

Exploración de la interacción entre la región 5'UTR del Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) y proteínas del hospedero maíz

Exploration of the interaction between the 5'UTR region of Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) and host maize proteins

Exploração da interação entre a região 5'UTR do Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) e proteínas do hospedeiro milho

Giovanni Chaves-Bedoya¹

Forma de citar: G. Chaves-Bedoya, "Exploración de la interacción entre la región 5'UTR del Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) y proteínas del hospedero maíz", *Respuestas*, vol. 22, no. 1, pp. 103-111, 2017.

Recibido:
Agosto 30 de 2016

Aceptado:
Diciembre 1 de 2016

Resumen

Antecedentes: El virus del mosaico de la caña de azúcar, SCMV (*Potyvirus*) es un miembro de la gran familia de virus de ARN de cadena positiva, sin una estructura CAP en su extremo 5' no traducido (5'UTR), pero con una proteína viral unida al genoma (VPg) y una cola poli A en su extremo 3'UTR. Se ha sugerido que proteínas del hospedero hacen un puente entre las regiones no traducidas virales 5' y 3' para potenciar la traducción viral. Dado que las regiones no traducidas presentes en los genomas virales contienen elementos involucrados en la regulación de su ciclo replicativo, es importante analizar la interacción entre estas regiones y las proteínas virales o del hospedero para inferir su función. **Objetivo:** Determinar si existen proteínas del hospedero maíz que pudieran estar interactuando con la región 5'UTR de SCMV. **Metodología:** La región 5'UTR de SCMV se amplificó por PCR incluyendo la secuencia del promotor T7 en la secuencia del oligo 5' UTR y se generaron sus transcritos marcados radiactivamente. Los transcritos marcados fueron entrecruzados con extractos proteicos de hojas de maíz sanas e infectadas. **Resultados:** Los resultados sugieren la presencia de una proteína putativa de interacción del hospedante maíz de aproximadamente 53kDa, con la región 5'UTR de SCMV. **Conclusión:** Los ensayos de entrecruzamiento, especificidad y estabilidad de los complejos ARN-proteína sugieren que en el hospedante maíz existe al menos una proteína que interactúa con la región 5' UTR de SCMV.

Palabras Clave: Complejo ARN-proteína, entrecruzamiento UV, fracción proteica, Potyvirus, VPg.

Abstract

Background: Sugarcane mosaic virus is a member of the great family of positive sense RNA viruses, without a CAP structure in its 5'UTR end, but with a viral protein attached to the genome (VPg) and a poli A tail in its 3'UTR end. It has been suggested that some host proteins make a bridge between the untranslated 5' and 3' regions (UTRs) to enhance the canonical and/or non-canonical virus translation. Since the UTR regions present in the viral genomes have some elements involved in the regulation of their replicative cycle, it is important to analyze the interaction that may occur between these regions and the viral or host proteins to infer regarding its function. **Objective:** To identify proteins of

¹Doctorado en Biotecnología Vegetal
gchavesb@ufps.edu.co
Orcid: 0000-0003-1013-614X
Grupo de Investigación PLANTAE, Facultad de Ciencias Básicas
Universidad Francisco de Paula Santander
Cúcuta-Colombia

the host maize that could be interacting with the 5'UTR region of SCMV. **Methodology:** 5'UTR region of SCMV was amplified by PCR including the sequence of the T7 promoter in the 5' oligo sequence. The transcripts were radioactively labeled. Labeled transcripts were crosslinked with proteins extracts from healthy and infected maize leaves. **Results:** The results suggest the presence of a 53 kDa putative protein interacting with the 5'UTR region of SCMV. **Conclusion:** Crosslinking essays, specificity and the stability of the RNA-protein complex suggest that in maize host there is at least one protein that interacts with the 5'UTR region of SCMV.

Keywords: RNA-Protein complex, UV crosslinking, protein fraction, Potyvirus, VPg

Resumo

Antecedentes: O vírus do mosaico da cana de açúcar (SCMV) da Família *Potyviridae* é um membro da grande família de vírus de ARN de cadeia positiva, sem uma estrutura CAP em seu extremo 5' não traduzido (5'UTR), mas com uma proteína viral unida ao genoma (VPg) e uma cola poli A em seu extremo 3'UTR. Tem-se sugerido que proteínas do hospedeiro fazem uma ponte entre as regiões não traduzidas virais 5' e 3' para potenciar a tradução viral. Devido que as regiões não traduzidas presentes nos genomas virais contém elementos involucrados na regulação de seu ciclo replicativo, é importante analisar a interação entre estas regiões e as proteínas virais O do hospedeiro para inferir sua função. **Objetivo:** Determinar se existem proteínas hospedeiras milho que puderam estar interagindo com a região 5'UTR de SCMV. **Metodologia:** A região 5'UTR de SCMV se amplificou por PCR incluindo a sequência do promotor T7 na sequência do oligo 5'UTR e se geraram seus transcritos marcados radiativamente. Os transcritos marcados foram entrecruzados com extratos proteicos de folhas de milho saudáveis e infetadas. **Resultados:** Os resultados sugerem a presença de uma proteína putativa de interação do hospedeiro milho de aproximadamente 53 kDa, com a região 5'UTR de SCMV. **Conclusão:** Os ensaios de entrecruzamento, especificidade e estabilidade dos complexos ARN-proteína sugerem que no hospedeiro milho existe pelo menos uma proteína que interatua com a região 5'UTR de SCMV.

Palavras-chave: complexo ARN-proteína, entrecruzamento UV, fração proteica, Potyvirus, VPg,.

1. Introducción

El virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV), es un miembro del grupo de los potyvirus, dentro de la familia *Potyviridae*, y puede infectar varios cultivos, incluyendo caña de azúcar, sorgo y maíz, causando clorosis y retraso en el crecimiento [1].

Los virus como SCMV codifican relativamente un número bajo de genes con respecto a sus hospederos. Por ejemplo, las células de hospedantes vegetales codifican miles de genes, por lo que la mayoría de pasos en la infección viral involucra interacciones entre

relativamente pocos componentes virales y muchos factores del hospedero. Los factores del hospedero juegan papeles importantes en la mayoría de pasos de la infección viral, y la identificación de tales factores y sus contribuciones ha sido reconocido como un importante objetivo de investigación [2].

Los genomas vegetales codifican proteínas de unión a ARN, las cuales se piensa que se unen a sitios específicos de los ARN mensajeros afectando la fisiología de las plantas. Sin embargo, la función de estas proteínas aun no es muy clara en términos

de cómo las interacciones entre el ARN viral y las proteínas de unión al ARN se regulan de manera específica, o cómo estas proteínas influyen en el ARN viral [3].

En el caso de los *Potyvirus* como el virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV), funciones como la replicación y movimiento sistémico requieren de la interacción de factores del hospedero con proteínas virales y ARN [4]. Aunque se conoce mucho respecto a la función individual de las proteínas de los potyvirus y la estructura del ARN en la replicación viral y el movimiento, [5], [6] poco se conoce acerca de la identidad y función de los factores del hospedero que son requeridos para la infección potyviral en plantas [7].

De manera similar a los ARNm celulares, los ARN virales de cadena positiva tienen regiones codificantes y regiones no traducibles (UTRs). El ARN de los potyvirus, tiene una proteína viral unida al extremo 5'UTR y una cola poli(A) en el extremo 3'UTR. En contraste a los ARNm celulares, el extremo 5' de los ARN virales puede tomar una de diferentes formas: un grupo fosfato, una proteína "cap", o un polipéptido codificado por el virus llamado VPg ("Viral protein genome-linked"), unida covalentemente al primer nucleótido de ARN [8].

Los virus de ARN de cadena positiva han evolucionado diferentes maneras para utilizar los recursos de las células huésped. Sin embargo, a pesar de los diversos juegos de factores del hospedero que son reclutados por diferentes virus, los estudios funcionales sugieren que las diferentes proteínas de los hospederos podrían proporcionar funciones similares durante la replicación del ARN viral [9].

La interacción entre proteínas o de proteínas con ARN desempeñan funciones importantes en la mayoría de procesos durante el ciclo de infección viral; por ejemplo, en la formación de los complejos de replicación viral, el

ensamble de viriones, el movimiento viral entre células y la transmisión de virus entre plantas por vectores [10]. Como ejemplo, en el caso de los potyvirus, se ha encontrado que la interacción entre el factor de traducción eucariota eIF4E con la proteína viral VPg es necesaria para la infección viral [11], y la resistencia recesiva de la planta al virus se determina por el éxito o no de la interacción entre esta proteína y proteínas virales [12]. En el caso del movimiento viral, los potyvirus no codifican proteínas de movimiento [13], pero se ha determinado que algunas proteínas del virus podrían estar relacionadas con el movimiento potyviral en asociación con proteínas de los hospederos [14]-[16].

Existe información limitada respecto a proteínas del hospedero que interactúen con las regiones no traducidas de potyvirus, sin embargo se ha reportado la interacción de proteínas de hospedero con las regiones 5'UTR y 3'UTR no traducidas del genoma del virus Norwalk [17].

En este trabajo se presentan los resultados exploratorios de la interacción *in vitro* de la región 5'UTR del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) con proteínas del hospedero maíz. El conocimiento y comprensión más detallado de las proteínas de unión al ARN del hospedero requeridas para la replicación viral podrá ayudar en el desarrollo de novedosas estrategias antivirales [18].

2. Materiales y métodos

2.1. Extracción de ARN viral. Para la extracción de ARN total, se utilizaron hojas de maíz de plantas que presentaban la sintomatología típica de SCMV utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN cuantificado fue almacenado en alícuotas a una temperatura de -80°C hasta el momento de usar el templado.

2.2. Subclonación del extremo 5' del ADN complementario (ADNc) genómico de SCMV

El segmento desde la posición 1 hasta la posición 892 del genoma de SCMV amplificado por RT-PCR se clonó en el vector TOPO de Invitrogen, siguiendo las indicaciones del fabricante. La amplificación específica de la región 5'UTR se realizó empleando el ADNc anterior utilizando un oligo 5'UTR que contenía la secuencia del promotor T7 para facilitar la síntesis de ARN. El fragmento de PCR obtenido de 149 pb fue subsecuentemente clonado en el vector pGEM-T (Promega).

2.3. Transcripción *in vitro* de la región 5' UTR de SCMV. Para la transcripción *in vitro* se siguió la metodología descrita previamente [19]. La región 5'UTR de SCMV fue amplificada por PCR incluyendo la secuencia del promotor T7 en el oligo 5'. La reacción de PCR se realizó con 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 30 segundos y 75°C x 30 segundos. El producto de PCR fue purificado del gel antes de ser empleado como templado para la síntesis de ARN. La reacción de transcripción *in vitro* se realizó a 38°C por dos horas en un volumen final de 20 µl, empleando la RNA polimerasa T7. Luego de la reacción de transcripción, el molde de ADN remanente se eliminó tratando la muestra con 1 µl DNase RQ1 (Promega) en presencia de inhibidores de RNasa durante 1 hora a 38°C. Para la síntesis de los transcritos de ARN radiomarcados se incluyó [α -³²P]UTP (Dupont).

2.4. Extracción de proteínas totales de hojas de maíz

2 gramos de hojas de maíz sana e infectada por separado se lavaron con agua destilada y se maceraron en morteros de porcelana en presencia de tampón fosfato sódico 0,2 M pH 7.5. El macerado se filtró y se centrifugó a 18.000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Se

colectó el sobrenadante con las fracciones proteicas.

2.5. Ensayos de entrecruzamiento ultravioleta. Para los ensayos de entrecruzamiento inducidos por UV, se incubaron 20 µg/µl de extracto proteico de maíz con 1×10^6 c.p.m de ARN radiomarcado a 0°C por 15 minutos expuestos a luz ultravioleta de longitud corta. El ARN no entrecruzado fue cortado con RNasa T1 (25U) y RNasa A (1mg) por 5 minutos y 37 °C. Finalmente, la muestra fue hervida en buffer de carga proteica por 5 min. y analizada en un gel SDS-PAGE. Los geles se secaron y se autoradiografiaron.

2.6. Inmovilización de ARN en perlas de agarosa dihidrazida y ensayos de afinidad de ARN. Este procedimiento se llevó a cabo empleando dihidrazida de ácido adípico (Sigma) y las metodologías descritas por [20] , [21] con algunas modificaciones. En resumen, 50 µg de ARN sintetizado *in vitro* se oxidó con periodato de sodio (10 mM) durante 2 horas. El ARN oxidado se precipitó con etanol absoluto y se resuspendió en 100 µl de acetato de sodio 0,1 M. El ARN tratado se mezcló con las perlas de dihidrazida de ácido adípico y se colocó en agitación toda la noche a 4°C. Las perlas con el ARN inmovilizado se incubaron con el extracto proteico a 4°C por 1 hora y las proteínas unidas por afinidad se lavaron con NaCl. Las proteínas recuperadas se corrieron en geles SDS-PAGE.

3. Resultados y análisis

3.1. Verificación de clonación del segmento 5' de SCMV y transcripción *in vitro* de la región 5'UTR.

Con el propósito de verificar que la región correspondiente a la 5'UTR de SCMV estaba siendo amplificada correctamente por PCR y de que el tamaño del transcrito *in vitro* eran correspondientes, los productos de PCR y de transcripción se corrieron en geles de agarosa.

En la figura 1, panel A, se puede apreciar un producto amplificado de aproximadamente 150 pares de bases, mientras que en el panel B, se indica lo correspondiente al transcrito de ese segmento. Las imágenes indican que tanto la amplificación por PCR como la transcripción *in vitro* se sintetizaron de manera adecuada, produciendo tamaños de amplificación esperados.

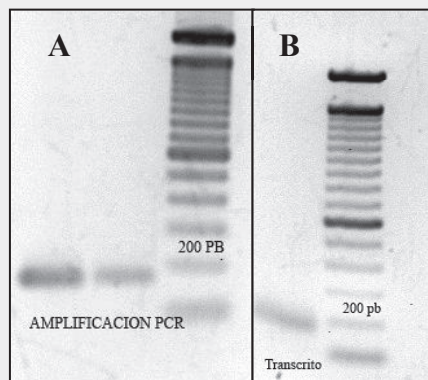


Figura 1. A. RT-PCR de la región 5' UTR de SCMV . B. Transcrito de la región 5' UTR. Tanto los productos de RT-PCR como el transcrito presentan el tamaño esperado

Fuente: Autor

3.2. Interacción de la región 5' UTR de SCMV con extractos proteicos de Maíz.

Para determinar si la región no traducida del extremo 5' del genoma del virus SCMV interactuaba con proteínas del hospedero maíz, los transcritos de ARN marcados radiactivamente con P^{32} que incluye los nucleótidos 1-149 se incubaron con los extractos proteicos de maíz. Luego de la electroforesis, se encontró al menos un complejo ARN-proteína tanto con los extractos de maíz obtenidos a partir de plantas sanas como de las plantas con expresión clara de síntomas de la virosis (Figura 2). El ensayo de entrecruzamiento se hizo tanto con plantas de maíz sanas como plantas de maíz enfermas. Se puede apreciar que en los dos sistemas se encuentra proteínas de interacción, lo que sugiere que las proteínas con las cuales esta interactuando esta región no son proteínas inducidas por el virus, sino que son proteínas constitutivas de maíz.

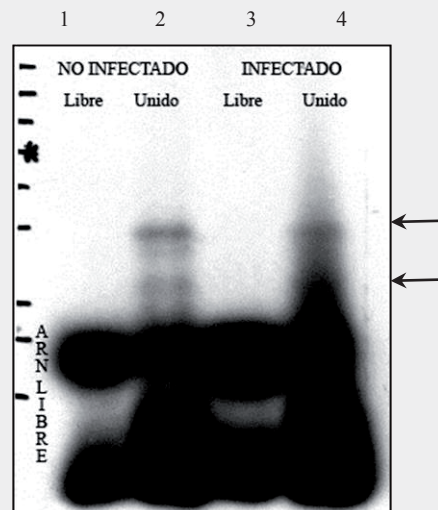


Figura 2. Ensayos de entrecruzamiento UV de ARN 5' UTR-Proteínas de maíz. ARN marcado incubado en ausencia (líneas 1 y 3) o presencia (líneas 2 y 4) de extractos proteicos de maíz. Las flechas al costado derecho indican los complejos ARN - proteína. Las manchas de menor peso en el gel corresponden a ARN marcado radiactivamente que no se unió a proteínas (ARN libre)

Fuente: Autor

3.3. Estabilidad de los complejos ARN-Proteína

Con el propósito de determinar la estabilidad de los complejos ARN-proteína, las muestras se incubaron con diferentes concentraciones de solución salina de cloruro de potasio. Los complejos ARN-proteína formados con el transcrito de 149 nucleótidos de la 5' UTR de SCMV fueron estables ya que aún a concentraciones de 0.6 M de cloruro de potasio no se deshicieron (Figura 3).

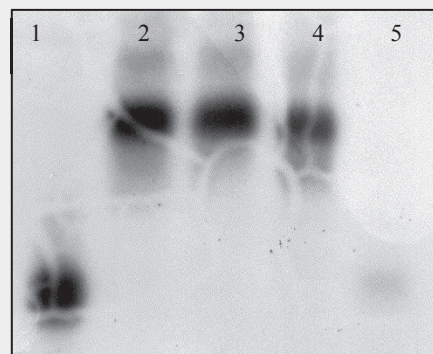


Figura 3. Estabilidad de los complejos 5' UTR. Los Complejos ARN-proteína formados por UV fueron tratados con KCl 0.3 M (Línea 3) 0.6M (Línea 4) y proteinasa K (Línea 5). En la línea 1 ARN marcado libre. Línea 2 ARN unido a proteína sin tratamiento de sal

Foto: Autor

Cuando la mezcla se trató con proteinasa K, una serine proteasa, el complejo desaparece (Figura 3, línea 5) por la digestión de la proteína. Cuando no se adicionó proteína al sistema, el ARN se movilizó más rápido porque no se formó ningún complejo (Figura 3, línea 1).

Los resultados de los ensayos de entrecruzamiento y la estabilidad de los complejos ARN-proteína sugieren que en el hospedante maíz existe al menos una proteína que interactúa con la región 5' UTR de SCMV y que esta interacción es estable.

3.4. Cromatografía de afinidad ARN-Proteína

Una vez que se encontró evidencia de la presencia de por lo menos una proteína del

hospedero maíz que formaba complejos con el transcrito de 149 nucleótidos de la región 5'UTR de SCMV, se realizó el ensayo de cromatografía de afinidad empleando dihidrazida de ácido adípico basado en metodologías previamente reportadas [20, 21] con algunas modificaciones. La figura 4 muestra los resultados del gel SDS-PAGE con las proteínas eluidas que estaban unidas por afinidad al transcrito de la región 5'UTR de SCMV. Como control se empleó ARN de transferencia (ARNt), el cual se mezcló con extracto proteico del mismo hospedero maíz. Como se observa en el carril 2 de la figura 4, con el ARNt no se aprecia el complejo que se formó con los transcritos de la 5' UTR (Figura 4, carriles 3 y 4), lo que sugiere la especificidad de la interacción de las proteínas del maíz con el transcrito 5'UTR de SCMV.

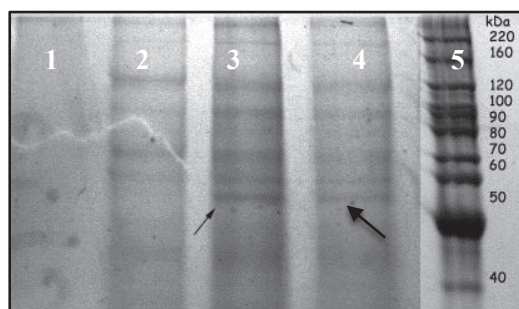


Figura 4. Gel SDS-PAGE con proteínas eluidas. En el carril 1 control sin ARN, carril 2 control con ARNt, carriles 3 y 4 eluidos 1 y 2, carril 5 marcador de peso molecular. En los carriles 3 y 4 se visualiza una banda de aproximadamente 53 kDa que no está presente en el carril 2, en el que se empleó ARNt como control positivo, ni en el carril 1, control en el que no se cargó ARN. En el carril 5 marcador de peso molecular.

Fuente: Autor

4. Discusión de resultados.

Los genomas de los pequeños virus de ARN de cadena sencilla, sentido positivo, no solamente deben codificar las proteínas virales requeridas para la replicación del genoma viral y la producción de partículas infecciosas, sino que además deben tener estructuras y secuencias de ARN que desempeñan un papel crítico en el ciclo de vida del virus. Los factores celulares del hospedero que

interactúan con estos elementos de ARN, desempeñan funciones importantes en todos los aspectos del ciclo de vida del virus [17]. En consecuencia, la manipulación de estas interacciones o la modificación de las interacciones RNA-proteína pueden permitir una atenuación o una actividad antiviral [22].

En la literatura existen reportes de proteínas del hospedero maíz que se encontraron interactuando con proteínas codificadas por

SCMV. Por ejemplo las interacciones entre la elongina C y la proteína viral VPg [23], o la interacción entre la Ferredoxina-5 con la proteína viral HC-Pro [24]. Sin embargo la interacción de proteínas del hospedero con las regiones no traducidas ha sido menos estudiada, a pesar de la importante función de estas regiones en el proceso de traducción en virus, que no presentan una estructura caperuza (cap) 7-metilguanosa (m7GpppG) en el extremo 5' como es el caso de los ARN mensajeros de eucariotas.

La mayoría de los virus de ARN han evolucionado diversos elementos de ARN en las regiones no traducidas 3' y 5' para reclutar el complejo ribosomal e iniciar la traducción en el codón AUG próximo al extremo 5' [25]. En los potyvirus, como SCMV, en el extremo 5'UTR, en lugar de una estructura cap, se encuentra una proteína viral VPg unida covalentemente que reemplaza la estructura cap, y el extremo 3'UTR está poliadelinado [26]. De acuerdo a los resultados de entrecruzamiento por luz ultravioleta, en este estudio se encontró que en el hospedante maíz existe por lo menos una proteína de aproximadamente 53 kDa, que posiblemente esté interactuando con la región 5' UTR del potyvirus SCMV.

Los resultados obtenidos al tratar el complejo ARN-proteína con concentraciones crecientes de solución salina, sugieren que esta proteína putativa de interacción forma complejos estables con los transcritos de la región 5' UTR de SCMV. Así mismo, la especificidad de la formación del complejo fue confirmada en ensayos de competencia utilizando ARN de transferencia como control. La formación de complejos estables y específicos, sugieren que la interacción del ARN de SCMV con la proteína de 53 kDa podría desempeñar una función importante en la traducción de SCMV.

Dado que la región 5'proximal de los genomas de algunos virus de ARN contienen

elementos que desempeñan funciones críticas en la traducción, se podría proponer de manera preliminar que la proteína de 53 kDa que se encuentra interactuando con esta región, posiblemente cumpla un papel como proteína auxiliar en la transcripción o traducción del virus por interacción directa con la región, o sirviendo como puente entre la región 5' UTR y la 3' UTR, ya que el sistema de transcripción y traducción de los virus de ARN con estructura tipo cap en el extremo 5' del genoma forman un puente con el otro extremo circularizando su genoma [27]. Se requiere de estudios complementarios para confirmar lo encontrado en este estudio.

5. Conclusiones

Se encontró evidencia preliminar de que una proteína de aproximadamente 53 kDa del hospedante maíz puede estar interactuando de manera específica y estable con la región 5'UTR del virus del mosaico de la caña de azúcar, la cual al interactuar con esta región del genoma viral sugiere que podría desempeñar una función en la traducción del genoma viral. Sin embargo, es necesario realizar análisis posteriores que permitan identificar la naturaleza de la proteína. El conocimiento y comprensión más detallado de las funciones de las proteínas de unión al ARN del hospedero requeridas para la replicación viral pueden ayudar al desarrollo de estrategias antivirales novedosas [18].

6. Agradecimientos

El autor expresa su agradecimiento a la Dra. L. Gutiérrez del Cinvestav México por la capacitación en técnicas de entrecruzamiento con luz ultra violeta y técnicas radiactivas.

7. Referencias

- [1] D. D. Shukla, M. Tasic, J. M. Jilka, R. Ford, W. Toler, and A. Langham, "Taxonomy of potyvirus infecting maize, sorghum, and sugarcane in

- Australia and the united States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins”, *Phytopatology*, vol. 79, pp. 223-229, 1989.
- [2] P. Ahlquist, A. O. Noueir, W. M. Lee, D. B. Kushner, and B. T. Dye, “Host factors in positive-strand RNA virus genome replication”, *J Virol*, vol. 77, pp. 8181-6, Aug 2003.
- [3] S. U. Huh and K. H. Paek, “Plant RNA binding proteins for control of RNA virus infection,” *Front Physiol*, vol. 4, p. 397, 2013.
- [4] J. C. Carrington, K. D. Kasschau, S. K. Mahajan, and M. C. Schaad, “Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants,” *Plant Cell*, vol. 8, pp. 1669-1681, Oct 1996.
- [5] J. L. Riechmann, M. T. Cervera, and J. A. Garcia, “Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability,” *J Gen Virol*, vol. 76 (Pt 4), pp. 951-6, Apr 1995.
- [6] S. Urcuqui-Inchima, J. Walter, G. Drugeon, S. German-Retana, A. L. Haenni, T. Candresse, *et al.*, “Potyvirus helper component-proteinase self-interaction in the yeast two-hybrid system and delineation of the interaction domain involved,” *Virology*, vol. 258, pp. 95-9, May 25 1999.
- [7] B. C. Kang, I. Yeam, J. D. Frantz, J. F. Murphy, and M. M. Jahn, “The pvr1 locus in Capsicum encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg,” *Plant J*, vol. 42, pp. 392-405, May 2005.
- [8] K. Thivierge, V. Nicaise, P. J. Dufresne, S. Cotton, J. F. Laliberte, O. Le Gall, *et al.*, “Plant virus RNAs. Coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events,” *Plant Physiol*, vol. 138, pp. 1822-7, Aug 2005.
- [9] P. D. Nagy and J. Pogany, “The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors,” *Nat Rev Microbiol*, vol. 10, pp. 137-49, Dec 19 2011.
- [10] D. Guo, M. L. Rajamaki, M. Saarma, and J. P. Valkonen, “Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system,” *J Gen Virol*, vol. 82, pp. 935-9, Apr 2001.
- [11] C. Robaglia and C. Caranta, “Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection,” *Trends Plant Sci*, vol. 11, pp. 40-5, Jan 2006.
- [12] J. Diaz-Pendon, V. Truniger, C. Nieto, J. Garcia-Mas, A. Bendahmane, and M. A. Aranda, “Advances in understanding recessive resistance to plant viruses,” *Mol Plant Pathol*, vol. 5, pp. 223-233, 2004.
- [13] F. Revers, O. Le Gall, T. Candresse, and A. Maule, “New Advances in Understanding the Molecular Biology of Plant/Potyvirus Interactions,” *MPMI*, vol. 12, pp. 367-376, 1999.
- [14] J. C. Carrington, P. E. Jensen, and M. C. Schaad, “Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement,” *Plant J*, vol. 14, pp. 393-400, May 1998.
- [15] V. V. Dolja, R. Haldeman-Cahill, A. E. Montgomery, K. A. Vandenbosch, and J. C. Carrington, “Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco

- etch potyvirus,” *Virology*, vol. 206, pp. 1007-16, Feb 1 1995.
- [16] K. D. Kasschau, S. Cronin, and J. C. Carrington, “Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase,” *Virology*, vol. 228, pp. 251-62, Feb 17 1997.
- [17] S. Vashist, L. Urena, Y. Chaudhry, and I. Goodfellow, “Identification of RNA-protein interaction networks involved in the norovirus life cycle,” *J Virol*, vol. 86, pp. 11977-90, Nov 2012.
- [18] Z. Li and P. D. Nagy, “Diverse roles of host RNA binding proteins in RNA virus replication,” *RNA Biol*, vol. 8, pp. 305-15, Mar-Apr 2011.
- [19] A. L. Gutierrez-Escolano, Z. U. Brito, R. M. del Angel, and X. Jiang, “Interaction of cellular proteins with the 5’ end of Norwalk virus genomic RNA,” *J Virol*, vol. 74, pp. 8558-62, Sep 2000.
- [20] M. Caputi and A. M. Zahler, “Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H’/F/2H9 family,” *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 43850-9, Nov 23 2001.
- [21] G. P. Patel, S. Ma, and J. Bag, “The autoregulatory translational control element of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex,” *Nucleic Acids Res*, vol. 33, pp. 7074-89, 2005.
- [22] V. Fontanes, S. Raychaudhuri, and A. Dasgupta, “A cell-permeable peptide inhibits hepatitis C virus replication by sequestering IRES transacting factors,” *Virology*, vol. 394, pp. 82-90, Nov 10 2009.
- [23] M. Zhu, Y. Chen, X. S. Ding, S. L. Webb, T. Zhou, R. S. Nelson, *et al.*, “Maize Elongin C interacts with the viral genome-linked protein, VPg, of Sugarcane mosaic virus and facilitates virus infection,” *New Phytol*, vol. 203, pp. 1291-304, Sep 2014.
- [24] Y. Q. Cheng, Z. M. Liu, J. Xu, T. Zhou, M. Wang, Y. T. Chen, *et al.*, “HC-Pro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta,” *J Gen Virol*, vol. 89, pp. 2046-54, Aug 2008.
- [25] J. Zhang, R. Roberts, and A. M. Rakotondrafara, “The role of the 5’ untranslated regions of Potyviridae in translation,” *Virus Res*, vol. 206, pp. 74-81, Aug 3 2015.
- [26] M. J. Adams, J. F. Antoniw, and F. Beaudoin, “Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae,” *Mol Plant Pathol*, vol. 6, pp. 471-87, Jul 1 2005.
- [27] T. W. Dreher and W. A. Miller, “Translational control in positive strand RNA plant viruses,” *Virology*, vol. 344, pp. 185-97, Jan 5 2006.