COMPLEXIDADE PROTEICA DO MICROAMBIENTE ASSOCIADO AO COMPLEXO PMeV/PMeV2

Giovanni Ferreira Montovaneli[1]*, Russolina Benedeta Zingali[2], Viviana Ramírez Ríos[3], Emanuel Felipe Medeiros Abreu[3], Gisele Cardoso de Amorim[1], José Aires Ventura[4], Patricia Machado Bueno Fernandes[5], Silas Pessini Rodrigues[1]

[1]Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa em Biologia (NUMPEX-Bio), Duque de Caxias, RJ; [2]Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis (IBqM), Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica (UEMP), Rio de Janeiro, RJ; [3]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF; [4]Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), Vitória, ES; [5]Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Núcleo de Biotecnologia, Vitória, ES.
*giomontovaneli@gmail.com

INTRODUÇÃO

A meleira do mamoeiro é uma importante doença de *Carica papaya* L., associada à infecção conjunta pelo complexo papaya meleira virus (PMeV e PMeV2) (Sá Antunes *et al*., 2016). A infecção apresenta estreita associação com o sistema laticífero da planta e provoca alterações características no látex, incluindo sua exsudação espontânea em frutos e folhas (Rodrigues *et al*., 2009). Esse compartimento especializado constitui, portanto, um ambiente relevante para compreender a organização dos vírus e sua relação com componentes do hospedeiro.

A purificação do material viral a partir do látex permite recuperar partículas associadas ao PMeV/PMeV2 juntamente com outros componentes moleculares. Análises proteômicas anteriores desse material identificaram, além de proteínas virais, proteínas do hospedeiro, incluindo proteases e componentes relacionados à resposta antiviral, como Dicer e Argonauta (Maurastoni *et al*., 2023). Esses achados sustentam a existência de um microambiente molecular complexo que copurifica com as partículas virais. Entretanto, a análise proteômica global não permite relacionar diretamente os componentes identificados às diferentes regiões do perfil proteico observado após separação eletroforética.

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo investigar a complexidade proteica do material que co-purifica com o complexo PMeV/PMeV2, combinando separação eletroforética e espectrometria de massas para ampliar a caracterização do microambiente viral associado ao látex.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de látex de mamoeiros sintomáticos foram submetidas à purificação do material viral por ultracentrifugação diferencial e em gradiente de CsCl, conforme Maurastoni *et al*. (2023). Frações do gradiente

foram analisadas por SDS-PAGE e regiões representativas do perfil eletroforético foram excisadas individualmente, submetidas à digestão in-gel com tripsina (Shevchenko *et al.*, 1996) e analisadas por LC-MS/MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A purificação do material viral a partir do látex de mamoeiros sintomáticos resultou em frações (Super Topo (ST), Topo (T), Médio (M), Baixo (B) e Ultra Baixo (UB) após gradiente de cloreto de césio com perfil proteico complexo (dados não apresentados). A análise por SDS-PAGE das frações T e UB revelou a predominância de bandas de aproximadamente 55 e 40 kDa (p55 e p40), previamente associadas à proteína do capsídeo do PMeV (Maurastoni *et al*., 2023), além de componentes distribuídos em diferentes regiões de massa molecular (Figura 1).

A análise de regiões representativas desse perfil por LC-MS/MS confirmou a presença de componentes virais, notavelmente a proteína capsidial e o RdRp viral e identificou proteínas de origem vegetal, como a papaína, associadas ao material purificado (Tabela 1). Esses resultados ampliam as observações obtidas por análises proteômicas globais anteriores (Maurastoni *et al*., 2023) e demonstram que o material que co-purifica com PMeV/PMeV2 apresenta composição proteica mais complexa do que aquela sugerida pelas bandas majoritárias.

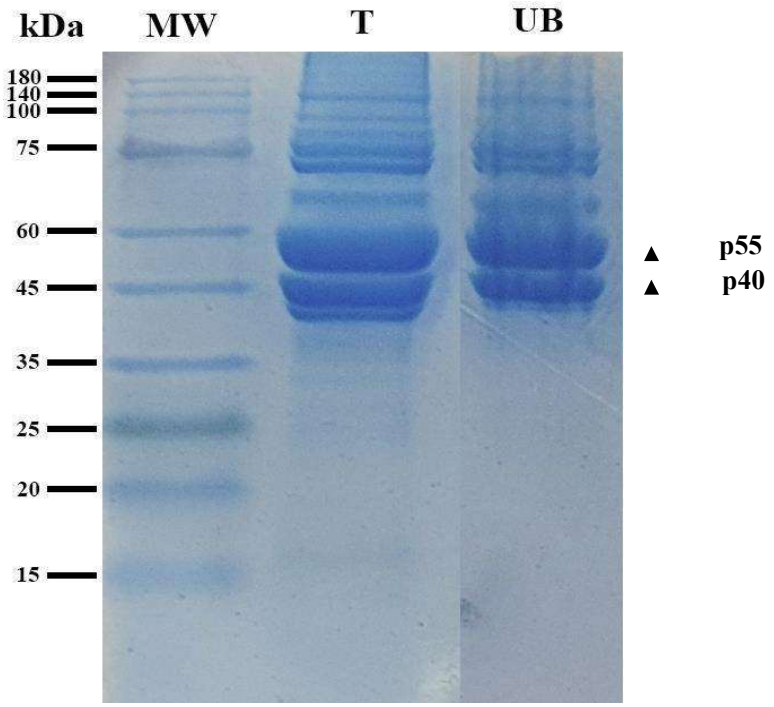


Figura 1 - Perfil proteico do material viral purificado associado ao complexo PMeV/PMeV2. SDS-PAGE de frações obtidas após purificação do material viral a partir do látex de mamoeiros sintomáticos. Observa-se a predominância das bandas de aproximadamente 55 e 40 kDa, além de componentes distribuídos em diferentes regiões de massa molecular. MW - marcador de peso molecular; T – Fração topo; UB – Fração ultra.

Tabela 1 – Lista de proteínas observadas por LC-MS/MS relevantes ao estudo

Codigo de acesso	Proteina do PMeV e proteínas homologas em plantas	Score
AMU19319.1	Proteina do capsídeo (*Fusagravirus kyu*)	5434
IF5A1_BOVIN	Fator de iniciação da tradução eucariótica	163
AMU19320.1	RNA-polimerase dependente de RNA (*Fusagravirus kyu*)	57
HSP7C_BOVIN	Proteína cognata do choque térmico de71 kDa	42
CH10_BOVIN	Proteína do choque térmico mitocondrial de 10 kDa	35
PAPA1_CARPA	Papaíana	29
KPYM_MOUSE	Piruvato quinase PKM	25

Em conjunto, a separação eletroforética associada à identificação por LC-MS/MS evidencia a presença de componentes virais e do hospedeiro distribuídos ao longo do perfil proteico do material purificado. Essa heterogeneidade acrescenta uma dimensão à caracterização proteômica previamente realizada e reforça a importância de investigar como esses componentes se organizam no contexto do microambiente viral associado ao complexo PMeV/PMeV2.

CONCLUSÕES

- O material que copurifica com o complexo PMeV/PMeV2 apresenta um perfil proteico complexo, caracterizado por bandas majoritárias associadas ao capsídeo viral e por componentes distribuídos em diferentes regiões de massa molecular;
- a análise por LC-MS/MS confirmou a presença de componentes virais e do hospedeiro no material purificado, como as proteínas do capsídeo, RNA-polimerase dependente de RNA e papaína;
- os resultados ampliam a caracterização proteômica do material associado ao PMeV/PMeV2 e fornecem uma base para investigar a organização molecular do microambiente viral no látex.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela bolsa de doutorado concedida a Giovanni Ferreira Montovaneli (Processo nº 204.755/2024) e pelo financiamento APQ1-FAPERJ (Processo nº 210.334/2024), coordenado por Silas Pessini Rodrigues. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradecemos, ainda, à Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica (UEMP/UFRJ), em especial à M.Sc. Ana Lucia de Oliveira Carvalho e ao Dr. Yuri Pereira Souza, pelo suporte no preparo das amostras e nas análises por espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

MAURASTONI, M.; ANTUNES, T.F.S.; ABREU, E.F.M.; RIBEIRO, S.G.; MEHTA, A.; SANCHES, M.M.; FONTES, W.; KITAJIMA, E.W.; CRUZ, F.T.; SANTOS, A.M.C.; VENTURA, J.A.; GOMES, A.C.M.M.; ZERBINI, F.M.; SOSA-ACOSTA, P.; NOGUEIRA, F.C.S.; RODRIGUES, S.P.; ARAGÃO, F.J.L.; WHITFIELD, A.E.; FERNANDES, P.M.B. A capsid protein fragment of a fusagra-like virus found in *Carica papaya* latex interacts with the 50S ribosomal protein L17. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 541, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/v15020541

RODRIGUES, S.P.; CUNHA, M.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B.; Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 861-871, 2009. DOI: https://doi.org/10.1007/s00299-009-0673-7

SÁ ANTUNES, T.F.; AMARAL, R.J.V.; VENTURA, J.A.; GODINHO, M.T.; AMARAL, J.G.; SOUZA, F.O.; ZERBINI, P.A.; ZERBINI, F.M.; FERNANDES, P.M.B.; The dsRNA virus Papaya meleira virus and an ssRNA virus are associated with papaya sticky disease. **PLoS ONE**, v. 11, e0155240, 2016. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155240

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M.; Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996. DOI: https://doi.org/10.1021/ac950914h