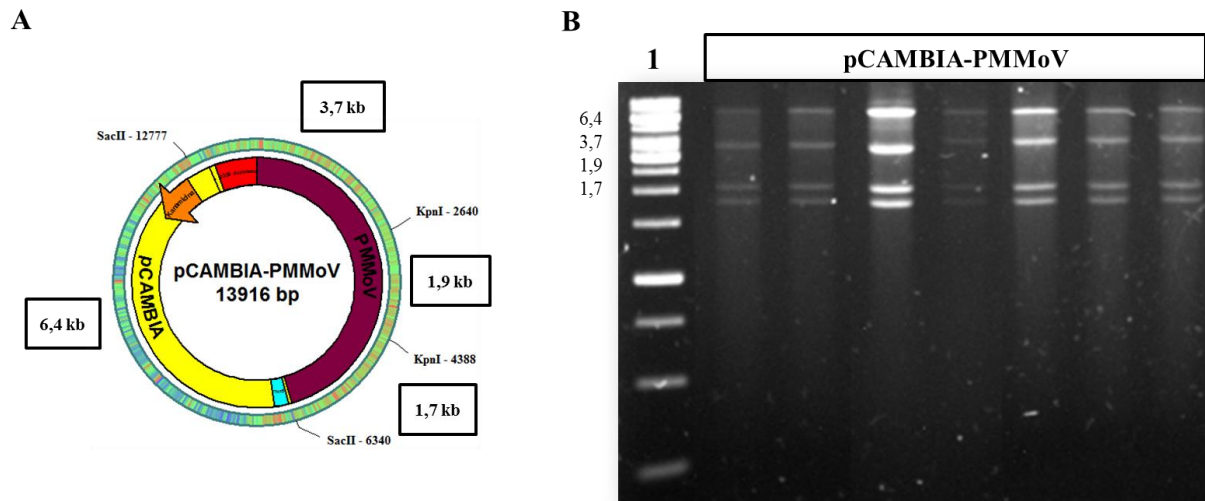


Figura 17. Perfil por digestão com enzimas de restrição de clones pCAMBIA-PMMoV. Eletroforese em gel de agarose 1 %. (A) Perfil de enzimas de restrição identificado *in silico*, do tratamento do plasmídeo pCAMBIA-PMMoV com KpnI e SacII mostrando os tamanhos de fragmentos esperados, 6,4, 3,7, 1,9 e 1,7 kb. (B) Perfil correto de digestão de pCAMBIA-PMMoV transformado em STBL4. Poço 1: marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); Poços 2 a 7: digestão dos clones apresentando os tamanhos esperados.

Sete clones pCAMBIA-PMMoV foram transformados em *A. tumefaciens* GV3101. Cinco colônias de cada clone foram submetidas à PCR que foi realizado com a finalidade de confirmar a presença de cDNA de PMMoV em *A. tumefaciens*. A figura 18 mostra a amplificação da CP (473 bp), confirmada a amplificação de CP dos clones pCAMBIA-PMMoV 6, 7 e 8 (Fig. 18 A); clones 14, 17 e 18 (Fig. 18 B); e clone 22 (Fig. 18 C).

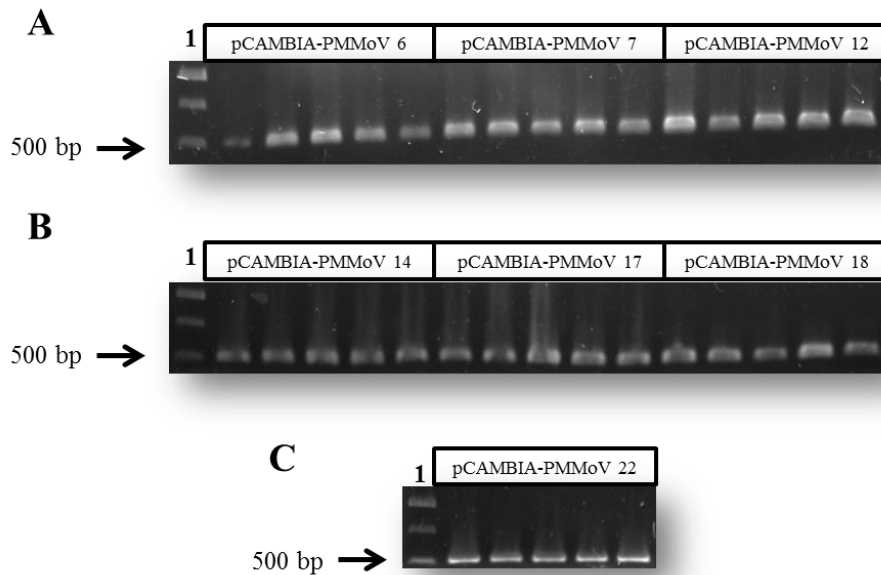


Fig. 18. Amplificação de CP por PCR de colônias de *A. tumefaciens* contendo clones pCAMBIA-PMMoV. Eletroforese em gel de agarose 1 %. Cinco colônias, de cada um dos sete clones de pCAMBIA-PMMoV transformados em *A. tumefaciens*, foram submetidas a PCR. Em todos os géis o poço 1 é marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); (A) Poços 2 a 6: clone 6 de pCAMBIA-PMMoV; Poços 7 a 11: clone 7 de pCAMBIA-PMMoV; e Poços 12 a 16: clone 12 de pCAMBIA-PMMoV. (B) Poços 2 a 6: clone 14 de pCAMBIA-PMMoV; Poços 7 a 11: clone 17 de pCAMBIA-PMMoV; e Poços 12 a 16: clone 18 de pCAMBIA-PMMoV. (C) Poços 2 a 6: clone 22 de pCAMBIA-PMMoV.

O clone 1 de cada um dos sete selecionados, foi multiplicado, induzido com acetosiringona e infiltrado em folhas jovens de *N. benthamiana* de apenas uma planta. Após 12 dias, os sintomas foram observados. A figura 19 A mostra diferentes intensidades e variação dos sintomas: enrugamento, distorção, deformação e mosaico. Deformação foliar foi causada pelos clones 6, 14, 17 e 18; mosaico pelos clones 14, 18 e 22; enrugamento foi observado pelos clones 6, 14, 17, 18 e 22; e deformação pelo clone 17. Os clones 7 e 12 não causaram sintomas (dado não mostrado). A figura 19 B mostra a vista superior de folhas de uma planta agroinoculada com o clone 18 evidenciando o enrolamento e deformação de folhas apicais não inoculadas. A figura 19 C mostra detalhe evidenciando sintomas de deformação foliar, bolhosidade e clorose em uma folha apical não inoculada causados pelo clone 6.

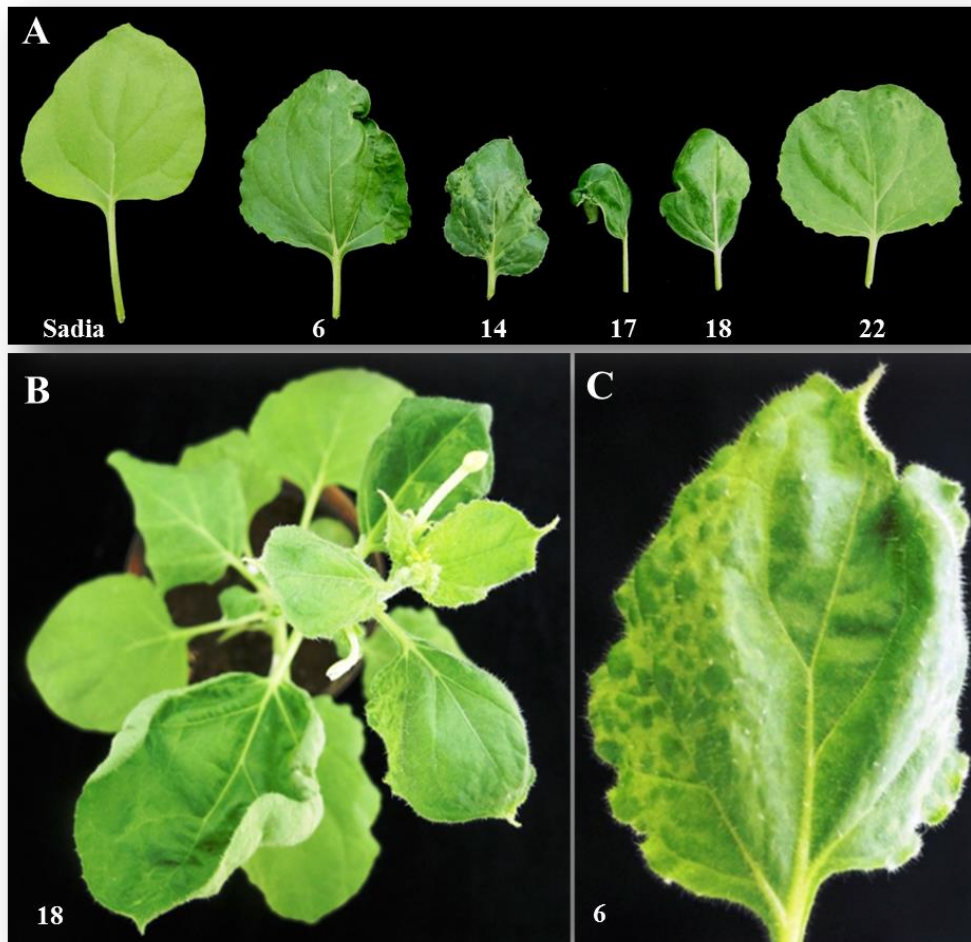


Figura 19. Sintomas induzidos pela agroinoculação de pCAMBIA-PMMoV em folhas de *N. benthamiana*. (A) À esquerda folha não inoculada, seguida de folhas apicais não inoculadas de plantas agroinoculadas com os clones 6, 14, 17, 18, e 22, apresentando distorção, enrugamento e deformação. (B) Vista superior de uma planta infiltrada, mostrando distorção das folhas apicais não inoculadas. (C) Detalhe de uma folha sistemicamente infectada evidenciando bolhosidade, clorose e deformação.

Extratos de folhas sintomáticas foram utilizados para sensibilizar membrana de nitrocelulose para a realização de teste de detecção por sorologia (DIBA). A figura 20 mostra DIBA de extratos de plantas agroinoculadas, em que cinco dos sete clones pCAMBIA-PMMoV reagiram positivamente e apresentaram níveis de reação semelhante ao de PMMoV BR-DF01.

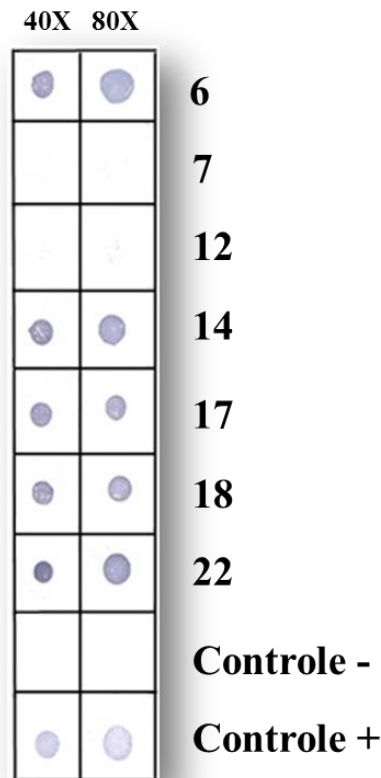


Figura 20. DIBA de extrato de plantas agroinoculadas com pCAMBIA-PMMoV. A membrana foi sensibilizada com extrato nas concentrações 40 X e 80 X (p/v). Cinco (pCAMBIA-PMMoV 6, 12, 17, 18 e 22) de sete clones apresentaram reação positiva como o controle positivo (PMMoV BR-DF01). Os clones pCAMBIA-PMMoV 7 e 12 não foram infectivos, por comparação com o controle negativo.

5.3 Inoculação de PMMoV recuperados em diferentes plantas indicadoras

Três fontes de PMMoV recuperados foram utilizadas nesse ensaio: (1) tipo selvagem de PMMoV, (2) transcrito *in vitro* e (3) agroinoculados com pCAMBIA-PMMoV, todos previamente confirmadas e mantidas a -80 °C.

Não houve diferenças na resposta dos hospedeiros quanto à fonte viral. As plantas foram mantidas por até 30 dias em casa de vegetação e a progressão dos sintomas foi observada. Mosqueado, mosaico e distorção das folhas apicais não inoculadas foram observadas em todas as plantas de *N. benthamiana* inoculadas com as três fontes de PMMoV. Lesões necróticas locais de hipersensibilidade foram observadas somente em folhas inoculadas de *C. chinense* PI159236. Não foram observadas sintomas em *C. annuum* cv. Ikeda, porém a presença de partículas virais foi visualizada por microscopia eletrônica (dados não mostrados).

5.4 Inserção do gene do epítipo de vírus da Dengue no gene *cp* de PMMoV

A região genômica do vírus (nt 3411-6471) foi escolhida por estar flanqueada pelos sítios de restrição das enzimas *SalI* e *PvuI*. O fragmento 3411-6471 (3060 bp) foi amplificado com sucesso (Fig. 21 A). Seguiu-se a clonagem em pGEMT-easy para facilitar a inserção do epítipo, resultando em um plasmídeo 7 kb menor em relação a pCAMBIA-PMMoV. A Figura 21 B mostra o perfil de restrição de pGEMT-3411/6471 (6075 bp) tratado com *PstI*, o qual apresentou dois fragmentos (4,7 e 1,3 kb) como esperado.

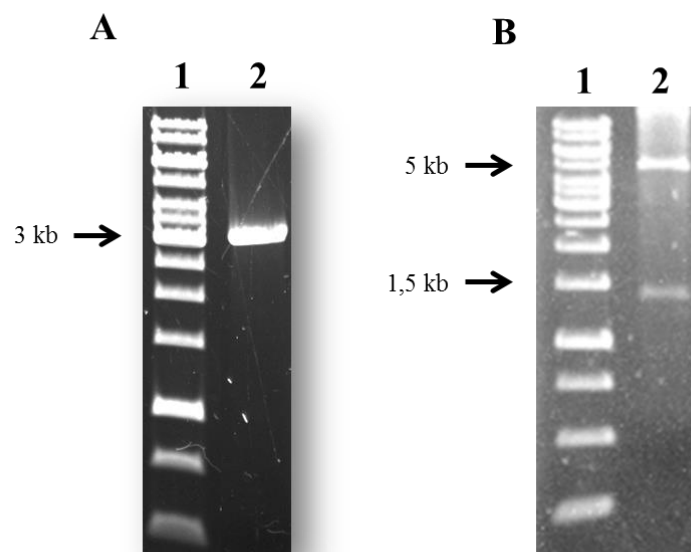


Fig. 21. Construção do plasmídeo intermediário pGEM-3411/6471PMMoV. Gel em eletroforese de agarose 1 %, as setas indicam os fragmentos obtidos. (A) Poço 1: marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); Poço 2: amplificação por PCR de parte da sequência (nt 3411-6471) de pCAMBIA-PMMoV, flanqueada pelos sítios *SalI* e *PvuI*, cujo tamanho é 3060 bp. (B) Poço 1: marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); Poço 2: perfil de restrição do plasmídeo pGEM-3411/6471PMMoV tratado com a enzima *PstI*, os fragmentos obtidos foram 4,7 e 1,3 kb, como esperado.

Para confirmar a inserção do epítipo, por alteração do tamanho da ORF CP, colônias de *E. coli* DH5 α transformadas com pGEM-3411/6471PMMoV-DI-59/60 e -154/155 foram submetidas a PCR. As colônias que apresentaram as bandas de DNA maiores na eletroforese foram selecionadas.

A figura 22 mostra o padrão de amplificação da PCR de colônias da região compreendida pela ORF CP, 3' UTR e ribozima. Em 22 A é possível distinguir as colônias

que tiveram o epítipo inserido (795 bp) na posição 59/60 do controle sem o epítipo (723 bp) e 22 B mostra o PCR das colônias com o epítipo inserido (795 bp) na posição 154/155 e o controle sem o epítipo (723 bp).

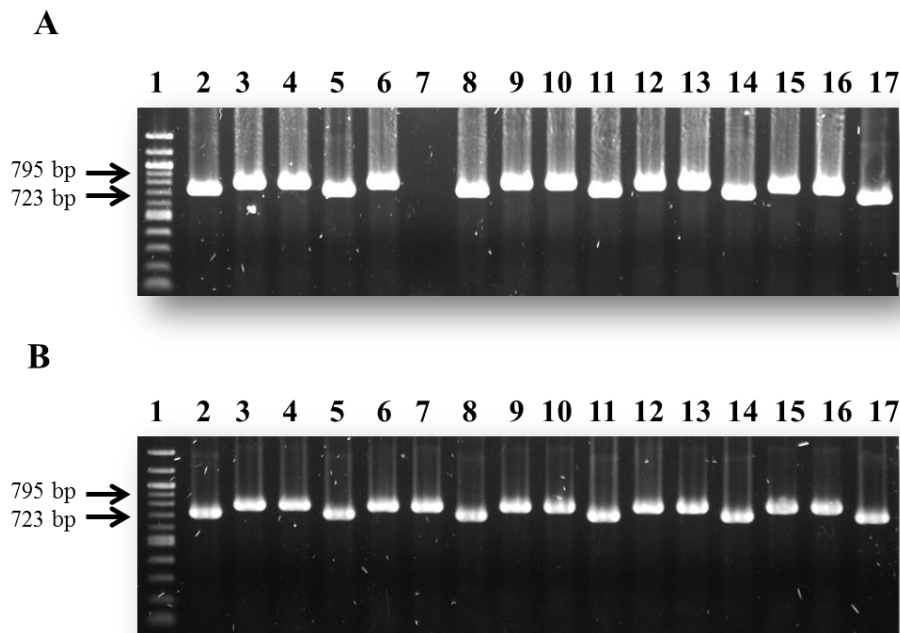


Figura 22. Incorporação do epítipo no plasmídeo pGEM-3411/6471PMMoV por PCR de colônias. O controle de tamanho é CP não modificada, possibilitando a visualização da variação no tamanho correspondente à adição de 72 nucleotídeos. O poço 1 de ambos os géis é o marcador de tamanho molecular “100 bp DNA ladder” (NEB). (A) Eletroforese em gel de agarose mostrando a inserção do peptídeo entre os aminoácidos 59/60; os poços 2, 5, 8, 11, 14 e 17 mostram fragmento amplificado correspondente ao controle sem epítipo (723 bp); e os poços 3, 4, 6, 9,10, 12, 13, 15 e 16 mostram fragmento amplificado correspondente à adição do epítipo na CP (795 bp). (B) Eletroforese em gel de agarose mostrando a posição de inserção do epítipo entre os aminoácidos 154/155: os poços 2, 5, 8, 11, 14 e 17 mostram fragmento amplificado correspondente ao controle sem epítipo (723 bp); e os poços 3, 4, 6, 7, 9,10, 12, 13, 15 e 16 mostram fragmento amplificado correspondente à inserção do epítipo na CP (795 bp).

Os clones 1 tanto de pGEM-3411/6471PMMoV-DI-59/60 quanto de -154/155 foram escolhidos para substituição da região contendo o epítipo na análoga de pCAMBIA-PMMoV. Os três plasmídeos (pGEM-3411/6471PMMoV-DI-59/60, -154/155 e pCAMBIA-PMMoV), foram tratados com as enzimas de restrição SalI e PvuI, para que a região delimitada por esses sítios nas construções contendo o epítipo, pudessem ser substituídas em pCAMBIA-PMMoV. Os plasmídeos resultantes da substituição foram pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 (13988 bp) e pCAMBIA-PMMoV-DI-154/155 (13988 bp). O padrão de restrição com as enzimas KpnI e

SacII, predito por análise *in silico*, confirmou a substituição da sequência 3411/6471PMMoV-59/60 (Fig. 23 A) e -154/155 (Fig. 23 B) em pCAMBIA-PMMoV.

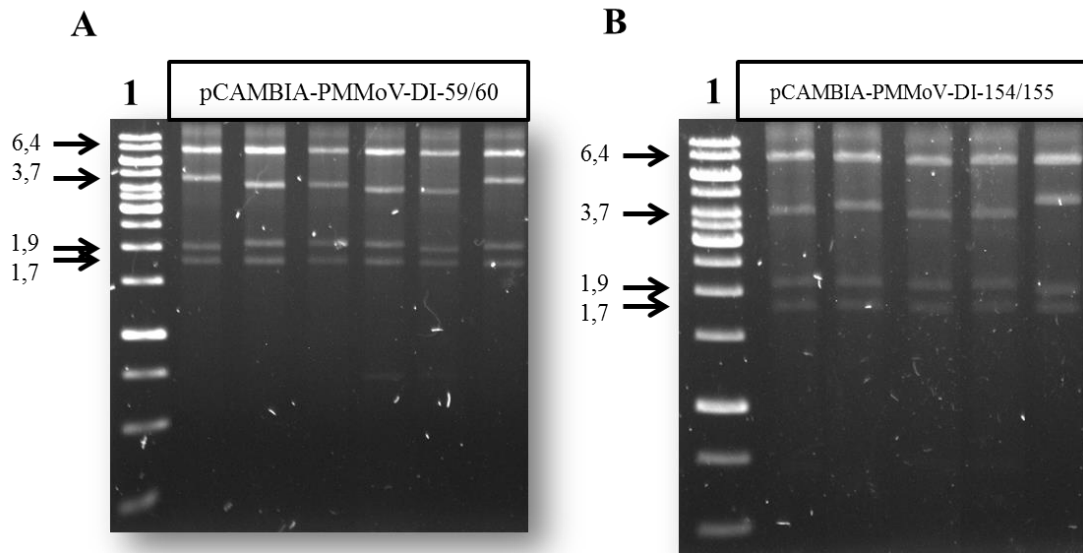


Figura 23. Perfil de pCAMBIA-PMMoV tratada por enzimas de restrição cuja sequência de CP teve epítipo DENV-1 adicionado, nos dois géis o perfil dos fragmentos correspondia ao esperado de acordo com análises *in silico*. (A) poço 1: marcador de massa molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific), e clones pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60. (B) poço 1: marcador de massa molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific), e pCAMBIA-PMMoV-DI-154/155.

Os plasmídeos pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e -154/155 confirmados, foram transformados em *A. tumefaciens* GV3101, e colônias foram submetidas à PCR para confirmação da presença de CP contendo os epítipos.

A figura 24 mostra os fragmentos amplificados a partir de colônias de agrobactérias transformadas com pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 (581 bp) (poços 2 a 7), cujos iniciadores foram DI-59/60 For e PMMoV-ribo Rev; e a partir de colônias transformadas com pCAMBIA-PMMoV-DI-154/155 (poços 8 a 12) (498 bp). O par de iniciadores utilizados nessa reação foram e PMMoV-CP For e 154/155 Rev.

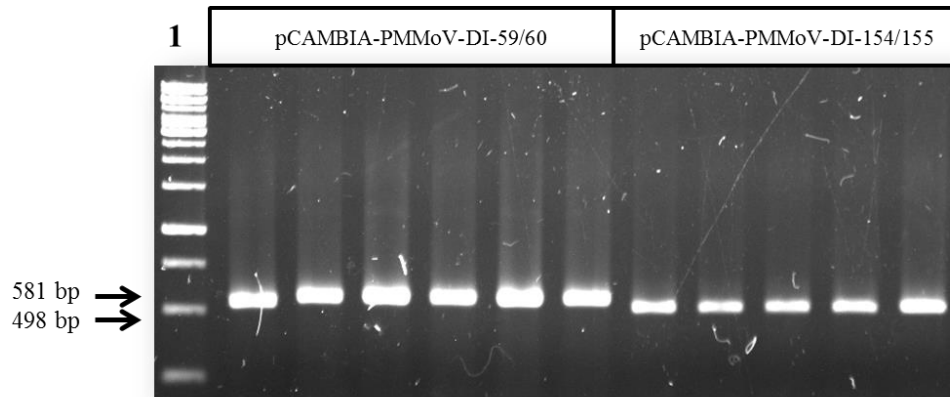


Figura 24. PCR de colônias de *A. tumefaciens* para confirmação da transformação com pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e -154/155. Eletroforese em gel de agarose 1 %. (A) Poço 1: marcador de tamanho molecular “1 kb DNA ladder” (Thermo Scientific); Poços 2 a 7: pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 (581 bp); Poços 8 a 12: pCAMBIA-PMMoV-DI-154/155 (498 bp).

A partir de análises de sequenciamento, dois clones (4 e 9) de pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e quatro (4, 6, 8 e 11) de -154/155 foram utilizados para ensaio em planta. As colônias foram crescidas, induzidas com acetosiringona, agroinoculadas em folhas jovens *N. benthamiana* (4 semanas) e mantidas em casa de vegetação por 12 dias.

O primeiro ensaio realizado para confirmação da presença de CP contendo epítipo foi DIBA (Fig. 25), utilizando os anticorpos policlonais anti-PMMoV e anti-multiepítipo da dengue. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-PMMoV, sendo 25 A folhas inoculadas e 25 B folhas apicais não inoculadas. É possível notar que o extrato de planta inoculada com o clone 8 não reagiu, mas as demais plantas apresentaram reação positiva, principalmente nas folhas sistemicamente infectadas (B) em relação às inoculadas (A), sugerindo que o vírus se espalhou sistemicamente. Já as membranas contidas na figura 25 C e D foram incubadas com anticorpo anti-multiepítipo de dengue. Diferente do observado anteriormente, os clones reagiram mais positivamente nas folhas inoculadas (C) do que nas sistêmicas (D). Não houve diferença entre as reações.

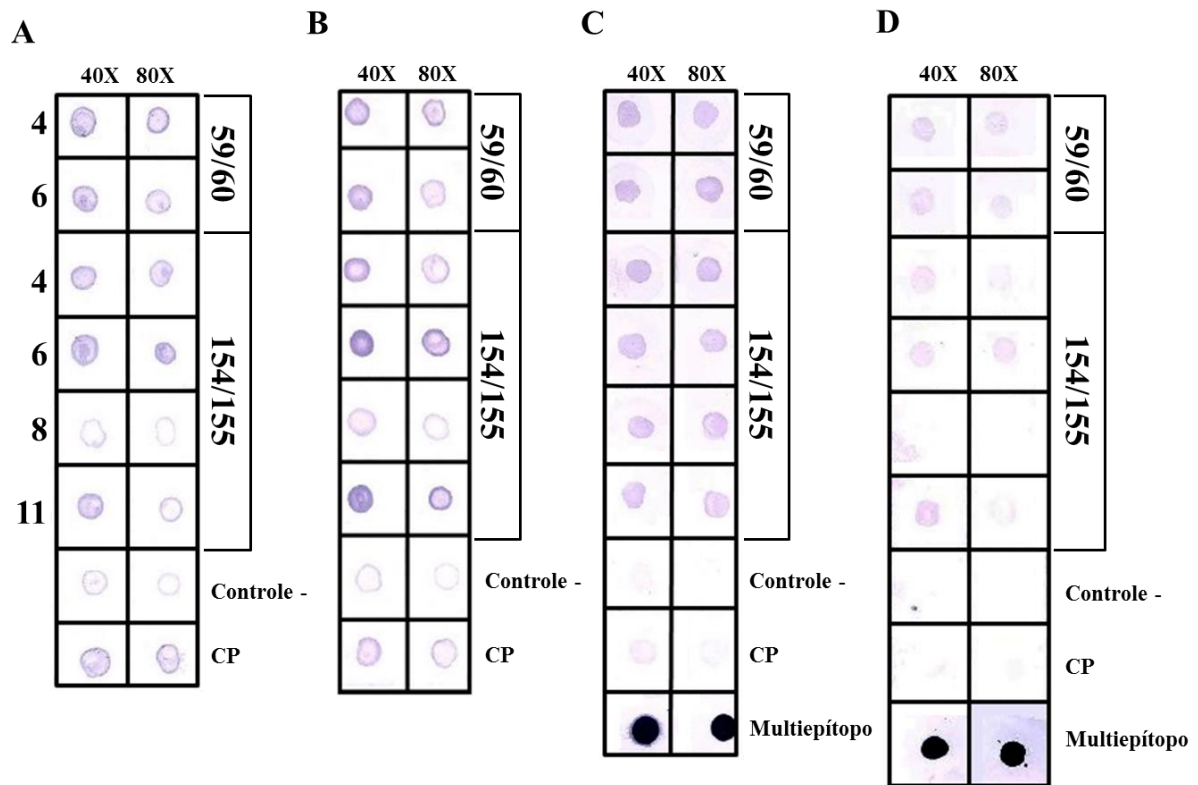


Figura 25. DIBA realizado com extrato de plantas agroinoculadas com pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e - 154/155. Os controles são: *N. benthamiana* não inoculada (controle -); pCAMBIA-PMMoV (controle +); e proteína purificada expressada em *E. coli* (multiépítopo). Extrato de folhas com pCAMBIA-PMMoV-DENV nas posições 59/60 e 154/155. Extrato de folhas inoculadas (A) e apicais não inoculadas (B) reagiram contra anticorpo policlonal anti-CP. Extrato de folhas inoculadas (C) e apicais não inoculadas (D) reagiram contra anticorpo policlonal anti-multiépítopo.

Para descartar a possibilidade de reação inespecífica dos anticorpos policlonais com os extratos de plantas agroinoculadas e detectar o tamanho das CPs contendo os epítomos, foram realizados SDS-PAGE e *Western blotting* com antissoro policlonal anti-PMMoV. No SDS-PAGE apenas o controle positivo pCAMBIA-PMMoV foi detectado (poço 3). No *Western blotting* o controle foi aplicado em concentração igual às amostras (poço 10) e diluído 10 X (poço 3). O ensaio das folhas apicais não inoculadas (Fig. 26 C e D) se comportou como o anterior, ambos não detectaram CP-DENV-1 (poços 4 a 9) cujo tamanho predito era 19,7 kDa, apenas o controle positivo CP (17 kDa) foi detectável (poço 3).

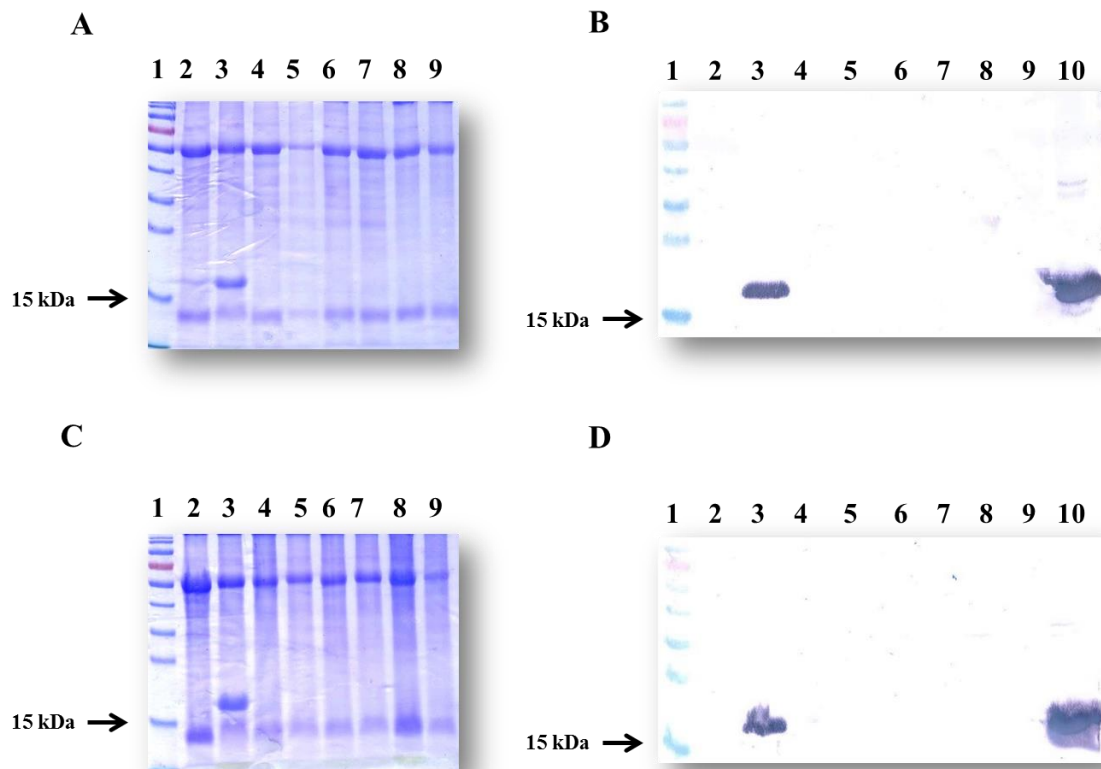


Figura 26. SDS-PAGE e *Western blotting* dos extratos de folhas de *N. benthamiana* agroinoculadas com pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e -154/155. A seta indica o tamanho de banda 15 kDa. Poço 1: marcador de massa proteica “Pre-stained PageRuler” (Thermo); Poço 2: extrato de planta não agroinoculada (controle negativo); Poço 3: extrato de planta agroinoculada com pCAMBIA-PMMoV (controle positivo); Poços 4 e 5: extrato de plantas agroinoculadas com pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 clones 4 e 5; Poços 6 a 9: extrato de plantas agroinoculadas com pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 clones 4, 6, 8 e 11. (A) SDS-PAGE de folhas infiltradas. (B) *Western-blotting* de folhas infiltradas, sendo o poço 10 controle positivo e poço 3 controle positivo diluído 10 X. (C) SDS-PAGE de folhas apicais não inoculadas. (D) *Western-blotting* de folhas apicais não inoculadas, sendo poço 10 controle positivo e poço 3 controle positivo diluído 10 X.

6. DISCUSSÃO

O vetor baseado em PMMoV tem sido largamente utilizado para a elucidação de mecanismos de resistência a tobamovírus em plantas. Em geral, emprega-se a estratégia de produção de vírus infectivo através da transcrição *in vitro* de cDNAs, porém há exemplos de uso de vetores binários para agroinoculação (Tomita *et al.*, 2011). Os grupos que desenvolveram cDNAs infectivos de PMMoV utilizaram a técnica da segmentação do

genoma viral anterior à construção do genoma completo (Hamada *et al.*, 2002; Tomita *et al.*, 2011). Com essa estratégia, existem maiores chances de ocorrência de mutações que podem alterar o perfil de infectividade ou as propriedades biológicas dos clones. Dessa forma, a viabilização de um protocolo de construção de um clone infectivo com a clonagem do genoma completo de uma forma simplificada é de grande interesse e poderá facilitar e acelerar o processo de construção dos clones.

Existem duas formas principais empregadas na construção de clones infectivos, por transcrição *in vitro* e por agroinoculação de vetores binários contendo cDNA viral. A transcrição *in vitro* é empregada a partir da inoculação de transcritos de cDNAs virais e os resultados podem ser gerados em intervalo menor de tempo comparado a outras metodologias. Os promotores para as RNA polimerases podem ser inseridos no iniciador senso e existem kits comerciais de transcrição. Por ter tamanho reduzido, o plasmídeo utilizado para a transcrição *in vitro* de PMMoV foi pUC19.

Uma das limitações da metodologia de transcrição *in vitro* é a presença de RNases no ambiente e na célula. A inoculação de gRNA desprotegido, por haver ausência de CPs para formar o vírion, facilita a ação dessas enzimas degradativas, o que não acontece durante uma infecção natural em que ocorre a desmontagem co-traducional da partícula (Turpen, 1999). Isso pode resultar em uma queda da eficiência de infecção dos transcritos e conseqüentemente diminuição da taxa de recuperação viral. Por esses e outros fatores a construção de clone agroinfectivo é geralmente priorizada.

Para não restarem nucleotídeos não virais na extremidade 3', no método de transcrição *in vitro*, foi utilizado o sítio de restrição de MluI por se tratar de uma enzima cuja protrusão é da extremidade 5'. No clone agroinfectivo, a inserção de sequência ribozima (Turpen *et al.*, 1993) fusionada com a extremidade 3' do vírus garantiu a manutenção correta dessa extremidade viral.

A construção pUC19-PMMoV teve o pT7 inserido com sucesso pelo iniciador senso e o sítio MluI garantiu a fidelidade da extremidade 3' viral. Quando inoculados em folhas jovens de plantas esses transcritos foram infectivos e infectaram sistemicamente a planta. Apenas um clone submetido à transcrição *in vitro* foi recuperado. No entanto, manipular transcritos é trabalhoso e inviável para aplicação biotecnológica em larga escala.

O cDNA de PMMoV foi clonado por *overlap-extension PCR* em um vetor binário derivado de pTRV2-MCS para permitir a expressão transiente do vírus. Em dois passos de PCR, ambos os fragmentos foram unidos na região da ribozima. Não houve inserção de nucleotídeos não virais nas extremidades 5' e 3' o que é importante para manter a

infectividade viral e características biológicas. A agroinoculação, comparada à transcrição *in vitro*, é um processo que permite maior eficiência de transcrição, é mais fácil de aumentar a escala e possui menor valor de produção agregado.

A geração de pCAMBIA-PMMoV por fusão não foi um passo de dificuldade elevada, porém cuidados extras foram tomados durante a manipulação do mesmo. No passo de eluição e purificação do fragmento, o kit utilizado foi escolhido por apresentar um protocolo menos invasivo no passo de eluição, em que o DNA é separado da resina. Além disso, para minimizar danos físico-químicos, agarose com menor temperatura de derretimento foi utilizada.

É necessário ressaltar que antes da modificação das condições de crescimento bacteriano, inúmeras tentativas foram em vão. Várias adaptações de diferentes protocolos de clonagem e transformação bacteriana foram realizadas sem sucesso

Nas metodologias de construção de clones infectivos empregadas foi observada a recuperação dos clones comparável a do vírus selvagem, dado mostrado pelos testes sorológicos (Figs. 15 A e 20). Para confirmar o perfil de infectividade dos clones, ensaios de inoculação em plantas de diferentes graus de suscetibilidade ao vírus foram realizados. *N. benthamiana* é uma planta suscetível a PMMoV, e foi detectada infecção sistêmica. *C. chinense* PI159236 apresentou lesões necróticas de hipersensibilidade devido à presença do gene L³ que confere resistência ao PMMoV. *C. annuum* cv. Ikeda foi utilizada por ser suscetível a tobamovírus. Embora não tenha manifestado sintomas, foi possível detectar partículas virais por microscopia eletrônica em folhas sistêmicas.

Rhee e colaboradores (2014) construíram clone agroinfectivo do tobamovírus *Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV) com passos simplificados, assim como o proposto aqui. Ao clonar o cDNA de CFMMV em vetor binário, o p35S foi inserido em um passo independente de subclonagem, enquanto o presente trabalho fez a clonagem por *overlap-extension PCR* em apenas duas PCRs. A adição de passos na clonagem aumenta a probabilidade de surgimento de mutações deletérias na sequência viral, por isso a simplificação da metodologia se faz necessária.

O uso de plantas como biorreatores é uma das alternativas mais eficientes e de menor custo para a produção de proteínas recombinantes em larga escala. Uma grande vantagem desse método é a produção de proteínas no sistema de expressão eucariótico, em que as proteínas expressadas sofrem modificações pós-traducionais, que podem ser essenciais para a sua funcionalidade (Hefferon, 2012; Yusibov *et al.*, 1999).

O gene escolhido para apresentar os epítomos foi CP porque ele possui características intrínsecas como a automontagem, o elevado nível de expressão e poder atuar como molécula carregadora de peptídeos antigênicos lineares e conformacionais (Yusibov *et al.*, 1999). Além disso, Namba e colaboradores (1989) já tinham demonstrado posições potenciais de inserção de epítomos na CP do TMV, facilitando o desenho racional e extrapolação do modelo para o PMMoV.

A proposta desse projeto era apresentar os epítomos em duas posições na CP do PMMoV, uma na extremidade C e outra na região de *loop* entre os aminoácidos 59 e 60. No entanto, existem relatos em que a inserção de sequências heterólogas na CP pode resultar na interferência da montagem do vírion, na perda da infecção sistêmica e na indução de resposta de hipersensibilidade (Bendahmane *et al.*, 1999).

A dengue é uma doença comum no Brasil e o país carece de kits nacionais que atendam à demanda. Para desenvolver uma ferramenta capaz de auxiliar no diagnóstico e usar um vírus de planta, a construção de PMMoV com CP apresentando múltiplos epítomos de dengue foi proposta. Essa alternativa possui especificidade promissora frente aos kits existentes, porque vírus de planta não são patógenos de humanos e animais, logo não há produção de anticorpos contra os mesmos, que poderiam resultar em inespecificidade do teste.

Para validar o uso de PMMoV como vetor viral, e demonstrar uma aplicação biotecnológica por meio de apresentação, o epítomo de DENV-1 proteína E domínios I/II *in tandem* foi inserido por mutagênese sítio dirigida na sequência do gene *cp*. Os epítomos foram inseridos na sequência dos iniciadores para evitar mutações deletérias na ORF. Hamada e colaboradores (2002) desenvolveram clones infectivos com mutações em CP, que foi previamente modificada, análogo a esse método foi a construção do cDNA infectivo com os epítomos de DENV-1. As modificações foram realizadas em pGEMT-easy que é um vetor mais fácil de manipular.

Apesar da clonagem dos cDNAs contendo os epítomos ter sido confirmada por perfil de restrição e sequenciamento, os ensaios DIBA não mostraram alta reatividade. Para diminuir o efeito de reação inespecífica do DIBA, foi realizado *Western-blotting*, entretanto nenhuma amostra testada reagiu com os anticorpos anti-PMMoV e anti-multiepítomo (dado não mostrado) no tamanho esperado, 19,7 kDa.

O tamanho do epítomo a ser apresentado é limitante para plataformas de apresentação. O epítomo de DENV-1 utilizado neste trabalho possui 25 aminoácidos, o que está em concordância com Koprowski e Yusibov (2001), que discutem a possibilidade da inserção de

até 25 aminoácidos em CP. Vários trabalhos mostram a inserção de epítomos de diferentes tamanhos como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Epítomos apresentados por CP de tobamovírus *in planta*.

Quantidade de aminoácidos	Epítopo	Autor
10	MHV – coronavírus	Bendahmane <i>et al.</i> (1999)
11	FMDV	Wu <i>et al.</i> (2003)
12	Malária	Turpen <i>et al.</i> (1995)
13	Zona pelúcida-ZP3	Fitchen <i>et al.</i> (1995)
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMDV	Staczek <i>et al.</i> (2000) Wu <i>et al.</i> (2003)
15	Poliovírus	Fujiyama <i>et al.</i> (2006)
18	Hemaglutinina	Sugiyama <i>et al.</i> (1995)
23	Vírus da raiva	Bendahmane <i>et al.</i> (1999)

Bendahmane e colaboradores (1999) expressaram um epítopo de 23 aminoácidos, na posição de inserção entre os aminoácidos 154/155 da CP. Para diminuir a interferência do ambiente molecular da CP pelo epítopo, eles modificaram a sequência primária de aminoácidos do mesmo para que o pI não fosse muito diferente do pI da CP, de 5,01. Com isso eles garantiram que o clone não causasse lesões necróticas e tivesse espalhamento sistêmico.

Na abordagem que foi realizada por esse trabalho não foi levada em consideração a possível interferência do pI do epítopo no pI geral da molécula. O pI da CP-DENV-1 é 5,46. Já foi demonstrado que um aumento do pI é mais deletério para a molécula do que uma diminuição (Bendahmane *et al.*, 1999). Como o pI de CP-DENV-1 é maior que o de CP isso pode ter causado maior interferência nas interações dessa molécula com o hospedeiro.

Uma forma de comprovar em que nível foi o silenciamento da expressão de CP, *Northern blotting* e qRT-PCR podem ser realizados para testar se houve efeito deletério em nível transcricional. Caso o mRNA tenha sido sintetizado, isso corroboraria outra hipótese levantada, a de que CP-DENV-1 é traduzida, mas as alterações conformacionais sofridas pela molécula são tais que impossibilitam a formação do vírion, que pode ter afetado regiões

responsáveis pela automontagem. Porém utilizando anticorpo anti-PMMoV não foi possível detectar CP com 19,7 kDa (Fig. 25 B e D). Isso pode ser explicado pelo fato de CP não se polimerizar e com isso ser encaminhada para a maquinaria de degradação de proteínas, logo não seria possível detectar nem mesmo os epítomos de CP. Um ensaio de inibição de proteossoma poderia indicar se a degradação de CP é a explicação para o resultado obtido.

A principal limitação do uso de vetores virais é o tamanho e a natureza físico-química das sequências heterólogas inseridas. As versões de cDNA infectivos completos impõem limitações de tamanho de sequências heterólogas a serem inseridas. A apresentação de epítomo em CP é ainda mais limitada, pelo fato de CP ser uma proteína estrutural do vírus. Nas versões desconstruídas de vírus, como MagIcon, peptídeos maiores são tolerados como foi o caso do HPV 8 E7 (98 aminoácidos) (Noris *et al.*, 2011) e do *Norwalk virus-like particles* (530 aminoácidos) (Santi *et al.*, 2008) que foram expressas por esse sistema.

7. CONCLUSÃO

O uso de plantas como sistema de expressão é eficiente para a produção de epítomos de interesse biotecnológico. Plataformas que empreguem clones infectivos são amplamente utilizadas para várias espécies de plantas, principalmente *N. benthamiana*.

Tobamovirus é um gênero de vírus de planta modelo para inúmeros estudos moleculares. PMMoV por pertencer a esse gênero, apresenta características que o tornam uma promissora ferramenta biomolecular.

O emprego de sequências virais para a construção de clones infectivos é uma das formas de construção de vetores de expressão de proteínas heterólogas *in planta*. Para tanto, o cDNA viral pode ser transcrito *in vitro* ou *in vivo* por agroinoculação. Neste trabalho, ambas as construções foram realizadas. Em plantas susceptíveis, os clones positivos confirmados se mostraram tão infectivos quanto o tipo selvagem por ensaio imunológico e de microscopia eletrônica. Para confirmar o perfil de infectividade e possíveis divergências de comportamento biológico, os clones foram inoculados em plantas indicadoras.

Uma aplicação biotecnológica foi empregada, em que um epítomo de DENV-1 de 24 aminoácidos foi expresso em duas posições distintas em CP, sendo que cada unidade de CP viral continha o epítomo. A inserção do epítomo pode ter sido deletéria para CP, o que pode ser explicado pelas características físico-químicas e pelo tamanho do epítomo ser próximo ao limite superior já relatado. Outros experimentos são necessários para corroborar essa hipótese.

PERSPECTIVAS

A principal perspectiva desse trabalho é validar o uso do clone infectivo de PMMoV como vetor viral, para a expressão de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico, e de vetor de indução de silenciamento gênico (VIGS) para auxiliar no entendimento das interações patógeno-hospedeiro.

Com relação à apresentação de epítopos pela CP, o primeiro passo é confirmar se o tamanho foi limitante. Como o pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e -154/155 não se mostraram infectivos frente a uma agroinoculação e a principal causa pode ter sido o tamanho do epítipo inserido no gene *cp*, construções contendo o HA-tag, derivado da proteína hemaglutinina de *Human influenza virus*, foram feitas, já que esse epítipo possui apenas nove aminoácidos. Além disso, a substituição de aminoácidos como a realizada por Turpen e colaboradores (1995) pode ser uma alternativa promissora, para isso uma minimização do epítipo DENV-1 proteína E domínios I/II será realizada. A substituição de *cp* por *gfp* está em andamento para testar a capacidade de acomodação de sequências heterólogas por esse sistema.

Além disso, a expressão em sistema baseado em *E. coli* apenas da CP com epítipo, derivada das construções pCAMBIA-PMMoV-DI-59/60 e -154/155 será realizada para confirmar se o tamanho do epítipo foi limitante ou na manutenção da infectividade do vírus.

A validação de pCAMBIA-PMMoV como ferramenta VIGS está em construção, onde parte do mRNA de fitoeno desaturase (PDS) foi clonado em uma versão de pCAMBIA-PMMoV cujo gene *cp* foi deletado e o seu promotor subgenômico foi substituído pelo análogo de ToMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.J., ANTONIW, J.F., KREUZE, J. (2009). *Virgaviridae*: a new family of rod-shaped plant viruses. *Archives of Virology*. 154, 1967-1972.

ADKINS, S. (2002). *Tobamovirus* as model organisms and plant pathogens. International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease. Disponível em: <http://www.spcru.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=139914&pf=1> Acessado em: 7 de janeiro de 2014.

AHLQUIST, P., FRENCH, R., JANDA, M., LOESCH-FRIES, L. (1984). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81, 7066-7070.

AL-ALLAF, F.A., TOLMACHOV, O.E., ZAMBETTI, L.P., TCHETCHELNITSKI, V., MEHMET, H. (2013). Remarkable stability of an instability prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* STBL3. *3 Biotech*. 3(1), 61-70.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M. *et al.* (2008). *Molecular biology of the cell*. 5th edition. New York. 1268p.

ALMAZÁN, F., GONZÁLEZ, J.M., PÉNZES, Z., IZETA, A., CALVO, E., PLANADURÁN, J., ENJUANES, L. (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(10), 5516-5521.

ALONSO, E., GARCÍA-LUQUE, I., CRUZ, A., WICKE, B., AVILA-RINCÓN, M.J., SERRA, M.T., CASTRESANA, C., DÍAZ-RUÍZ, J.R. (1991). Nucleotide sequence of the genomic RNA of *Pepper mild mottle virus*, a resistance-breaking *Tobamovirus* in pepper. *Journal of General Virology*. 72, 2875-2884.

AVILA-RINCON, M.J., FERRERO, M.L., ALONSO, E., GARCÍA-LUQUE, I., DÍAZ-RUÍZ, J.R. (1989). Nucleotide sequence of 5' and 3' non-coding regions of *Pepper mild mottle virus* strain S RNA. *Journal of General Virology*. 70, 3025-3031.

BEDOYA, L.C., e DARÒS, J.A. (2010). Stability of *Tobacco etch virus* infectious clones in plasmid vectors. *Virus Research*. 149, 234-240.

BENDAHMANE M., KOO, M., KARRER, E., BEACHY, R.N. (1999). Display of epitopes on the surface of *Tobacco mosaic virus*: impact of charge and isoelectric point of the epitope on virus-host interactions. *Journal of Molecular Biology*. 290, 9-20.

BOROVSKY, D., RABINDRAN, S., DAWSON, W.O., POWELL, C.A., IANOTTI, D.A., MORRIS, T.J., SHABANOWITZ, J., HUNT, D.F., DEBONT, H.L., DELOOF, A. (2006).

Expression of *Aedes* trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: a potential larvicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(50), 18963-18968.

BOUKEMA, I.W. 1980. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum L.* *Euphytica*. 29, 433-439.

BOYER, J.C. e HAENNI, A.N. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*. 198, 415-426.

BUCHER, E., SIJEN, T., HAAN, P., GOLDBACH, R., PRINS, M. (2003). Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology*. 77(2), 1329-1336.

CHANDRAN, D., SHAHANA, P.V., RANI, G.S., SUGUMAR, P., SHANKAR, C.R., SRINIVASAN, V.L. (2010). Display of neutralizing epitopes of *Canine parvovirus* and a T-cell epitope of the fusion protein of *Canine distemper virus* on chimeric tymovirus-like particles and its use as a vaccine candidate both against Canine parvo and Canine distemper. *Vaccine*. 28, 132-139.

CHRISTENSEN, N., TILSNER, J., BELL, K., HAMMANN, P., PARTON, R. (2009). The 5' CAP of *Tobacco mosaic virus* (TMV) is required for virion attachment to the actin/endoplasmic reticulum network during early infection. *Traffic*. 10(5), 536-551.

COLSON, P., RICHET, H., DESNUES, C., BALIQUE, F., MOAL, V., GROB, J.J., BERBIS, P. *et al.* (2010). *Pepper mild mottle virus*, a plant virus associated with specific immune responses, fever, abdominal pains, and pruritus in humans. *PLoS One*. 5(4), e10041.

CREAGER, A.N.H. (1999). Tobacco mosaic virus: pioneering research for a century. *Plant Cell*. 11(3), 301-308.

DALSGAARD, K., UTTENTHAL, A., JONES, T.D., XU, F., MERRYWEATHER, A., HAMILTON, W.D.O., LANGEVELD, J.P.M., *et al.* (1997). Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature*. 15, 248-252.

DELFOSSE, V.C., CASSE, M.F., AGROFOGLIO, Y.C., KRESIC, I.B., HOPP, H.E., ZIEGLER-GRAFF, V., DISTÉFANO, A.J. (2013). Agroinoculation of a full-length cDNA clone of *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) results in systemic infection in cotton and the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Virus Research*. 175, 64–70.

DING, S.X., JIANZHONG, L., CHENG, N., FOLIMONOV, A., *et al.* (2004). The *Tobacco mosaic virus* 126 kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17(6), 583-592.

DUNIGAN, D.D. e ZAITLIN, M. (1990). Capping of *Tobacco mosaic virus* RNA analysis of viral-coded guanylyltransferase-like activity. *Journal of Biological Chemistry*. 265, 7779-7786.

DZIANOTT, A.M., e BUJARSKI, J.J. (1989). Derivation of an infectious viral RNA by autolytic cleavage of *in vitro* transcribed viral cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(13), 4823-4827.

EFIMOV, V.A., CHAKHMAKHCHEVA, O.G., ARCHDEACON, J., FERNANDEZ, J.M., FEDORKIN, O.N., DOROKOV, Y.L., ATABEKOV, G. (2001). Detection of the 5'-cap structure of messenger RNAs with the use of cap-jumping approach. *Nucleic Acids Research*. 29(22), 4751-4759.

GLOSSÁRIO EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. (2005). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/glossario.htm>. Acessado em: 6 de março de 2014.

FAN, Q., TREDER, K., MILLER, W.A. (2012). Untranslated regions of diverse plant viral RNAs vary greatly in translation enhancement efficiency. *BMC Biotechnology*. 12, 22.

FERNANDES, H.S., NEDEL, J.L., PESKE, S.T., GALLI, J. (1997). Variação intracultivar de vigor de pimentão (*Capsicum annum* L.). *Revista Brasileira de Agrociência*. 3(2), 95-98.

FITCHEN, J., BEACHY, R.N., HEIN, M.B. (1995). Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine*. 13(12), 1051-1057.

FRANSEN, R.J.D. (2010). ATMT. Disponível em: <<http://www.rasmusfransen.dk/atmt.htm>> Acessado em: 26 de janeiro de 2014.

FUJIYAMA, K., SAEJUNG, W., YANAGIHARA, I., NAKADO, J., MISAKI, R., HONDA, T., WATANABE, Y., SEKI, T. (2006). *In planta* production of immunogenic poliovirus peptide using *Tobacco mosaic virus*-based vector system. *Journal of Biosciences and Bioengineering*. 101(5), 398–402.

GALLIE, D.R. e KADO, C.I. (1989). A translation enhancer derived from *Tobacco mosaic virus* is functionally equivalent to a Shine-Dalgarno sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86, 129-132.

GALLIE, D.R., e WALBOT, V. (1990). RNA pseudoknot domain of *Tobacco mosaic virus* can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. *Genes & Development*. 4, 1149-1157.

GALLIE, D.R., e WALBOT, V. (1992). Identification of the motifs within the *Tobacco mosaic virus* 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Research*. 20(17), 4631-4638.

GAL-ON, A., MEIRI, E., HUET, H., HUA, W.J., RACCAH, B., GABA, V. (1995). Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of Zucchini yellow mosaic potyvirus. *Journal of General Virology*. 76, 3223-3227.

GENDA, Y., KANDA, A., HAMADA, H., SATO, K., OHNISHI, J., TSUDA, S. (2007). Two amino acid substitutions in the coat protein of *Pepper mild mottle virus* are responsible for overcoming the L-4-gene mediated resistance in *Capsicum* spp. *Phytopathology*. 97, 787-793.

GLEBA, Y., MARILLONNET, S., KLIMYUK, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Current Opinion in Plant Biology*. 7, 182-188.

GLEBA, Y., KLIMYUK, V., MARILLONNET, S. (2005). Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*. 23, 2042-2048.

GLEBA, Y., KLIMYUK, V., MARILLONNET, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 18, 134-141.

GLUBER, D.J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(3), 480-496.

GOREGAOKER, S.P. e CULVER, J.N. (2002). Oligomerization and activity of the helicase domain of the *Tobacco mosaic virus* 126- and 183 kilodalton replicase proteins. *Journal of Virology*. 77(6), 3549-3556.

GULTYAEV, A.P., BATENBURG, E., PLEIJ, C.W.A. (1994). Similarities between the secondary structure of satellite *Tobacco mosaic virus* and tobamovirus RNAs. *Journal of General Virology*. 75, 2851-2856.

HAGIWARA, K., ICHIKI, T.U., OGAWA, Y., OMURA, T., TSUDA, S. (2002). A single amino acid substitution in 126-kDa protein of *Pepper mild mottle virus* associates with symptom attenuation in pepper; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C-1421. *Archives of Virology*. 147, 833-840.

HAMADA, H., TAKEUSHI, S., KIBA, A., TSUDA, S., HIKICHI, Y., OKUNO, T. (2002). Amino acid changes in *Pepper mild mottle virus* coat protein that affect L3 gene-mediated resistance in pepper. *Journal of General Plant Pathology*. 68, 155-162.

HAMADA, H., TOMITA, R., IWADATE, Y., KABAYASHI, K., MUNEMURA, I., TAKEUSHI, S., HIKICHI, Y., SUZUKI, K. (2007). Cooperative effect of two amino acid mutations in the coat protein of *Pepper mild mottle virus* overcomes L³-mediated resistance in *Capsicum* plants. *Virus Genes*. 34, 205-214.

HEINLEIN, M., PADGETT, H.S., GENS, J.S., PICKARD, B.G., CASPER, S.J., EPEL, B.L., BEACHY, R.N. (1998). Changing patterns of localization of the *Tobacco mosaic virus*

movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell*. 10, 1107-1120.

HEFFERON, K.L. (2013). Plant virus expression vectors set the new stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology*. 433, 1-6.

HELLENS, R. e MULLINEAUX, P. (2000). A guide to agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*. 5(10), 1360-1385.

HEMA, M., NAGENDRAKUMAR, S.B., YAMINI, R., CHANDRAN, D., RAJENDRA, L., THIAGARAJAN, D., PARIDA, S., PATON, D.J., SRINIVASAN, V.A. (2007). Chimeric tymovirus-like particles displaying *Foot-and-mouth disease virus* non-structural protein epitopes and its use for detection of FMDV-NSP antibodies. *Vaccine*. 25, 4784-4794.

HOLT, C.A. e BEACHY, R.N. (1991). *In vivo* complementation of infectious transcripts from mutant *Tobacco mosaic virus* cDNAs in transgenic plants. *Virology*. 181(1), 109-117.

HUHTAMO, E., HASU, E., UZCÁTEQUI, N.I., ERRA, E., NIKKARI, S., KANTELE, A., VAPALAHTI, O., PIIPARINEN, H. (2010). Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel Real-Time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *Journal of Clinical Virology*. 47, 49-53.

ICHIKI, T.U., NAGAOKA, E.N., HAGIWARA, K., UCHIKAWA, K., TSUDA, S., OMURA, T. (2005). Integration of mutations responsible for the attenuated phenotype of *Pepper mild mottle virus* strains results in a symptomless cross-protecting strain. *Archives of Virology*. 150, 2009–2020.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS (ICTV). Virus Taxonomy. Disponível em: <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Ictv/fs_tobam.htm> Acessado em: 7 de janeiro de 2014.

IVANOV, K.I. e MAKINEN, K. (2012). Coat proteins, host factors and plan viral replication. *Current Opinion in Virology*. 2, 712-718.

JIANG, L., LI, Q., LI, M., ZHOU, Z., WU, L., FAN, J., ZHANG, Q., ZHU, H., XU, Z. (2006). A modified TMV-based vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco. *Vaccine*. 24, 109–115.

JOHANSEN, I.E. (1996). Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93, 12400-12405.

KADARE, G. e HAENNI, A. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*. 71(4), 2583-2590.

KAWAKAMI, S., WATANABE, Y., e BEACHY, R. (2004). *Tobacco mosaic virus* infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 6291-6296.

KIRITA, M., AKUTSU, K., WATANABE, Y., TSUDA, S. (1997). Nucleotide sequence of the Japanese isolate of Pepper mild mottle tobamovirus (TMV-P) RNA. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 63, 373-376.

KNAPP, E., DANYLUK, G.M., ACHOR, D., LEWANDOWSKY, D.J. (2005). A bipartite *Tobacco mosaic virus*-defective RNA (dRNA) system to study the role of the N-terminal methyl transferase domain in cell-to-cell movement of dRNAs. *Virology*. 341(1), 47-58.

KOBAYASHI, M., SEKI, M., TABATA, H., WATANABE, Y., YAMASHITA, I. (2010). Fabrication of aligned magnetic nanoparticles using tobamoviruses. *Nano Letters*. 10(3), 773-776.

KOONIN, E. V. (1991). Similarities in RNA helicases. *Nature*. 352, 290.

KOPROWSKY, H., e YUSIBOV, V. (2001). The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine*. 19, 2735-2741.

KUBOTA, K., TSUDA, S., TAMAI, A., MESHI, T. (2003). *Tomato mosaic virus* replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*. 77(20), 11016-11026.

KUHN, R.J., ZHANG, W., ROSSMANN, M.G., PLETNEV, S.V., CORVER, J., LENCHES, E. *et al.* (2002). Structure of *Dengue virus*: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 108, 717-725.

KURANE, I. (2007). Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 30, 329-340.

LAI, M.M.C. (2000). The make of infectious viral RNA: no size limit in sight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(10), 5025–5027.

LARTEY, RT., VOSS, TC., MELCHER, U. (1996). Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Molecular Biology and Evolution* 13, 1327-1338.

LEHTO, K., GRANTHAM, G.L., DAWSON, W.O. (1990). Insertion of sequences containing the coat protein subgenomic RNA promoter and leader from the *Tobacco mosaic virus* 30K ORF delays its expression and cause defective cell-to-cell movement. *Virology*. 174, 145-157.

LIAO, HH. (1991). Effects of temperature on the expression of wild-type and thermostable mutants of kanamycin nucleotidyltransferase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2, 43-50.

LICO, C., CHEN, Q., SANTI, L. (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *Journal of Cellular Physiology*. 216, 366-377.

LIU, C., e NELSON, R.S. (2013). The cell biology of *Tobacco mosaic virus* replication and movement. *Frontiers in Plant Science*. 4, 12.

LIU, Z. e KEARNEY, C.M. (2010). A tobamovirus expression vector for agroinfection of legumes and *Nicotiana*. *Journal of Biotechnology*. 147, 151-159.

LÓPEZ-MOYA, J.J. e GARCÍA, J.A. (2001). Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of Plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Research*. 68, 99-107.

MACKAY, I.M. (2013). DENV-5: virus from the jungle comes to humans? *Virology Down Under*. Disponível em: <<http://virologydownunder.blogspot.com.au/2013/10/denv-5-virus-from-jungle-comes-to-humans.html>> Acessado em: 29 de janeiro de 2013.

MALDANER, F.R., ARAGÃO, F.J.L., SANTOS, F.B., FRANCO, O.L., *et al.* (2013). *Dengue virus* tetra-epitope peptide expressed in lettuce chloroplasts for potential use in dengue diagnosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(13), 5721-5729.

MARILLONNET, S., THOERINGER, C., KANDZIA, R., KLIMYUK, V., GLEBA, Y. (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology*. 23(6), 718-723.

MESHI, T., ISHIKAWA, M., MOTOYOSHI, F., SEMBA, K., OKADA, Y. (1986). *In vitro* transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of *Tobacco mosaic virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83, 5043-5047.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2011). *Dengue Diagnóstico e Manejo Clínico Adulto e Criança*. 4ª edição. Brasília, DF. p. 44.

MIZUMOTO, H., NAKAMURA, I., SHIMOMOTO, Y., SAWADA, H., TOMITA, R., SEKINE, K.T., KIBA, A., NISHIGUCHI, M., KOBAYASHI, K., HIKICHI, Y. (2012). Amino acids in *Tobamovirus* coat protein controlling pepper L^{1a} gene-mediated resistance. *Molecular Plant Pathology*. 13(8), 915-922.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S.C. (2004). Structure of the *Dengue virus* envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 427, 313-319.

MURAI, N. (2013). Review: plant binary vectors in Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* with a broad host-range replicon of pRK2, pRi, pSa, or pVS1. *American Journal of Plant Sciences*. 4, 932-939.

NAKAMURA, Y. (2007). Codon usage database. Disponível em: <<http://www.kazusa.or.jp/codon/>> Acessado em: 20 de abril de 2013.

NAMBA, K., PATTANAYEK, R., STUBBS, G. (1986). Structure of *Tobacco mosaic virus* at 3.6 Å resolution: implications for assembly. *Science*. 231, 1401-1406.

NAMBA, K., PATTANAYEK, R., STUBBS, G. (1989). Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus refined structure of intact *Tobacco mosaic virus* at 2,9Å resolution by X-ray fiber diffraction. *Journal of Molecular Biology*. 208, 307-325.

NIEHL, A. e HEINLEIN, M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma*. 248, 75-99.

NORIS, E., POLI, A., CAJOCA, R., RITTÀ, M., CAVALLO, F., VAGLIO, S., MATIC, S., LANDOLFO, S. (2011). A human papillomavirus 8 E7 protein produced in plants is able to trigger the mouse immune system and delay the development of skin lesions. *Archives of Virology*. 156, 587-595.

NORMILE, D. (2013). First new *Dengue virus* type in 50 years. *ScienceInsider, Health*. Disponível em: <<http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>> Acessado em: 29 de janeiro de 2013.

OLIVEIRA, L.M., INOUE-NAGATA, A.K., NAGATA, T. (2010). Complete genome nucleotide sequence of *Pepper mild mottle virus* isolated in the Federal District, Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 35, 6.

PROTEIN DATA BANK PDB. *Tobacco mosaic virus* CP. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2TMV>>. Acessado em: 10 de janeiro de 2014.

PELHAM, H.R.B. (1978). Leaky UAG termination codon in *Tobacco mosaic virus* RNA. *Nature*. 272, 469-471.

PORTAL DA SAÚDE (2012). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31125> Acessado em: 30 de outubro de 2012.

RHEE, S.J., HONG, J.S., LEE, G.P. (2014). Infectivity and complete nucleotide sequence of *Cucumber fruit mottle mosaic virus* isolate Cm cDNA. *Archives of Virology*. DOI 10.1007/s00705-014-1990-x.

RICE, C.M., GRAKOU, A., GALLER, R., CHAMBERS, T.J. (1989). Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. *Nature New Biology*. 1, 285-296.

ROCHA, E.S.O., OLIVEIRA, J.G., SANTOS, J.R., RODRIGUES, G.O., FIGUEIREDO, L.B., PESSANHA, J.E., *et al.* (2012). Recombinant envelope protein-based enzyme immunoassay for IgG antibodies is comparable to neutralization tests for epidemiological studies of dengue infection. *Journal of Virological Methods*. 187(1), 114-120.

ROSARIO, K., SYMONDS, E.M., SINIGALLIANO, C., STEWART, J., BREITBART, M. (2009). *Pepper mild mottle virus* as an indicator of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 7261-7267.

SAMBROOK, J., e RUSSEL, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Plainview, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANTI, L., BATCHELOR, L., HUANG, Z., HJELM, B., KILBOURNE, J., ARNTZEN, C.J., CHEN, Q., MASON, H.S. (2008). An efficient plant viral system generating orally immunogenic *Norwalk virus*-like particles. *Vaccine*. 26(15), 1846-1854.

SATYANARAYANA, T., GOWDA, S., AYLLÓN, M.A., DAWSON, W.A. (2003). Frameshift mutations in infectious cDNA clones of *Citrus tristeza virus*: a strategy to minimize the toxicity of viral sequences to *Escherichia coli*. *Virology* 313, 481–491.

SCHOLTHOF, K.B. (2000). *Tobacco mosaic virus*. Disponível em: <
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/TobaccoMosaic.aspx>>
Acessado em: 10 de janeiro de 2014.

SHAW, J.G. (1999). *Tobacco mosaic virus* and the study of early events in virus infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Sciences*. 354(1383), 603-611.

SIEGEL, A., HARL, V., KOLACZ, K. (1978). The effect of *Tobacco mosaic virus* infection on host and virus-specific protein synthesis in protoplasts. *Virology*. 85,494-503.

SOUZA, A.C., VASQUES, R.M., INOUE-AGATA, A.K., LACORTE, C., *et al.*. (2013). Expression and assembly of *Norwalk virus*-like particles in plants using a viral RNA silencing suppressor gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97, 9021-9027.

STACZEK, J., BENDAHMANE, M., GILLELAND, L.B., BEACHY, R.N., GILLELAND, H.E. (2000). Immunization with a chimeric *Tobacco mosaic virus* containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa*. *Vaccine*. 18(21), 2266–2274.

SUGIYAMA, Y., HAMAMOTO, H., TAKEMOTO, S., WATANABE, Y., OKADA, Y. (1995). Systemic production of foreign peptides on the particle surface of *Tobacco mosaic virus*. *FEBS Letters*. 359, 247-250.

SUMIYOSHI, H., HOKE, C.H., TRENT, D.W. (1992). Infectious *Japanese encephalitis virus* RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *Journal of Virology*. 66(9), 5425-5431.

SUZUKI, K., KURODA, T., MIURA, Y., MURAI, J. (2003). Screening and field trials of virus resistant sources in *Capsicum* spp. *Plant Disease*. 87, 779-783.

THIEL, H.J., COLLET, M.S., GOULD, E.A., HEINZ, F.X., HOUGHTON, M., MEYERS, G., PURCELL, R.H. e RICE, C. (2005). Flavivirus. *In: Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press. p. 981-992.

TILSNER, J., e OPARKA, K.J. (2012). Missing links? – The connection between replication and movement of plant RNA viruses. *Current Opinion in Virology.* 2, 705-711.

TOMITA, R., MURAI, J., MIURA, Y., ISHIHARA, H., LIU, S., KUBOTERA, Y., HONDA, A., *et al.* (2008). Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene L³ of *Capsicum chinense* in a 400 kb region of R-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences. *Theoretical and Applied Genetics.* 117, 1107-1118.

TOMITA, R., SEKINE, K.T., MIZUMOTO, H., SAKAMOTO, M., MURAI, J., KIBA, A., HIKICHI, Y., KOBAYASHI, K. (2011). Genetic basis for the hierarchical interactions between Tobamovirus spp. and L resistance gene alleles from different pepper species. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 24, 108-117.

TSUDA, S., KIRITA, M., WATANABE, Y. (1998). Characterization of a Pepper mild mottle tobamovirus strain capable of overcoming the L³ gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 11(4), 327-331.

TURPEN, T.H. (1999). Tobacco mosaic virus and the virescence of biotechnology. *Transactions of the Royal Society London B Biological Sciences.* 354, 665-673.

TURPEN, T.H., REINL, S.J., CHAROENVIT, Y., HOFFMAN, S.L., FALLARME, V., GRILL, L.K. (1995). Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant *Tobacco mosaic virus*. *Biotechnology.* 13(1), 53-57.

TURPEN, T.H., TURPEN, A.M., WEINZETTL, N., KUMAGAI, M.H., DAWSON, W.O. (1993). Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of *Tobacco mosaic virus*. *Journal of Virological Methods.* 42, 227-240.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA AGRICULTURE & NATURAL RESOURCES, STATEWIDE INTEGRATED PEST MANAGEMENT PROGRAM UC IPM. Disponível em: <<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r604100711.html#SYMPTOMS>> Acessado em: 06 de janeiro de 2014.

VIRALZONE. Swiss Institute of Bioinformatics. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/51.html> Acessado em: 7 de janeiro de 2014.

VOGLER, H., AKBERGENOV, R., SHIVAPRASAD, P.V., DANG, V. *et al.* (2007). Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by *Tobamovirus* replicase domain. *Journal of Virology*. 81(19), 10379-10388.

WALPITA, P. e FLICK, R. (2005). Reverse genetics of negative-stranded RNA viruses: a global perspective. *FEMS Microbiology Letters*. 244(1), 9-18.

WANG, L.Y. LIN, S.S., HUNG, T.H., LI, T.K., LIN, N.C., SHEN, T.L. (2012). Multiple domains of the *Tobacco mosaic virus* p126 protein can independently suppress local and systemic RNA silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25(5), 648-657.

WEILAND, J.J. e DREHER, T.W. (1989). Infectious TYMV RNA from cloned cDNA: effects in vitro and in vivo of point substitutions in the initiation codons of two extensively overlapping ORFs. *Nucleic Acids Research*. 17(12), 4675-4687.

WIKIPEDIA. *Tobacco mosaic virus*. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Tobacco_mosaic_virus Acessado em: 9 de janeiro de 2014.

WU, L., JIANG, L., ZHOU, Z., FAN, J., ZHANG, Q., ZHU, H., HAN, Q., XU, Z. (2003). Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a *Tobacco mosaic virus* based vector. *Vaccine*. 21, 4390-4398.

YAMAYA, J., YOSHIOKA, M., MESHI, T., OKADA, Y., OHNO, T. (1988). Expression of *Tobacco mosaic virus* RNA in transgenic plants. *Molecular Genetics and Genomics*. 211, 520-525.

YAMSHCHIKOV, V., MISHIN, V., COMINELLI, F. (2001). A new strategy to design (+) RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. coli*. *Virology*. 281, 272-280.

YOON, J.Y., MIN, B.E., CHOI, S.H., RYU, K.H. (2001). Completion of nucleotide sequence and generation of infectious transcripts to cucurbits from full-length cDNA clone of *Kyiuri green mottle mosaic virus*. *Archives of Virology*. 146, 2085-2096.

YUSIBOV, V., SHIVPRASAD, S., TURPEN, T.H., DAWSON, W., KOPROWSKI, H. (1999). Plant viral vectors based on tobamoviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 240, 81-84.

ZACCOMER, B., HAENNI, A.L., MACAYA, G. (1995). The remarkable variety of plant virus RNA genomes. *Journal of General Virology*. 76, 231-247.

ZAITLIN, M. (2011). Tobamovirus. *The Springer Index of Viruses*. 2065-2069.

ZHANG, H., WANG, L., HUNTER, D., VOOGD, C., JOYCE, N., DAVIES, K. (2013). A Narcissus mosaic viral vector system for protein expression and flavonoid production. *Plant Methods*. 9, 28.

ZHANG, T., BREITBART, M., LEE, W.H., RUN, J., WEI, C.L., *et al.* (2006). RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biology*. 4(1), e3.

ZHANG, Y., ZHANG, W., OGATA, S., CLEMENTS, D., STRAUSS, J.H., BAKER, T.S., KUHN, R.J., *et al.* (2004). Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*. 12, 1608-1618.

ANEXOS

Permissão do uso de figuras

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 03, 2014

This is a License Agreement between Bruna Junqueira ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3321331145714
License date	Feb 03, 2014
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature
Licensed content title	Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion
Licensed content author	Yorgo Modis, Steven Ogata, David Clements, Stephen C. Harrison
Licensed content date	Jan 22, 2004
Volume number	427
Issue number	6972
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	n/a
Figures	Figure 1
Author of this NPG article	No
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Estabelecimento de um sistema de genética reversa para Pepper mild mottle virus e uso de cp como apresentador de peptídeos
Expected completion date	Feb 2014
Estimated size (number of pages)	70
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you

should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501216926.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

Artigo publicado



Short communication

A simplified approach to construct infectious cDNA clones of a tobamovirus in a binary vector



Bruna Rayane Teodoro Junqueira^a, Cícero Nicolini^b, Natalia Lucinda^b,
Anelise Franco Orílio^b, Tatsuya Nagata^{a,*}

^a Pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

A B S T R A C T

Article history:

Received 23 August 2013

Received in revised form 3 December 2013

Accepted 17 December 2013

Available online 31 December 2013

Keywords:

Tobamovirus

PMMoV

Full-length cDNA clone

Overlap-extension PCR

Infectious cDNA clones of RNA viruses are important tools to study molecular processes such as replication and host–virus interactions. However, the cloning steps necessary for construction of cDNAs of viral RNA genomes in binary vectors are generally laborious. In this study, a simplified method of producing an agro-infectious *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) clone is described in detail. Initially, the complete genome of PMMoV was amplified by a single-step RT-PCR, cloned, and subcloned into a small plasmid vector under the T7 RNA polymerase promoter to confirm the infectivity of the cDNA clone through transcript inoculation. The complete genome was then transferred to a binary vector using a single-step, overlap-extension PCR. The selected clones were agro-infiltrated to *Nicotiana benthamiana* plants and showed to be infectious, causing typical PMMoV symptoms. No differences in host responses were observed when the wild-type PMMoV isolate, the T7 RNA polymerase-derived transcripts and the agroinfiltration-derived viruses were inoculated to *N. benthamiana*, *Capsicum chinense* PI 159236 and *Capsicum annuum* plants.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Pepper mild mottle virus (PMMoV) is a member of the genus *Tobamovirus* that has a rod-shaped particle with single-stranded RNA genome in the positive sense polarity. Similar to the type member *Tobacco mosaic virus* (TMV), the RNA genome contains four open reading frames (ORF) (Alonso et al., 1991; Velasco et al., 2002). The ORF1 encodes a 126-kDa protein and terminates with an amber stop codon. This protein possesses methyltransferase and helicase activities and is also reported as a suppressor of PTGS (post-transcriptional gene silencing) (Lewandowski and Dawson, 2000; Tsuda et al., 2007; Souza et al., 2013). According to Alonso et al. (1991), part of the ORF1 extends by the ribosome read-through mechanism, resulting in a 183-kDa protein with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) activity. These two proteins are involved in RNA replication and vascular-dependent movement (Derrick et al., 1997). The movement protein (MP) and the coat protein (CP) are translated from subgenomic RNAs. The MP (ORF3) is responsible for the cell-to-cell spread of the virus by modifying the size exclusion limit of plasmodesmatal junctions (Deom et al., 1990; Bendahmane et al., 2002). The CP (ORF4) has primarily the function of virion formation (Okada, 1999), and is essential for

long-distance movement of the virus through the vascular system (Saito et al., 1990; Ivanov and Mäkinen, 2012).

Infectious cDNA clones of plant RNA viruses are very useful tools for the basic study of viral replication, virus–host interactions and, more recently, for biotechnological purposes (Boyer and Haenni, 1994; Yusibov et al., 1999; Marillonnet et al., 2005; Lindbo, 2007). Reports of the first infectious clones of plant RNA viruses date back to the 80s. Ahlquist et al. (1984) in a milestone work constructed an infectious clone of the *Brome mosaic virus* (BMV), which was followed by many other infectious clones of plant RNA viruses. Typically, an infectious clone under the T7 RNA polymerase promoter, which normally requires an *in vitro* transcription step before inoculation, can be constructed by a simple RT-PCR procedure, since the T7 promoter can be incorporated in the forward primer (Staczek et al., 2000; Yoon et al., 2001; Wu et al., 2003; Fujiyama et al., 2006; Jiang et al., 2006; Chandran et al., 2010). Even though a full-length cDNA is obtained, Boyer and Haenni (1994) pointed out some factors that may influence the infectivity of the RNA transcripts, such as the presence of mutations in the sequence of both the 5' and 3' untranslated regions (UTRs). Despite the convenience in the cloning strategy and the smaller size of the resulting plasmids, this technique requires careful handling of the RNA transcripts which are more prone to degradation due to RNase activities.

An alternative approach that avoids *in vitro* synthesis of RNA uses agro-infectious clones: viral cDNA is inserted downstream of

* Corresponding author. Tel.: +55 61 31072980.

E-mail addresses: tatsuya@unb.br, tatunag@gmail.com (T. Nagata).

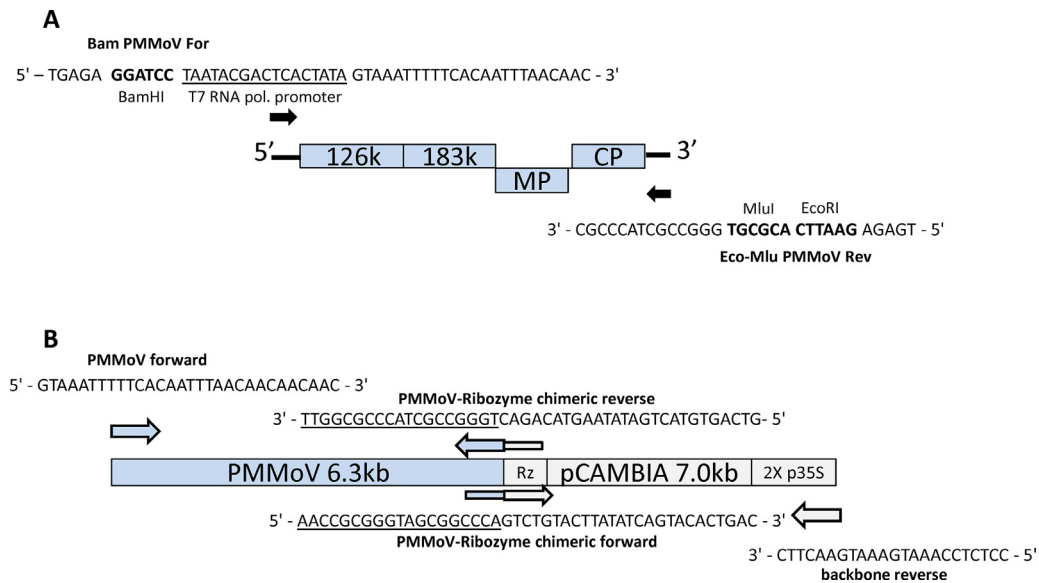


Fig. 1. Schematic description of two different PCR designs to obtain infectious cDNA clones of PMMoV. (A) The cDNA construct under the T7 RNA polymerase promoter to be used as template to perform *in vitro* transcription. (B) The amplification strategy by overlap-extension PCR to obtain a binary vector with the complete viral cDNA downstream a duplicated CaMV 35S promoter and upstream a ribozyme.

a promoter recognized by a plant RNA polymerase (typically the 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus*) in a binary vector within the T-DNA region (Turpen et al., 1993; Kapila et al., 1997). However, this strategy is, in many cases, troublesome due to plasmid instability in the transformed *Escherichia coli*. Binary vectors are often larger than 10 kbp (Murai, 2013) and, furthermore, the cDNA insertion of the entire genome of single stranded RNA viruses, mostly more than 6 kbp (Zaccomer et al., 1995), results in large plasmids. Such plasmids are unstable for many reasons (Al-Allaf et al., 2013), hence, the cloning steps are often challenging and sometimes require laborious steps as repeated subclonings of a segmented viral genome (Liu and Kearney, 2010; Yoon et al., 2011; Delfosse et al., 2013). In addition, it is common that the transformation procedure of such large plasmids results in deletion of essential parts of the viral genome in the *E. coli* host (Boyer and Haenni, 1994; Lai, 2000; Satyanarayana et al., 2003).

Turpen et al. (1993) were the first to describe a method to transfer the viral cDNA into plant cells using *Agrobacterium tumefaciens* harbouring binary vector plasmids containing the cDNA of the TMV genome. To guarantee the success of this strategy, it is necessary to: (1) eliminate any nucleotide between the transcriptional start and the 5' end of the viral genome; and (2) add a ribozyme structure at the 3' end upstream of the terminator, for non-poly(A)-tailing viruses.

Recently, insertion of multiple plant-gene introns was used to improve the insert stability of plant viral vectors in plant cells (Gils et al., 2005; Marillonnet et al., 2005; Sainsbury et al., 2010). Alternatively, the deletion of the TMV CP subgenomic promoter and CP gene (potential RNA silencing inducer) may contribute to increase the plasmid stability, and may be a more effective procedure for foreign protein expression in plants (Lindbo, 2007).

All but one reported PMMoV infectious clones have been constructed under the T7 RNA promoter. Tomita et al. (2011) have described a method to construct a full-length cDNA clone from a PMMoV isolate in the binary vector pBI121, but the disadvantage of this method was the requirement of many subcloning steps.

In this study, an approach is proposed using a minimum number of cloning steps to construct successfully an agro-infectious cDNA clone containing the whole PMMoV genome in a binary vector. For this purpose, the RT-PCR procedure was optimized, a suitable *E. coli*

strain Stb14 was used, and the incubation temperature of *E. coli* culture was reduced.

To produce the genomic cDNA, initially the total RNA was extracted from *N. benthamiana* plants inoculated with PMMoV BR-DF01 (AB550911) isolate (Oliveira et al., 2010) using Plant RNA reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The first strand cDNA was synthesized using the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) standard protocol, with the reverse primer Eco-Mlu PMMoV Rev (5'-TGA GAG AAT TCA CGC GTG GGC CGC TAC CCG C-3', EcoRI and MluI sequences are underlined) (Fig. 1A) by incubation at 50 °C for one hour. The full-length viral genome was amplified using the forward primer containing the minimum T7 RNA polymerase promoter, Bam PMMoV For (5'-TGA GAG GAT CCT AAT ACG ACT CAC TAT AGT AAA TTT TTC ACA ATT TAA CAA C-3', BamHI is underlined and the T7 RNA polymerase promoter is in italics) and the reverse primer (Eco-Mlu PMMoV Rev) (Fig. 1A). PCR was performed using LongAmp Taq DNA polymerase (NEB: New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The DNA amplification was performed in two different cycles as follows: (1) a pre-denaturation step at 94 °C for 3 min; (2) first 10 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 7 min; (3) 25 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 8 min; and (4) an extra 10 min of extension at 65 °C. The 6.3 kbp PCR product was gel purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and cloned into pCR4-TOPO (Invitrogen) using *E. coli* DH5 α (Invitrogen). The selected clones were sequenced by primer walking at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The complete genome containing the T7 promoter was subcloned in the cloning sites of BamHI/EcoRI of pUC19 (GE Healthcare), a vector free of the T7 promoter sequence. The correct cloning of the amplicon (pUC-PMMoV) was confirmed by restriction endonuclease digestion and sequencing. pUC-PMMoV was then linearized with MluI (NEB) at the 3' end of the PMMoV genome for run-off *in vitro* transcription carried out using RiboMAX large-scale RNA production system-T7 (Promega, Madison, WI, USA) and the Ribo m7G Cap Analog (Promega), for capping the transcripts, according to the manufacturer's protocol. The transcripts were inoculated by gentle rubbing in *N. benthamiana* plants of approximately four weeks old with phosphate buffer (pH 7.0) onto

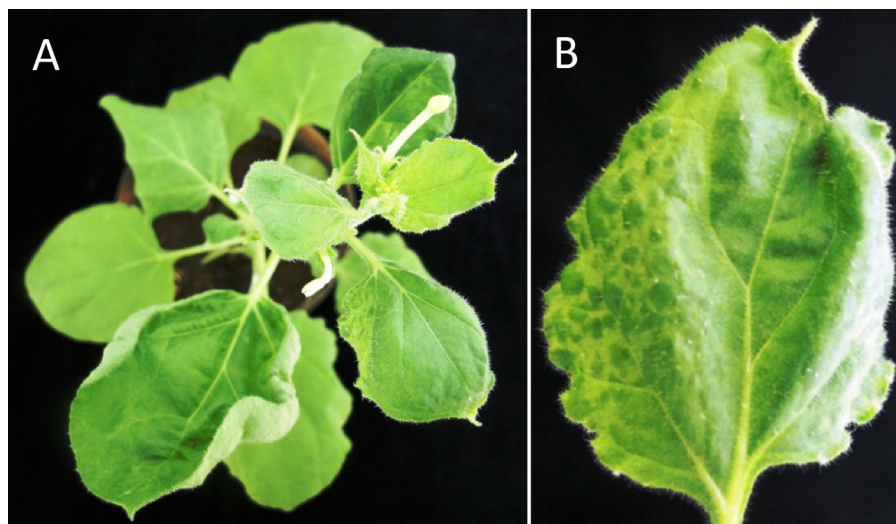


Fig. 2. *N. benthamiana* symptoms caused by PMMoV infectious clones in a binary vector. The symptoms of leaf distortion (A) and mosaic in leaf (B) were observed.

carborundum-dusted leaves. The typical PMMoV symptoms were observed at three weeks after inoculation. The presence of virus was also confirmed by Dot-Immunobinding Assay (DIBA, Fig. 3A) using a rabbit PMMoV polyclonal antibody, and by transmission electron microscopy (TEM) employing a leaf dip method. The rod-like shaped particles of typical PMMoV were observed in systemic uninoculated leaves (data not shown), demonstrating that the PMMoV clone was infectious.

For the construction of agro-infectious PMMoV clones, the complete PMMoV genome (in pCR4-TOPO vector) was transferred to a binary vector using overlap-extension PCR (Ho et al., 1989) to join the complete viral genome with a binary vector. In this approach, the PCR was done in two steps. First, the PMMoV viral genome and the vector backbone from pTRV2-MCS, containing the duplicated CaMV 35S promoter and the *Subterranean clover mottle virus* satellite RNA ribozyme (AF406991) (Liu et al., 2002), were amplified separately (Fig. 1B). Then, overlap-extension PCR was performed to join the two DNA fragments (Fig. 1B). The PMMoV viral genome was amplified using the PMMoV forward primer (5'-GTA AAT TTT TCA CAA TTT AAC AAC AAC AAC-3') (Fig. 1B) and the PMMoV-Ribozyme chimeric reverse primer (5'-GTC AGT GTA CTG ATA TAA GTA CAG ACT GGG CCG CTA CCC GCG GTT-3', the 3' upmost terminal end of PMMoV is underlined) (Fig. 1B). The pTRV-MCS backbone (pCAMBIA 390 based) was amplified using the PMMoV-Ribozyme chimeric forward primer (5'-AAC CGC GGG TAG CCG CCC AGT CTG TAC TTA TAT CAG TAC ACT GAC-3', the 3' upmost terminal end of PMMoV is underlined) and the backbone reverse primer (5'-CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TC-3') (Fig. 1B). PCR amplifications were carried out using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (NEB). The resulting amplicons were 6.3 kbp (PMMoV genome) and 7.0 kbp (pTRV-MSC backbone), respectively. These PCR products were gel-purified using Illustra GFX PCR DNA and the Gel Band Purification kit (GE Healthcare). The overlap-extension PCR was performed in two reactions. The first reaction was done only with purified PMMoV cDNA and pTRV-MSC backbone DNA fragments using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (NEB) without primers, under the condition of a pre-denaturing step at 98 °C for 30s followed by denaturing at 98 °C for 10s, annealing at 50 °C for 30s, and extension at 72 °C for 7 min for 12 cycles. This PCR product was the template for the second reaction. The second PCR condition was similar to the first reaction except for three differences: the number of cycles was 25 and the annealing temperature was 53 °C instead of 50 °C; and the two primers, which anneal to the cDNA ends (PMMoV forward and backbone reverse primers), were added.

These fragments were gel-purified using the QIAEX II Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). This kit is resin suspension-based, instead of resin column-based, to increase the recovery of large DNA fragments. The amplified DNA fragments were self-ligated by phosphorylation using the polynucleotide kinase (NEB) followed by ligation using T4 DNA ligase (NEB). The electrocompetent *E. coli* Stb14 strain (Invitrogen) was transformed and maintained at 30 °C for up to two days in LB culture medium amended with kanamycin. Seven clones (pCAMBIA-PMMoV) were selected by restriction endonuclease analysis and partial sequencing. Aiming to recover the infectious virus, the *A. tumefaciens* (GV3101 strain) suspension harbouring each of pCAMBIA-PMMoV full-length clones was infiltrated by the procedure essentially described by Bucher et al. (2003). The *N. benthamiana* leaves were syringe (without needle) infiltrated at an OD600 of 2.0.

After 12 days of inoculation, mild mottling and distortion of the upper leaves (Fig. 2A and B), identical to those observed in the plants infected with the wild-type virus, were observed in five inoculated plants out of the seven. Infection with PMMoV was confirmed in plants infiltrated with these five clones by DIBA using a polyclonal antibody against PMMoV (Fig. 3B). To evaluate whether there are different host responses when inoculated with the wild-type virus, and viruses recovered by *in vitro* transcripts and by agroinfiltration, virus stocks in *N. benthamiana* leaves once infected and recovered by previous experiments and maintained at -80 °C were inoculated in three plant species: *N. benthamiana*, *C. chinense* PI 159236, which carries L3 resistant gene (Oliveira et al., 2010), and *C. annuum* cv. Ikeda plants. No differences in host responses were observed when these viruses were inoculated and observed during 30 days of incubation in the greenhouse. Mottling, mosaic and top distortion were observed in all inoculated *N. benthamiana* plants. Only local lesions were observed in inoculated leaves of *C. chinense* PI159236 plants. And almost no symptoms were observed in *C. annuum* cv. Ikeda plants, although the systemic infections were confirmed by the observation of the leaf-dip preparations using transmission electron microscope.

The production of an infectious clone is usually complex and time consuming. Before achieving the final protocol described above, several attempts were made. The most difficult step was the cloning of the complete genomic cDNA into the binary vector, which always resulted in deletion mutants of the plasmids. Four *E. coli* strains (Invitrogen) were used to test their ability to maintain the integrity of the insert: DH5 α , DH10B, OminiMax and Stb14. Bacterial cultivation of transformants at the typical growth

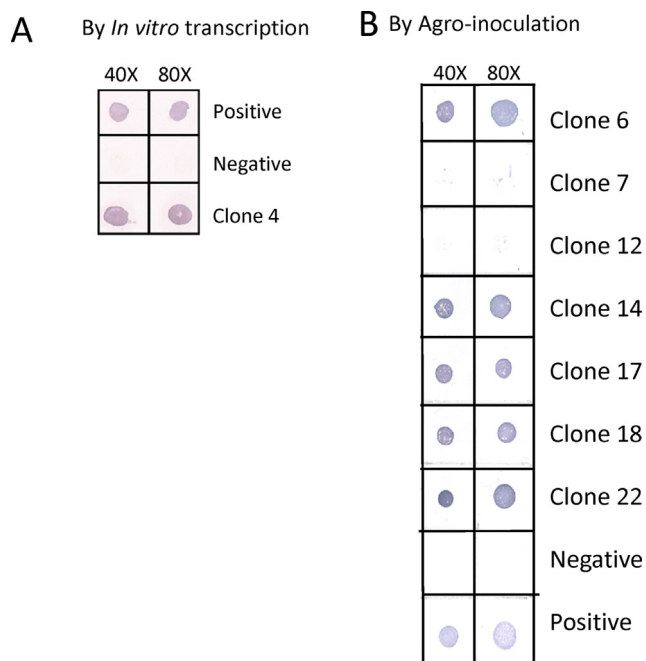


Fig. 3. Dot-Immunobinding Assay to confirm PMMoV infection. (A) T7 *in vitro* transcripts clone. (B) *Agrobacterium*-mediated approach, PMMoV genome in binary vector. Positive = positive control, crude sap of plants infected by wild-type virus. Negative = negative control, crude sap of healthy plant. 40× = macerated with PBS buffer in 1:40 (leaf:buffer in w/v), 80× = 1:80 (leaf:buffer in w/v).

temperature of 37 °C caused deletions in the plasmids, which generally occurred at the 5' end of the PMMoV genome. Incubation at lower temperatures reduces the risk of undesired deletions and minimises the instability of plasmids (Hanahan et al., 1991; Joshi and Jeang, 1993). Thus, incubation at 30 °C was attempted for DH5 α and Stbl4. Plasmid deletions were observed in the clones recovered from DH5 α cells, but more than half of the constructs (five out of seven) recovered from Stbl4 cells were intact and infectious. It was concluded that the procedure described above is efficient and quick for the construction of infectious cDNA clones of a tobamovirus. The described procedure reduces the laborious steps and may facilitate constructing infectious clones from other virus genera.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors thank CNPq for the M.Sc. scholarship to the first author. The 2nd, 4th and 5th authors are research fellows of the CNPq. We thank Alice K. Inoue-Nagata for critically reading this manuscript and providing plant support.

References

Ahlquist, P., French, R., Janda, M., Loesch-Fries, S., 1984. Multicompetent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 7066–7070.

Al-Allaf, F.A., Tolmachov, O.E., Zambetti, L.P., Tchetchnitski, V., Mehmet, H., 2013. Remarkable stability of an instability-prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* Stbl3. *3 Biotech.* **3**, 61–70.

Alonso, E., García-Luque, I., de la Cruz, A., Wicke, B., Avila-Rincón, M.J., Serra, M.T., Castresana, C., Díaz-Ruiz, J.R., 1991. Nucleotide sequence of the genomic RNA of Pepper mild mottle virus, a resistance-breaking Tobamovirus in pepper. *J. Gen. Virol.* **72**, 2875–2884.

Bendahmane, M., Szécsi, J., Chen, I., Berg, R.H., Beachy, R.N., 2002. Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (6), 3645–3650.

Boyer, J.-C., Haenni, A.-L., 1994. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **198**, 415–426.

Bucher, E., Sijen, T., Haan, P., Goldbach, R., Prins, M., 2003. Negative-strand tobamoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J. Virol.* **77** (2), 1329–1336.

Chandran, D., Shahana, P.V., Rani, G.S., Sugumar, P., Shankar, C.R., Srinivasan, V.L., 2010. Display of neutralizing epitopes of Canine parvovirus and a T-cell epitope of the fusion protein of Canine distemper virus on chimeric tobamovirus-like particles and its use as a vaccine candidate both against Canine parvo and Canine distemper. *Vaccine* **28**, 132–139.

Delfosse, V.C., Casse, M.F., Agrofoglio, Y.C., Kresic, I.B., Hopp, H.E., Ziegler-Graff, V., Distéfano, A.J., 2013. Agroinoculation of a full-length cDNA clone of cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) results in systemic infection in cotton and the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Virus Res.* **175**, 64–70.

Derrick, P.M., Carter, S.A., Nelson, R.S., 1997. Mutation of the 126/183 kD proteins of tobacco mosaic tobamovirus: the relationship of phloem-dependent accumulation with viral protein accumulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 589–596.

Deom, C.M., Schubert, K.R., Wolf, S., Holt, C.A., Lucas, W.J., Beachy, R.N., 1990. Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** (9), 3284–3288.

Fujiyama, K., Saejung, W., Yanagihara, I., Nakado, J., Misaki, R., Honda, T., Watanabe, Y., Seki, T., 2006. In planta production of immunogenic poliovirus peptide using tobacco mosaic virus-based vector system. *J. Biosci. Bioeng.* **101** (5), 398–402.

Gils, M., Kandzia, R., Marillonet, S., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2005. High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol. J.* **3**, 613–620.

Hanahan, D., Jesse, J., Bloom, F.R., 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**, 63–113.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59.

Ivanov, I.K., Mäkinen, K., 2012. Coat proteins host factors and plant viral replication. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 712–718.

Jiang, L., Li, Q., Li, M., Zhou, Z., Wu, L., Fan, J., Zhang, Q., Zhu, H., Xu, Z., 2006. A modified TMV-based vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco. *Vaccine* **24**, 109–115.

Joshi, A., Jeang, K.T., 1993. Reduction in growth temperature minimizes instability of large plasmids containing HIV-1 proviral genomes. *Biotechniques* **14** (6), 884–886, 880.

Kapila, J., Rycke, R.D., Montagu, M.V., Angenon, G., 1997. An *agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* **122**, 101–108.

Lai, M.M.C., 2000. The make of infectious viral RNA: no size limit in sight. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** (10), 5025–5027.

Lewandowski, D.J., Dawson, W., 2000. Functions of the 126- and 183-kDa proteins of tobacco mosaic virus. *Virology* **271**, 90–98.

Lindbo, J.A., 2007. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol.* **145**, 1232–1240.

Liu, Y.L., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S.P., 2002. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **30** (4), 415–429.

Liu, Z., Kearney, C.M., 2010. A tobamovirus expression vector for agroinfection of legumes and *Nicotiana*. *J. Biotechnol.* **147**, 151–159.

Marillonet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.* **23**, 718–723.

Murai, N., 2013. Review: plant binary vectors of Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* with a broad host-range replicon of pRK2, pRi, pSa or pVS1. *Am. J. Plant Sci.* **4**, 932–939.

Okada, Y., 1999. Historical overview of research on the tobacco mosaic virus genome: genome organization, infectivity and gene manipulation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 569–582.

Oliveira, L.M., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., 2010. Complete genome nucleotide sequence of Pepper mild mottle virus isolated in the Federal District, Brazil. *Trop. Plant Pathol.* **35** (6), 373–376.

Sainsbury, F., Cañizares, C.M., Lomonosoff, G.P., 2010. The plant virus-based biotechnology workhorse. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 437–455.

Saito, T., Yamanaka, K., Okada, Y., 1990. Long-distance movement and viral assembly of tobacco mosaic virus mutants. *Virology* **176**, 329–336.

Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Dawson, W.A., 2003. Frameshift mutations in infectious cDNA clones of *Citrus tristeza virus*: a strategy to minimize the toxicity of viral sequences to *Escherichia coli*. *Virology* **313**, 481–491.

Souza, A.C., Vasques, R.M., Inoue-Nagata, A.K., Lacorte, C., Maldaner, F.R., Noronha, E.F., Nagata, T., 2013. Expression and assembly of Norwalk virus-like particles in plant using a viral RNA silencing suppressor gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (20), 9021–9027.

Stacek, J., Bendahmane, M., Gilleland, L.B., Beachy, R.N., Gilleland, H.E., 2000. Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa*. *Vaccine* **18** (21), 2266–2274.

Tomita, R., Sekine, K.-T., Mizumoto, H., Sakamoto, M., Murai, J., Kiba, A., Hikichi, Y., Suzuki, K., Kobayashi, K., 2011. Genetic basis for the hierarchical interaction between Tobamovirus spp. and L resistance gene alleles from different pepper species. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24** (1), 108–117.

Tsuda, S., Kubota, K., Kanda, A., Ohki, T., Meshi, T., 2007. Pathogenicity of Pepper mild mottle virus is controlled by the RNA silencing suppression activity of its replication protein but not the viral accumulation. *Phytopathology* **97**, 412–420.

- Turpen, T.H., Turpen, A.M., Weinzettl, N., Kumagai, M.H., Dawson, W.O., 1993. Transfection of whole plants from wound inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. *J. Virol. Methods* 42, 227–240.
- Velasco, L., Janssen, D., Ruiz-Garcia, L., Segundo, E., Cuadrado, I.M., 2002. The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a Pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper. *J. Virol. Methods* 106, 135–140.
- Wu, L., Jiang, L., Zhou, Z., Fan, J., Zhang, Q., Zhu, H., Han, Q., Xu, Z., 2003. Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector. *Vaccine* 21, 4390–4398.
- Yoon, J.Y., Choi, S-K., Palukaitis, P., Gray, S.M., 2011. *Agrobacterium*-mediated infection of whole plants by yellow dwarf viruses. *Virus Res.* 160, 428–434.
- Yoon, J.Y., Min, B.E., Choi, S.H., Ryu, K.H., 2001. Completion of nucleotide sequence and generation of highly infectious transcripts to cucurbits from full-length cDNA clone of *Kyuri green mottle mosaic virus*. *Arch. Virol.* 146, 2085–2096.
- Yusibov, V., Shivprasad, S., Turpen, T.H., Dawson, W., Koprowsky, H., 1999. Plant viral vectors based on Tobamoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240, 81–94.
- Zaccomer, B., Haenni, A-L., Macaya, G., 1995. The remarkable variety of plant RNA virus genomes. *J. Gen. Virol.* 76, 231–247.