



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
E BIOLOGIA MOLECULAR

FERNANDA ALVES DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *eIF4E* EM FEIJÃO-CAUPI E  
POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES QUANTO À RESISTÊNCIA AO *cowpea aphid-borne  
mosaic virus* (CABMV)**

Recife

2025

FERNANDA ALVES DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *eIF4E* EM FEIJÃO-CAUPI E  
POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES QUANTO À RESISTÊNCIA AO *cowpea aphid-borne  
mosaic virus* (CABMV)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador(a): Profa. Dra. Valesca Pandolfi

Coorientador(a): Profa. Dra Ana Maria Benko-Iseppon

Prof. Dr. José Diogo Cavalcanti Ferreira

Recife  
2025

. Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Andrade, Fernanda Alves de.

Caracterização de mutações no gene eIF4E em feijão-caupi e possíveis implicações quanto à resistência ao cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) / Fernanda Alves de Andrade. - Recife, 2025. 76f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2025.

Orientação: Valesca Pandolfi.

Coorientação: Ana Maria Benko-Iseppon.

Coorientação: José Diogo Cavalcanti Ferreira.

Inclui referências e apêndices.

1. Fatores de iniciação 4E; 2. Feijão-caupi; 3. Potyvirus; 4. Resistência recessiva; 5. VPg. I. Pandolfi, Valesca. II. Benko-Iseppon, Ana Maria. III. Ferreira, José Diogo Cavalcanti. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

**FERNANDA ALVES DE ANDRADE**

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE eIF4E EM FEIJÃO-CAUPI E  
POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES QUANTO À RESISTÊNCIA AO *cowpea aphid-borne  
mosaic virus* (CABMV)**

**Área de Concentração: Biologia Molecular e Bioinformática**

**Aprovado em 12/02/2025.**

**Banca Examinadora**

---

Dra. Valesca Pandolfi

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Isabelle Freire Viana

Instituto Aggeu Magalhães

---

Dr. Tercilio Calsa Júnior

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Luciana Gonçalves de Oliveira

Instituto Agronômico de Pernambuco

Recife

2025

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, Maria Andrade, por todo o cuidado, apoio, amor e companheirismo incondicionais. Aos meus amigos Sabrina, Thayani e Vitor, que estiveram sempre ao meu lado, sou profundamente grato pela amizade e suporte constantes.

À minha orientadora, Dra. Valesca Pandolfi, agradeço pela confiança depositada em mim ao longo desses anos de orientação. Sou igualmente grata por sua compreensão e disponibilidade em me ajudar sempre que necessário.

Ao meu coorientador, Dr. José Diogo, expresso minha gratidão por sua contribuição fundamental para a execução do projeto, pela paciência e presença constante.

Também agradeço à minha coorientadora, Dra. Ana Maria Benko-Iseppon, por seu empenho em viabilizar a pesquisa no laboratório.

Agradeço ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) e a todos os amigos e colegas que conheci ao longo do processo, pelo apoio e aprendizado compartilhados.

Um agradecimento especial à Fernanda Freitas Souza, Ana Carolina, Ayug Lemos e Jarbson Henrique, cujas amizades tornaram essa jornada mais leve. De maneira ainda mais especial, agradeço ao meu amigo Madson Aragão por todos os ensinamentos e pela paciência inestimável.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pelo suporte essencial para a execução do projeto. Destaco o Dr. Antônio Félix da Costa, por sua atenção, cuidado e apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular/UFPE pela infraestrutura, suporte e conhecimentos oferecidos ao longo do mestrado.

Estendo meu reconhecimento à Universidade Federal de Pernambuco, pela formação acadêmica e profissional proporcionada desde a graduação até o presente momento.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa.

Muito obrigada!

## RESUMO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma leguminosa de elevada importância socioeconômica, principalmente em regiões semiáridas do Brasil e do mundo. No entanto, sofre perdas significativas causadas por fitopatógenos e pragas virais. Dentre as viroses destaca-se o *cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), vírus de RNA fita simples sentido positivo, o qual apresenta na extremidade 5' a proteína do genoma viral (VPg). O CABMV sequestra a maquinaria de tradução do hospedeiro ao interagir sua proteína VPg com os fatores de iniciação da tradução 4E (eIF4E), mimetizando o 5'cap do mRNA do hospedeiro, o que garante a replicação viral e resulta em sintomas como mosaico e distorções foliares. Mutações no gene *eIF4E* já foram associadas à resistência recessiva a outros vírus da família Potyviridae, mas seu papel na interação CABMV e *V. unguiculata* era inexplorado. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar qual relação existente entre mutações no gene *eIF4E* de *V. unguiculata* com a resistência ao CABMV. A hipótese considerada foi que alterações nesse gene poderiam comprometer a interação entre as proteínas eIF4E e VPg, conferindo resistência ao hospedeiro. Inicialmente, o gene *eIF4E* de três cultivares, duas suscetíveis e uma resistente ao CABMV foram sequenciados. As sequências apresentaram um percentual de conservação de 98,45%. Três mutações na mesma foram encontradas entre as cultivares suscetíveis e resistente (C203G, G325C e C329T), dentre essas as mutações C203G e G325C alteram as características dos aminoácidos das respectivas proteínas. Fundamentado nisso, dois pares de *primers* foram desenhados para serem utilizados na seleção de genótipos de cultivares de *V. unguiculata*. No total, vinte sete cultivares foram utilizadas para avaliação do genótipo por PCR e bioensaio com o CABMV. Das 27 cultivares estudadas, 17 amplificaram com o primer para a possível suscetibilidade, das quais 15 (88.24%) apresentaram sintomas 10 dias após infecção. Entre as 8 cultivares que amplificaram para a possível resistência, 5 (62,5%) foram assintomáticas e, duas não amplificaram com os dois pares de primers utilizados, como também, não exibiram sintomas. Paralelamente, análises *in silico* com cinco cultivares foram realizadas. Modelos teóricos gerados no AlphaFold 3 mostraram que mutações não sinônimas alteram a dinâmica estrutural da eIF4E, especialmente na interação com a VPg. Simulações de dinâmica molecular (MD) revelaram que a ligação VPg-eIF4E induz ajustes estruturais e maior estabilidade em cultivares resistentes. Análises de cargas

eletrostáticas indicaram perfis complementares entre VPg e eIF4E, reforçando o papel central desse mecanismo no sequestro da maquinaria de tradução. Análises da energia livre de ligação e da área de interação eIF4E-VPg demonstraram que cultivares suscetíveis têm maior afinidade pela VPg, enquanto resistentes exibem valores intermediários, sugerindo outros fatores na determinação da resistência. Este estudo descreve pela primeira vez o papel do gene eIF4E na infecção por CABMV em *V. unguiculata*, fornecendo bases para estratégias de manejo, melhoramento genético e investigações futuras sobre resistência.

**Palavras-chave:** Fatores de iniciação 4E; feijão-caupi; Potyvirus; Resistência recessiva; VPg.

## ABSTRACT

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] is a legume of high socioeconomic importance, especially in semi-arid regions of Brazil and the world. However, it suffers significant losses caused by phytopathogens and viral pests. Among the viral diseases, the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) stands out. It is a positive-sense single-stranded RNA virus, which has the viral genome-linked protein (VPg) at the 5' end. CABMV hijacks the host's translation machinery by interacting its VPg protein with the translation initiation factors 4E (eIF4E), mimicking the host mRNA 5' cap, which ensures viral replication and results in symptoms such as mosaic and leaf distortion. Mutations in the *eIF4E* gene have already been associated with recessive resistance to other viruses from the Potyviridae family, but their role in the CABMV and *V. unguiculata* interaction had not been explored. Thus, the objective of this work was to evaluate the relationship between mutations in the *eIF4E* gene of *V. unguiculata* and resistance to CABMV. The hypothesis considered was that alterations in this gene could compromise the interaction between the eIF4E and VPg proteins, conferring resistance to the host. Initially, the *eIF4E* gene of three cultivars—two susceptible and one resistant to CABMV—was sequenced. The sequences showed a conservation percentage of 98.45%. Three mutations were found between the susceptible and resistant cultivars (C203G, G325C, and C329T), among which the mutations C203G and G325C altered the characteristics of the respective protein amino acids. Based on this, two pairs of primers were designed to be used in the selection of genotypes of *V. unguiculata* cultivars. In total, twenty-seven cultivars were used for genotype evaluation by PCR and bioassay with CABMV. Of the 27 cultivars studied, 17 amplified with the primer for possible susceptibility, of which 15 (88.24%) showed symptoms 10 days after infection. Among the 8 cultivars that amplified for possible resistance, 5 (62.5%) were asymptomatic, and two did not amplify with either of the two primer pairs used and did not show symptoms. In parallel, *in silico* analyses were performed with five cultivars. Theoretical models generated in AlphaFold 3 showed that non-synonymous mutations alter the structural dynamics of eIF4E, especially in the interaction with VPg. Molecular dynamics (MD) simulations revealed that the VPg–eIF4E binding induces structural adjustments and greater stability in resistant cultivars. Electrostatic charge analyses indicated complementary profiles between VPg and eIF4E, reinforcing the central role of this mechanism in hijacking the translation

machinery. Analyses of binding free energy and the eIF4E–VPg interaction area showed that susceptible cultivars have greater affinity for VPg, while resistant ones exhibited intermediate values, suggesting other factors in the determination of resistance. This study describes for the first time the role of the *eIF4E* gene in CABMV infection in *V. unguiculata*, providing a foundation for management strategies, genetic improvement, and future investigations into resistance.

**Keywords:** Translation initiation factors 4E; cowpea; Potyvirus; recessive resistance; VPg.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### DISSERTAÇÃO

- Figura 1 – Organização do genoma de um membro típico da família Potyviridae e principais características e funções propostas para as proteínas potyvirais. VPg (*Viral genome-linked protein*); P1-Pro (protease da proteína 1); HC-Pro (protease de componente auxiliar); P3 (proteína 3); PIPO (*Pretty Interesting Potyviridae ORF*); 6K1 e 6K2 (proteínas transmembrana); CI (inclusão citoplasmática); NIa-Pro (protease de inclusão nuclear a); NIb (proteína de inclusão nuclear b); CP (proteína do capsídeo). Clivagem: P1-Pro (seta tracejada 1), HC-Pro (seta tracejada 2) e NIa-Pro (↓) ..... 20
- Figura 2 – Fatores do hospedeiro: pró-viral e antiviral. Os fatores antivirais (linha vermelha) influenciam a resistência à infecção viral, inibindo uma ou mais etapas essenciais do ciclo de infecção (caixa cinza). Por outro lado, os fatores pró-virais (seta verde) colaboram com os fatores virais em todas as fases do ciclo de infecção, determinando a suscetibilidade ao vírus e podem ser essenciais ou não essenciais para o hospedeiro ..... 21
- Figura 3 – Representação da interação eIF4E - VPg. Em (A) a atuação do complexo eIF4F em sua forma nativa na planta hospedeira (eIF4E ligado ao CAP 5'- mRNA) e em (B) o complexo eIF4F sendo utilizado pelo CABMV (eIF4E ligado à VPg 5'-mRNA viral) ..... 24
- Figura 4 – Representação da interação eIF4E - VPg. Em (A) atuação do complexo eIF4F em sua forma nativa na planta hospedeira (eIF4E ligado ao CAP 5'- mRNA) e em (B) o complexo eIF4F sendo utilizado pelo CABMV (eIF4E ligado à VPg 5'-mRNA viral) ..... 26
- Figura 5 – Fluxograma das etapas da simulação em Dinâmica Molecular: definição dos parâmetros da caixa; inserção da proteína na caixa; adição de água ao redor da proteína; e inclusão de íons para neutralização do sistema ..... 30
- Figura 6 – Modelo de ancoragem molecular ..... 32

### LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                |                                                                                                    |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AF2            | AlphaFold2                                                                                         |
| Avr            | Avirulência                                                                                        |
| CABMV          | <i>cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos)  |
| CYVV           | <i>clover yellow vein virus</i> (vírus da aveia amarela do trevo)                                  |
| ChiVMV         | <i>chilli veinal mottle virus</i> (vírus da mancha venosa da pimenta)                              |
| CPMV           | <i>cowpea mosaic virus</i> (vírus do mosaico do feijão-caupi)                                      |
| CPSMV          | <i>cowpea severe mosaic virus</i> (vírus do mosaico severo do feijão - caupi)                      |
| CONAB          | Companhia Nacional de Abastecimento                                                                |
| eIF4E          | <i>Eukaryotic translation Initiation Factor</i> 4E (Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E) |
| ETI            | <i>Effector-triggered immunity</i> (Imunidade desencadeada por efetores)                           |
| Genes <i>R</i> | Genes de resistência                                                                               |
| Genes <i>S</i> | Genes de suscetibilidade                                                                           |
| HB             | <i>Hydrogen Bond</i> (Pontes de Hidrogênio)                                                        |
| HR             | <i>Hypersensitive response</i> (Resposta hipersensível)                                            |
| IPA            | Instituto Agronômico de Pernambuco                                                                 |
| MD             | <i>Molecular Dynamics</i> (Dinâmica Molecular)                                                     |
| mRNA           | RNA mensageiro                                                                                     |
| NB-LRRs        | Domínios ricos em repetições em leucina de ligação a nucleotídeos                                  |
| PABP           | Proteína de ligação ao poli-A                                                                      |
| PAMPs          | <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)         |
| PCD            | <i>Programmed cell death</i> (Morte celular programada)                                            |
| PIPO           | <i>Pretty Interesting Potyviridae</i> ORF                                                          |
| RG             | <i>Radius of Gyration</i> (Raio de Giração)                                                        |
| RMSD           | <i>Root Mean Square Deviation</i> (Raiz do desvio quadrático médio)                                |
| RMSF           | <i>Root Mean Square Fluctuation</i> (Flutuação da raiz quadrada média)                             |
| ORF            | <i>Open Reading Frame</i> (Quadro de leitura aberto)                                               |
| PRRs           | <i>Pattern recognition receptor</i> (Receptor de reconhecimento de padrões)                        |

|         |                                                                     |
|---------|---------------------------------------------------------------------|
| PTI     | <i>PAMP triggered immunity</i> (Imunidade desencadeada por PAMP)    |
| PVY     | <i>potato Virus Y</i> (Vírus Y da batata)                           |
| RT-qPCR | <i>Real Time- Quantitative PCR</i> (PCR quantitativa em tempo real) |
| VPg     | <i>Viral Protein genome-linked</i> (Proteína do genoma viral)       |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                                                                                  |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                          | <b>14</b> |
| 1.1      | OBJETIVOS .....                                                                                                                                                                                  | 17        |
| 1.1.1    | Objetivo geral .....                                                                                                                                                                             | 17        |
| 1.1.2    | Objetivos específicos .....                                                                                                                                                                      | 17        |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                                                                                                                                               | <b>18</b> |
| 2.1      | FEIJÃO-CAUPI: IMPORTÂNCIA, PRODUÇÃO E DESAFIOS POR<br>POTYVIROSES .....                                                                                                                          | 18        |
| 2.2      | POTYVIRUS: ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E POLIPROTEÍNAS .....                                                                                                                                            | 19        |
| 2.3      | MECANISMOS DE SUSCETIBILIDADE/ RESISTÊNCIA DAS<br>PLANTAS AOS VÍRUS (POTYVIRUS) .....                                                                                                            | 21        |
| 2.4      | GENES <i>eIF4E</i> E ISOFORMAS .....                                                                                                                                                             | 23        |
| 2.1.1    | Ligação dos fatores <i>eIF4E</i> e <i>eIF(iso)4E</i> .....                                                                                                                                       | 24        |
| 2.5      | MODELAGEM MOLECULAR .....                                                                                                                                                                        | 25        |
| 2.6      | SIMULAÇÃO EM DINÂMICA MOLECULAR .....                                                                                                                                                            | 29        |
| 2.7      | ANCORAGEM MOLECULAR .....                                                                                                                                                                        | 31        |
| <b>3</b> | <b>ARTIGO - Deciphering Cowpea Resistance to Potyvirus:<br/>Assessment of 2 <i>eIF4E</i> Gene Mutations and Their Impact on the<br/><i>eIF4E</i>-VPg 3 Protein Interaction (Publicado) .....</b> | <b>34</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                                                         | <b>35</b> |
|          | <b>PRODUÇÃO DURANTE O VÍNCULO COM O PPGGBM .....</b>                                                                                                                                             | <b>44</b> |
|          | <b>APÊNDICE – Deciphering Cowpea Resistance to Potyvirus:<br/>Assessment of 2 <i>eIF4E</i> Gene Mutations and Their Impact on the<br/><i>eIF4E</i>-VPg 3 Protein Interaction .....</b>           | <b>49</b> |

## INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma importante leguminosa que possui um elevado teor de proteínas, como também carboidratos, vitaminas e sais minerais (Boukar et al., 2019). Além de ser importante para fertilidade do solo, uma vez que possui a capacidade de fixação de nitrogênio (Carvalho et al., 2017). No Brasil, sua comercialização é dada principalmente nas regiões Norte e Nordeste, mas com ampliação para a região Centro – Oeste (Freire Filho, 2011). Mundialmente seu cultivo concentra-se em regiões semiáridas, como África Subsaariana, Sudeste Asiático, América do Sul e Estados Unidos (Herniter; Muñoz-Amatriaín; Close, 2020).

Os vírus de plantas estão entre os principais agentes de perdas na produção agrícola em escala global, resultando em prejuízos econômicos substanciais (Faizal et al., 2024). Embora a incidência de doenças virais possa ser atenuada por medidas integradas (ex. controle de vetores virais, uso de sementes livres de doenças), estratégia mais eficaz e sustentável reside na resistência genética conferida pela planta hospedeira (Manzoor et al., 2024).

O gênero Potyvirus representa o maior grupo de vírus de RNA que infectam plantas (Nigam et al., 2019). Entre os principais vírus pertencentes a este gênero, destaca-se o vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (*cowpea Aphid-borne Mosaic virus* - CABMV), sendo responsável por perdas em rendimento de culturas entre 13-87%, a depender das condições de campo, da suscetibilidade da cultura, da cepa do vírus e das condições ambientais (Bashir; Ahmad; Ghafoor, 2002). O CABMV (como os demais Potyvirus) apresenta um RNA fita simples, sentido positivo (Wyllie et al., 2017). A extremidade 5' é ligada a uma proteína denominada VPg (*Viral Protein genome-linked*), sendo a extremidade 3' composta por uma cauda poli-A (Wyllie et al., 2017). Durante a infecção viral, a proteína VPg mimetiza o Cap-5' (m7GpppN) do mRNA eucariótico, ligando-se ao fator iniciação da tradução de eucariotos 4E (eIF4E - *eukaryotic translation initiation factor* 4E), a fim de promover a síntese proteica e completar seu ciclo de vida no hospedeiro (Revers; García, 2015; Wang; Krishnaswamy, 2012; Xu et al., 2017).

Além da resistência dominante, mediadas pelos genes *R* (de resistência), as plantas apresentam uma resistência recessiva, associada aos genes *S* (de suscetibilidade) (Pavan et al., 2010; Wu et al., 2019; Zlobin; Taranov, 2023). Neste

caso, quando ocorre a perda da função de uma proteína hospedeira (necessária para o ciclo de vida do vírus), a interação entre os fatores do hospedeiro e o vírus não ocorre, levando à resistência da planta ao referido patógeno (Gallois; German-Retana, 2023). Em geral, essa resistência é adquirida na ausência ou presença de mutações em genes que codificam proteínas essenciais para o ciclo de vida viral (Zlobin; Taranov, 2023). Tais mutações podem gerar substituições não sinônimas, promovendo alterações na carga e hidrofobicidade da proteína (Poulicard et al., 2016). Mudanças estruturais podem resultar em não interação entre proteínas do vírus e da planta hospedeira, levando à resistência ao patógeno (Gomez et al., 2019). A resistência é, em muitos casos, conferida por genes recessivos que codificam fatores de iniciação da tradução da família eIF4E, comumente associados à resistência a vírus do gênero Potyvirus (Gutierrez Sanchez et al., 2020).

Em eucariotos, a subunidade eIF4E atua como a proteína responsável pela ligação do Cap 5' do mRNA ao complexo eIF4F, além de recrutar a helicase eIF4A e o fator eIF4G (Gutierrez Sanchez et al., 2020). Em plantas são conhecidos dois ou mais membros dessa família de fatores, os quais atuam em conjunto com os demais fatores do complexo de tradução (Bastet; Robaglia; Gallois, 2017). Entretanto, sabe-se que os Potyvirus normalmente apresentam preferência por uma das isoformas do membro eIF4E para atuar como fator de susceptibilidade, destacando a especificidade na interação patógeno x hospedeiro (Gallois; Moury; German-Retana, 2018).

Diante dessa especificidade, diversas abordagens moleculares e computacionais têm sido empregadas para investigar, em nível atômico, as interações entre proteínas do hospedeiro e proteínas virais. Metodologias como ferramentas de bioinformática, modelagem molecular, simulações de dinâmica molecular e ancoragem (docking) têm contribuído significativamente para a compreensão desses complexos moleculares e para a identificação de possíveis alvos de manipulação genética (Coutinho De Oliveira et al., 2019; Saha; Mäkinen, 2020; Sharmila et al., 2019). Além disso, essas abordagens podem contribuir para a compreensão da complexidade nas relações entre hospedeiro e patógeno que ocorrem nos níveis celulares e moleculares (Santos-Silva et al., 2020).

Substituições na proteína eIF4E, localizadas em regiões próximas ao sítio de ligação com a VPg (Coutinho De Oliveira et al., 2019), já foram identificadas em pimenta (Val67Glu, Ala68Glu e Gly107Arg) (Charron et al., 2008; Ruffel et al., 2002,

2006), ervilha (Arg107Gly) (Gao et al., 2004) e melancia (Asp71Gly) (Zhou et al., 2024) como relacionadas a resistência contra Potyvirus. No entanto, em *Vigna unguiculata*, o mecanismo de resistência ao CABMV ainda não está completamente elucidado. Diante disso, este estudo teve como objetivo analisar a presença de mutações no gene *eIF4E* em *V. unguiculata* e investigar sua relação com a suscetibilidade ou resistência ao referido Potyvirus. Considerada a hipótese que alterações nesse gene poderiam comprometer a interação entre as proteínas eIF4E e VPg, conferindo resistência ao hospedeiro.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo analisar as sequências codificadoras do gene *eIF4E* de três cultivares de feijão-caupi, visando identificar mutações potencialmente relacionadas à resistência ou suscetibilidade ao Potyvirus CABMV, através de abordagens computacionais e experimentais.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Obter as sequências codificadoras do gene *eIF4E* das cultivares suscetíveis (Boca Negra e BR14 Mulato) e resistente (IT85F-2687) ao CABMV;
- Obter *primers* específicos para o gene *eIF4E*, visando discriminação de cultivares suscetíveis e resistentes ao CABMV;
- Realizar bioensaios com o CABMV buscando avaliar a presença ou ausência de sintomas em cultivares de feijão-caupi;
- Avaliar o impacto das mutações do gene *eIF4E* sobre a estrutura, estabilidade e flexibilidade da proteína eIF4E, assim como seus efeitos na interação com a proteína do genoma viral (VPg).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FEIJÃO-CAUPI: IMPORTÂNCIA, PRODUÇÃO E DESAFIOS POR POTYVIROSES

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa herbácea anual, com capacidade de se desenvolver em solos de baixa fertilidade, pouca disponibilidade hídrica e em uma ampla faixa de pH (Foyer et al., 2016). Além disso, apresenta habilidade de estabelecer associações com diversos microrganismos, como bactérias fixadoras de nitrogênio (Carvalho et al., 2017), o que contribui para a fertilidade do solo (Magrini et al., 2016).

Seu cultivo é direcionado principalmente para a produção de grãos (secos ou verdes), para o consumo humano devido ao notável valor nutricional, apresentando cerca de 32% de proteínas, 62% de carboidratos, além de deter um alto teor de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais (Boukar et al., 2019). Por essas razões, a cultura do feijão-caupi é muito importante na dieta da população brasileira, além de ser umas das leguminosas mais cultivadas na África Subsaariana, além do Sudeste Asiático, América do Sul e Estados Unidos (Herniter; Muñoz-Amatriaín; Close, 2020; Lonardi et al., 2019).

É uma cultura adaptada às condições tropicais e subtropicais, produzindo bem em todas as regiões do Brasil, com produção predominantemente concentrada nas regiões Norte e Nordeste, embora tenha se expandido para a região Centro- Oeste, especialmente no estado do Mato Grosso (Freire Filho, 2011). Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) a safra 23/2024 no Brasil abrangeu uma área de 1.245,00 ha, com a produção de 588,6 toneladas e produtividade de 473,0 kg/ha. As regiões Nordeste e Norte correspondem a 92,6% da área total.

Apesar da elevada produção e produtividade do feijão-caupi no Brasil, esta cultura é impactada por diferentes pragas e doenças causadas por fitopatógenos (Amorim et al., 2018). Dentre as quais se destacam as viroses, uma das mais importantes doenças que acometem tal cultura, principalmente devido à alta frequência e severidade com que acontecem (Borges-Martins et al., 2023; Cruz; Aragão, 2014). Entre as viroses destaca-se o vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV - *cowpea severe mosaic virus*), família Secoviridae, gênero Comovirus. Além do vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (CABMV - *cowpea aphid-*

*borne mosaic virus*), família Potyviridae, gênero Potyvirus (Borges-Martins et al., 2023; Cruz; Aragão, 2014).

O vírus do mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV) é conhecido no Brasil desde 1947 e ocorre em todo território brasileiro onde o feijão-caupi é cultivado. Pode ser transmitido pelos besouros crisomelídeos, essencialmente o *Cerotoma arcuata* (Pio Ribeiro, 2005). O CPSMV ganha destaque pela intensidade da infecção que causa e pela sua ocorrência disseminada (Varela et al., 2019). Os sintomas são bolhosidade, grave mosaico verde-amarelo nas folhas, redução do tamanho e enrugamento das folhas, afetando a taxa fotossintética e, consequentemente, o rendimento da cultura (Costa et al., 2020).

O CABMV é considerado um dos mais importantes agentes infecciosos do feijão-caupi sendo transmitido através da inoculação mecânica e por meio de sementes das plantas infectadas (Neya et al., 2015). Todavia, destaca-se como vetor natural os afídeos, em especial, *Aphis craccivora* Koch (Barros et al., 2013; Neya et al., 2015). Os sintomas mais frequentes são: mosaico intenso, clorose, distorção das folhas, necrose e diminuição do crescimento das plantas (Oliveira et al., 2012).

Os Potyvirus constituem o maior grupo de vírus de plantas de elevada importância para a agricultura (Yang; Li; Wang, 2021). Desde a criação do programa de melhoramento genético do feijão-caupi, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em parceria com outras instituições, lançou até 2020 cerca de 84 cultivares de diversas categorias comerciais (Freire Filho, 2023). Entre os ganhos mais significativos do programa, destaca-se a aquisição de certo grau de resistência aos vírus CPSMV e CABMV (Barros et al., 2013). Apesar dos avanços no melhoramento clássico do feijão-caupi, existe necessidade de estudos para compreensão de fatores do hospedeiro envolvidos na resistência contra fitopatógenos. Além disso, o interesse em utilizar ferramentas da engenharia genética para facilitar e reduzir o tempo necessário para a introdução de características desejadas no feijão-caupi (Popelka et al., 2006).

## 2.2 POTYVIRUS: ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E POLIPROTEÍNAS

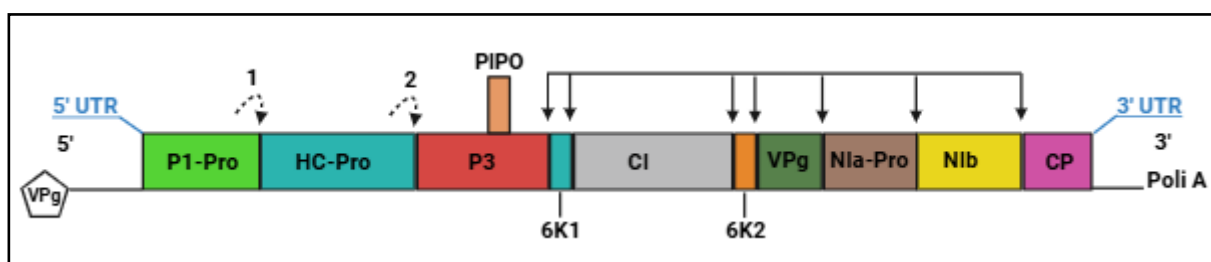
Os vírus do gênero Potyvirus (família Potyviridae) constituem o maior grupo de vírus de RNA, transmitidos por mais de 200 espécies de afídeos (Nigam et al., 2019).

Este gênero infecta uma vasta gama de plantas, resultando em perdas significativas em diversas culturas (Gadhavé; Vineeth; Gadekar, 2020; Moury; Desbiez, 2020).

Vírus pertencentes ao gênero Potyvirus, como o CABMV, apresentam genoma monopartido, constituído por RNA fita simples positiva (ssRNA) protegido por uma proteína de capa proteica (CP - *coat protein*). Os genomas monopartidos possuem tamanho entre 8 -11 kb, e dispõem de uma partícula que varia de 11-15 nm de diâmetro e 650-900 nm de comprimento (Wylie et al., 2017)

Os genomas dos Potyvirus possuem um quadro de leitura aberta (ORF - *Open Reading Frame*), que codifica uma poliproteína (Wylie et al., 2017), a qual é autoclivada pela atividade de três proteases (P1-Pro, HC-Pro e Nla-Pro), formando um conjunto de 10 proteínas (P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, Nla-Pro, Nlb e CP). Uma segunda ORF, denominada PIPO (*Pretty Interesting Potyviridae ORF*), também está presente, sobre a região da poliproteína que dá origem à proteína P3 (Mäkinen, 2020; Revers; García, 2015; Wylie et al., 2017). A extremidade 5' é covalentemente ligada à proteína VPg e a extremidade 3' é poliadenilada (REVERS; GARCÍA, 2015). As regiões não traduzidas 5' e 3'(UTRs) fornecem sequências regulatórias essenciais para muitas funções virais, protegendo contra a degradação (MÄKINEN, 2020a). Um esquema da organização genômica de Potyvirus está apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Organização do genoma de um membro típico da família Potyviridae e principais características e funções propostas para as proteínas potyvirais. VPg (*Viral Protein genome-linked*); P1-Pro (protease da proteína 1); HC-Pro (protease de componente auxiliar); P3 (proteína 3); PIPO (*Pretty Interesting Potyviridae ORF*); 6K1 e 6K2 (proteínas transmembrana); CI (inclusão citoplasmática); Nla-Pro (protease de inclusão nuclear a); Nlb (proteína de inclusão nuclear b); CP (proteína do capsídeo). Clivagem: P1-Pro (seta tracejada 1), HC-Pro (seta tracejada 2) e Nla-Pro (↓).



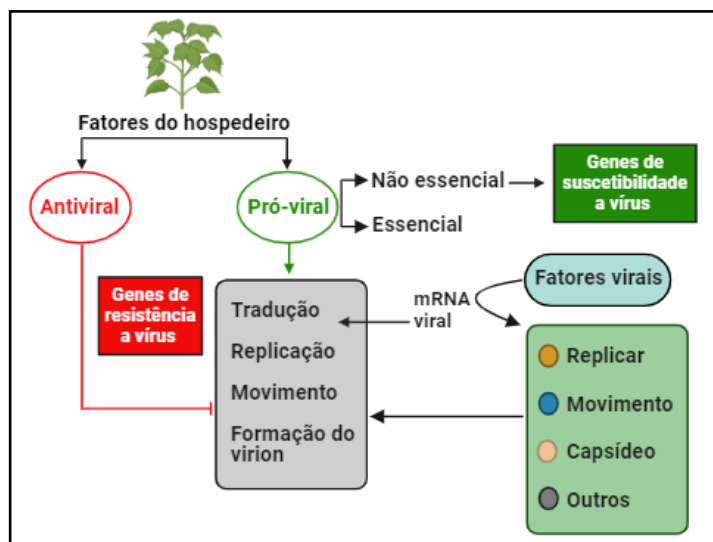
Fonte: WYLIE et al., 2017 (modificada pela autora).

A VPg pode interagir com diversas proteínas potyvíricas, além de fatores presentes nos hospedeiros, como o eIF4E (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E*) (Wang; Krishnaswamy, 2012), auxiliando no ciclo de replicação do próprio vírus. Estudos sugerem que a ligação entre a VPg e os fatores de iniciação da tradução 4E são essenciais para a tradução e replicação do RNA viral (Revers; García, 2015).

### 2.3 MECANISMOS DE SUSCETIBILIDADE/ RESISTÊNCIA DAS PLANTAS AOS VÍRUS (POTYVIRUS)

Devido ao seu genoma pequeno, os vírus de plantas utilizam proteínas do hospedeiro para completar seu ciclo de vida. Essas proteínas também atuam como fatores de suscetibilidade na interação planta – vírus (Zlobin; Taranov, 2023). Dentre os fatores do hospedeiro, destacam-se duas classes funcionais: os antivirais e os pró-virais (Figura 2) (Garcia-Ruiz, 2018). Os fatores pró-virais são fundamentais no processo de infecção viral (replicação, tradução, movimento e formação dos vírions). Por outro lado, os fatores antivirais apresentam papel essencial, suprimindo a infecção (Garcia-Ruiz, 2018).

Figura 2 - Fatores do hospedeiro: pró-viral e antiviral. Os fatores antivirais (linha vermelha) influenciam na resistência à infecção viral, inibindo uma ou mais etapas essenciais do ciclo de infecção (caixa cinza). Por outro lado, os fatores pró-virais (seta verde) colaboram com os fatores virais no ciclo de infecção, determinando a suscetibilidade ao vírus, podendo ser essenciais ou não essenciais para o hospedeiro.



Fonte: Garcia-Ruiz, 2018 (modificado pela autora).

Em plantas suscetíveis, a presença de fatores pró-virais essenciais resultam na infecção, em uma interação compatível. Por outro lado, na ausência de algum desses fatores, estamos diante de uma “interação incompatível”, obtendo-se a resistência/imunidade (Garcia-Ruiz, 2019). Esse tipo de resistência é conhecido também por perda de suscetibilidade, resistência recessiva ou genes de suscetibilidade (genes S) (Pavan et al., 2010). A resistência recessiva é mais duradoura, de amplo espectro, e genes dessa categoria codificam fatores de suscetibilidade fundamentais com mutações (Pavan et al., 2010). Em contrapartida, a resistência dominante identifica genes próprios de virulência para estimular respostas imunes (Van Schie; Takken, 2014).

A resistência por perda de suscetibilidade é transmitida de forma recessiva e exibe um número elevado de genes herdados recessivamente quando comparada a outros patógenos vegetais (Truniger; Aranda, 2009). Ao contrário de patógenos não virais, cuja resistência geralmente é dominante, a resistência a *Potyvirus* é frequentemente recessiva, envolvendo mutações em genes críticos utilizados pelo patógeno viral (Akhter; Nakahara; Masuta, 2021; Wu et al., 2019).

Dentre os genes mais conhecidos de resistência recessiva contra diferentes *Potyvirus* está o eIF4E e suas isoformas (Zlobin; Taranov, 2023). Essa resistência mediada por eIF4E está associada a alterações na sequência da proteína eIF4E (Gallois; German-Retana, 2023) e não se restringe apenas a *Potyvirus*, mas a outros vírus de RNA fita simples como Bymovirus e Ipomovirus (Kanyuka et al., 2005; Nieto et al., 2007). Além de duradoura, esse tipo de resistência tem ação sobre a inibição da multiplicação viral no hospedeiro, sobre o movimento viral dentro da célula, de célula a célula e a longas distâncias (Sanfaçon, 2015).

Para que ocorra a infecção, os vírus precisam suprimir os principais mecanismos de defesa da planta, como a imunidade inata, silenciamento de RNA e repressão traducional (Wu et al., 2019). Primeiro, as plantas podem perceber, por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - *Pattern recognition receptor*), presentes na superfície celular, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Dando início à primeira camada de defesa chamada imunidade desencadeada por PAMP (PTI - *PAMP Triggered Immunity*) (Dodds; Rathjen, 2010). Essa defesa pode ser suprimida

através de moléculas produzidas pelos patógenos, chamadas de efetoras (Wu et al., 2019).

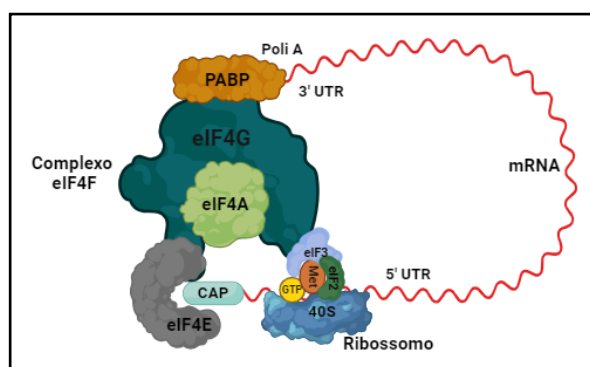
Outro aspecto frequente na resposta imune do hospedeiro a patógenos, incluindo vírus, é a morte celular programada (PCD - *Programmed Cell Death*) das células que circundam a região da infecção, chamada resposta de hipersensibilidade (HR - *Hypersensitive Response*) (De Ronde; Butterbach; Kormelink, 2014). A HR frequentemente começa com o reconhecimento do fator de avirulência (*Avr*) pelos genes de resistência dominante (*R*) do hospedeiro (Huang, 2021). Grande parte dos genes *R* codifica proteínas que possuem domínios ricos em repetições em leucina de ligação a nucleotídeos (NB - LRRs ou NLRs), os quais identificam o fator *Avr* através de uma interação entre genes (Moffett, 2017).

A resistência desencadeada pelo gene *R* é dita desencadeada por efetores (ETI - *Effector-Triggered Immunity*) (Moffett, 2017). No entanto, as proteínas NLRs normalmente conferem resistência a um patógeno específico, abrangendo apenas um número limitado de cepas (Boualem; Dogimont; Bendahmane, 2016), diferentemente das proteínas eIF4E. Para o vírus suplantarmos a resistência mediada pelo gene *R*, uma mutação pontual em um efector reconhecido pelas proteínas NLR é suficiente, impedindo o reconhecimento (Ravensdale et al., 2011). Já, no caso da resistência mediada pelo gene *S*, é preciso que o vírus não seja dependente dos fatores do seu hospedeiro (Van Schie; Takken, 2014).

## 2.4 GENES *eIF4E* E ISOFORMAS

Genes *eIF4E* constituem a classe de fatores de início da tradução em eucariotos, participando da interação com o mRNA (RNA mensageiro), facilitando o recrutamento da maquinaria de tradução (Zlobin; Taranov, 2023) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da maquinaria de tradução em eucariotos, evidenciando o complexo de início da tradução.



Fonte: a autora (uso da ferramenta Bio Render.com).

O processo traducional é dividido em três etapas: iniciação, alongação e terminação, sendo a iniciação uma das etapas com maior número de fatores, sob a qual a proteína eIF4E interage (Browning; Bailey-Serres, 2015). A iniciação envolve três complexos essenciais: o complexo eIF4F (proteína eIF4E e helicases eIF4A e eIF4G), o complexo 43S (subunidade 40S dos ribossomos e a proteína eIF3); e o complexo ternário (eIF2, GTP e o Met-tRNA<sub>i</sub>) (Merrick; Pavitt, 2018).

Resumidamente, o processo da tradução inicia com a interação entre a 5' CAP do mRNA e a proteína de ligação eIF4E. Esta, por sua vez, recruta a proteína eIF4G e a helicase eIF4A, formando o complexo eIF4F (Sesma; Castresana; Castellano, 2017). Neste complexo, a eIF4G liga-se à proteína PABP (proteína de ligação ao poli-A) e a helicase eIF4A atua desfazendo as estruturas secundárias do mRNA, a fim de recrutar o complexo 43S (Merrick; Pavitt, 2018). O complexo 43S junto com o complexo ternário é formado pela ligação entre o eIF4G e o eIF3. Assim, a subunidade ribossômica menor (40S) inicia a varredura ao longo do mRNA (direção 5' - 3'), até o reconhecimento do códon de início AUG (Hinnebusch; Ivanov; Sonenberg, 2016; Urquidi Camacho; Lokdarshi; Von Arnim, 2020), cujo reconhecimento promove a liberação do eIF2-GDP, favorecendo a junção da subunidade 60S, concluindo a fase de iniciação (Hinnebusch; Ivanov; Sonenberg, 2016).

Em geral, as plantas apresentam dois ou mais fatores de iniciação da tradução eIF4E, denominado eIF(iso)4E os quais, juntos com outras proteínas formam o complexo eIF4F, denominado eIF(iso)4F (Bastet; Robaglia; Gallois, 2017). Em algumas plantas, mais de duas isoformas foram observadas, incluindo *Arabidopsis* e

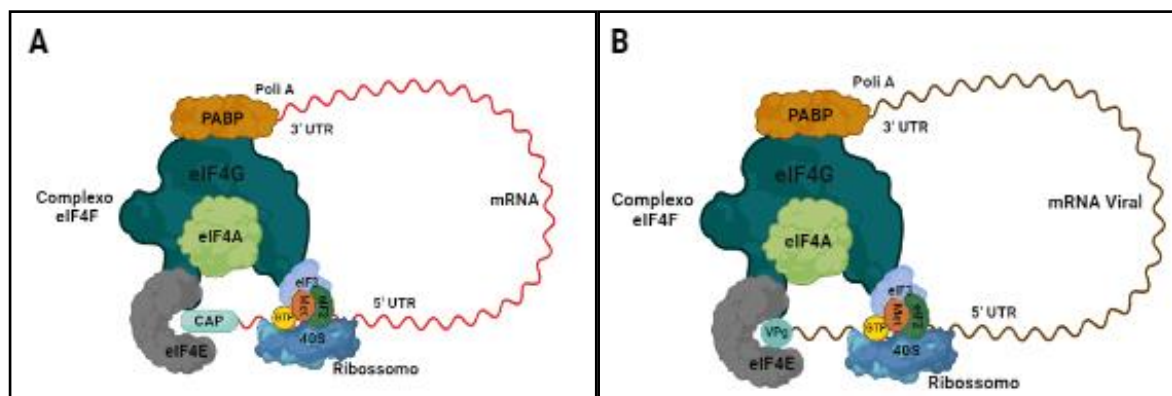
mandioca (Gomez et al., 2019; Kropiwnicka et al., 2015). Apesar dos membros desta família apresentarem um nível moderadamente baixo de similaridade das sequências, a estrutura tridimensional é semelhante (Estevan et al., 2014). Estruturalmente, a eIF4E passou por muitas duplicações ao longo do processo evolutivo, gerando formas da proteína que podem desempenhar novas funções (Joshi et al., 2005).

De acordo com Duprat et al., 2002 a exclusão da isoforma eIF(iso)4E resultou no aumento da expressão de eIF4E, sugerindo uma redundância de funções entre as isoformas de eIF4E. Entretanto, em plantas cultivadas sob condições de estresse, a distinção nas funções de eIF4E e eIF(iso)4E pode ser mais evidente (Martínez-Silva et al., 2012). No tomate, a inativação dos genes eIF4E2 e eIF(iso)4E foi letal (Bastet; Robaglia; Gallois, 2017). Já o knockout simultâneo de eIF4E1 e eIF4E2 do tomate gerou plantas com nanismo, em comparação com a inativação de apenas um desses genes (Kumar et al., 2022).

#### **2.4.1 Ligação dos fatores eIF4E e eIF(iso)4E com a VPg**

A virulência dos vírus da família Potyviridae está associada à proteína VPg - uma característica exclusiva das potyviroses (Saha; Mäkinen, 2020). Ligada ao final 5' do mRNA (5'-VPg-mRNA), a VPg do vírus mimetiza o CAP 5' do mRNA de eucariotos (Figura 4B), favorecendo a sua interação com os fatores eIF4E ou eIF(iso)4E do hospedeiro – etapa fundamental para a infecção (Figura 4) (Lebedeva et al., 2024).

Figura 4 - Representação da interação eIF4E - VPg. Em (A) atuação do complexo eIF4F em sua forma nativa na planta hospedeira (eIF4E ligado ao CAP 5'- mRNA) e em (B) o complexo eIF4F sendo utilizado pelo CABMV (eIF4E ligado à VPg 5'-mRNA viral).



Fonte: a autora (criação no BioRender.com).

Em geral, os Potyvirus apresentam preferência por apenas uma isoforma eIF4E para atuar como fator de suscetibilidade, embora as outras isoformas disponíveis nas plantas também possam ser recrutadas (Gallois; Moury; German-Retana, 2018; Nicaise et al., 2007). Por exemplo, o vírus Y da batata (PVY - *potato virus Y*) utiliza apenas o eIF4E1 da pimenta para a tradução do mRNA viral, enquanto na batata ele pode utilizar as duas isoformas (eIF4E1 e eIF4E2), embora não interaja com eIF(iso)4E (Lebedeva et al., 2021). Além disso, um único Potyvirus é capaz de utilizar diferentes formas de eIF4E em distintas plantas (Zlobin; Taranov, 2023). Em Solanáceas, por exemplo, o *pepper veinal mottle virus* (PVMV) depende do eIF4E2 em plantas de tomate (Moury; Desbiez, 2020), mas muda para eIF4E1 e eIF(iso)4E quando em plantas de pimenta (Ruffel et al., 2006).

A interação entre as isoformas de eIF4E e a VPg pode ser interrompida por substituições de apenas alguns aminoácidos em seu domínio de ligação (Gomez et al., 2019). Em geral, esses aminoácidos não são conservados, o que resulta em alterações significativas na carga e hidrofobicidade das regiões proteicas equivalentes (Poulicard et al., 2016). Os resíduos de aminoácidos Y64, F107, I108, G111, E112, S115, Q116 e V118, presentes no domínio central da VPg, estão intimamente relacionados com sua interação com eIF4E ou eIF(iso)4E, e caracterizam uma região de carga negativa no PVY (Saha; Mäkinen, 2020). Já os resíduos W22, W68, R118, R120 e K123, presentes na região de ligação CAP 5' do eIF4E e suas isoformas, formam uma região de carga positiva e são essenciais na interação com a VPg dos

Potyvirus (Coutinho De Oliveira et al., 2019). Em melancia, mutações não sinônimas de aminoácidos estão situadas dentro ou próximo dessa região de ligação da proteína eIF4E (Zhou et al., 2024). No feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) mutações não silenciosas nos códons 53, 64, 76 e 111 dos eIF4E foram associadas à resistência recessiva ao *clover yellow vein virus* (CIYVV), um Potyvirus que causa doenças em plantas de trevo e outras leguminosas (Hart; Griffiths, 2013).

Assim, mutações nos genes *eIF4E* podem conferir perda de suscetibilidade a Potyvirus e vários outros vírus. Desta forma, na ausência de cultivares naturalmente resistentes recessivas, e se a resistência mediada por eIF4E não for eficaz em uma interação planta-vírus, uma mutação em um gene de resistência recessiva pode ser introduzida, permitindo o melhoramento genético de culturas baseadas em resistência recessiva contra uma ampla gama de vírus (Hashimoto et al., 2016).

## 2.5 MODELAGEM MOLECULAR

O desenvolvimento de ferramentas computacionais para obtenção de modelos tridimensionais (3D) de proteínas a partir de sequências primárias, tem fornecido informações preciosas para compreensão das bases moleculares de sistemas biológicos (Wodak; Velankar, 2023). Essas ferramentas têm proporcionado avanços em estudos mutacionais e de dobramento, comparação estrutural, além de investigações evolutivas (Bertoline et al., 2023).

As análises *in silico* para modelagem de proteínas podem ser divididas em quatro grupos distintos: modelagem comparativa ou de homologia, *ab initio* e *threading*, além dos métodos de aprendizado de máquina (Bertoline et al., 2023).

Os métodos de modelagem comparativa produzem modelos 3D funcionais com base em seu alinhamento com modelos já resolvidos, utilizando a comparação de sequências e perfis (Källberg et al., 2012; Webb; Sali, 2016). Esses métodos partem da premissa de que sequências semelhantes geralmente apresentam dobramentos tridimensionais similares, reforçando ao final com sua função biológica (Santos-Silva et al., 2020). Apesar da automação favorecer a utilização da modelagem comparativa tanto para iniciantes quanto para especialistas, alguns ajustes ainda são indispensáveis para aumentar a precisão do modelo (Webb; Sali, 2016). Dessa forma, é necessário avaliar de forma cuidadosa os modelos gerados, levando em

consideração a resolução e a qualidade do modelo aplicado, assim como o grau de homologia entre modelo e proteína de interesse (Santos-Silva et al., 2020).

O método *threading* tem como fundamento que estruturas tridimensionais de proteínas são mais conservadas do que suas sequências primárias (de aminoácidos), além de possuir um número reduzido nos tipos de dobras estáveis (Du et al., 2020). E estruturas semelhantes podem ser encontradas em proteínas sem relação evolutiva próxima ou que estejam relacionadas (Santos-Silva et al., 2020). As abordagens *threading* selecionam o melhor modelo tridimensional de dobramentos conhecidos, e que melhor se encaixe na sequência-alvo. Com isso, a sequência-alvo é alinhada ao modelo e seus átomos são reestruturados no backbone equivalente. Por fim, a afinidade da sequência com a dobra 3D é analisada, seguida de revisão manual (Bertoline et al., 2023). Apesar de ser uma opção para contextos em que a modelagem comparativa não apresenta boa precisão, a sua utilização pode se limitar quando não houver homólogos com dobramentos previamente resolvidos (Bertoline et al., 2023; Santos-Silva et al., 2020).

A abordagem *ab initio* é utilizada quando não há disponibilidade de informações sobre a sequência-alvo. Na ausência de um modelo tridimensional, tal método exige amostragem conformacional e a aplicação de critérios de avaliação para identificar conformações quase nativas que podem ser usadas como possíveis candidatas (Paiva et al., 2022). A abordagem *ab initio* tem como base a hipótese de Anfinsen, o qual assegura que o estado nativo de uma proteína é aquele de energia livre mínima, permitindo prever o modelo mais adequado (Paiva et al., 2022; Wu; Skolnick; Zhang, 2007). Esse menor estado de energia livre é ilustrado por um funil de enovelamento proteico, no qual o ponto inferior do funil representa o estado de energia livre global mais estável (Chong; Ham, 2019). A hipótese central dessa teoria é que, ao passo que a proteína se dobra, as interações intramoleculares e intermoleculares guiam sua estrutura através do funil. Durante esse processo, a proteína perde entropia, ganhando estabilidade conformacional, alcançando assim, níveis mais baixos de energia livre (Koga et al., 2021). Dessa forma, os métodos *ab initio* podem ser mais eficazes ao prever uma estrutura tridimensional correta, pois conduzem a proteína a alcançar sua conformação única (Bloodworth et al., 2022; Koga et al., 2021).

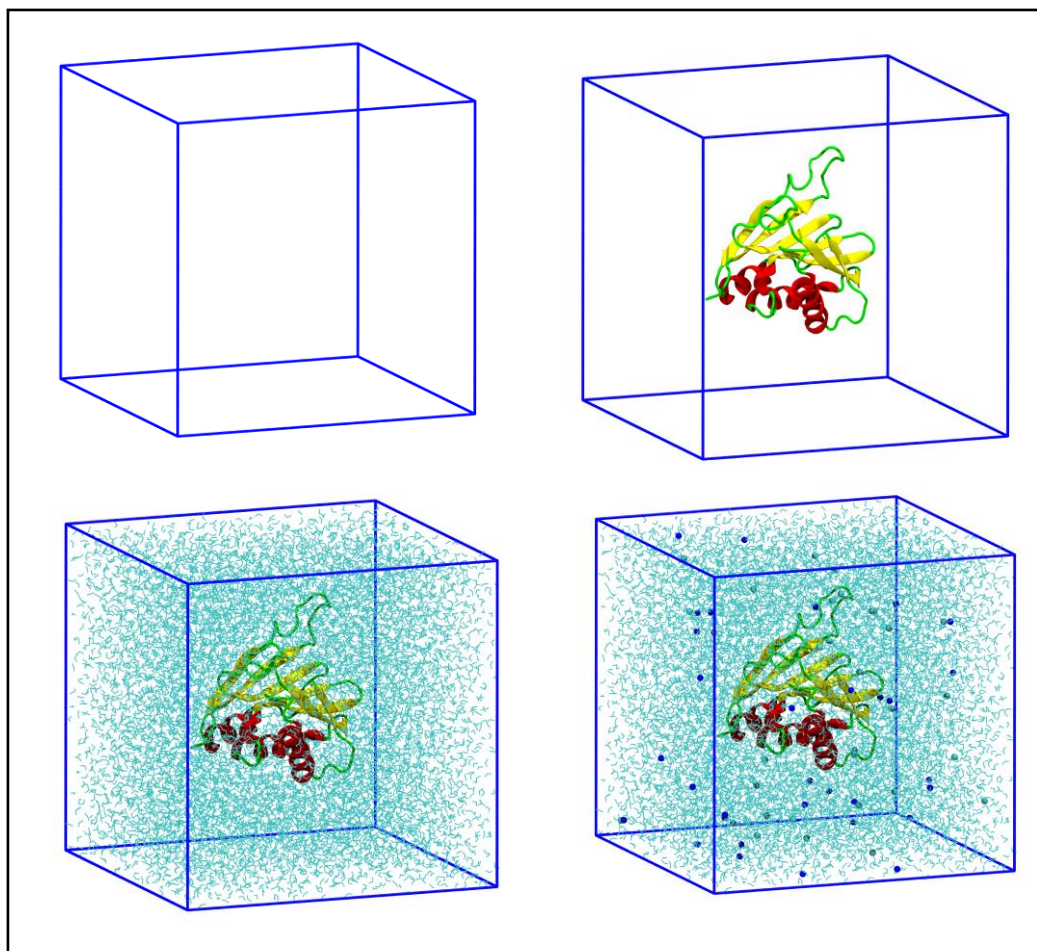
Por fim, atualmente, surgiram as novas técnicas híbridas que combinam ferramentas existentes ou métodos já conhecidos foram aperfeiçoados com modelos

baseados em aprendizado de máquina (Bertoline et al., 2023). De acordo com o CASP (*Critical Assessment of Protein Structure Prediction*), os algoritmos fundamentados em aprendizado de máquina são eficientes para prever e escolher modelos tridimensionais com elevado grau de assertividade quando comparado com outros métodos de modelagem (Jumper et al., 2021; Kryshtafovych et al., 2021). Entre os principais preditores agrupados a algoritmos de aprendizado de máquina, destacam-se o AlphaFold 2 (AF2), RosettaFold, I-TASSER e MULTICOM, conforme os últimos rankings do CASP. Em 2020, o AF2 foi o preditor com melhor desempenho no teste do CASP-14, apresentando-se com maior precisão quando comparado com outros métodos (Kryshtafovych et al., 2021). Atualmente, o AF2 já está disponível em versões mais atualizadas, permitindo a predição de interações do tipo proteína-proteína, com excelente grau de exatidão (Yang et al., 2023). A excelência do AF2 tem revolucionado a biologia estrutural, impactando profundamente o campo da biologia (Yang et al., 2023).

## 2.6 SIMULAÇÃO EM DINÂMICA MOLECULAR

A simulação em dinâmica molecular (MD – *Molecular Dynamics*) é um método amplamente utilizado na biologia estrutural, que permite investigar propriedades cinéticas e termodinâmicas de biomoléculas (Vieira et al., 2023). Além disso, essa abordagem obtém informações de mudanças conformacionais, ligação de ligantes e dobramentos de proteínas ao longo do tempo, com base em modelos fundamentados nas leis físicas que regem as interações do sistema (Belghit et al., 2024; Lazim; Suh; Choi, 2020). A princípio, um arquivo PDB com a biomolécula a ser simulada é utilizado para configurar a simulação. Durante o processo, são definidos parâmetros como campo de força, modelo da água, tipo de caixa de simulação e bordas da caixa (Figura 5) (Vieira et al., 2023).

Figura 5 - Fluxograma das etapas de uma simulação em Dinâmica Molecular: definição dos parâmetros da caixa; inserção da proteína na caixa; adição de moléculas de água ao redor da proteína; e inclusão de íons para neutralização do sistema.



Fonte: autora (modelo em VMD).

As simulações em MD atuam com base nas posições iniciais de todos os átomos de determinado sistema biológico (como proteínas ou ácidos nucleicos, por exemplo), é possível calcular a força que cada átomo atua nos demais (Hollingsworth; Dror, 2018). Esse processo é conduzido utilizando leis da mecânica clássica (leis do movimento de Newton), utilizando parâmetros empíricos definidos pelo campo de força. Esse método é capaz de calcular a posição e o comportamento ao longo de um tempo designado (Hollingsworth; Dror, 2018; Robustelli; Piana; Shaw, 2018). Essencialmente, o resultado da trajetória consiste em um filme tridimensional que retrata a configuração atômica do sistema em cada instante ao longo do intervalo de tempo simulado (Hollingsworth; Dror, 2018).

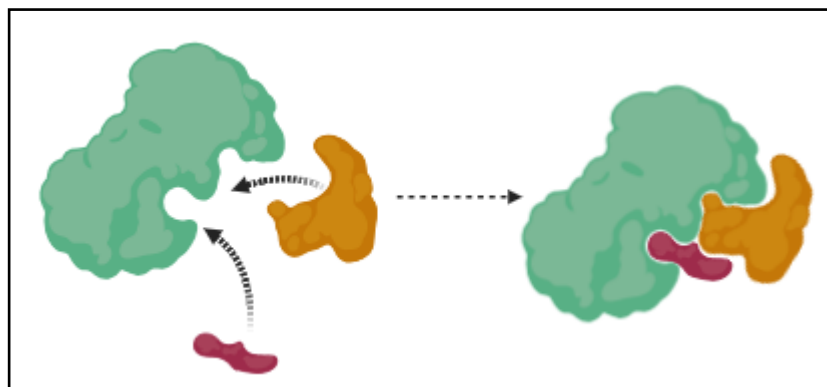
Atualmente, esse método tem sido amplamente utilizado em estudos com proteínas, buscando compreender as propriedades físico-químicas das proteínas individuais (Santos-Silva et al., 2020; Sinha; Tam; Wang, 2022). Permitindo prever, ao nível atômico, como as biomoléculas podem reagir a perturbações, como mutações, fosforilações, remoção ou adição de ligantes e protonação (Hollingsworth; Dror, 2018; Lazim; Suh; Choi, 2020). Ademais pode, por meio dos modelos desenvolvidos através de técnicas de modelagem molecular, validar e descrever fenômenos estruturais e biológicos (Hollingsworth; Dror, 2018). As informações obtidas através da trajetória da simulação em MD, são fundamentais para o entendimento do sistema, incluindo aspectos como convergência energética, flexibilidade estrutural, estabilidade, dinâmica molecular e interações interatômicas ou intermoleculares (Hollingsworth; Dror, 2018). As análises dessas trajetórias são interpretadas a partir de quatro principais informações: Raiz do desvio quadrático médio (RMSD – *Root Mean Square Deviation*), Raiz da flutuação quadrática média (RMSF – *Root Mean Square Fluctuation*), Pontes de Hidrogênio (HBOND - *Hydrogen Bond*) e Raio de giração (Rg – *Radius of Gyration*) (Margreitter; Oostenbrink, 2017).

A simulação em MD também pode ser empregada para avaliar a precisão ou refinar estruturas modeladas *in silico* (Hollingsworth; Dror, 2018). Um exemplo são as estruturas cristalinas as quais podem apresentar artefatos causados pelo empacotamento da rede cristalina. Esses artefatos podem ser corrigidos ao realizar uma simulação baseada na estrutura cristalina, em um ambiente solvatado (normalmente com água e íons, em concentração fisiológica) permitindo que a estrutura relaxe até atingir uma conformação estável (Burg et al., 2015). Como também é possível refinar estruturas obtidas por difração de raio X através de protocolos de recozimento simulado com base em MD, que ajustam o modelo aos dados experimentais, preservando uma estrutura fisicamente consistente (Afonine et al., 2012). Atualmente, a simulação em MD tornou-se uma ferramenta fundamental no desenvolvimento de fármacos e como algumas proteínas interagem com ligantes ou outras macromoléculas, em conjuntos com estudos de ancoragem molecular (Pan et al., 2019; Santos; Ferreira; Caffarena, 2019; Sinha; Tam; Wang, 2022).

## 2.7 ANCORAGEM MOLECULAR

As técnicas de ancoragem molecular (*Molecular Docking*), são utilizadas na biologia estrutural para prever a melhor forma de interação entre um ligante e uma macromolécula, como proteína, incluindo distintos tipos de interações, como proteína-ácido nucleico, proteína-fármaco e proteína-proteína (Figura 6) (Salmaso; Moro, 2018). Para tal finalidade, a estrutura tridimensional do alvo é um pré-requisito necessário, sendo obtida através dos métodos computacionais de modelagem molecular (Salmaso; Moro, 2018). O processo de ancoragem molecular é constituído sobretudo por dois momentos: um que inclui a previsão da orientação e posição molecular (conformação) do ligante dentro do receptor, seguido do cálculo da complementaridade de sua interação através da função de pontuação, ou seja, a conformidade da ligação (Meng et al., 2011; Salmaso; Moro, 2018).

Figura 6 - Modelo de docking molecular.



Fonte: a autora (criação no BioRender.com).

As funções de pontuação são ferramentas fundamentais para a ancoragem molecular, já que são utilizadas para selecionar as melhores posições e orientações geradas pelo mecanismo de amostragem. E podem ser divididas em três grupos tendo baseados em campo de força, em função de pontuação empírica e de conhecimento (Hollingsworth; Dror, 2018; Meng et al., 2011). Os cálculos baseados no campo de força aproximam a energia potencial de determinado sistema com uns arranjos intermoleculares (não ligados), os quais compreendem as interações de van der Waals e forças de Coulomb (termos eletrostáticos) entre os pares de átomos

(Hollingsworth; Dror, 2018; Meng et al., 2011). Na ancoragem molecular, os elementos intermoleculares, ou seja, a interação entre ligante e receptor são priorizadas. Entretanto, para uma maior precisão, as características internas do ligante, como rotação torcional, também podem ser consideradas, uma vez que influenciam a forma e ajuste no receptor (Hollingsworth; Dror, 2018; Vanommeslaeghe; Guvench; MacKerell, 2014). *GoldScore* e *AutoDock*, são exemplos de software fundamentados em campo de força (Hollingsworth; Dror, 2018).

No que se refere às funções de pontuações empíricas, a energia de ligação é separada em vários elementos de energia, como interação iônica, ligação de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos e a colaboração da entropia de ligação (Huang; Zou, 2010). A partir da multiplicação de cada um desses componentes por um determinado coeficiente é então somado, é gerado um valor de pontuação final. Esses coeficientes são obtidos a partir de um conjunto de dados experimentais de ligantes e proteínas previamente conhecidas, utilizando análises de regressão (Hollingsworth; Dror, 2018). Já as funções de pontuação baseadas em conhecimento, partem de avaliações estatísticas para obter frequências de contato entre pares de átomos do ligante e proteína. Os quais partem da suposição de que interações mais adequadas tendem a ocorrer com maior frequência (Hollingsworth; Dror, 2018; Meng et al., 2011). Dentre os softwares desenvolvidos para análises de ancoragem molecular, o HADDOCK (Dominguez; Boelens; Bonvin, 2003) destaca-se como o mais bem sucedido em gerar uma grande quantidade de modelos precisos para complexos proteína-proteína (Santos-Silva et al., 2020). Um bom exemplo de sua aplicação para prever interações proteína-proteína em larga escala no proteoma de *Arabidopsis thaliana*, contribuindo percepções acerca da organização funcional das proteínas nas plantas (Dong et al., 2019). Atrelado a outras técnicas computacionais e de biologia molecular, os estudos de ancoragem molecular podem contribuir para compreensão de novas interações biomoleculares, como aquelas entre proteínas de plantas e vírus. Essas descobertas podem ser aplicadas na mitigação de fitopatógenos e pragas virais, com o objetivo de promover melhoramento genético de culturas (Sharma; Kumar; Ramakrishnan, 2021).

**3 ARTIGO – Deciphering Cowpea Resistance to Potyvirus: Assessment of *eIF4E* Gene Mutations and Their Impact on the eIF4E-VPg Protein Interaction**

Adicionado nos apêndices.

Publicado em: *Viruses*, 2025.

DOI: <https://doi.org/10.3390/v17081050>.

## REFERÊNCIAS

- AFONINE, Pavel V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with *phenix.refine*. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 68, n. 4, p. 352–367, 1 abr. 2012.
- AKHTER, Md. Shamim; NAKAHARA, Kenji S.; MASUTA, Chikara. Resistance induction based on the understanding of molecular interactions between plant viruses and host plants. **Virology Journal**, v. 18, p. 176, 28 ago. 2021.
- AMORIM, Lidianne Lindinalva Barbosa *et al.* Cowpea and abiotic stresses: identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR. **Plant Methods**, v. 14, n. 1, p. 88, 12 out. 2018.
- BARROS, Gislanne Brito *et al.* Obtenção de plantas de feijão-caupi resistentes ao *cowpea severe mosaic virus* e ao *cowpea aphid-borne mosaic virus*. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 2, p. 130–136, jun. 2013.
- BASHIR, M.; AHMAD, Z.; GHAFOR, A. *Cowpea aphid-borne mosaic* Potyvirus: A review. **International Journal of Pest Management**, v. 48, n. 2, p. 155–168, 1 jan. 2002.
- BASTET, Anna; ROBAGLIA, Christophe; GALLOIS, Jean-Luc. eIF4E Resistance: Natural Variation Should Guide Gene Editing. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 5, p. 411–419, maio 2017.
- BELGHIT, Hayet *et al.* From complex data to clear insights: visualizing molecular dynamics trajectories. **Frontiers in Bioinformatics**, v. 4, p. 1356659, 11 abr. 2024.
- BERTOLINE, Letícia M. F. *et al.* Before and after AlphaFold2: An overview of protein structure prediction. **Frontiers in Bioinformatics**, v. 3, p. 1120370, 28 fev. 2023.
- BLOODWORTH, Nathaniel *et al.* Rosetta FlexPepDock to predict peptide-MHC binding: An approach for non-canonical amino acids. **PLOS ONE**, v. 17, n. 12, p. e0275759, 13 dez. 2022.
- BORGES-MARTINS, Artemisa Nazaré Costa *et al.* Unlocking Cowpea's Defense Responses: Conserved Transcriptional Signatures in the Battle against CABMV and CPSMV Viruses. **Life**, v. 13, n. 8, p. 1747, ago. 2023.
- BOUALEM, Adnane; DOGIMONT, Catherine; BENDAHMANE, Abdelhafid. The battle for survival between viruses and their host plants. **Current Opinion in Virology**, v. 17, p. 32–38, abr. 2016.
- BOUKAR, Ousmane *et al.* Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Breeding. In: AL-KHAYRI, Jameel M.; JAIN, Shri Mohan; JOHNSON, Dennis V. (Orgs.). **Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 201–243.

BROWNING, Karen S.; BAILEY-SERRES, Julia. Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. **The Arabidopsis Book**, v. 13, p. e0176, jan. 2015.

BURG, John S. *et al.* Structural basis for chemokine recognition and activation of a viral G protein–coupled receptor. **Science**, v. 347, n. 6226, p. 1113–1117, 6 mar. 2015.

CARVALHO, Márcia *et al.* Cowpea: a legume crop for a challenging environment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 13, p. 4273–4284, out. 2017.

CHARRON, Carine *et al.* Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. **The Plant Journal**, v. 54, n. 1, p. 56–68, abr. 2008.

CHONG, Song-Ho; HAM, Sihyun. Folding Free Energy Landscape of Ordered and Intrinsically Disordered Proteins. **Scientific Reports**, v. 9, p. 14927, 17 out. 2019.  
COSTA ET AL. **CADERNO-SEMIARIDO-17-FEIJAO-CAUPI (1)**, 2020.

COUTINHO DE OLIVEIRA, Luciana *et al.* Structural studies of the eIF4E–VPg complex reveal a direct competition for capped RNA: Implications for translation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 48, p. 24056–24065, 26 nov. 2019.

CRUZ, A. R. R.; ARAGÃO, F. J. L. RNA i-based enhanced resistance to *cowpea severe mosaic virus* and *cowpea aphid-borne mosaic virus* in transgenic cowpea. **Plant Pathology**, v. 63, n. 4, p. 831–837, ago. 2014.

DE RONDE, Dryas; BUTTERBACH, Patrick; KORMELINK, Richard. Dominant resistance against plant viruses. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 27 jun. 2014.

DODDS, Peter N.; RATHJEN, John P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539–548, ago. 2010.

DOMINGUEZ, Cyril; BOELEN, Rolf; BONVIN, Alexandre M. J. J. HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 7, p. 1731–1737, 19 fev. 2003.

DONG, Shaowei *et al.* Proteome-wide, Structure-Based Prediction of Protein-Protein Interactions/New Molecular Interactions Viewer. **Plant Physiology**, v. 179, n. 4, p. 1893–1907, 1 abr. 2019.

DU, Zongyang *et al.* CATHER: a novel threading algorithm with predicted contacts. **Bioinformatics**, v. 36, n. 7, p. 2119–2125, 1 abr. 2020.

DUPRAT, Anne *et al.* The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. **The Plant Journal**, v. 32, n. 6, p. 927–934, dez. 2002.

ESTEVAN, Joan *et al.* Specific requirement for translation initiation factor 4E or its isoform drives plant host susceptibility to Tobacco etch virus. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 67, dez. 2014.

FAIZAL, Ahmad *et al.* Genome editing in future crop protection: utilizing CRISPR/Cas9 to improve crop resistance against diseases, pests, and weeds. **Discover Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 104, 19 nov. 2024.

FOYER, Christine H. *et al.* Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. **Nature Plants**, v. 2, n. 8, p. 1–10, 2 ago. 2016.

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. [S.l.]: Embrapa Meio-Norte, 2011.

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues. **Feijão-Caupi na Embrapa Meio-Norte: Melhoramento, cultivares lançadas, genealogias e base genética**. Brasília, DF: Embrapa, 2023.

GADHAVE, Ravindra V.; VINEETH, S. K.; GADEKAR, Pradeep T. Cross-linking of polyvinyl alcohol/starch blends by glutaraldehyde sodium bisulfite for improvement in thermal and mechanical properties. 2020.

GALLOIS, Jean-Luc; GERMAN-RETANA, Sylvie. Rôle des facteurs d'initiation de la traduction 4E dans la résistance des plantes aux potyvirus : de la découverte des résistances naturelles à l'édition des gènes. **Virologie**, v. 27, n. 4, p. 225–337, 1 jul. 2023.

GALLOIS, Jean-Luc; MOURY, Benoît; GERMAN-RETANA, Sylvie. Role of the Genetic Background in Resistance to Plant Viruses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 2856, 20 set. 2018.

GAO, Zhihuan *et al.* The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. **The Plant Journal**, v. 40, n. 3, p. 376–385, nov. 2004.

GARCIA-RUIZ, Hernan. Susceptibility Genes to Plant Viruses. **Viruses**, v. 10, n. 9, p. 484, 10 set. 2018.

GARCIA-RUIZ, Hernan. Host factors against plant viruses. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 11, p. 1588–1601, nov. 2019.

GOMEZ, Michael A. *et al.* Simultaneous CRISPR /Cas9-mediated editing of cassava *EIF4E* isoforms *NCBP -1* and *NCBP -2* reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 2, p. 421–434, fev. 2019.

GUTIERREZ SANCHEZ, Pablo A. *et al.* Overexpression of a modified eIF4E regulates potato virus Y resistance at the transcriptional level in potato. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 18, 6 jan. 2020.

HART, John P.; GRIFFITHS, Phillip D. A series of eIF4E alleles at the Bc-3 locus are associated with recessive resistance to *clover yellow vein virus in common bean*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 11, p. 2849–2863, nov. 2013.

HASHIMOTO, Masayoshi *et al.* Recessive Resistance to Plant Viruses: Potential Resistance Genes Beyond Translation Initiation Factors. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 26 out. 2016.

HERNITER, Ira A.; MUÑOZ-AMATRIÁIN, María; CLOSE, Timothy J. Genetic, textual, and archeological evidence of the historical global spread of cowpea ( [L.] Walp.). **Legume Science**, v. 2, n. 4, p. e57, 2020.

HINNEBUSCH, Alan G.; IVANOV, Ivaylo P.; SONENBERG, Nahum. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. **Science**, v. 352, n. 6292, p. 1413–1416, 17 jun. 2016.

HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O. Molecular dynamics simulation for all. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 19 set. 2018.

HUANG, Changjun. From Player to Pawn: Viral Avirulence Factors Involved in Plant Immunity. **Viruses**, v. 13, n. 4, p. 688, 16 abr. 2021.

HUANG, Sheng-You; ZOU, Xiaoqin. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3016–3034, 18 ago. 2010.

JOSHI, Bhavesh *et al.* Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. **BMC Evolutionary Biology**, v. 5, n. 1, p. 48, dez. 2005.

JUMPER, John *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, ago. 2021.

KÄLLBERG, Morten *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. **Nature Protocols**, v. 7, n. 8, p. 1511–1522, ago. 2012.

KANYUKA, Konstantin *et al.* Evidence that the recessive bymovirus resistance locus *rym 4* in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 4, p. 449–458, jul. 2005.

KOGA, Nobuyasu *et al.* Role of backbone strain in de novo design of complex  $\alpha/\beta$  protein structures. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 3921, 24 jun. 2021.

KROPIWNICKA, Anna *et al.* Five eIF4E isoforms from *Arabidopsis thaliana* are characterized by distinct features of cap analogs binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 456, n. 1, p. 47–52, jan. 2015.

KRYSHTAFOVYCH, Andriy *et al.* Critical Assessment of Methods of Protein Structure Prediction (CASP) – Round XIV. **Proteins**, v. 89, n. 12, p. 1607–1617, dez. 2021.

KUMAR, Surender *et al.* Development of PVY resistance in tomato by knockout of host eukaryotic initiation factors by CRISPR-Cas9. **Phytoparasitica**, v. 50, n. 4, p. 743–756, set. 2022.

LAZIM, Raudah; SUH, Donghyuk; CHOI, Sun. Advances in Molecular Dynamics Simulations and Enhanced Sampling Methods for the Study of Protein Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6339, jan. 2020.

LEBEDEVA, Marina *et al.* Interaction of *Solanum tuberosum* L. translation initiation factors eIF4E with potato virus Y VPg: Apprehend and avoid. **Biochimie**, v. 219, p. 1–11, abr. 2024.

LEBEDEVA, Marina V. *et al.* VPg of Potato Virus Y and Potato Cap-Binding eIF4E Factors: Selective Interaction and Its Supposed Mechanism. **Biochemistry (Moscow)**, v. 86, n. 9, p. 1128–1138, set. 2021.

LONARDI, Stefano *et al.* The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **The Plant Journal**, v. 98, n. 5, p. 767–782, jun. 2019.

MAGRINI, Marie-Benoit *et al.* Why are grain-legumes rarely present in cropping systems despite their environmental and nutritional benefits? Analyzing lock-in in the French agrifood system. **Ecological Economics**, v. 126, p. 152–162, 1 jun. 2016.

MÄKINEN, Kristiina. Plant susceptibility genes as a source for potyvirus resistance. **Annals of Applied Biology**, v. 176, n. 2, p. 122–129, 2020.

MANZOOR, Subaya *et al.* Advancing crop disease resistance through genome editing: a promising approach for enhancing agricultural production. **Frontiers in Genome Editing**, v. 6, 26 jun. 2024.

MARGREITTER, Christian; OOSTENBRINK, Chris. MDplot: Visualise Molecular Dynamics. **The R journal**, v. 9, n. 1, p. 164–186, 10 maio 2017.

MARTÍNEZ-SILVA, Ana Valeria *et al.* Translation Initiation Factor AtelF(iso)4E Is Involved in Selective mRNA Translation in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31606, 20 fev. 2012.

MENG, Xuan-Yu *et al.* Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 1 jun. 2011.

MERRICK, William C.; PAVITT, Graham D. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 12, p. a033092, dez. 2018.

MOFFETT, Peter. Transfer and modification of NLR proteins for virus resistance in plants. **Current Opinion in Virology**, Engineering for viral resistance • Viruses and Cancer. v. 26, p. 43–48, 1 out. 2017.

MOURY, Benoît; DESBIEZ, Cécile. Host Range Evolution of Potyviruses: A Global Phylogenetic Analysis. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 111, jan. 2020.

NEYA, B. J. *et al.* Evaluation of Yield Losses Caused by *cowpea Aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in 21 Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Varieties in Burkina Faso. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 7, p. 304–313, 15 set. 2015.

NICAISE, Valérie *et al.* Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, v. 581, n. 5, p. 1041–1046, 6 mar. 2007.

NIETO, Cristina *et al.* EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 34, dez. 2007.

NIGAM, Deepti *et al.* Genome-Wide Variation in Potyviruses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1439, 12 nov. 2019.

OLIVEIRA, Cláudia Roberta Ribeiro De *et al.* Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo Cucumber mosaic virus, Cowpea aphid-borne mosaic virus e Cowpea severe mosaic virus. **Bragantia**, v. 71, n. 1, p. 59–66, 29 mar. 2012.

PAIVA, Vinícius De Almeida *et al.* Protein structural bioinformatics: An overview. **Computers in Biology and Medicine**, v. 147, p. 105695, ago. 2022.

PAN, Albert C. *et al.* Atomic-level characterization of protein–protein association. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 10, p. 4244–4249, 5 mar. 2019.

PAVAN, Stefano *et al.* Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. **Molecular Breeding**, v. 25, n. 1, p. 1–12, 2010.  
PIO RIBEIRO. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: [S.n.]. v. 2.

POPELKA, J. Carlos *et al.* Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 4, p. 304–312, 1 abr. 2006.

POULICARD, Nils *et al.* Human Management of a Wild Plant Modulates the Evolutionary Dynamics of a Gene Determining Recessive Resistance to Virus Infection. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 8, p. e1006214, 4 ago. 2016.

RAVENSDALE, Michael *et al.* Co-evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 1, p. 93–102, jan. 2011.

REVERS, Frédéric; GARCÍA, Juan Antonio. Molecular Biology of Potyviruses. *In: Advances in Virus Research*. [S.l.]: Elsevier, 2015. v. 92 p. 101–199.

ROBUSTELLI, Paul; PIANA, Stefano; SHAW, David E. Developing a molecular dynamics force field for both folded and disordered protein states. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 21, p. E4758–E4766, 22 maio 2018.

RUFFEL, Sandrine *et al.* A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). **The Plant Journal**, v. 32, n. 6, p. 1067–1075, dez. 2002.

RUFFEL, Sandrine *et al.* Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 7, p. 2089–2098, 1 jul. 2006.

SAHA, Shreya; MÄKINEN, Kristiina. Insights into the Functions of eIF4E-Binding Motif of VPg in *potato virus A* Infection. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 197, 11 fev. 2020.

SALMASO, Veronica; MORO, Stefano. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 923, 22 ago. 2018.

SANFAÇON, Hélène. Plant Translation Factors and Virus Resistance. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3392–3419, 24 jun. 2015.

SANTOS, Lucianna H. S.; FERREIRA, Rafaela S.; CAFFARENA, Ernesto R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *In: DE AZEVEDO, Walter Filgueira (Org.). Docking Screens for Drug Discovery*. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2019. v. 2053 p. 13–34.

SANTOS-SILVA, Carlos André dos *et al.* Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 1177932220952739, 1 jan. 2020.

SESMA, Ane; CASTRESANA, Carmen; CASTELLANO, M. Mar. Regulation of Translation by TOR, eIF4E and eIF2 $\alpha$  in Plants: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 644, 26 abr. 2017.

SHARMA, Radheshyam; KUMAR, Ashish; RAMAKRISHNAN, R. Shiv. Role of Computational Biology in Sustainable Development of Agriculture. *In: UPADHYAY, Atul Kumar; SOWDHAMINI, R.; PATIL, Virupaksh U. (Orgs.). Bioinformatics for agriculture: High-throughput approaches*. Singapore: Springer, 2021. p. 53–69.

SHARMILA, D. Jeya Sundara *et al.* Molecular dynamics investigations for the prediction of molecular interaction of cauliflower mosaic virus transmission helper component protein complex with *Myzus persicae* stylet's cuticular protein and its docking studies with annosquamosin-A encapsulated in nano-porous Silica. **VirusDisease**, v. 30, n. 3, p. 413–425, set. 2019.

SINHA, Siddharth; TAM, Benjamin; WANG, San Ming. Applications of Molecular Dynamics Simulation in Protein Study. **Membranes**, v. 12, n. 9, p. 844, set. 2022.  
TRUNIGER, V.; ARANDA, M. A. Recessive Resistance to Plant Viruses. *In*: **Advances in Virus Research**. [S.l.]: Elsevier, 2009. v. 75 p. 119–231.

URQUIDI CAMACHO, Ricardo A.; LOKDARSHI, Anshul; VON ARNIM, Albrecht G. Translational gene regulation in plants: A green new deal. **WIREs RNA**, v. 11, n. 6, p. e1597, nov. 2020.

VAN SCHIE, Chris C. N.; TAKKEN, Frank L. W. Susceptibility Genes 101: How to Be a Good Host. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 551–581, 4 ago. 2014.

VANOMMESLAEGHE, Kenno; GUVENCH, Olgun; MACKERELL, Alexander D. Molecular Mechanics. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 20, p. 3281–3292, 2014.

VARELA, Anna Lúcia Nunes *et al.* A resistant cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotype became susceptible to cowpea severe mosaic virus (CPSMV) after exposure to salt stress. **Journal of Proteomics**, v. 194, p. 200–217, 1 mar. 2019.

VIEIRA, Ivo Henrique Provensi *et al.* Visual dynamics: a WEB application for molecular dynamics simulation using GROMACS. **BMC Bioinformatics**, v. 24, n. 1, p. 107, 22 mar. 2023.

WANG, Aiming; KRISHNASWAMY, Sowmya. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 7, p. 795–803, set. 2012.

WEBB, Benjamin; SALI, Andrej. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]**, v. 54, p. 5.6.1-5.6.37, 20 jun. 2016.

WODAK, Shoshana J.; VELANKAR, Sameer. Structural biology: The transformational era. **PROTEOMICS**, v. 23, n. 17, p. 2200084, 2023.

WU, Sitao; SKOLNICK, Jeffrey; ZHANG, Yang. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. **BMC Biology**, v. 5, n. 1, p. 17, dez. 2007.

WU, Xiaoyun *et al.* The Tug-of-War between Plants and Viruses: Great Progress and Many Remaining Questions. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 203, 28 fev. 2019.

WYLIE, Stephen J. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 3, p. 352–354, 1 mar. 2017.

XU, Manlin *et al.* Translation Initiation Factor eIF4E and eIFiso4E Are Both Required for Peanut stripe virus Infection in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 10 mar. 2017.

YANG, Xiuling; LI, Yinzi; WANG, Aiming. Research Advances in Potyviruses: From the Laboratory Bench to the Field. **Annual Review of Phytopathology**, v. 59, n. 1, p. 1–29, 25 ago. 2021.

YANG, Zhenyu *et al.* AlphaFold2 and its applications in the fields of biology and medicine. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, p. 115, 14 mar. 2023.

ZHOU, Ling-Xi *et al.* A natural substitution of a conserved amino acid in eIF4E confers resistance against multiple potyviruses. **Molecular Plant Pathology**, v. 25, n. 1, p. e13418, jan. 2024.

ZLOBIN, Nikolay; TARANOV, Vasiliy. Plant eIF4E isoforms as factors of susceptibility and resistance to potyviruses. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1041868, 10 fev. 2023.

**Fernanda Alves de Andrade**Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/5875524742722842>

Última atualização do currículo em 03/02/2025

Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (2022). Atualmente é mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da mesma instituição. Atua na área de transformação genética de plantas no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV - UFPE). Possui experiência em pesquisas na área de Biologia Molecular, na análise de expressão gênica de plantas do semiárido brasileiro frente à estresses abióticos. **Texto informado pelo autor**

**Identificação**

|                                        |                                                                                           |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nome</b>                            | Fernanda Alves de Andrade                                                                 |
| <b>Filiação</b>                        | Maria José de Andrade Dória de Araújo                                                     |
| <b>Nascimento</b>                      | 16/09/1997 - Machados/PE - Brasil                                                         |
| <b>Lattes ID</b>                       | 5875524742722842                                                                          |
| <b>Orcid ID</b>                        | <a href="https://orcid.org/0009-0004-0299-6937">https://orcid.org/0009-0004-0299-6937</a> |
| <b>Nome em citações bibliográficas</b> | ANDRADE, F. A.                                                                            |

**Formação acadêmica/titulação**

- 2023** Mestrado em Genética e Biologia Molecular.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Caracterização de mutações do gene *elf4E* de *Vigna unguiculata* (L.) Walp e possíveis implicações quanto a resistência ao CABMV (Cowpea aphid-borne mosaic virus)  
Orientador: Dra. Valesca Pandolfi  
Co-orientador: Dra. Ana Maria Benko-Iseppon  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
- 2017 - 2022** Graduação em Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Análise da expressão gênica de *Stylosanthes scabra* Vogel sob condição de déficit hídrico  
Orientador: Profa. Dra. Valesca Pandolfi
- 2013 - 2015** Ensino Profissional de nível técnico em Técnico em Registro e Informações em Saúde.  
Escola Técnica Estadual José Humberto de Moura Cavalcanti, ETE, Brasil
- 2013 - 2015** Ensino Médio (2o grau) .  
Escola Técnica Estadual José Humberto de Moura Cavalcanti, ETE, Brasil

**Formação complementar**

- 2024 - 2024** Fundamentos e Práticas de Conservação de Solo e Água. . (Carga horária: 20h).  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Brasil
- 2024 - 2024** Curso de curta duração em Bioinformática: Uma abordagem teórico-prática. (Carga horária: 12h).  
Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIFASV, Brasil
- 2022 - 2022** Monitoria de Fundamentos da Genética 2022.1. . (Carga horária: 216h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2022 - 2022** Curso de curta duração em Modelagem molecular em biotecnologia. (Carga horária: 8h).  
Fundação Oswaldo Cruz, FRIOCRÚZ, Brasil
- 2022 - 2022** Curso de curta duração em Sequenciamento de DNA e suas gerações: de pequenos genes a genomas completo. (Carga horária: 4h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2022 - 2022** Gestão & Tributação no Agronegócio. . (Carga horária: 2h).  
Faculdade BSSP, BSSP, Goiania, Brasil
- 2022 - 2022** Curso de curta duração em Sistema CRISPR na edição de plantas: conceitos e aplicações práticas. (Carga horária: 4h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2021 - 2021** Curso de curta duração em I Curso de Inverno LIBM. (Carga horária: 25h).  
Faculdade Integrada Cete, FIC, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em IV Curso de Inverno em Genética Humana. (Carga horária: 20h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2020 - 2020** Monitoria de Fundamentos da Genética 2020.1. . (Carga horária: 216h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2020 - 2020** Monitoria de Fundamentos da Genética 2020.3. . (Carga horária: 216h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2020 - 2020** Monitoria de Fundamentos da Genética 2020.2. . (Carga horária: 216h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2019 - 2019** Monitoria de Histologia 2019.2. . (Carga horária: 216h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em Introdução ao Cultivo de Células Tronco. (Carga horária: 4h).  
Fundação Oswaldo Cruz, FRIOCRÚZ, Brasil
- 2019 - 2019** Monitoria de Histologia 2019.1. . (Carga horária: 216h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

**2019 - 2019** Curso de curta duração em Curso prático de atualização em histologia básica. (Carga horária: 30h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

**2018 - 2020** Estágio. . (Carga horária: 416h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

**2018 - 2018** Curso de curta duração em Preparação de Lâminas. (Carga horária: 2h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

**2018 - 2018** Curso de curta duração em Produção de Transgênicos. (Carga horária: 8h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

## Projetos

### Projetos de pesquisa

**2021 - 2022** Expressão de Taumatinas do tecido foliar de *S. scabra* e *C. pyramidale* sob condição de estresse salino e hídrico

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Fernanda Alves de Andrade; Valesca Pandolfi (Responsável); Maria Cidinaria da Silva Alves

**2020 - 2021** Análise da expressão de Taumatinas de *S. scabra* e *C. pyramidale* sob condição de estresse abiótico

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Fernanda Alves de Andrade; Valesca Pandolfi (Responsável); Maria Cidinaria da Silva Alves

### Projeto de extensão

**2022 - 2022** Biologia nos Bairros

Descrição: Participação como membro da comissão organizadora. Carga horária de 360 horas.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Fernanda Alves de Andrade (Responsável); ; Patrícia Vieira Tiago

## Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética

## Produção

### Produção bibliográfica

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **ANDRADE, F. A.**; FERREIRA, J. D. C.; SOUZA, F. F.; COSTA, A. F.; OLIVEIRA, A. C. R.; BENKOISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V.. Estudo da variação genética para resistência/suscetibilidade ao CABMV em acessos de feijão-caupi In: XIV JORNADA PPGBM, 2024, Recife. .. 2024,
2. PENNA, S. R. M.; LUNA-ARAGAO, M. A.; **ANDRADE, F. A.**; LEMOS, A. B.; SILVA, M. D.; SANTOS-SILVA, C. A.; FERREIRA, J. D. C.; PANDOLFI, V.; BENKO-ISEPPON, A. M.. In silico structural characterization of eIF4E isoforms in *Vigna unguiculata* In: 8 School of Computational Chemistry, 2024, São Paulo. **Semiempirical Methods and Tight-Binding Model**. 2024,
3. OLIVEIRA, A. C. R.; SILVA, P. V. G.; SILVA, M. E.; LIMA, C. B.; **ANDRADE, F. A.**; CRUZ, R. C.; FERREIRA, J. D. C.; PANDOLFI, V.. Otimização do sistema de seleção in vitro utilizando o imazapyr na regeneração de embriões de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar olathe pinto In: XIV JORNADA PPGBM, 2024, Recife. .. 2024,
4.  ALVES, M. C. S.; PIRES, C. J.; FROSI, G.; ARAUJO, F. C.; SANTOS-SILVA, C. A.; **ANDRADE, F. A.**; BENKO-ISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V.. Structural and functional analysis of the TLPs family in the *Stylosanthes scabra* transcriptome under irrigation suppression In: Genética 22, 2022, Natal - RN. **Anais do GENÉTICA 22**. 2022,
5. **ANDRADE, F. A.**; SILVA, A. A.; DIAS, F. C. R.; ALVES, L. C.. CAMUNDONGOS BALB/C IMUNODEPRIMIDOS TEM SUA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA ALETERADA QUANDO INFECTADOS PELO VÍRUS ZIKA In: IV Encontro de Morfofisiologia: Inovações tecnológicas e aspectos terapêuticos, 2021. **VI Encontro de Morfofisiologia: Inovações tecnológicas e aspectos terapêuticos**. 2021,
6. ALVES, M. C. S.; PIRES, C. J.; FROSI, G.; LIMA, M. O.; **ANDRADE, F. A.**; ARAUJO, F. C.; BENKOISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V.. Propescção e Caracterização In Silico de TLPs no

Transcriptoma de *Stylosanthes scabra* sob Deficiência Hídrica In: XXIII Encontro de Genética do Nordeste, 2021, Petrolina. **XXIII Encontro de Genética do Nordeste - Engene**. 2021,

7. **ANDRADE, F. A.**; SILVA, A. A.; DIAS, F. C. R.; ALVES, L. C.. Vírus zika reduz o nível de testosterona sérica em camundongos balb/C adultos In: V Simposio Capixaba de Ciências Biológicas, **V Simpósio Capixaba de Ciências Biológicas**. 2021,

#### **Apresentação de trabalho e palestra**

1. **ANDRADE, F. A.**; FERREIRA, J. D. C.; SOUZA, F. F.; COSTA, A. F.; OLIVEIRA, A. C. R.; BENKOISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V.. Estudo da variação genética para resistência/suscetibilidade ao CABMV em acessos de feijão-caupi, 2024. (Outra,Apresentação de Trabalho)
2. **ANDRADE, F. A.**. Uso do sistema CRISPR/Cas9 para nocaute do gene eIF4E de feijão-caupi visando a resistência ao Potyvirus, 2024. (Seminário,Apresentação de Trabalho)
3. **ANDRADE, F. A.**; FERREIRA, J. D. C.; SOUZA, F. F.; SILVA, M. E.; COSTA, A. F.; BENKO-ISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V.. Avaliação da resistência ou susceptibilidade de variedades de feijão-caupi ao CABMV", 2023. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
4. ALVES, M. C. S.; PIRES, C. J.; ARAUJO, F. C.; FROSI, G.; SANTOS-SILVA, C. A.; LIMA, M. O.; **ANDRADE, F. A.**; BENKO-ISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V.. "CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE TLPS (THAUMATIN-LIKE PROTEINS) EM DUAS LEGUMINOSAS DA CAATINGA SOB STRESS ABIÓTICOS, 2023. (Outra,Apresentação de Trabalho)
5. **ANDRADE, F. A.**; ARAGAO, F. J. L.; FERREIRA, J. D. C.; TANAKA, Y. M. R.; ROCHA, M. E. O. P.; SILVA, M. E.; BENKO-ISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V.. Edição gênica (CRISPR/Cas9) de feijão-caupi visando resistência a vírus, 2023. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
6. **ANDRADE, F. A.**. Uso do sistema CRISPR/Cas9 para nocaute do gene eIF4E de feijão-caupi visando a resistência ao Potyvirus, 2023. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

7. **ANDRADE, F. A.**; SILVA, A. A.; DIAS, F. C. R.; ALVES, L. C.. CAMUNDONGOS BALB/C IMUNODEPRIMIDOS TEM SUA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA ALETERADA QUANDO INFECTADOS PELO VÍRUS ZIKA, 2021. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
8. **ANDRADE, F. A.**; SILVA, A. A.; DIAS, F. C. R.; ALVES, L. C.. VÍRUS ZIKA REDUZ O NÍVEL DE TESTOSTERONA SÉRICA EM CAMUNDONGOS BALB/C, 2021. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

#### Produção técnica

#### Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. PANDOLFI, V.; **ANDRADE, F. A.**; SOUZA, F. F.. Alimentos Modificados Geneticamente, 2024.
2. **ANDRADE, F. A.**. "Field Resistance to Phakopsora pachyrhizi and Colletotrichum truncatum of Transgenic Soybean Expressing the NmDef02 Plant Defensin Gene, 2024.
3. **ANDRADE, F. A.**. Design of Three Residues Peptides against SARS-CoV-2 Infection, 2023.

## Eventos

#### Eventos

#### Participação em eventos

1. **AGROWORK 2024 - "Uso de biológicos na agricultura moderna"**, 2024. (Encontro) .
2. **I Ciclo de Seminários LGBV**, 2024. (Seminário) Uso do sistema CRISPR/Cas9 para nocaute do gene eIF4E de feijão-caupi visando a resistência ao Potyvirus.
3. **XI Workshop de Genética e Melhoramento: Integração entre o campo e as novas tecnologias**, 2024. (Outra) .
4. **XIV JORNADA PPGGBM**, 2024. (Outra) Estudo da variação genética para resistência/suscetibilidade ao CABMV em acessos de feijão-caupi.
5. **XIV JORNADA PPGGBM**, 2024. (Outra) .
6. **AGROWORK 2023 - "Uso de biológicos na agricultura moderna"**, 2023. (Outra) .
7. Apresentação Oral no(a) **Encontro de Genética do Nordeste**, 2023. (Congresso) Avaliação da resistência ou susceptibilidade de variedades de feijão-caupi ao CABMV".
8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Encontro de Genética do Nordeste**, 2023. (Congresso) Uso do sistema CRISPR/Cas9 para nocaute do gene eIF4E de feijão-caupi visando a resistência a vírus.
9. Apresentação Oral no(a) **I Workshop de Bioinformática e Biotecnologia de Plantas**, 2023. (Outra) Uso do sistema CRISPR/Cas9 para nocaute do gene eIF4E de feijão-caupi visando a resistência ao Potyvirus CABMV.
10. **I Workshop de Bioinformática e Biotecnologia de Plantas**, 2023. (Outra) .
11. **XIII Jornada de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**, 2023. (Outra) .
12. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XIII Jornada de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**, 2023. (Outra) Edição gênica (CRISPR/Cas9) de feijão-caupi visando resistência a vírus.
13. **10ª Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde**, 2022. (Congresso) .
14. **Congresso Biotecnologia do Brasil**, 2022. (Congresso) .
15. **I Workshop in Genetics and Molecular Biology/XII Jornada de Pós-Graduação em Genética ua**, 2022. (Outra) .
16. **IV Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFRPE**, 2022. (Outra) .
17. **II Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (II CDNB)**, 2021. (Congresso) .
18. **IV Encontro de Morfofisiologia: Inovações tecnológicas e aspectos terapêuticos**, 2021. (Encontro) CAMUNDONGOS BALB/C IMUNODEPRIMIDOS TEM SUA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA ALETERADA QUANDO INFECTADOS PELO VÍRUS ZIKA.
19. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **V Simpósio Capixaba de Ciências Biológicas**, 2021. (Simpósio) Vírus Zika reduz o nível de testosterona sérica de camundongos balb/C adultos.
20. **I Ciclo de Palestras - Programa de Pós - Graduação em Fisiologia Vegetal-UFV**, 2020. (Simpósio) .
21. **I Simpósio Digital de Sistemática e Evolução de Plantas**, 2020. (Simpósio) .
22. **I Simpósio da Liga Acadêmica de Endocrinologia Unigranrio**, 2020. (Simpósio) .
23. **I Simpósio de Princípios Oncológicos**, 2020. (Simpósio) .
24. **Jornada Científica Laboratório Virtual**, 2020. (Simpósio) .
25. **Semana do Biólogo**, 2020. (Simpósio) .
26. **VI Encontro de Agroecologia do Agreste de Pernambuco**, 2020. (Simpósio) .

27. **Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde**, 2019. (Congresso) .

28. **Colóquio de Ecologia e Evolução**, 2018. (Outra) .

29. **Simpósio Pernambucano de Biociências**, 2018. (Simpósio) .

#### Organização de evento

1. **ANDRADE, F. A.**. XIV JORNADA PPGGBM, 2024. (Outro, Organização de evento)

2. **ANDRADE, F. A.**. XIII Jornada de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2023. (Outro, Organização de evento)

3. **ANDRADE, F. A.**; **SILVA, A. A.**. 2º Curso de Boas Práticas em Laboratório e em Biotérios, 2022. (Outro, Organização de evento)

4. **ANDRADE, F. A.**; **SILVA, A. A.**. 1º Curso de Boas Práticas em Laboratórios e em Biotérios, 2021. (Outro, Organização de evento)

5. **ANDRADE, F. A.**; **SILVA, A. A.**. 3º Curso Prático de Capacitação em Neuroanatomia, Estesiologia, Sistemas de Tegumentos e Endócrino, 2021. (Outro, Organização de evento)

**APÊNDICE – Deciphering Cowpea Resistance to Potyvirus: Assessment of *eIF4E* Gene Mutations and Their Impact on the eIF4E-VPg Protein Interaction**

O artigo “Deciphering Cowpea Resistance to Potyvirus: Assessment of *eIF4E* Gene Mutations and Their Impact on the eIF4E-VPg Protein Interaction” foi publicado no periódico *Viruses*, link de acesso: <https://doi.org/10.3390/v17081050>.



## Article

# Deciphering Cowpea Resistance to Potyvirus: Assessment of *eIF4E* Gene Mutations and Their Impact on the eIF4E-VPg Protein Interaction

Fernanda Alves de Andrade <sup>1,†</sup>, Madson Allan de Luna-Aragão <sup>2,†</sup>, José Diogo Cavalcanti Ferreira <sup>3</sup>,  
Fernanda Freitas Souza <sup>1</sup>, Ana Carolina da Rocha Oliveira <sup>1</sup>, Antônio Félix da Costa <sup>4</sup>, Francisco José  
Lima Aragão <sup>5</sup>, Carlos André dos Santos-Silva <sup>6</sup>, Ana Maria Benko-Iseppon <sup>1,\*</sup> and Valesca Pandolfi <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife 50670-901, Brazil; fernanda.aandrade@ufpe.br (F.A.d.A.); fernanda.freitas@ufpe.br (F.F.S.); carolina.roliveira@ufpe.br (A.C.d.R.O.)

<sup>2</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte 31270-901, Brazil; madsomdeluna@gmail.com

<sup>3</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE), Abreu e Lima 53515-120, Brazil; jdiogocavalcanti@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife 50761-000, Brazil; afelixc.ipa@gmail.com

<sup>5</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, Brasília 70770-900, Brazil; francisco.aragao@embrapa.br

<sup>6</sup> Centro Universitário CESMAC, Maceió 57051-160, Brazil; carlos.biomedicina@gmail.com

\* Correspondence: ana.iseppon@ufpe.br (A.M.B.-I.); valesca.pandolfi@ufpe.br (V.P.)

† These authors contributed equally to this work.

## Abstract

Cowpea (*Vigna unguiculata*) is a crop of significant socioeconomic importance, particularly in the semi-arid regions of Africa and America. However, its productivity has been adversely affected by viral diseases, including the cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), a single-stranded RNA virus. It is known that the VPg protein interacts with the host's translation initiation factor (eIF4E), promoting viral replication. This study aimed to investigate the relationship between mutations in the cowpea *eIF4E* gene and resistance to CABMV. Twenty-seven cultivars were screened by PCR and bioassays for presence/absence of mutations associated with resistance or susceptibility to Potyviruses. Of the cultivars with mutations previously associated with susceptibility, 88.24% exhibited viral symptoms, while 62.5% associated with resistance remained asymptomatic. The in silico analyses revealed that non-synonymous mutations (Pro68Arg, Gly109Arg) alter the structure of the eIF4E protein, reducing its affinity to VPg. Molecular dynamics simulations also pointed to an enhanced structural stability of eIF4E in resistant cultivars and reinforced, for the first time, key mutations and the functional role of the *eIF4E* gene in resistance to CABMV in cowpea. Our results offer valuable insights for virus disease management and for genetic improvement programs for this important crop.

**Keywords:** *Vigna unguiculata*; translation initiation factor 4E; CABMV; recessive resistance



Academic Editors: Miguel A. Aranda and Manuel Miras

Received: 1 June 2025

Revised: 25 July 2025

Accepted: 25 July 2025

Published: 28 July 2025

**Citation:** Andrade, F.A.d.; Luna-Aragão, M.A.d.; Ferreira, J.D.C.; Souza, F.F.; Rocha Oliveira, A.C.d.; Costa, A.F.d.; Aragão, F.J.L.; Santos-Silva, C.A.d.; Benko-Iseppon, A.M.; Pandolfi, V. Deciphering Cowpea Resistance to Potyvirus: Assessment of *eIF4E* Gene Mutations and Their Impact on the eIF4E-VPg Protein Interaction. *Viruses* **2025**, *17*, 1050. <https://doi.org/10.3390/v17081050>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) is a multifunctional legume known for its ability to tolerate poor soils and hot environments [1]. The cultivation of this legume contributes to soil quality due to its ability to fix nitrogen through symbiosis with rhizobia bacteria [2]. In addition to its high adaptability, cowpea stands out for its remarkable nutritional value,

with about 32% protein and 62% carbohydrates, besides a high content of essential amino acids, vitamins, and minerals [3,4]. It is a crop of socioeconomic interest, prevalent in semi-arid regions around the world, mainly in countries of America and Africa [5].

Although this crop exhibits adaptability to unfavorable environments, its productivity has been negatively impacted in various regions worldwide due to the incidence of phytopathogens and pests, including plant viruses [6]. Among the major plant viruses affecting cowpea, two are particularly noteworthy: *cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), from the Secoviridae family (genus Comovirus), and *cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), a member of the Potyviridae family (genus Potyvirus), which is transmitted by aphids [7,8]. Of these, CABMV is considered one of the most widespread and damaging viruses, directly impacting production and, consequently, having a major economic impact on the agro-industrial sector [9]. Viruses of the Potyviridae family exhibit a monopartite single-stranded positive-sense RNA (+ssRNA) genome that encodes ten viral proteins. The 5' end of the viral RNA is covalently linked to the viral protein genome-linked (VPg), while the 3' end has a polyadenylated tail (Poly-A) [10]. VPg is part of the group of proteins present in viruses of the Potyviridae family [11]. In Potyvirus, VPg is correlated with the hijacking and utilization of the plant host's translation machinery through association with translation initiation factor 4E (eIF4E), which is used to complete the viral replication cycle [12]. The eIF4E-VPg interaction occurs due to the physicochemical characteristics of VPg, which mimics and competes with the 7-methylguanosine cap (m<sup>7</sup>GpppN), found at the 5' end of the host's messenger RNA (mRNA), by binding to the cap-binding domain of eIF4E [13]. A study on the VPg of *potato virus Y* (PVY) revealed, through nuclear magnetic resonance (NMR) and molecular docking, that the VPg region binding to eIF4E has a negative surface charge. In contrast, the binding domain of eIF4E has a predominantly positive surface charge [13].

Furthermore, during infection, VPg acts as a primer, analogous to the 5' cap, being essential for both the translation and replication of viral RNA, after undergoing a process called uridylylation [14]. During uridylylation, the nuclear inclusion protein b (Nib) acts as a viral RNA polymerase and covalently links a uridine monophosphate (UMP) molecule to a specific tyrosine residue (Tyr-Y) in the VPg protein, converting it into VPg-pUpU [15,16]. These features enable the Potyvirus to infect a broad range of plant hosts, consolidating this genus as one of the most relevant for agriculture [9,17].

In addition to the responses triggered by innate immunity, also called dominant resistance, mediated by resistance (R) genes, plants can also exhibit recessive resistance [18]. Recessive resistance, known for the loss of susceptibility and related to susceptibility (S) genes, is correlated with the absence or mutations of host genes that encode proteins, essential for viral replication and life cycle [19,20].

Mutations in these genes can lead to non-synonymous substitutions in the encoded protein, thereby altering the physicochemical properties of specific amino acids [21]. Considering the perspective of their three-dimensional folding, these amino acid changes may induce local and global structural alterations in the molecule [22]. Such changes can compromise the structural stability, dynamics, and ability to interact with its natural ligands [23] and may even lead the host to manifest resistance to some pathogens. For Potyvirus, recessive resistance in several crops have been frequently associated with eIF4E factors and their isoforms [17] because the mandatory eIF4E-VPg interaction is fundamental for viral success [24].

In eukaryotes, eIF4E interacts with the 5' cap end (m<sup>7</sup>GpppN) of mRNA. Then, it recruits the eIF4G protein and the eIF4A helicase, among other accessory subunits, ultimately forming the eIF4F complex. Once assembled, the translation process begins through ribosome recruitment [25]. Throughout plant evolution, due to duplications, mutations, and

translocations, paralogs and/or isoforms of eIF4E, named eIF(iso)4E, have emerged [26,27]. These isoforms often display functional redundancy; for example, it has been demonstrated that the deletion of eIF(iso)4E in *Arabidopsis thaliana* resulted in increased expression of eIF4E, suggesting functional redundancy between these genes [28]. Furthermore, although the amino acid sequences between isoforms show moderately low identity, their three-dimensional structures remain highly conserved [29].

Even if plants possess one or more eIF4E isoforms, it has been demonstrated that Potyviruses show a preference for only one available isoform, usually the one considered primary in the translation pathway, using it as a susceptibility factor [20,30]. For example, PVY uses only one eIF4E isoform, the main one for translation, among the six available in tobacco plants [31]. In other cases, a Potyvirus may require more than one isoform as a susceptibility factor [17]. This was reported for PVY, which uses two isoforms in potato (eIF4E1 and eIF4E2) for viral mRNA translation but does not interact with eIF(iso)4E [32]. Meanwhile, *pepper veinal mottle virus* (PVMV) uses eIF4E2 in tomato species and, on the other hand, switches to eIF4E1 and eIF(iso)4E in pepper species [33,34], suggesting that the same Potyvirus may require distinct eIF4E isoforms in different crops [17].

To date, the nature of the natural recessive resistance of *V. unguiculata* to Potyvirus remains unclear. In this context, our study aimed to investigate mutations in the *eIF4E* gene in cowpea cultivars and their possible relationship with susceptibility/resistance to the Potyvirus CABMV through molecular and computational approaches. This study is essential for understanding the biology of Potyvirus infection in cowpea with impacts on the genus *Vigna*, considering both the socioeconomic importance of these legumes and the fundamental role of eIF4E/iso4E isoforms in Potyvirus infection. Moreover, the insights gained from this study provide a valuable foundation for future marker-assisted selection aiming at cowpea's genetic improvement.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Analysis of the Coding Sequence of eIF4E Genes and VPg Coding Sequence

Two susceptible cowpea cultivars (cv Boca Negra and BR14 Mulato) and one resistant cultivar (cv IT85F-2687) to CABMV were evaluated for the presence of mutations in the coding sequence (CDS) of the *eIF4E* gene. Total RNA extraction was performed on leaves of 4-week-old plants (both cultivars) using the SV Total RNA Isolation System kit (Promega, Madison, WI, USA). For each of the three cultivars analyzed, three independent biological replicates were used, corresponding to samples from different plants grown under the same experimental conditions. Each RNA extraction was analyzed in technical duplicate, totaling two technical replicates per biological replicate. RNA extraction was also carried out from leaves of 4-week-old virally symptomatic plants (previously inoculated with CABMV). After DNase I treatment (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), RNA quality was estimated by agarose gel electrophoresis and quantified by a Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen). For each sample, 1 µg of RNA was converted to cDNA using the ImProm-II Reverse Transcription Systems kit (Promega). The primer pairs 5' ATGGTTGTGGAAGATTCACAA 3' (forward) and 5' TCATATCACGTATTTATTTTACACCC 3' (reverse) and 5' CATATGGGGAAGAAAAGGATGATACAGAAG 3' (forward) and 5' CTCGAGTTCAACTCCAACATCTTCATTGGG 3' (reverse) were used for amplification of *eIF4E* and VPg coding sequences, respectively. The total reaction volume was 20 µL, containing 1 µL of cDNA, 2 µL of 10× buffer, 0.3 µL of each primer (forward and reverse), 0.2 µL of dNTPs, 0.1 µL of Taq DNA polymerase, and 15.5 µL of H<sub>2</sub>O. Amplification reactions were performed using a TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific, Staffordshire, UK). All samples were amplified in triplicate assays using the following conditions: 95 °C for 7 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min,

and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR band was extracted from the agarose gel, then purified with a PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) and cloned into the pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit (Promega), according to the manufacturer's instructions. Individual *E. coli* DH10B colonies (Invitrogen) were selected for plasmid preparation using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for plasmid purification. The authenticity of the CDSs was confirmed by Sanger sequencing, using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) in a 2250XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### 2.2. Confirmation of Mutations in the *eIF4E* Gene in Cowpea

The sequencing result of the *eIF4E* gene CDSs revealed the presence of mutations between the susceptible cultivars (cv Boca Negra and BR14 Mulato) and the resistant cultivar (cv IT85F-2687) to CABMV. Based on this, two pairs of primers were designed, one for each mutation type: *eIF4E*\_Susc (F: 5' GACCTTCTGGTTCGACAACCC 3'; R: 5' GCAGTGAAAGTCCGCCCC 3') and *eIF4E*\_Res (F: 5' GACCTTCTGGTTCGACAACCG 3'; R: 5' GCAGTGAAAGTCCACCCG 3'). The forward sequence of the *eIF4E*\_Susc primer recognizes position 203 with a cytosine (C203), and the reverse sequence recognizes position 325 with a guanine (G325), both positions associated with susceptibility to CABMV Potyvirus. In the *eIF4E*\_Res primer, the forward sequence recognizes position 203 with a guanine (G203), and the reverse sequence recognizes position 325 with a cytosine (C325), potentially associated with resistance.

### 2.3. Analysis of *eIF4E* Gene Mutations and Assessment of Susceptibility/Resistance to CABMV in Cowpea Cultivars

The possible association of *eIF4E* gene mutation with susceptibility or resistance to CABMV was evaluated in 27 cowpea cultivars. The plants were cultivated in 4 L pots containing soil and vermiculite (1:1), under controlled greenhouse conditions at the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), Pernambuco, Brazil. For each cultivar, two pots were prepared, with four plants per pot. One week after sowing, leaf tissue samples were collected for DNA extraction following the method of Doyle and Doyle (1987) [35]. Plants were inoculated with CABMV as described by Oliveira and collaborators [36]. PCR reactions were performed as previously described in Section 2.1, using the primer pairs *eIF4E*\_Res and *eIF4E*\_Susc (annealing temperature of 55 °C and amplification product of 297 bps).

The viral inoculum was prepared from infected leaf tissues, which were macerated [0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)] at a 1:9 (*w/v*) ratio of tissue to buffer. For inoculation, a pestle was dipped into the viral extract and gently rubbed onto the surface of leaves (trifoliate leaves) from cultivars. Prior to inoculation, the leaves were dusted with 600-mesh Carborundum to create micro-wounds and facilitate viral entry. After inoculation, the residual inoculum and abrasive were rinsed off with distilled water [36]. Disease symptoms were evaluated through regular inspections of the inoculated plants, by observing and recording the emergence and development of any symptom, such as vein clearing, chlorosis, or mosaic. Plants with visible symptoms were classified as susceptible and those without symptoms as resistant [37].

An additional group of plants not inoculated with CABMV was evaluated for mutation in the CDS of the *eIF4E* gene. RNA isolation, cDNA synthesis, PCR reactions, purification, and sequencing were performed as described in Section 2.1, except for the annealing temperature (57 °C), as well as the primer pair used, SeqVuELF4E-Indel (F: 5' CTAGCAGGGTCGACAACG 3'; R: 5' CTGAGCAGCTTCATTGAAGC 3'), amplifying a fragment of 527 base pairs (bps). The data was processed to assess sequence quality and to exclude low-quality reads using BioEdit software (v. 7.7). Subsequently, nucleotide

sequences were aligned using the ClustalW software in the MEGA package (v. 11) and visualized with Jalview (v. 2.11) [38]. These sequences were analyzed alongside those from the three cultivars initially examined in the study—Boca Negra, BR14 Mulato, and IT85F-2687, which served as reference standards for comparative analysis.

#### 2.4. Primary Sequences, Alignments, and Conserved Domain of eIF4E Coding Region

To investigate the possible impact of specific mutations in the *eIF4E* gene on its interaction with VPg (CABMV)—a factor potentially associated with susceptibility or resistance to the virus—five cowpea cultivars (Bajão, Boca Negra, BRS Cauamé, BRS Xiquexique, and IT85F-2687) were selected for in silico analyses. This selection was based on mutations in the *eIF4E* coding sequence (CDS) and bioassay results. Boca Negra and BRS Xiquexique were both susceptible to CABMV, although BRS Xiquexique carries a thymine at position 325. BRS Cauamé and IT85F-2687 share mutations at positions 203 and 325, but only IT85F-2687 showed a resistant phenotype. Bajão exhibited unique changes, including a six-base-pair insertion between positions 223 and 230. The nucleotide sequences of these cultivars were evaluated via BLAST (v.2.16.0) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed on 10 July 2024) to confirm the conservation of the *eIF4E* gene. Subsequently, the primary sequences of the *eIF4E* proteins (from the five cultivars, along with the VPg protein) were translated using the ORFfinder tool <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> (accessed on 10 July 2024). The search for functional domains of the proteins was performed via CD Search <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (accessed on 11 July 2024). In parallel, a search for VPg protein sequences from different *Potyvirus*es was conducted on NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 14 July 2024) to verify conserved domains (Figure S1). All sequence alignments were performed using the ClustalW method in the MEGA package (v. 11) and subsequently visualized in Jalview (v. 2.11).

#### 2.5. Molecular Modeling, Model Validation, and Molecular Dynamics Simulations

The predicted theoretical models were selected based on two confidence metrics, the Predicted Local Distance Difference Test (pLDDT) and Predicted Aligned Error (PAE), both available in the AlphaFold 3 algorithm [39]. The models were validated for folding quality and thermodynamics using ProSA, PROCHECK, and QMEANDisCo. Furthermore, the theoretical models were aligned with an experimental model from *Arabidopsis thaliana* (PDB ID: 5BXV). Molecular dynamics (MD) simulations for the isolated *eIF4E*, the VPg proteins, and the *eIF4E*-VPg complexes (obtained by molecular docking with HADDOCK) were analyzed and executed in the GROMACS package [40]. Physiological conditions were simulated at 0.15 M, with water (SPC type) and NaCl ions, for 100 ns, using the GROMOS 53A6 force field [40,41]. Periodic boundary conditions were applied in the x, y, and z directions, centering the models in a cubic box of 10 nm × 10 nm × 10 nm, followed by energy minimization of the systems [40,42]. In the NVT step, the temperature was set to 300 K, employing solute atom restraints at the initial positions [40]. The LINCS method was used to apply constraints to the covalent bonds of the systems, including those involving hydrogen atoms [43]. Integration was performed by the leapfrog algorithm, using an integration time step of 2 fs [44]. Using the steepest descent algorithm, the energy of the systems was optimized using 50,000 steps. MD simulations were performed without restraints, with constant temperature and pressure (300 K and 1 atm, respectively) for 100 ns. The MD simulation trajectories were also analyzed with GROMACS, considering the following parameters: Root Mean Square Deviation (RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), radius of gyration (RG), and hydrogen bonds (HBs) [40]. Finally, Electrostatic Surface Potential (ESP) analyses were performed using the APBS server [45].

### 2.6. Molecular Docking and Binding Energy Between eIF4E-VPg Complexes

Molecular docking was performed with representative models from each trajectory of the isolated systems simulated by MD. The molecular docking interaction between the proteins of the selected cultivars, eIF4E and VPg, was submitted to HADDOCK (v. 2.4), following the software's default settings. Interaction residues were defined according to the literature [13]. For VPg, the residues determined as active were F107, I108, E112, S115, Q116, and V118. For the eIF4E proteins of Boca Negra, IT85F-2687, BRS Cauamé, and BRS Xiquexique, they were W22, W68, R118, R120, and K123. In contrast, for the eIF4E protein of the Bajão cultivar, the residues were W24, W70, R120, R122, and K125. The pairs generated by molecular docking were selected based on the most favorable HADDOCK score values, considering the combination of cluster positions and physicochemical characteristics of the interactions. The results were submitted to the Rosetta package (v. 4.0) to calculate the Gibbs free energy between eIF4E and VPg. Additionally, the theoretical binding free energy for each complex was estimated using the MM/GBSA method. For this purpose, all complex structures were submitted to the HawkDock server, defining eIF4E (chain A) as the receptor and VPg (chain B) as the ligand [46].

The complexes generated by HADDOCK were subjected to MD (parameters from Section 2.5) to assess possible alterations in eIF4E after interaction with VPg. Furthermore, the positions of the mutations identified in the five cowpea cultivars were analyzed to determine whether they are located in or close to the VPg-binding pocket.

## 3. Results

### 3.1. Mutations in the eIF4E Gene of Vigna Unguiculata

Analysis of the *eIF4E* gene revealed five mutations (at positions 203, 224, 325, 329, and 520) between the two susceptible cultivars (Boca Negra and BR14 Mulato) and the resistant cultivar (IT85F-2687) (Table 1). Of these, three mutations (at positions 203, 325, and 329) differed between the two susceptible cultivars and the resistant one (Table 1). The substitutions included the following: C203G, leading to a change from proline to arginine (P68R); G325C, with a change from glycine to arginine (Gly109Arg); and C329T, where an alanine was replaced by a valine (Ala110Val) (Table 1). At positions 224 and 520, the susceptible cultivars exhibited different types of substitutions compared to the resistant one: C224A in the Boca Negra cultivar and T520A in the BR14 Mulato cultivar.

**Table 1.** Mutations identified in the *eIF4E* gene sequence and the corresponding amino acid sequences of proteins from three cowpea cultivars: Boca Negra, BR14 Mulato (susceptible to CABMV), and IT85F-2687 (resistant to CABMV). Of the five mutations detected, three (\*) differentiate the susceptible cultivars from the resistant one.

| POSITION | TYPE       | CULTIVAR/Condition |                 |                  |
|----------|------------|--------------------|-----------------|------------------|
|          |            | Susceptible        |                 | Resistant        |
|          |            | BOCA NEGRA         | BR14 MULATO     | IT85F-2687       |
| 203      | Nucleotide | Cytosine (C)       | Cytosine (C)    | Guanine (G) *    |
| 224      | Nucleotide | Cytosine (C)       | Adenine (A)     | Adenine (A)      |
| 325      | Nucleotide | Guanine (G)        | Guanine (G)     | Cytosine (C) *   |
| 329      | Nucleotide | Cytosine (C)       | Cytosine (C)    | Thymine (T) *    |
| 520      | Nucleotide | Adenine (A)        | Thymine (T)     | Adenine (A)      |
| 68       | Amino acid | Proline (Pro)      | Proline (Pro)   | Arginine (Arg) * |
| 75       | Amino acid | Alanine (Ala)      | Aspartate (Asp) | Aspartate (Asp)  |

Table 1. Cont.

| POSITION | TYPE       | CULTIVAR/Condition |                  |                  |
|----------|------------|--------------------|------------------|------------------|
|          |            | Susceptible        |                  | Resistant        |
|          |            | BOCA NEGRA         | BR14 MULATO      | IT85F-2687       |
| 109      | Amino acid | Glycine (Gly)      | Glycine (Gly)    | Arginine (Arg) * |
| 110      | Amino acid | Alanine (Ala)      | Alanine (Ala)    | Valine (Val) *   |
| 174      | Amino acid | Tyrosine (Tyr)     | Asparagine (Asn) | Asparagine (Asn) |

### 3.2. Susceptibility/Resistance to CABMV Based on Mutations in the *eIF4E* Gene

Based on the mutations at positions 203 and 325 (observed in the *eIF4E* gene in the cultivars Boca Negra, BR14 Mulato, and IT85F-2687), two primers pairs (*eIF4E\_Susc* and *eIF4E\_Res*) were designed and employed in PCR assays across 27 cowpea cultivars. The *eIF4E\_Susc* primer recognizes the C203/G325 mutations associated with susceptibility, while the *eIF4E\_Res* primer recognizes the G203/C325 mutations associated with resistance. Of the 27 cultivars evaluated, 25 (92.52%) confirmed the amplification of the expected 297 bp fragment (Figure S2). Of these, 17 cultivars (62.96%) amplified with the primer pair for susceptibility (*eIF4E\_Susc*: C203/G325), and eight cultivars amplified with the primer pair for resistance (*eIF4E\_Res*: G203/C325). Notably, two cultivars (TVU-966 and Bajão) failed to amplify with either primer set.

### 3.3. Bioassay of Cowpea Cultivars Inoculated with Potyvirus CABMV

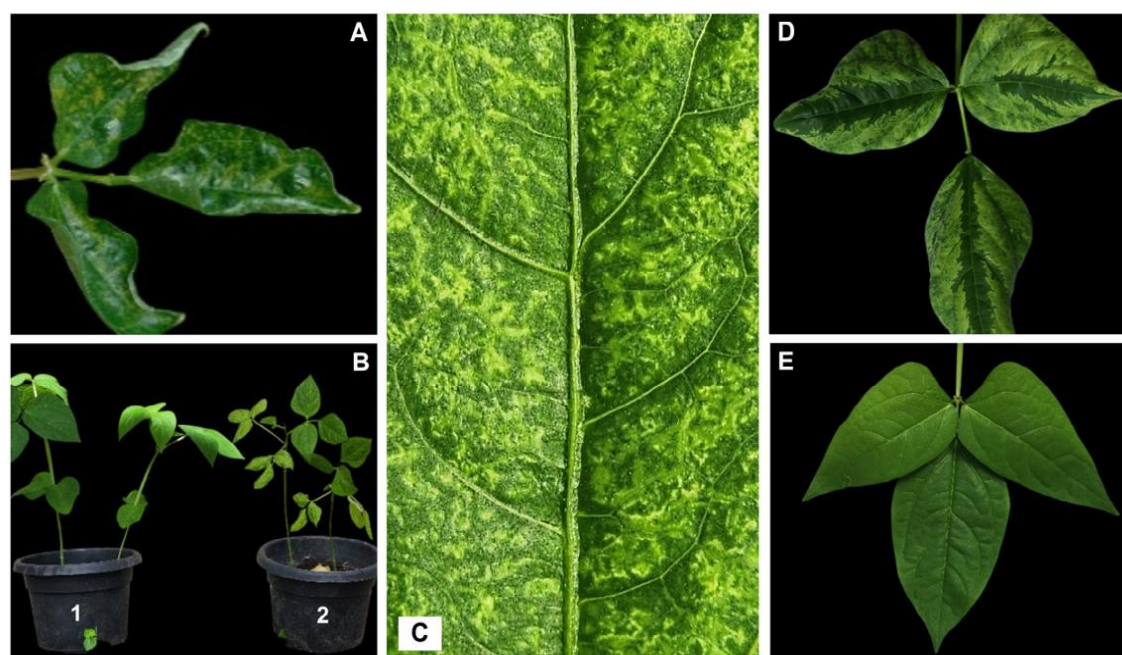
To confirm the association of mutations with susceptibility/resistance to CABMV, the 27 cowpea cultivars previously analyzed by PCR were monitored for symptom development following CABMV inoculation. Of the 17 cultivars that tested positive (via PCR) for the mutation associated with susceptibility, 15 (88.24%) exhibited symptoms 10 days after inoculation (dais) (Figure 1; Table 2). Among the eight cultivars that were used for the PCR search of mutations associated with resistance, five (62.5%) remained asymptomatic, while three (37.5%) developed symptoms (Table 2). Although the cultivars TVU-966 and Bajão did not amplify with the tested primers, they present no symptoms in the bioassay, confirming their resistance to CABMV (Table 2). Figure 1 shows the main symptoms observed in the cowpea cultivars after viral inoculation, including reduced plant size and leaf distortion (Figure 1A,B), severe mosaic (Figure 1C), and mosaic and green stripes along the veins (Figure 1D).

**Table 2.** Analysis of the 27 cowpea cultivars for their response to CABMV infection (resistant/susceptible), based on PCR results and bioassays, compared with published reports. \*: negative PCR (no amplification); \*\*: no published data available regarding the cultivar's response to CABMV.

| GENOTYPES         | THIS STUDY  |             | LITERATURE DATA        |           |
|-------------------|-------------|-------------|------------------------|-----------|
|                   | PCR         | Bioassay    | Reaction               | Reference |
| 1—Santo Inácio    | Susceptible | Susceptible | **                     |           |
| 2—Pingo de Ouro   | Susceptible | Susceptible | Susceptible            | [37]      |
| 3—BR 14 Mulato    | Susceptible | Susceptible | Susceptible            | [47,48]   |
| 4—BRS Xiquexique  | Susceptible | Susceptible | Susceptible            | [48]      |
| 5—BRS Tumucumaque | Resistant   | Susceptible | Susceptible            | [48]      |
| 6—Inhuma          | Susceptible | Susceptible | **                     |           |
| 7—Boca Negra      | Susceptible | Susceptible | **                     |           |
| 8—João Paulo II   | Susceptible | Susceptible | **                     |           |
| 9—IT85F-2687      | Resistant   | Resistant   | Resistant              | [48]      |
| 10—BR 1 Poty      | Susceptible | Susceptible | Susceptible            | [37]      |
| 11—BRS Maratão    | Susceptible | Susceptible | Susceptible/ Resistant | [37,47]   |

Table 2. Cont.

| GENOTYPES                 | THIS STUDY  |             | LITERATURE DATA       |           |
|---------------------------|-------------|-------------|-----------------------|-----------|
|                           | PCR         | Bioassay    | Reaction              | Reference |
| 12—BRS Cauamé             | Resistant   | Susceptible | Susceptible/Resistant | [45,46]   |
| 13—BRS Guariba            | Resistant   | Resistant   | Resistant/Susceptible | [47–49]   |
| 14—BRS Itaim              | Susceptible | Susceptible | Resistant             | [47]      |
| 15—BRS Paraguaçu          | Susceptible | Susceptible | **                    |           |
| 16—L.950.002              | Resistant   | Resistant   | **                    |           |
| 17—Miranda IPA 207        | Susceptible | Resistant   | **                    |           |
| 18—IPA 206                | Resistant   | Resistant   | **                    |           |
| 19—BRS Juruá              | Susceptible | Susceptible | Susceptible/Resistant | [36,47]   |
| 20—Canapu                 | Susceptible | Susceptible | **                    |           |
| 21—BR10 Piauí             | Susceptible | Susceptible | Susceptible           | [48]      |
| 22—Corujinha              | Resistant   | Susceptible | **                    |           |
| 23—TVU-966                | *           | Resistant   | Resistant             | [47,50]   |
| 24—Manteguinha Santarém   | Susceptible | Resistant   | Resistant             | [48]      |
| 25—IT81D-1053             | Resistant   | Resistant   | Resistant             | [48]      |
| 26—Sempre Verde Salgueiro | Susceptible | Susceptible | Susceptible           | [50]      |
| 27—Bajão                  | *           | Resistant   | Resistant             | [48]      |



**Figure 1.** Representative symptoms exhibited by the cowpea cultivars inoculated with *cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV): (A) Leaf distortions and mosaic symptoms. (B) Comparison of cowpea cultivars: (B1) asymptomatic plant and (B2) infected plant showing mosaic symptoms and reduced leaf size. (C) Severe mosaic. (D) Mosaic and green stripes along the veins. (E) Healthy leaf from a resistant cultivar (IT85F-2687).

#### 3.4. Genetic Variation in the eIF4E CDS Among 27 Cowpea Cultivars

In addition to PCR amplification and symptom evaluation, plants of the 27 cultivars (not inoculated with CABMV) were also analyzed for mutations in the coding sequence of the eIF4E gene. For this purpose, the 527 bp fragments amplified from the cDNA of all 27 cultivars were sequenced. Sequence analysis revealed a high level of conservation (>98%; Figure S3), although some mutations were detected (Figure S4).

Among the 17 cultivars whose loci were amplified with the eIF4E\_Susc primer pair (indicating possible susceptibility), 16 (94%) exhibited a cytosine at position 203 (C203), consistent with the expectation for susceptible phenotypes. Only one cultivar (Sempre Verde Salgueiro) displayed guanine at this position (G203). Regarding the nucleotide at position 325 (identified as G325 in susceptible cultivars), only two cultivars (BRS Xiquexique and BRS Paraguaçu, both susceptible) exhibited a thymine at this position (T325). Among the eight PCR-positive cultivars for the eIF4E\_Res primer (suggesting possible resistance), all exhibited a guanine at position 203 (G203) and a cytosine at position 325 (C325). Only two cultivars failed to amplify with both primer pairs, TVu-966 and Bajão (both resistant). They exhibited nucleotide substitutions preventing the annealing of primers. These substitutions included C328/329 in the TVu-966 cultivar. Notably, the mutation at position 328 is also found in the Inhuma and Sempre Verde Salgueiro cultivars (Figure S4). Interestingly, the Bajão cultivar displayed a greater number of differences in the *eIF4E* gene compared to the other cultivars. This cultivar had the G203 mutation, also observed in other cultivars possibly resistant to CABMV. Another difference was a 6 bp insertion detected between positions 223 and 230. Furthermore, at position 331, this cultivar showed an adenine (A331), distinguishing it from the other possibly resistant cultivars (Figure S4). The mentioned mutations, classified as non-synonymous, alter the amino acid sequences of the eIF4E protein. The corresponding alterations in the protein sequence are shown in Figure S5.

### 3.5. Alignment and Conserved Domain of eIF4E and VPg Proteins

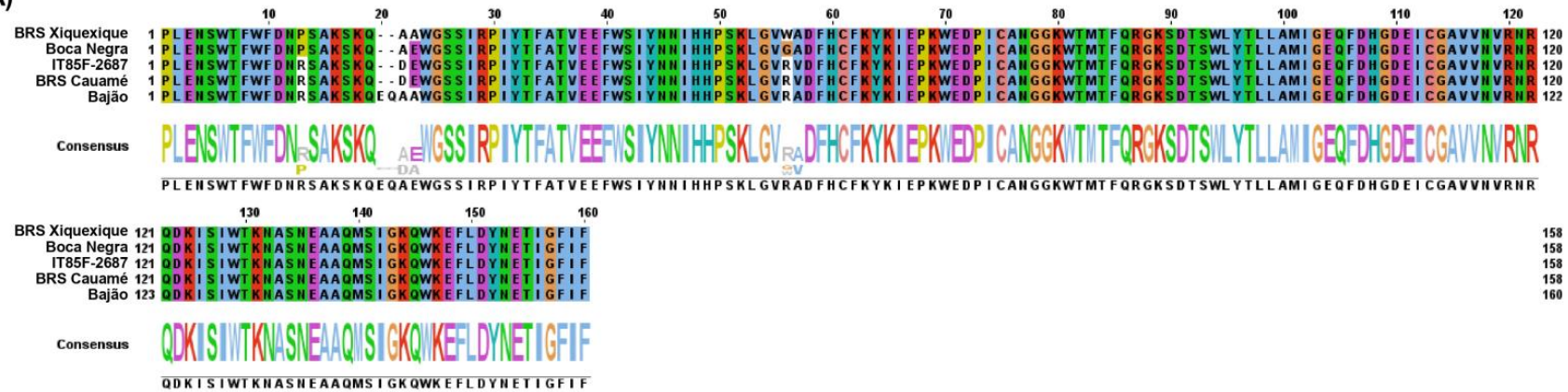
In silico analyses were performed on five selected cowpea cultivars (Bajão, Boca Negra, BRS Cauamé, BRS Xiquexique, and IT85F-2687), based on the identified amino acid substitutions and the performance observed in the bioassay following CABMV inoculation (Table 2 and Section 3.3). These substitutions are present in the conserved domain of the cowpea eIF4E protein, as shown in Figure 2A. Figure 2B shows the conserved domain of the CABMV VPg protein.

### 3.6. Molecular Modeling and Structural Validation of eIF4E and VPg Models

The theoretical models of the eIF4E proteins from cowpea cultivars (Boca Negra, BRS Xiquexique, BRS Cauamé, IT85F-2687, and Bajão) as well as the VPg protein from CABMV, all obtained through modeling using AlphaFold 3, exhibited validation metrics within quality criteria [51,52]. Analyses performed in ProSA showed Z-Score values ranging from −6.14 to −6.63 for the three-dimensional models of eIF4E and of −4.75 for the VPg model. Furthermore, values obtained in PROCHECK revealed values above 92% for residues that were located in regions with thermodynamically favorable torsion angles. The highest scores (>95%) were observed for the VPg and the eIF4E models of Boca Negra and IT85F-2687. The models for BRS Cauamé and BRS Xiquexique exhibited scores above 93%, while the model for the Bajão cultivar had a score of 92.5%. QMEANDisCo analysis further supported the quality of the models, with all structures presenting values ranging from 0.85 to 0.87 for eIF4E and of 0.56 for VPg, highlighting the quality of the models [53].

The alignment of the three-dimensional models of the cowpea eIF4E proteins revealed an RMSD of 0.071 Å (Figure S6). In turn, the alignment between the cowpea eIF4E models and the *A. thaliana* eIF4E models exhibited an RMSD of 0.576 Å (Figure 3A).

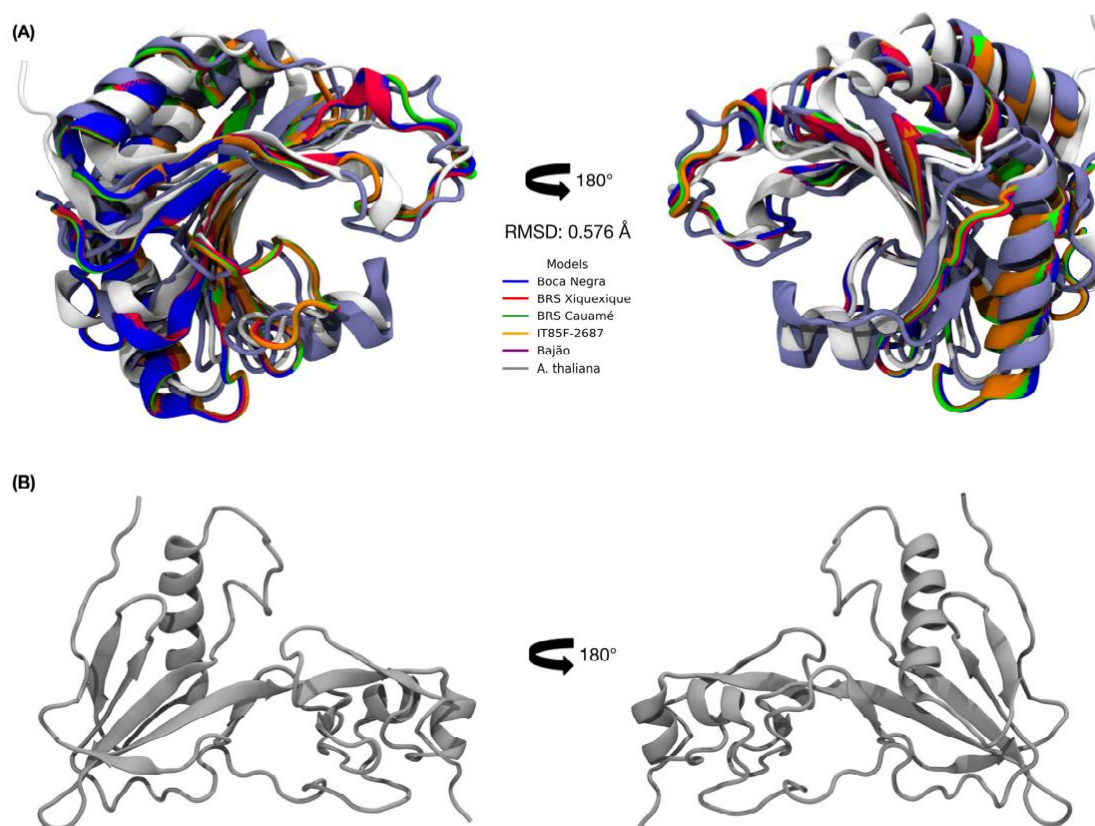
(A)



(B)



**Figure 2.** Conserved domain analysis. (A) Conserved domain of the eIF4E protein from five cowpea cultivars (Bajão, Boca Negra, BRS Cauamé, BRS Xiquexique, and IT85F-2687). (B) Conserved domain of the VPg protein from CABMV (*cowpea aphid-borne mosaic virus*). The red circle (position 64) in the VPg sequence highlights the tyrosine (Tyr) residue essential for the VPg uridylylation process.



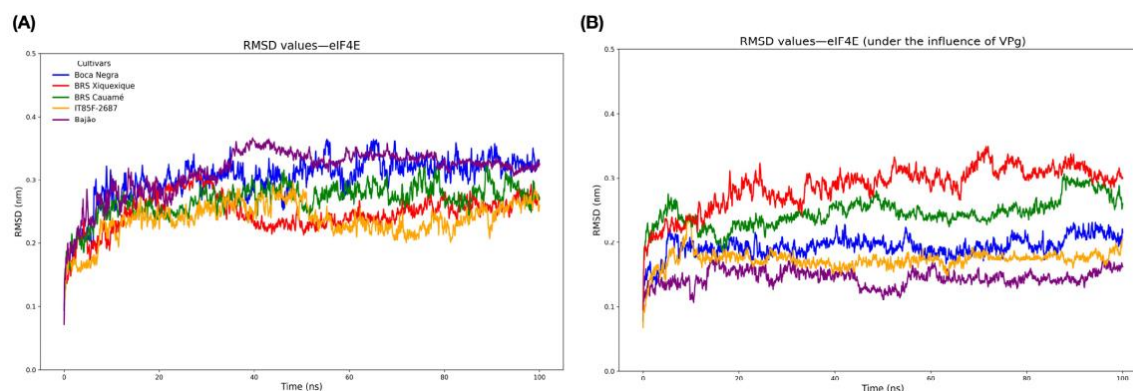
**Figure 3.** Alignment between the theoretical three-dimensional models of eIF4E proteins. (A) Alignment of the three-dimensional structures of cowpea eIF4E proteins with *A. thaliana* eIF4E, RMSD of 0.576 Å (PYMOL v.3.1). (B) Three-dimensional structure of the VPg protein from the CABMV Potyvirus.

Analysis of the molecular dynamics (MD) trajectories of the five theoretical three-dimensional models of eIF4E revealed RMSD values converging in all conditions around 15 ns (Figure 4A). The BRS Xiquexique and IT85F-2687 models showed the lowest RMSD values, with structural convergence in the trajectory at 25 ns and 50 ns, respectively. In contrast, the highest RMSD values, and therefore the largest fluctuations, were observed in the Bajão and Boca Negra models, followed by the BRS Cauamé model. Additional MD results for the VPg protein are presented in Figure S7.

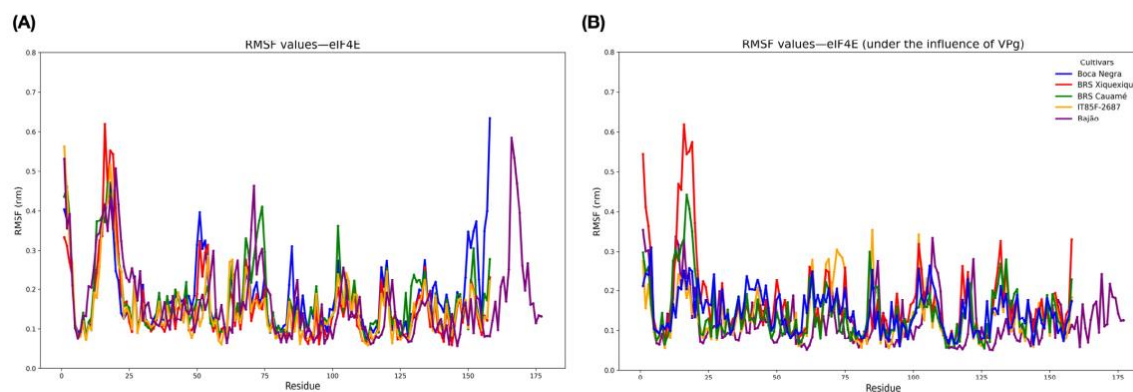
Data extracted from the MD trajectories indicated that the interaction of eIF4E proteins with VPg (eIF4E-VPg) caused local and global alterations in the structural dynamics of eIF4Es (Figure 4B). The eIF4E proteins from Bajão and BRS Xiquexique exhibited the largest fluctuations, as indicated by RMSD values (Figure 4B). The eIF4E protein from the Bajão cultivar, followed by that of IT85F-2687, showed less perturbation at the 5'cap-binding site in response to VPg binding. In contrast, eIF4E from BRS Xiquexique displayed global perturbations upon interaction with VPg (Figure 4B).

Additionally, RMSF analysis revealed similar flexibility profiles among the systems before binding with VPg (Figure 5A), with emphasis on BRS Cauamé and Bajão, which displayed an exclusive flexibility peak between residues 65 and 78. Boca Negra exhibited a fluctuation peak at residue 150, while Bajão showed a characteristic peak between residues

150 and 175, differing from the other evaluated systems. The degree of flexibility of each region in the protein structures is visualized in Figures S8 and S9. Notably, the 160–175 region of eIF4E showed a marked decrease in flexibility upon VPg binding (Figure S8). This stabilization suggests the direct involvement of this segment in the binding interface. This result aligns with previous reports that map the interaction site to the C-terminal domain of eIF4E [54,55]. Following VPg interaction (Figure 5B), the RMSF profiles of the eIF4E proteins showed a global reduction in flexibility across all cultivars. However, the BRS Cauamé and BRS Xiquexique models exhibited an exclusive gain in flexibility between residues 8 and 16 (Figure 5B).

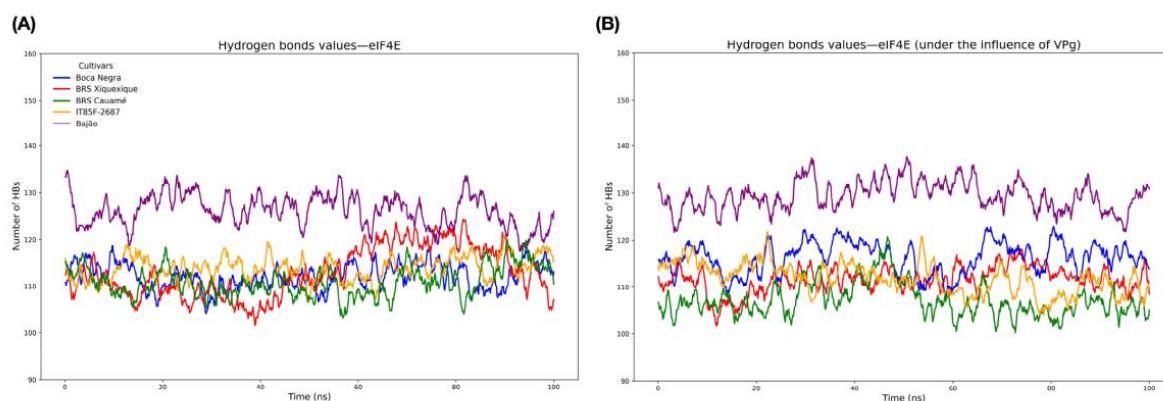


**Figure 4.** Evaluation of the structural convergence of *V. unguiculata* eIF4E proteins. (A) RMSD of isolated eIF4E proteins; (B) RMSD of eIF4E proteins after docking with VPg.



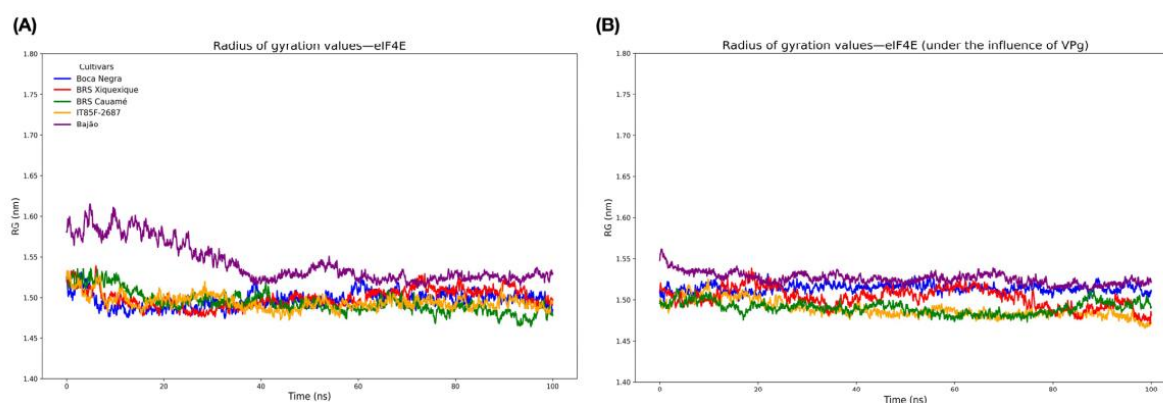
**Figure 5.** Evaluation of the flexibilities of the three-dimensional structures of *V. unguiculata* eIF4E. (A) RMSF of isolated eIF4E proteins; (B) RMSF of eIF4E proteins after docking with VPg.

In addition to structural convergence and flexibility analyses, we also investigated properties related to protein compaction and secondary structure maintenance, using the number of intramolecular hydrogen bonds (HBs) and radius of gyration (RG) as parameters. HB analysis revealed that the eIF4E protein of the Bajão cultivar exhibited the highest number of HBs, whereas the other cultivars showed similar values (Figure 6A). Furthermore, the number of HBs remained unchanged following the eIF4E-VPg interaction (Figure 6B).



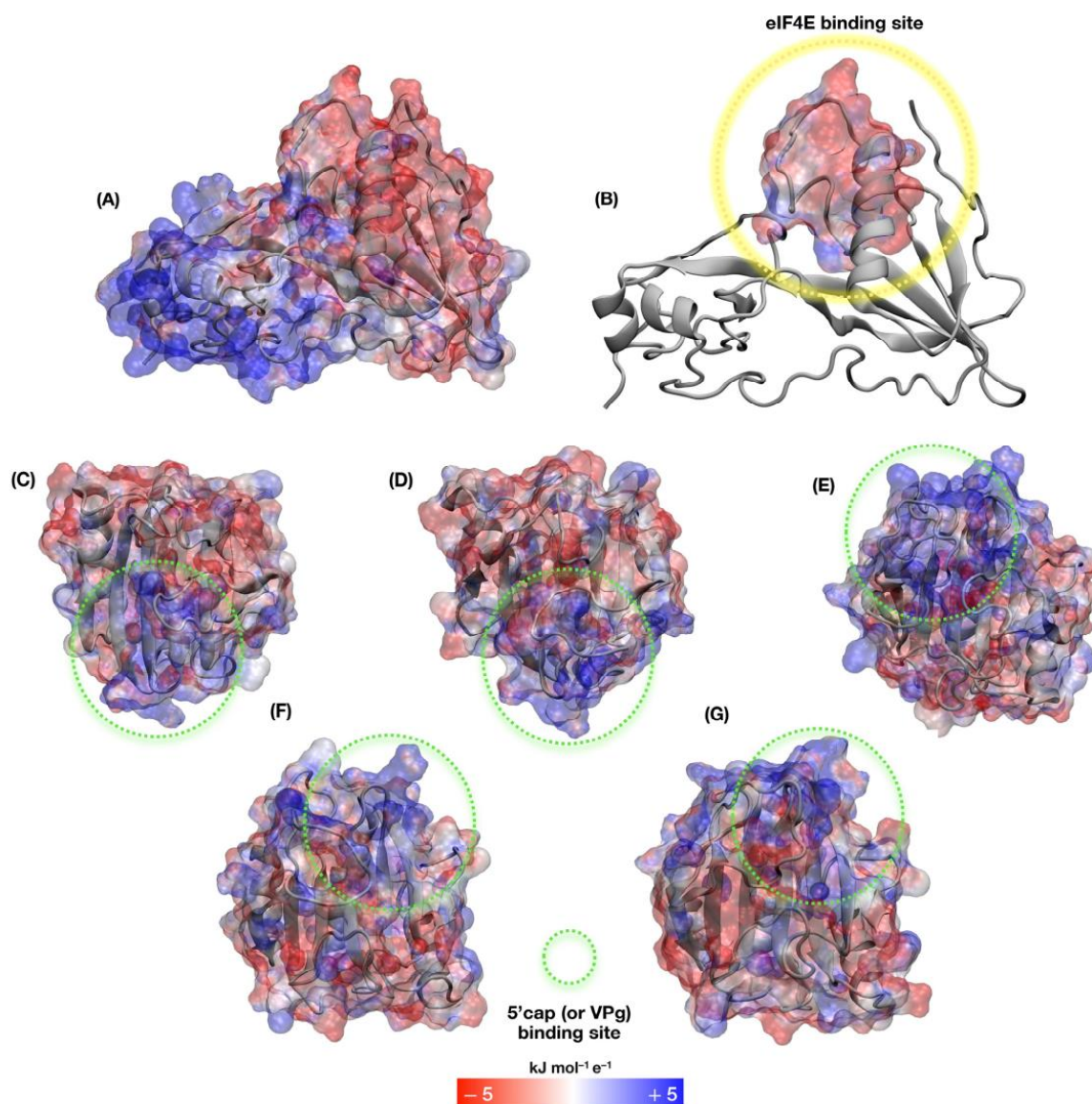
**Figure 6.** Evaluation of the intramolecular hydrogen bonds (HBs). (A) Number of intramolecular HBs in isolated eIF4E proteins; (B) number of intramolecular HBs after interaction with the VPg protein (eIF4E-VPg).

Regarding the degree of compaction, as assessed by the radius of gyration (RG) parameter of the proteins, the eIF4E protein isolated from the Bajão cultivar showed lower compaction during the first 40 ns but then behaved similarly to the other cultivars throughout the trajectory. For the eIF4E-VPg complex, all cultivars displayed a numerically similar degree of compaction among themselves (as also observed when analyzed in isolation) (Figure 7).



**Figure 7.** Evaluation of the radius of gyration (RG) of eIF4E proteins. (A) RG of isolated eIF4E proteins; (B) RG after docking with VPg (eIF4E-VPg).

To understand the electrostatic contribution of the eIF4E-VPg interaction, we evaluated the surface charge distribution of eIF4E proteins. Possible alterations in protein charges, due to the observed mutations in the eIF4E of cowpea cultivars, were also assessed. This analysis revealed opposite charge profiles localized in different VPg regions. The region directly interacting with eIF4E exhibited a predominantly anionic electrostatic profile (Figure 8A,B), whereas another site displayed strongly cationic characteristics (Figure 8). The VPg interaction site (dedicated to mimicking the 5' cap) showed predominantly negative charges (Figure 8A,B). The data also revealed that the region responsible for recognizing and binding to the 5' cap of mRNA in eIF4E is cationic in nature.



**Figure 8.** Evaluation of the electrostatic surface profiles of eIF4E structures from cowpea cultivars and the VPg protein from CABMV Potyvirus. Dots highlight the eIF4E-VPg interaction regions with anionic (green circle) and cationic charges (yellow circle), respectively. (A) VPg; (B) VPg's eIF4E binding site; (C) Boca Negra; (D) IT85F-2687; (E) Bajão; (F) BRS Xiquexique; (G) BRS Cauamé.

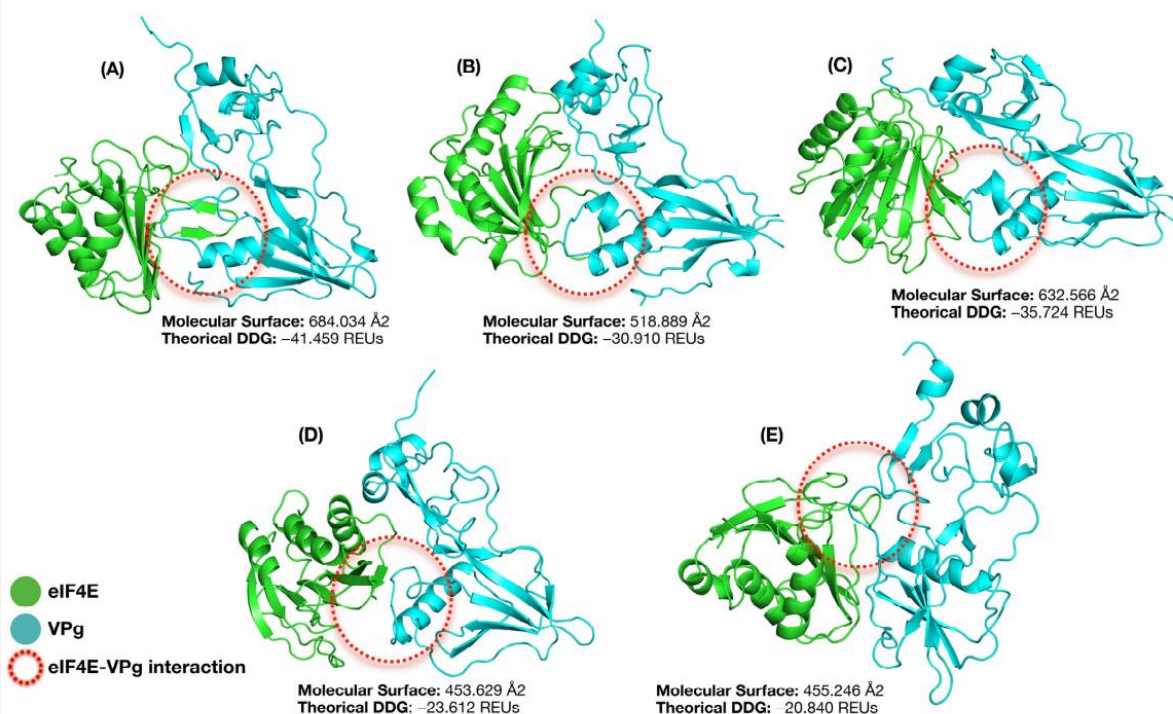
### 3.7. Molecular Docking, Interface Analysis, and Binding Energy

The docking scores for the eIF4E-VPg complexes, which were generated using the previously described AlphaFold 3 theoretical models and docked with HADDOCK, ranged from  $-72.3$  to  $-115.5$  (Table 3). The most favorable interactions (indicated by more negative scores) were observed between VPg and eIF4E from the BRS Xiquexique ( $-102.9$ ) and IT85F-2687 ( $-115.5$ ) cultivars. In contrast, dockings with eIF4E from the BRS Cauamé and Bajão cultivars obtained the highest scores ( $-72.3$  and  $-75.9$ , respectively) and were, therefore, less favorable for interaction with CABMV VPg.

**Table 3.** Data on HADDOCK score, Gibbs free energy difference (Theoretical DDG), and interaction area related to VPg-eIF4E complex formation.

| COMPLEXES                  | HADDOCK |                                    | ROSETTA                |                                     | HAWKDOCK<br>MM-GBSA                                 |
|----------------------------|---------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                            | Score   | Interaction Area (Å <sup>2</sup> ) | Theoretical DDG (REUs) | Molecular Surface (Å <sup>2</sup> ) | Predicted Binding Free Energy of Complex (kcal/mol) |
| eIF4E (Bajão)/VPg          | −75.9   | 1195.7                             | −35.724                | 632.566                             | −84.23                                              |
| eIF4E (Boca Negra)/VPg     | −91.2   | 1424.1                             | −41.459                | 684.034                             | −98.21                                              |
| eIF4E (BRS Cauamé)/VPg     | −72.3   | 1316.4                             | −20.840                | 455.246                             | −68.52                                              |
| eIF4E (BRS Xiquexique)/VPg | −102.9  | 1944.6                             | −23.612                | 453.629                             | −72.97                                              |
| eIF4E (IT85F-2687)/VPg     | −115.5  | 1820.6                             | −30.910                | 518.889                             | −82.22                                              |

Additionally, the free binding energy and interaction area between the proteins were calculated with the Rosetta package, aiming to understand the eIF4E-VPg fit (Table 3). It should be noted that the absolute values of these computationally derived energies carry inherent uncertainty. Therefore, it is more robust to use them to establish relative energetic trends, for which the susceptible Boca Negra complex was used as the baseline to compare the other cultivars. The Boca Negra cultivar showed the largest interaction area, as well as the most favorable binding energy among all complexes tested. The BRS Cauamé and BRS Xiquexique cultivars showed the smallest interaction areas between the eIF4E-VPg complex, as well as the lowest binding energies (Figure 9).



**Figure 9.** Schematic representation of the interaction areas in Å<sup>2</sup> of the VPg-eIF4E complex and the corresponding Gibbs free energy difference (Theoretical DDG), expressed in Rosetta Energy Units (REUs). (A) Boca Negra; (B) IT85F-2687; (C) Bajão; (D) BRS Xiquexique; (E) BRS Cauamé.

Furthermore, the binding free energies calculated using the MM-GBSA method through HawkDock confirmed the energetic trends predicted by the other two previ-

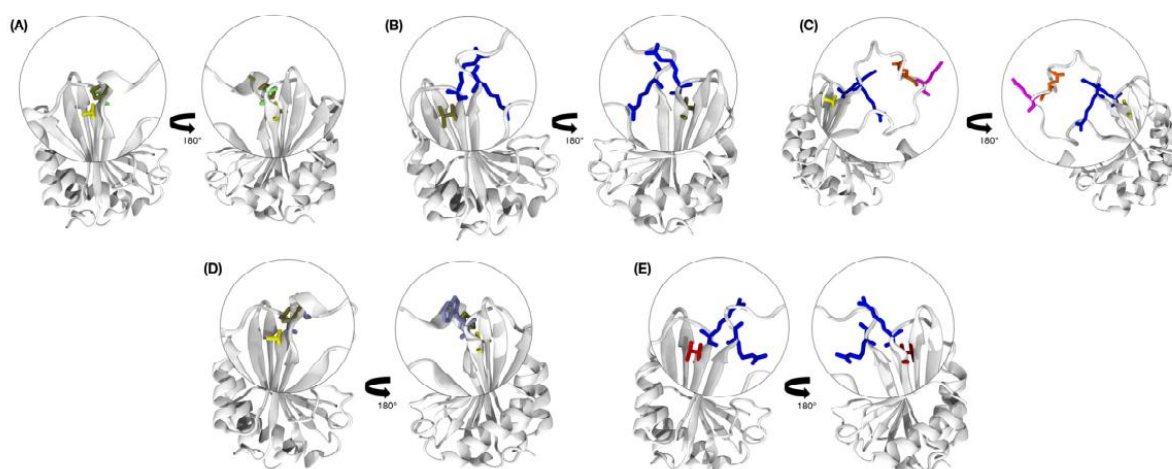
ously presented tools (Table 3). Notably, in addition to the total binding free energy, this analysis also provided per-residue energy decomposition, highlighting the key residues that contribute to the stability of the eIF4E-VPg complex. This decomposition detailed the specific contributions from van der Waals (VDW), electrostatic (ELE), polar solvation (GB), and nonpolar solvation (SA) interaction components. The per-residue energy decomposition (Supplementary Table S1) revealed a conserved interaction “hotspot” in the 118–121 region of eIF4E, where residues such as Arg-118 and Arg-120 act as fundamental binding anchors in most variants, underscoring the importance of this region for the formation of the eIF4E-VPg complex. A clear pattern emerged from this hotspot: it is dominated by a strong positive charge, creating a key electrostatic surface. The analysis also highlighted the diversity in binding strategies: the BRS Xiquexique cultivar presented a high interaction dominated by Arg-120 (exhibiting a predicted theoretical binding free energy of the complex =  $-14.89$  kcal/mol), as exhibited in Table S1, while the Bajão cultivar demonstrated a divergent recognition pattern, utilizing a distinct set of residues at the interface (e.g., Pro-73, Ile-74).

Notably, the Pro68Arg substitution stood out as the only one among the central mutations of this study to directly and significantly impact the binding energy at the interface, as evidenced by its high contribution in the Boca Negra cultivar. This finding, along with the relevance of the Trp-68 residue in the same system, demonstrates the importance of electrostatic and aromatic interactions at the main eIF4E interface (cap and VPg binding). In contrast, the other analyzed mutations are not among the main energetic contributors, suggesting their role in resistance is likely indirect, acting through the modulation of the protein’s global conformation and dynamics, a hypothesis supported by our MD analyses. The extended per-residue decomposition results for all systems are available in Supplementary Table S1.

These MM-GBSA-based findings help clarify the molecular recognition process between the systems, offering important clues as to the mechanism of action for the investigated resistance mutations. However, it is important to note that the absolute binding energy values derived from computational methods carry significant uncertainty, largely due to the challenge of accurately capturing the entropic component of binding. Therefore, these values are best interpreted not for their absolute magnitude but as semi-quantitative estimates that reliably indicate the energetic trends and relative differences between the systems.

The Boca Negra cultivar exhibited the largest interaction area, as well as the most favorable binding energy, among all complexes analyzed. Interestingly, the resistant cultivars IT85F-2687 and Bajão displayed intermediate interaction surface areas and free binding energies when compared to the other cultivars. Three-dimensional models of eIF4E revealed that the mutations identified in this study are located within the VPg-binding pocket (Figure 10).

Complementarily, other strategies for identification of key amino acid residues driving the eIF4E-VPg interaction were accomplished through two distinct analyses of the docking-derived MD trajectories. Initially, the most representative structure was selected from each of the five eIF4E-VPg systems, one for each cultivar. In this analysis, these structures were used to map intermolecular contacts by categorizing all eIF4E residues located within a 5 Å radius of VPg (Supplementary Tables S2–S7). Concurrently, hydrogen bond occupancy was quantified across these MD trajectories, applying strict geometric criteria (donor–acceptor distance  $\leq 3.5$  Å and angle  $\geq 120^\circ$ ) to identify the most persistent interactions stabilizing the eIF4E-VPg interface (Supplementary Tables S8–S12).



**Figure 10.** Highlighted representation of arginine (blue), glutamate (orange), glutamine (magenta), alanine (yellow), proline (tan), glycine (lime), valine (red), and tryptophan (purple) residues in *V. unguiculata* in the VPg-binding pocket of eIF4E proteins. (A) Boca Negra; (B) IT85F-2687; (C) Bajão; (D) BRS Xiquexique; (E) BRS Cauamé.

A combined analysis of the top favorable energetic residue contributions from MM-GBSA (Supplementary Table S1), the frequency of all interaction types (Supplementary Tables S2–S7), and hydrogen bond occupancy (Supplementary Tables S8–S12) revealed a set of key residues at the eIF4E-VPg-binding interface. Among the aromatic residues, Trp-68 was a standout (Supplementary Tables S1 and S7), not only ranking as the top energetic contributor for the Boca Negra cultivar but also being one of its most frequent interactors. This trend was also observed for other hydrophobic residues, such as Ile-74 and Pro-73 in the Bajão cultivar, as shown in Supplementary Tables S1 and S7. The analysis underscored the role of positively charged residues, particularly Arg-118, which was identified as a convergent “hotspot” in four (Boca Negra, BRS Cauamé, BRS Xiquexique, and IT85F-2687) of the five cultivars studied. Other charged residues, such as arginine and lysine, also showed a correlation between high energetic contribution and frequent contact (Supplementary Tables S1 and S7). Furthermore, polar uncharged residues were found to be essential, exemplified by Gln-121, which was the most significant energetic contributor for BRS Cauamé while also being a frequent binding interactor.

In addition, the hydrogen bond occupancy analysis (Supplementary Tables S8–S12) highlighted the key interaction anchors by quantifying the stability of the most persistent bonds throughout the MD trajectories. For the BRS Cauamé cultivar, a persistent stable hydrogen bond (97.36% occupancy) was observed between eIF4E’s backbone carbonyl oxygen of Trp-68 and VPg’s amide nitrogen of Gly-111, suggesting this interaction serves as a fundamental structural lock. In Boca Negra and IT85F-2687, the charged residue Arg-120 was central, forming persistent hydrogen bonds (51.55% and 46.58%, respectively), highlighting the role of electrostatic forces in complex stabilization. In the Bajão cultivar, the most durable interaction (62.34%) occurred between the backbone (Gly-25) and the polar side chain of Ser-115 (VPg), indicating a combination of specificity and structural stability. In contrast, the BRS Xiquexique cultivar displayed more transient hydrogen interactions, with the highest occupancy (Lys-18 and Gly-111) reaching only 4.60%, which may correlate with a different binding affinity profile.

Taken together, these results of correlation between the binding scores, per-residue energetic contribution, and contact frequency, enriched by hydrogen bond occupancy data, provide robust evidence for identifying the most functionally relevant residues at the

eIF4E-VPg interface. The consistent identification of residues like Arg-118, Trp-68, and Gln-121 and the importance of H-bond anchors involving Arg-120 and backbones suggest that the interface's stability relies on a cooperative network of hydrophobic, electrostatic, and hydrogen-bonding interactions, the specific balance of which dictates the affinity in each cowpea cultivar.

#### 4. Discussion

Recessive resistance of plants to Potyvirus infection can be acquired through natural (or induced) mutations in the eIF4E protein and its isoforms (eIF (iso) 4E). This type of resistance typically results from single-nucleotide polymorphisms (SNPs) [56], involving non-synonymous amino acid substitutions, which can hinder viral infection, reducing symptoms in the host plant [57]. Based on this mechanism, the present study aimed to investigate the effect of mutations in the coding region of the *eIF4E* gene and their potential role in determining susceptibility or resistance of selected cowpea cultivars to *cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).

Five non-synonymous mutations in the *eIF4E* gene were identified among the three cowpea cultivars analyzed in this study. Of these, three mutations (at positions 203, 325, and 329) distinguish the two susceptible cultivars (Boca Negra and BR14 Mulato) from the resistant cultivar (IT85F-2687). These mutations corresponded to the nucleotide substitutions C203G, G325C, and C329T, resulting in amino acid changes Pro68Arg, Gly109Arg, and Ala110Val, respectively. The first two mutations involve the replacement of apolar hydrophobic amino acids (proline and glycine) with arginine, a basic amino acid with a positive charge, resulting in important structural and functional changes in the eIF4E protein. On the other hand, the third mutation (Ala110Val), although also non-synonymous, involves a substitution between two apolar amino acids, (hydrophobic), not altering the charge or polarity of the protein [58]. It is worth noting that point mutations can lead to local and global alterations in the protein and, consequently, affect its interaction with other proteins [59], such as VPg. These alterations may contribute to resistance against Potyvirus infection. Similar substitutions, at the same or nearby positions in eIF4E, have previously been associated with recessive resistance to Potyviruses [56]. Amino acid substitutions such as Val67Glu, Ala68Glu, and Gly107Arg have been identified in pepper resistant to *potato virus Y* (PVY) [34,60]. Similarly, in lettuce and watermelon, resistance to Potyvirus has been associated with the Arg107Gly and Asp71Gly substitutions, respectively [61,62]. These mutations reflect a pattern in which basic or acidic amino acids (Arg, Glu, or Asp) found in resistant cultivars were replaced by apolar amino acids (Gly, Ala, or valine) in susceptible phenotypes, consistent with the pattern observed in cowpea in the present study.

Molecular approaches, including PCR amplifications using specific primers for each mutation (resistant/susceptible), largely supported the results from the viral infection assay across the 27 cowpea cultivars. Similarly, sequencing and alignment results confirmed the presence of mutations at positions 203 and 325 in most of the cultivars tested.

While BRS Tumucumaque, BRS Cauamé, and BRS Guariba have been described as susceptible [48,49], other studies have reported BRS Cauamé and BRS Guariba as resistant to CABMV [47]. The discrepancy observed (where some cultivars amplified with the primer associated with resistance but showed symptoms of CABMV) may be explained by resistance breakdown. Such breakdowns are often driven by viral mutations, as observed in the coat protein (CP) of *Pepino mosaic virus* (PepMV) [63]. Resistance breakdown mediated by eIF4E occurs mainly through single or multiple mutations in the VPg protein, allowing the virus to reuse eIF4E or another isoform as a susceptibility factor [64], as reported in pepper, tomato, pea, and barley [64,65]. These alterations represent one of the main factors responsible for the decrease in the durability of recessive resistance of plants to phytopathogens [20],

such as Potyvirus. Furthermore, some plants, when possessing resistant *eIF4E* alleles in homozygosity, may occasionally exhibit symptoms, albeit late [66,67].

In the case of the cultivars Miranda IPA 207 and Manteiguinha Santarém, although both tested PCR-positive for susceptibility, they did not show symptoms after viral infection. Notably, the Miranda IPA 207 cultivar has previously been described as susceptible, whereas Manteiguinha Santarém has been reported as resistant to CABMV [48]. The latter, Manteiguinha Santarém, could be a target for future studies aimed at prospecting genes related to cowpea resistance to CABMV. Moreover, understanding the involvement of susceptibility genes in the plant–virus pathosystem is fundamental for advancing genetic improvement programs focused on developing resistant cultivars.

The alignments of the three-dimensional structures revealed a high conservation of the three-dimensional folding of *eIF4E* among the five cowpea cultivars, corroborating the data described experimentally in several studies [13]. Despite this, some point mutations were observed, which can cause local and global alterations in the protein [59,68,69]. These mutations are close to the *eIF4E* binding site with VPg (Figure 10), suggesting they could potentially affect their interaction.

Among the five proteins analyzed in silico, BRS Xiquexique and Bajão showed the most pronounced discrepancies in RMSD values. The Trp109Gly substitution in BRS Xiquexique, which distinguishes it from the other susceptible cultivars, and the addition of two amino acid residues (Glu and Gln) at positions 76 and 77, respectively, in Bajão, may account for the observed RMSD deviation. These findings suggest that BRS Xiquexique and Bajão presented the greatest alterations throughout the MD. When interacting with VPg, the *eIF4E* of Bajão was less perturbed, unlike BRS Xiquexique, which exhibited global perturbations after the interaction. These observations may be associated with viral resistance mechanisms, as CABMV relies critically on hijacking *eIF4E*, a key component of the translational complex to complete its viral replication process [17,20,67]. Moury et al. [33] demonstrated that knocking out the *eIF4E* gene in tomato conferred resistance to *pepper veinal mottle virus* (PVMV), proving the importance of *eIF4E* genes in Potyvirus infection.

The interaction with VPg markedly altered the flexibility profile of the *eIF4E* proteins in the analyzed cultivars, suggesting that the formation of the *eIF4E*-VPg complex generates global conformational charges. These alterations may result from steric hindrances due to proximity to VPg or from conformational adjustments directly caused by the interaction. The fluctuation peak observed between residues 8 and 16 (characteristic of the BRS Xiquexique and BRS Cauamé cultivars) coincided with the site of the Pro68Arg mutation, differentiating susceptible cultivars from resistant ones. Nearby residues may have led to increased flexibility, since the properties of amino acids have the potential to influence protein flexibility significantly [70,71]. A remarkable contribution to the entropy of a system consists of its greater flexibility which, in turn, interferes with interactions with other systems [72]. This observation supports the experimental data, as BRS Cauamé, despite presenting mutations similar to those found in resistant cultivars, exhibited a flexibility peak comparable to that of the susceptible BRS Xiquexique cultivar and behaved as susceptible when inoculated with CABMV.

Moreover, our findings shed light on the dynamics of the N-terminal region of *eIF4E*. In agreement with the previous literature [73,74], our MD simulations suggest that this domain (residues 1–25) is highly flexible, as indicated by its high RMSF values (Figure 5), and that its flexibility is not completely reduced upon VPg binding (Figures 5 and S8). This is consistent with the established role of the N-terminal domain of *eIF4E* as the primary binding site for *eIF4G*, a crucial interaction for the initiation of translation hijacked by Potyviruses [74, 75]. This raises an intriguing possibility for the mechanism of the Pro68Arg resistance mutation. Rather than directly impeding the VPg interaction, the Pro68Arg substitution

could remotely modulate the dynamics of the N-terminal domain. Such a long-range effect could consequently impair the recruitment of eIF4G, disrupting viral polyprotein synthesis and ultimately leading to the resistant phenotype. This proposed structural pattern mechanism provides an interesting hypothesis for future experimental validation.

Although eIF4E factors play a critical role in viral replication and contribute to recessive resistance in plants, other viral proteins may also act as secondary factors influencing susceptibility or resistance. For example, the HC-Pro protein has been shown to interact with eIF4E isoforms in peanut [76], in addition to VPg. The interaction of HC-Pro, VPg, and eIF4E is essential not only for the efficient translation of viral RNA [76] but also for the suppression of the host plant's defense responses [77].

Intramolecular HBs play a fundamental role in various biological processes, including the stabilization of three-dimensional protein structures [78]. In addition to HBs, the conformation and compaction of protein structures analyzed through RG [79] is an important parameter for MD studies. The results obtained from HB and RG analysis indicate that the eIF4E-VPg interaction does not affect the degree of compaction, which was numerically similar among them and also like that of the isolated eIF4Es. This suggests that, although interaction with VPg directly affects the degree of flexibility, it does not significantly influence the degree of compaction of eIF4E. The electrostatic profiles of eIF4E and VPg proteins revealed predominantly cationic and anionic charges, respectively. The distribution of positive charges in the 5' cap recognition region of mRNA by eIF4E is critical for efficient translation initiation in eukaryotes. Furthermore, this same characteristic allows the recognition of VPg, which has a negative charge, resembling the physicochemical nature of N7-methylguanosine (m7G) of the host's mRNA 5'cap region [13]. This mechanism is shared with other viruses of the Potyviridae family, known for hijacking the host's translation machinery to ensure successful infection.

The findings revealed by the analysis of the eIF4E-VPg-binding interface reveal that its stability does not depend on a single force but on a network of intramolecular interactions, combining both hydrophobic and electrostatic effects. Docking analysis and binding free energy calculations revealed distinct thermodynamic profiles among the cultivars. The Boca Negra cultivar, for instance, exhibited highly thermodynamically favorable binding interactions, whereas BRS Cauamé displayed a less favorable energetic profile. Suggestive divergent binding profiles were also observed, such as the use of the polar residue Arg-120 by BRS Xiquexique and the hydrophobic residue Pro-73 by the Bajão cultivar. Hydrophobic residues like Trp-68 and Ile-74 were prominent, and electrostatic forces involving charged residues appear to be crucial for both the orientation and energetic stabilization of the complex.

Furthermore, one of the most significant findings was the identification of interaction "hotspots", both conserved and cultivar-specific patterns. The residue Arg-118 emerged as a fundamental and convergent anchoring point in four (Boca Negra, BRS Cauamé, BRS Xiquexique, and IT85F-2687) of the five cultivars, while specific residues, such as Gln-121 in BRS Cauamé and the Pro-73 and Ile-74 pair in Bajão, likely determine the differences in binding affinity. These variations in the interface may be the molecular basis for the observed differences in susceptibility to viral infection. Although the data is computational, it provides a solid basis for prioritizing these residues in future site-directed mutagenesis studies, with experimental validation being a critical next step for developing durable resistance strategies.

The physicochemical conservation of VPg enables it to mimic the 5'cap structure of eukaryotic mRNA. This feature in viruses of the Potyviridae family may be one of the keys to their high infection potential across diverse plant hosts, including potato, tomato, passion fruit, and peanut [17]. In vitro and NMR-based structural studies have demonstrated that

PVY VPg can interact with human eIF4E, reflecting the strong conservation of the primary sequence and structural folding of eIF4E across eukaryotes [13]. This conservation of physicochemical nature in both VPg and eukaryotic eIF4E may be one of the factors explaining the broad infection capacity of Potyviridae family viruses in a wide variety of vegetables belonging to different genera and families.

Finally, our analysis of the eIF4E-VPg interaction suggests that additional factors, independently of eIF4E, may influence the process of susceptibility or resistance to CABMV in *V. unguiculata* cultivars. The results also indicate that resistance to viral infection in *V. unguiculata* is not absolute. Therefore, further investigations are essential to elucidate other additional resistance mechanisms against Potyviruses.

## 5. Conclusions

The results obtained suggest that mutations in the *eIF4E* gene affect the structural properties of the protein and, consequently, its interaction with the CABMV VPg protein, potentially modulating the resistance or susceptibility of *V. unguiculata*. The mutation data presented in this study suggests that they may be associated with the resistance or susceptibility of *V. unguiculata* cultivars to CABMV, as confirmed with bioassays, where most cultivars harboring susceptibility-associated mutations exhibited symptoms. In turn, some of the cultivars with resistance-associated mutations remained asymptomatic. Supporting the experimental findings, a suite of computational analyses, including MD simulations, docking, and binding free energy calculations, revealed that structural adjustments both within the eIF4E protein and at the eIF4E-VPg interface dictate binding affinity. The stability of this interaction is critically dependent not only on hydrophobic and electrostatic forces but also on a more complex network of interactions required to maintain the bond. Also, the interface and energetic analyses pinpointed a set of key residues driving this interaction, which represent promising targets for enabling a basis for a deeper future understanding.

These findings reinforce the role of eIF4E in the response to CABMV and provide a basis for selecting genotypes resistant to CABMV and other plant viruses dependent on translation factors. Furthermore, this study presents, for the first time, approaches involving protein modeling, MD simulations, and docking analysis, providing strong evidence of the association between specific mutations and susceptibility/resistance of *V. unguiculata* cultivars to agriculturally important Potyviruses. The results also highlight the complexity of the mechanisms involved in the virus–host interaction, suggesting that additional, yet unidentified, factors may be indirectly acting on the condition of susceptibility/resistance to CABMV. Our data reinforces the importance of the *eIF4E* gene as a potential target in generating CABMV-resistant cultivars via gene editing.

## 6. Future Perspectives

The data obtained in this study indicates some key regions and mutations of the *eIF4E* gene associated with cowpea resistance to CABMV. As future perspectives, the target regions may be promising for gene editing approaches, such as CRISPR/Cas9. Furthermore, the identified polymorphisms are valuable for application in marker-assisted selection (MAS) in breeding programs, significantly reducing the time required for the identification and introgression of resistance genes in cultivars of interest.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v17081050/s1>, Figure S1: Conserved domain of VPg proteins from different plant viruses. Figure S2: Agarose gel electrophoresis (1.5%) of eIF4E gene CDS amplifications from 27 cowpea cultivars. Figure S3: Percent identity matrix of eIF4E gene sequences from 27 *V. unguiculata* cultivars, performed in MEGA (v. 11). Figure S4: Alignment between cowpea cultivars. The three reference sequences (with the Full tag), with the 27 cowpea cultivars (1 to 27). Figure S5: Alignment of

eIF4E proteins from cowpea cultivars that showed characteristic mutations. Figure S6: Alignment of the three-dimensional structures of *V. unguiculata* eIF4E proteins. Figure S7: Graphs referring to the molecular dynamics of CABMV VPg. Figure S8: Annotated RMSF plot highlighting key flexibility peaks in eIF4E. Figure S9: Graphical representation of b-factor values in eIF4E protein models, highlighting flexibility peaks that vary to warmer (red/orange) and thicker tones. Table S1: Per-residue binding free energy decomposition for eIF4E variants from different cultivars interacting with CABMV VPg. Table S2: Intermolecular contacts at the eIF4E-VPg interface for the Bajão cultivar. Table S3: Intermolecular contacts at the eIF4E-VPg interface for the Boca Negra cultivar. Table S4: Intermolecular contacts at the eIF4E-VPg interface for the BRS Cauamé cultivar. Table S5: Intermolecular contacts at the eIF4E-VPg interface for the BRS Xiquexique cultivar. Table S6: Intermolecular contacts at the eIF4E-VPg interface for the BRS IT85F-2687 cultivar. Table S7: Summary of the most frequent eIF4E residues at the interaction interface with VPg. Table S8: Hydrogen bond occupancy (%) at the eIF4E-VPg interface for the Bajão cultivar. Table S9: Hydrogen bond occupancy (%) at the eIF4E-VPg interface for the Boca Negra cultivar. Table S10: Hydrogen bond occupancy (%) at the eIF4E-VPg interface for the BRS Cauamé cultivar. Table S11: Hydrogen bond occupancy (%) at the eIF4E-VPg interface for the BRS Xiquexique cultivar. Table S12: Hydrogen bond occupancy (%) at the eIF4E-VPg interface for the IT85F-2687 cultivar.

**Author Contributions:** Conceptualization—F.A.d.A., M.A.d.L.-A., C.A.d.S.-S., V.P., J.D.C.F., and A.M.B.-I.; methodology—F.A.d.A., M.A.d.L.-A., A.F.d.C., and J.D.C.F.; formal analysis—F.A.d.A., and M.A.d.L.-A.; investigation—F.A.d.A., F.F.S., A.C.d.R.O., and A.F.d.C.; writing—original draft—F.A.d.A., and M.A.d.L.-A.; writing—review and editing—V.P., J.D.C.F., A.M.B.-I., and F.J.L.A.; visualization—F.A.d.A., and M.A.d.L.-A.; supervision—V.P., and J.D.C.F.; project administration—F.A.d.A., M.A.d.L.-A., and V.P.; and resources—V.P., A.M.B.-I., and F.J.L.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) (financial support umbers: 404070/2024-8, 406657/2023-8 and 406048/2022-3); CNPq (167660/2022-5) and FAPEMIG (Minas Gerais State Research Support Foundation) (23072.242088/2024-72) grants.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article or Supplementary Materials, and further inquiries can be directed to the corresponding authors.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge the National Laboratory for Scientific Computing (LNCC) for providing high-performance computing resources through the Santos Dumont supercomputer, which supported the computational analyses performed in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## Abbreviations

|        |                                        |
|--------|----------------------------------------|
| +ssRNA | Positive-sense single-stranded RNA     |
| A      | Adenine                                |
| Ala    | Alanine                                |
| Asn    | Asparagine                             |
| Asp    | Aspartate                              |
| C      | Cytosine                               |
| CABMV  | <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> |
| cDNA   | Complementary DNA                      |
| CDS    | Coding sequence                        |
| CPSMV  | <i>Cowpea severe mosaic virus</i>      |
| DAIs   | Days after inoculation                 |
| DDG    | Delta Delta G                          |

|         |                                             |
|---------|---------------------------------------------|
| eIF4E   | Eukaryotic translation initiation factor 4E |
| F       | Forward                                     |
| G       | Guanine                                     |
| Gln     | Glutamine                                   |
| Glu     | Glutamate                                   |
| Gly     | Glycine                                     |
| HBs     | Hydrogen bonds                              |
| m7GpppN | 7-Methylguanosine                           |
| MD      | Molecular dynamics                          |
| mRNA    | Messenger RNA                               |
| NMR     | Nuclear magnetic resonance                  |
| PAE     | Predicted Aligned Error                     |
| PDB     | Protein Data Bank                           |
| pLDDT   | Predicted Local Distance Difference Test    |
| Poly-A  | Polyadenylated tail                         |
| Pro     | Proline                                     |
| PSE     | Electrostatic Surface Potential             |
| PVMV    | <i>Pepper veinal mottle virus</i>           |
| PVY     | <i>Potato virus Y</i>                       |
| R       | Reverse                                     |
| R genes | Resistance genes                            |
| REU     | Rosetta Energy Unit                         |
| RG      | Radius of gyration                          |
| RMSD    | Root Mean Square Deviation                  |
| RMSF    | Root Mean Square Fluctuation                |
| S genes | Susceptibility genes                        |
| SNPs    | Single-nucleotide polymorphisms             |
| T       | Thymine                                     |
| Trp     | Tryptophan                                  |
| Tyr     | Tyrosine                                    |
| UMP     | Uridine monophosphate                       |
| Val     | Valine                                      |
| VPg     | Viral protein genome-linked                 |

## References

- Angira, B.; Zhang, Y.; Scheuring, C.F.; Zhang, Y.; Masor, L.; Coleman, J.R.; Liu, Y.-H.; Singh, B.B.; Zhang, H.-B.; Hays, D.B.; et al. Construction of a Single Nucleotide Polymorphism Linkage Map and Identification of Quantitative Trait Loci Controlling Heat Tolerance in Cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Mol. Genet. Genom.* **2022**, *297*, 1481–1493. [\[CrossRef\]](#)
- Alemu, M.; Asfaw, Z.; Woldu, Z.; Fenta, B.A.; Medvecky, B. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Fabaceae) Landrace Diversity in Northern Ethiopia. *Int. J. Biodivers. Conserv.* **2016**, *8*, 297–309. [\[CrossRef\]](#)
- Boukar, O.; Togola, A.; Chamarthi, S.; Belko, N.; Ishikawa, H.; Suzuki, K.; Fatokun, C. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Breeding. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes*; Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., Johnson, D.V., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; pp. 201–243, ISBN 978-3-030-23399-0.
- Kapraavelou, G.; Martínez, R.; Martino, J.; Porres, J.M.; Fernández-Figares, I. Natural Fermentation of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Flour Improves the Nutritive Utilization of Indispensable Amino Acids and Phosphorus by Growing Rats. *Nutrients* **2020**, *12*, 2186. [\[CrossRef\]](#)
- Herniter, I.A.; Muñoz-Amatriáin, M.; Close, T.J. Genetic, Textual, and Archeological Evidence of the Historical Global Spread of Cowpea ([L.] Walp.). *Legume Sci.* **2020**, *2*, e57. [\[CrossRef\]](#)
- Amorim, L.L.B.; Ferreira-Neto, J.R.C.; Bezerra-Neto, J.P.; Pandolfi, V.; de Araújo, F.T.; da Silva Matos, M.K.; Santos, M.G.; Kido, E.A.; Benko-Iseppon, A.M. Cowpea and Abiotic Stresses: Identification of Reference Genes for Transcriptional Profiling by qPCR. *Plant Methods* **2018**, *14*, 88. [\[CrossRef\]](#)
- Borges-Martins, A.N.C.; Ferreira-Neto, J.R.C.; Silva, M.D.d.; Morais, D.A.d.L.; Pandolfi, V.; Silva, R.L.d.O.; Melo, A.L.T.M.d.; da Costa, A.F.; Benko-Iseppon, A.M. Unlocking Cowpea's Defense Responses: Conserved Transcriptional Signatures in the Battle against CABMV and CPSMV Viruses. *Life* **2023**, *13*, 1747. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

8. Cruz, A.R.R.; Aragão, F.J.L. RNAi-Based Enhanced Resistance to *Cowpea severe mosaic virus* and *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in transgenic cowpea. *Plant Pathol.* **2014**, *63*, 831–837. [\[CrossRef\]](#)
9. Tavert-Roudet, G.; Anne, A.; Barra, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Michon, T. The Potyvirus Particle Recruits the Plant Translation Initiation Factor eIF4E by Means of the VPg Covalently Linked to the Viral RNA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2017**, *30*, 754–762. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Mäkinen, K. Plant Susceptibility Genes as a Source for Potyvirus Resistance. *Ann. Appl. Biol.* **2020**, *176*, 122–129. [\[CrossRef\]](#)
11. Walter, J.; Charon, J.; Hu, Y.; Lachat, J.; Leger, T.; Lafforgue, G.; Barra, A.; Michon, T. Comparative analysis of mutational robustness of the intrinsically disordered viral protein VPg and of its interactor eIF4E. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0211725. [\[CrossRef\]](#)
12. Wang, A.; Krishnaswamy, S. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-mediated Recessive Resistance to Plant Viruses and Its Utility in Crop Improvement. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 795–803. [\[CrossRef\]](#)
13. Coutinho De Oliveira, L.; Volpon, L.; Rahardjo, A.K.; Osborne, M.J.; Culjkovic-Kraljacic, B.; Trahan, C.; Oeffinger, M.; Kwok, B.H.; Borden, K.L.B. Structural Studies of the eIF4E–VPg Complex Reveal a Direct Competition for Capped RNA: Implications for Translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 24056–24065. [\[CrossRef\]](#)
14. Sun, Y.; Guo, Y.; Lou, Z. Formation and Working Mechanism of the Picornavirus VPg Uridylylation Complex. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *9*, 24–30. [\[CrossRef\]](#)
15. Rantalainen, K.I.; Eskelin, K.; Tompa, P.; Mäkinen, K. Structural Flexibility Allows the Functional Diversity of Potyvirus Genome-Linked Protein VPg. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2449–2457. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Shen, W.; Shi, Y.; Dai, Z.; Wang, A. The RNA-Dependent RNA Polymerase Nib of Potyviruses Plays Multifunctional, Contrasting Roles during Viral Infection. *Viruses* **2020**, *12*, 77. [\[CrossRef\]](#)
17. Zlobin, N.; Taranov, V. Plant eIF4E Isoforms as Factors of Susceptibility and Resistance to Potyviruses. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, 1041868. [\[CrossRef\]](#)
18. Garcia-Ruiz, H.; Szurek, B.; Van den Ackerveken, G. Stop Helping Pathogens: Engineering Plant Susceptibility Genes for Durable Resistance. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2021**, *70*, 187–195. [\[CrossRef\]](#)
19. Van Schie, C.C.N.; Takken, F.L.W. Susceptibility Genes 101: How to Be a Good Host. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2014**, *52*, 551–581. [\[CrossRef\]](#)
20. Gallois, J.-L.; Moury, B.; German-Retana, S. Role of the Genetic Background in Resistance to Plant Viruses. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2856. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Truniger, V.; Aranda, M.A. Recessive Resistance to Plant Viruses. In *Advances in Virus Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2009; Volume 75, pp. 119–231, ISBN 978-0-12-381397-8.
22. Sotomayor-Vivas, C.; Hernández-Lemus, E.; Dorantes-Gilardi, R. Linking Protein Structural and Functional Change to Mutation Using Amino Acid Networks. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0261829. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Teng, S.; Wang, L.; Srivastava, A.K.; Schwartz, C.E.; Alexov, E. Structural Assessment of the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Stability and Protein-Protein Interaction. *Int. J. Comput. Biol. Drug Des.* **2010**, *3*, 334–349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Lebedeva, M.; Nikonova, E.; Babakov, A.; Kolesnikova, V.; Razhina, O.; Zlobin, N.; Taranov, V.; Nikonov, O. Interaction of *Solanum Tuberosum* L. Translation Initiation Factors eIF4E with *Potato virus Y* VPg: Apprehend and Avoid. *Biochimie* **2024**, *219*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
25. Urquidí Camacho, R.A.; Lokdarshi, A.; Von Arnim, A.G. Translational gene regulation in plants: A green new deal. *WIREs RNA* **2020**, *11*, e1597. [\[CrossRef\]](#)
26. Joshi, B.; Lee, K.; Maeder, D.L.; Jagus, R. Phylogenetic Analysis of eIF4E-Family Members. *BMC Evol. Biol.* **2005**, *5*, 48. [\[CrossRef\]](#)
27. Patrick, R.M.; Browning, K.S. The eIF4F and eIFiso4F Complexes of Plants: An Evolutionary Perspective. *Int. J. Genom.* **2012**, *2012*, 287814. [\[CrossRef\]](#)
28. Duprat, A.; Caranta, C.; Revers, F.; Menand, B.; Browning, K.S.; Robaglia, C. The *Arabidopsis* Eukaryotic Initiation Factor (iso)4E Is Dispensable for Plant Growth but Required for Susceptibility to Potyviruses. *Plant J.* **2002**, *32*, 927–934. [\[CrossRef\]](#)
29. Estevan, J.; Maréna, A.; Callot, C.; Lacombe, S.; Moretti, A.; Caranta, C.; Gallois, J.-L. Specific Requirement for Translation Initiation Factor 4E or Its Isoform Drives Plant Host Susceptibility to *Tobacco Etch virus*. *BMC Plant Biol.* **2014**, *14*, 67. [\[CrossRef\]](#)
30. Nicaise, V.; Gallois, J.-L.; Chafiai, F.; Allen, L.M.; Schurdi-Levraud, V.; Browning, K.S.; Candresse, T.; Caranta, C.; Le Gall, O.; German-Retana, S. Coordinated and Selective Recruitment of eIF4E and eIF4G Factors for Potyvirus Infection in *Arab. Thaliana*. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 1041–1046. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Michel, V.; Julio, E.; Candresse, T.; Cotucheau, J.; Decorps, C.; Volpatti, R.; Moury, B.; Glais, L.; Jacquot, E.; de Borne, F.D.; et al. A complex eIF4E Locus Impacts the Durability of *va* Resistance to *Potato virus Y* in Tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20*, 1051–1066. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

32. Lebedeva, M.V.; Nikonova, E.Y.; Terentiev, A.A.; Taranov, V.V.; Babakov, A.V.; Nikonov, O.S. VPg of *Potato virus Y* and Potato Cap-Binding eIF4E Factors: Selective Interaction and Its Supposed Mechanism. *Biochem. Mosc.* **2021**, *86*, 1128–1138. [\[CrossRef\]](#)
33. Moury, B.; Lebaron, C.; Szadkowski, M.; Ben Khalifa, M.; Girardot, G.; Bolou Bi, B.A.; Koné, D.; Nitiema, L.W.; Fakhfakh, H.; Gallois, J.-L. Knock-out Mutation of Eukaryotic Initiation Factor 4E2 (eIF4E2) Confers Resistance to *Pepper vein mottle virus* in Tomato. *Virology* **2020**, *539*, 11–17. [\[CrossRef\]](#)
34. Ruffel, S.; Gallois, J.-L.; Moury, B.; Robaglia, C.; Palloix, A.; Caranta, C. Simultaneous Mutations in Translation Initiation Factors eIF4E and eIF(Iso)4E Are Required to Prevent *Pepper vein mottle virus* Infection of Pepper. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 2089–2098. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochem. Bull.* **1987**, *19*, 11–15.
36. Oliveira, C.R.R.D.; Freire Filho, F.R.; Nogueira, M.D.S.D.R.; Barros, G.B.; Eiras, M.; Ribeiro, V.Q.; Lopes, Â.C.D.A. Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo *Cucumber mosaic virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e *Cowpea severe mosaic virus*. *Bragantia* **2012**, *71*, 59–66. [\[CrossRef\]](#)
37. Lima, J.A.A.; Silva, A.K.F.D.; Aragão, M.D.L.; Ferreira, N.R.D.A.; Teófilo, E.M. Simple and Multiple Resistances to Viruses in Cowpea Genotypes. *Pesqui. Agropecuária Bras.* **2011**, *46*, 1432–1438. [\[CrossRef\]](#)
38. Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.A.; Clamp, M.; Barton, G.J. Jalview Version 2—A Multiple Sequence Alignment Editor and Analysis Workbench. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2009**, *25*, 1189–1191. [\[CrossRef\]](#)
39. Abramson, J.; Adler, J.; Dunger, J.; Evans, R.; Green, T.; Pritzel, A.; Ronneberger, O.; Willmore, L.; Ballard, A.J.; Bambrick, J.; et al. Accurate Structure Prediction of Biomolecular Interactions with AlphaFold 3. *Nature* **2024**, *630*, 493–500. [\[CrossRef\]](#)
40. Abraham, M.J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J.C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19–25. [\[CrossRef\]](#)
41. Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A.E.; Van Gunsteren, W.F. A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1656–1676. [\[CrossRef\]](#)
42. Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; van Gunsteren, W.F.; Hermans, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In *Intermolecular Forces: Proceedings of the Fourteenth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry Held in Jerusalem, Israel, April 13–16, 1981*; Pullman, B., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1981; pp. 331–342, ISBN 978-94-015-7658-1.
43. Hess, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 116–122. [\[CrossRef\]](#)
44. Van Gunsteren, W.F.; Berendsen, H.J.C. A Leap-Frog Algorithm for Stochastic Dynamics. *Mol. Simul.* **1988**, *1*, 173–185. [\[CrossRef\]](#)
45. Jurrus, E.; Engel, D.; Star, K.; Monson, K.; Brandi, J.; Felberg, L.E.; Brookes, D.H.; Wilson, L.; Chen, J.; Liles, K.; et al. Improvements to the APBS Biomolecular Solvation Software Suite. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2018**, *27*, 112–128. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Zhang, X.; Jiang, L.; Weng, G.; Shen, C.; Zhang, O.; Liu, M.; Zhang, C.; Gu, S.; Wang, J.; Wang, X.; et al. HawkDock Version 2: An Updated Web Server to Predict and Analyze the Structures of Protein-Protein Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2025**, *gkaf379*. [\[CrossRef\]](#)
47. Oliveira, C.R.R. Reação de Genótipos de Feijão-Caupi às Coinfeções pelo *Cucumber mosaic virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e *Cowpea severe mosaic virus*. Master's Thesis, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brazil, 2011.
48. Silva, J.A.; Costa, A.F.D.; Benko-Iseppon, A.M.; Guimarães, L.M.P.; Nicoli, A. Resistência de *Vigna unguiculata* ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. *Pesqui. Agropecuária Pernambucana* **2021**, *26*, 1–3. [\[CrossRef\]](#)
49. Barros, G.B.; Nogueira, M.D.S.D.R.; Oliveira, C.R.R.D.; Freire Filho, F.R.; Ribeiro, V.Q.; Veiga, C.F.D.M.; Brioso, P.S.T.; Eiras, M. Obtenção de plantas de feijão-caupi resistentes ao *Cowpea severe mosaic virus* e ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. *Summa Phytopathol.* **2013**, *39*, 130–136. [\[CrossRef\]](#)
50. de Santana, S.R.A.; da Silva Santana, J.T.; da Silva Costa, K.D.; da Costa, R.R.; da Costa, A.F.; de Carvalho Filho, J.L.S. Herança Da Resistência do Feijão-Caupi Ao *Cowpea severe mosaic virus* e *Cowpea aphid-borne mosaic virus*: Inheritance of Cowpea Resistance to *Cowpea severe mosaic virus* and *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. *Braz. J. Dev.* **2022**, *8*, 69367–69383. [\[CrossRef\]](#)
51. Santos-Silva, C.A.D.; Zupin, L.; Oliveira-Lima, M.; Vilela, L.M.B.; Bezerra-Neto, J.P.; Ferreira-Neto, J.R.; Ferreira, J.D.C.; Oliveira-Silva, R.L.D.; Pires, C.D.J.; Aburjaile, F.F.; et al. Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. *Bioinforma. Biol. Insights* **2020**, *14*, 1177932220952739. [\[CrossRef\]](#)
52. Santos-Silva, C.A.D.; Vilela, L.M.B.; Oliveira-Silva, R.L.D.; Silva, J.B.D.; Machado, A.R.; Bezerra-Neto, J.P.; Crovella, S.; Benko-Iseppon, A.M. Cassava (*Manihot esculenta*) Defensins: Prospection, Structural Analysis and Tissue-Specific Expression under Biotic/Abiotic Stresses. *Biochimie* **2021**, *186*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
53. Studer, G.; Rempfer, C.; Waterhouse, A.M.; Gumienny, R.; Haas, J.; Schwede, T. QMEANDisCo—Distance Constraints Applied on Model Quality Estimation. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 1765–1771. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

54. Walter, J.; Barra, A.; Charon, J.; Taver-Roudet, G.; Michon, T. Spectroscopic Investigation of the Kinetic Mechanism Involved in the Association of Potyviral VPg with the Host Plant Translation Initiation Factor eIF4E. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5618. [\[CrossRef\]](#)
55. Okade, H.; Fujita, Y.; Miyamoto, S.; Tomoo, K.; Muto, S.; Miyoshi, H.; Natsuaki, T.; Rhoads, R.E.; Ishida, T. Turnip Mosaic Virus Genome-Linked Protein VPg Binds C-Terminal Region of Cap-Bound Initiation Factor 4E Orthologue without Exhibiting Host Cellular Specificity. *J. Biochem.* **2009**, *145*, 299–307. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Yeam, I.; Cavatorta, J.R.; Ripoll, D.R.; Kang, B.-C.; Jahn, M.M. Functional Dissection of Naturally Occurring Amino Acid Substitutions in eIF4E That Confers Recessive Potyvirus Resistance in Plants. *Plant Cell* **2007**, *19*, 2913–2928. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Sanfaçon, H. Plant Translation Factors and Virus Resistance. *Viruses* **2015**, *7*, 3392–3419. [\[CrossRef\]](#)
58. Horovitz, O.; Paşca, R.-D. Classification of Amino Acids by Multivariate Data Analysis, Based on Thermodynamic and Structural Characteristics. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chemia.* **2017**, *62*, 19–31. [\[CrossRef\]](#)
59. Holzgräfe, C.; Wallin, S. Local versus Global Fold Switching in Protein Evolution: Insight from a Three-Letter Continuous Model. *Phys. Biol.* **2015**, *12*, 026002. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Charron, C.; Nicolai, M.; Gallois, J.; Robaglia, C.; Moury, B.; Palloix, A.; Caranta, C. Natural Variation and Functional Analyses Provide Evidence for Co-evolution between Plant eIF4E and Potyviral VPg. *Plant J.* **2008**, *54*, 56–68. [\[CrossRef\]](#)
61. Gao, Z.; Johansen, E.; Eysers, S.; Thomas, C.L.; Noel Ellis, T.H.; Maule, A.J. The Potyvirus Recessive Resistance Gene, *sbm1*, Identifies a Novel Role for Translation Initiation Factor eIF4E in Cell-to-cell Trafficking. *Plant J.* **2004**, *40*, 376–385. [\[CrossRef\]](#)
62. Zhou, L.; Tian, Y.; Ren, L.; Yan, Z.; Jiang, J.; Shi, Q.; Geng, C.; Li, X. A Natural Substitution of a Conserved Amino Acid in eIF4E Confers Resistance against Multiple Potyviruses. *Mol. Plant Pathol.* **2024**, *25*, e13418. [\[CrossRef\]](#)
63. Duff-Farrier, C.R.A.; Candresse, T.; Bailey, A.M.; Boonham, N.; Foster, G.D. Evidence for Different, Host-Dependent Functioning of Rx against Both Wild-Type and Recombinant *Pepino mosaic virus*. *Mol. Plant Pathol.* **2016**, *17*, 120–126. [\[CrossRef\]](#)
64. Moury, B.; Janzac, B.; Ruellan, Y.; Simon, V.; Ben Khalifa, M.; Fakhfakh, H.; Fabre, F.; Palloix, A. Interaction Patterns between *Potato virus Y* and eIF4E-Mediated Recessive Resistance in the *Solanaceae*. *J. Virol.* **2014**, *88*, 9799–9807. [\[CrossRef\]](#)
65. Bruun-Rasmussen, M.; Møller, I.S.; Tulinius, G.; Hansen, J.K.R.; Lund, O.S.; Johansen, I.E. The Same Allele of Translation Initiation Factor 4E Mediates Resistance Against Two *Potyvirus* Spp. in *Pisum sativum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2007**, *20*, 1075–1082. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Lebaron, C.; Rosado, A.; Sauvage, C.; Gauffier, C.; German-Retana, S.; Moury, B.; Gallois, J.-L. A New *eIF4E1* Allele Characterized by RNAseq Data Mining is Associated with Resistance to *Potato virus Y* in Tomato Albeit with a Low Durability. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 3063–3072. [\[CrossRef\]](#)
67. Naderpour, M.; Lund, O.S.; Larsen, R.; Johansen, E. Potyviral Resistance Derived from Cultivars of *Phaseolus Vulgaris* Carrying *Bc-3* Is Associated with the Homozygotic Presence of a Mutated *eIF4E* allele. *Mol. Plant Pathol.* **2010**, *11*, 255–263. [\[CrossRef\]](#)
68. Sikosek, T.; Krobath, H.; Chan, H.S. Theoretical Insights into the Biophysics of Protein Bi-Stability and Evolutionary Switches. *PLoS Comput. Biol.* **2016**, *12*, e1004960. [\[CrossRef\]](#)
69. Trotter, D.; Wallin, S. Effects of Topology and Sequence in Protein Folding Linked via Conformational Fluctuations. *Biophys. J.* **2020**, *118*, 1370–1380. [\[CrossRef\]](#)
70. Schllessinger, A.; Rost, B. Protein Flexibility and Rigidity Predicted from Sequence. *Proteins* **2005**, *61*, 115–126. [\[CrossRef\]](#)
71. Schmid, S.; Hugel, T. Controlling Protein Function by Fine-Tuning Conformational Flexibility. *eLife* **2020**, *9*, e57180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Amaral, M.; Kokh, D.B.; Bomke, J.; Wegener, A.; Buchstaller, H.P.; Eggenweiler, H.M.; Matias, P.; Sirrenberg, C.; Wade, R.C.; Frech, M. Protein Conformational Flexibility Modulates Kinetics and Thermodynamics of Drug Binding. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 2276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Grüner, S.; Peter, D.; Weber, R.; Wohlbold, L.; Chung, M.-Y.; Weichenrieder, O.; Valkov, E.; Igreja, C.; Izaurralde, E. The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interface to Regulate Translation Initiation. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 467–479. [\[CrossRef\]](#)
74. Michon, T.; Estevez, Y.; Walter, J.; German-Retana, S.; Le Gall, O. The Potyviral Virus Genome-Linked Protein VPg Forms a Ternary Complex with the Eukaryotic Initiation Factors eIF4E and eIF4G and Reduces eIF4E Affinity for a mRNA Cap Analogue. *FEBS J.* **2006**, *273*, 1312–1322. [\[CrossRef\]](#)
75. Chung, L.; Bailey, D.; Leen, E.N.; Emmott, E.P.; Chaudhry, Y.; Roberts, L.O.; Curry, S.; Locker, N.; Goodfellow, I.G. Norovirus Translation Requires an Interaction between the C Terminus of the Genome-Linked Viral Protein VPg and Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 21738–21750. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Xu, M.; Xie, H.; Wu, J.; Xie, L.; Yang, J.; Chi, Y. Translation Initiation Factor eIF4E and eIFiso4E Are Both Required for *Peanut Stripe Virus* Infection in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 338. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Ala-Poikela, M.; Rajamäki, M.-L.; Valkonen, J.P.T. A Novel Interaction Network Used by Potyviruses in Virus–Host Interactions at the Protein Level. *Viruses* **2019**, *11*, 1158. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

78. Pairas, G.N.; Tsoungas, P.G. *H* -Bond: The Chemistry-Biology *H* -Bridge. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 4520–4532. [[CrossRef](#)]
79. Lobanov, M.Y.; Bogatyreva, N.S.; Galzitskaya, O.V. Radius of Gyration as an Indicator of Protein Structure Compactness. *Mol. Biol.* **2008**, *42*, 623–628. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.