



**Estudios moleculares de la relación hospedante-patógeno:
resistencia mediada por la cápside heteróloga y homóloga;
relación entre microRNAs, supresores de silenciamientos,
generación de síntomas y malformaciones.**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Autor: Lic. Ariel A. Bazzini.

Director de tesis: Dr. Sebastian Asurmendi.

Consejero de estudios: Dr. Esteban Hopp.

Tesis realizada en el Instituto de Biotecnología, INTA, Castelar.

Buenos Aires, 9 de Noviembre, 2007

Estudios moleculares de la relación hospedante-patógeno: resistencia mediada por la cápside heteróloga y homóloga; relación entre microRNAs, supresores de silenciamientos, generación de síntomas y malformaciones.

Resumen

Las enfermedades provocadas por virosis provocan grandes pérdidas de producción en las especies cultivables, es por esto que la búsqueda de resistencia genética es de alta prioridad para los mejoradores vegetales y de gran importancia para nuestro país.

El objetivo de este trabajo fue profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de la interacción hospedante-patógeno teniendo como meta futura el diseño de nuevas estrategias de control de virosis. Para ello se estudiaron distintos tipos de mecanismos involucrados en la defensa a virus mediados por transgenes.

El trabajo fue dividido en 5 capítulos. En el primero se demuestra que la expresión transgénica de la cápside (CP) del virus del mosaico del tabaco (TMV) en cultivos celulares o en plantas, reduce la tasa de replicación, la acumulación viral y el movimiento célula a célula del virus X de la papa (PVX). A esta clase de resistencia se la conoce como resistencia mediada por CP (CP-MR), y como en este caso interfiere con un virus distinto a la CP expresada se lo denominó CP-MR heteróloga. Utilizando genes recombinantes codificantes para CPs de TMV mutadas puntualmente que confieren características estructurales diferentes, que modifican por ejemplo los niveles de agregación, se demostró que al variar estas características se observan cambios de CP-MR heteróloga, en correspondencia con lo previamente observado en CP-MR homóloga. Estos resultados sugieren que, de esta manera, se puede mejorar artificialmente el sistema de protección. Los experimentos inversos, expresando la CP de PVX e infectando con TMV, demostraron los mismos efectos, sugiriendo que para ambos casos la CP-MR heteróloga tiene mecanismos similares. En esta tesis se plantean tres modelos para explicar el funcionamiento de la denominada CP-MR heteróloga.

El segundo capítulo demuestra que el silenciamiento génico no juega un rol importante en la CP-MR homóloga en el caso de PVX. No se detectó una disminución en el grado de resistencia a PVX en plantas expresando la CP de PVX tanto pre-infectadas con el virus Y de la papa (portador de un supresor fuerte de silenciamiento), como en plantas crecidas a bajas temperaturas (considerando que las bajas temperaturas inhiben el silenciamiento). Tampoco se registró una disminución en la acumulación del RNA mensajero de la CP transgénica de PVX en plantas inoculadas con PVX como posible resultado del silenciamiento inducido por el PVX. Estos datos en conjunto con los del primer capítulo son indicios importantes que permiten pensar que el desarrollo de una resistencia viral de amplio espectro basada en la expresión de CP es posible y por lo tanto, vale la pena desarrollarla.

En el tercer capítulo se muestra que la co-expresión de la proteína de movimiento (MP) y la CP de TMV en plantas transgénicas de tabaco producen serios problemas en el desarrollo. En estas plantas al igual que en plantas no transgénicas infectadas con TMV se detectó un aumento en la acumulación de microRNAs (miRNA), sugiriendo que esta alteración podía causar tanto los problemas morfológicos de las plantas transgénicas como los síntomas de las plantas infectadas. Asimismo, se evidenció mediante experimentos de complementación de fluorescencia (BiFC) que la MP y CP interactúan *in vivo* y a su vez que la co-expresión no suprime el silenciamiento génico local ni sistémico. Este es el primer trabajo donde se muestra que tanto proteínas virales como virus sin capacidad de suprimir silenciamiento alteran la ruta de los miRNAs apoyando la hipótesis de un importante rol para los miRNAs en la interacción virus-planta.

En el cuarto capítulo se evidencia que la actividad supresora del silenciamiento viral no es necesaria para alterar la acumulación de miRNAs durante la infección. También se mostró una correlación entre la capacidad de alterar la acumulación de miRNAs y la severidad de los síntomas. Este capítulo junto al anterior apoyan fuertemente la existencia de una relación entre algunos miRNAs y las alteraciones morfológicas similares a síntomas. A su vez, estos datos sugieren un rol de los miRNAs en la interacción entre el virus y las plantas. La información obtenida propone continuar estudiando estos fenómenos para poder desarrollar nuevas estrategias para conferir resistencia o controlar la sintomatología de las infecciones virales.

En el último capítulo se describe la utilización de un miRNA sintético. Se diseñó un miRNA a partir del esqueleto del miR164 de *Arabidopsis* para reconocer al RNA mensajero de la proteína verde fluorescente. Se confirmó su actividad sobre el gen deseado *in vivo* mostrando que los miRNAs pueden ser utilizados como herramienta molecular para regular negativamente la acumulación de un RNA mensajero determinado y así controlar su expresión.

Palabras claves: Resistencia mediada por cápside viral, PVX, TMV, microRNA, silenciamiento.

Molecular host-pathogen studies: heterologous and homologous coat protein mediated resistance; relationship between microRNAs, silencing suppressors, symptoms severity and plant development.

Abstract

Viral infections cause significant economic losses in crops; therefore, it is extremely important to look for new genetic ways to confer resistance in these crops.

The goal of this thesis is to understand the molecular bases of the host-pathogen interaction; specially focusing in the development of novel strategies to control viral infection. Hence, different mechanisms to confer viral resistance mediated by transgenes were studied.

The work was divided in five chapters. In the first one, it was demonstrated that transgenic expression of tobacco mosaic virus (TMV) coat protein (CP) in plant cells cultures as well as in plants reduces the replication and cell to cell movement of the potato virus X (PVX). This class of resistance is named coat protein mediated resistance (CP-MR). When the CP of one virus confers resistance to another virus it is called heterologous CP-MR. Using TMV CP mutants, with particular structural characteristics, we demonstrated that the level of aggregation is important to produce heterologous CP-MR, same results were previously reported for homologous CP-MR. Consequently, these results suggest that mutations in the CP can be used to enhance the heterologous protection. In addition, expression of PVX CP also interfered with TMV accumulation and cell to cell movement. So, both heterologous CP-MR seems to work in similar ways. Three different hypotheses are discussed to explain this process.

In the second chapter it is shown that post transcriptional gene silencing (PTGS) does not play an important role in the homologous PVX CP-MR. No PVX resistance reduction was detected in transgenic tobacco plants expressing the CP of PVX either previously infected with the potato virus Y (carries a strong PTGS suppressor) or infected at low temperatures (PTGS is inhibited by low temperatures). Moreover, no reduction of the transgenic PVX CP RNA messenger level was detected after infection with PVX. In conclusion, these results showed that the PTGS is not a significant player on the PVX CP-MR mechanism.

The third chapter demonstrates that co-expression of TMV movement protein (MP) and CP in transgenic plants cause developmental problems. In the co-expressing line and in TMV infected plants, microRNAs (miRNA) levels are increased, suggesting that the miRNAs alteration could be the cause of the developmental abnormalities in the transgenic plants and the symptoms of the infected plants. Evidence of interaction of the MP with the CP *in vivo* was shown by bimolecular fluorescent complementation (BiFC) assays. The MP and/or CP expression could not suppress the systemic or local PTGS. Therefore, this is the first study showing that viral proteins with no PTGS suppression activity alter miRNA accumulation. Thus, these results support the idea of an important role of the miRNA pathway in the virus- plant interaction.

Chapter four confirms that viral PTGS suppression activity is not essential to alter miRNAs accumulation during viral infections. Furthermore a correlation between miRNA alteration and symptoms severity was found, suggesting links between miRNA alteration and developmental changes or viral symptoms. In agreement with the previous chapter, these results also support the hypothesis that miRNAs is an active player of the host-pathogen interaction.

In the last chapter, a proof concept of artificial miRNA potential applications is described. miRNA164a from *Arabidopsis thaliana* was used as a backbone, to design an artificial miRNA, meant to recognize the mRNA of the green fluorescent protein (GFP). The correct miRNA processing and activity *in vivo* was confirmed by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana* leaves. The artificial miRNA reduced the accumulation of the GFP mRNA and consequently reduced the fluorescence. Hence, an artificial miRNA could be used to control the expression of candidate genes in different organisms.

Keywords: Coat protein mediated resistance, PVX, TMV, microRNA, silencing.

Esta tesis esta dedicada a quienes influyeron profundamente en mi vida y lamentablemente ya no están...

a la abuela Elena, der Opi, Penny y especialmente a mi abuela.

Agradecimientos

Nuevamente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) por ser gratuita, laica y abierta para todos. Por proporcionar un lugar para poder desarrollarse y crecer intelectualmente.

Al Instituto de biotecnología del INTA Castelar por darme el lugar para poder desarrollar este trabajo sin censura ni restricciones. Por apoyar no solo a la ciencia aplicada sino también a la ciencia básica bien pensada y realizada.

Al CONICET por financiar el doctorado.

A todos los que me ayudaron a diseñar y realizar experimentos, pero especialmente a un grupo de personas que me ayudaron hacer lo que mas me cuesta, a escribir en castellano. Gracias a Seba, Flor, Naty, Vane, Esteban y a la puntillosa del Vas por hacer leible y entendible esta tesis.

A todos los del Instituto de Biotecnología, me gustaría nombrar a todos pero no terminaría mas. A todos por lo que me ayudaron.

A todos los del lavadero, no solo porque siempre que voy consigo lo que necesito sino que también porque siempre me llevo una sonrisa.

A las chicas del TEM y chicos del Invernáculo porque cuidaron y generaron muchas de mis plantas. Porque gracias a uds pude largar ensayos grandes y trabajar a otra velocidad.

Esteban, por dejarnos hacer lo que queramos, sin limite, condiciones o censura. Por haber confiado en mi para viajar ni bien me recibí. Por saber dar un paso al costado para que otros crezcan. Y por todas las correcciones de la tesis y papers.

A Oscar y todo su grupo, por lo hecho juntos, por viajes y porque es un placer ir a su laboratorio.

A Fernando porque estas totalmente loco pero me encanta trabajar cerca tuyo.

A Ruth por escucharme y aconsejarme. Y a Norma por ayuda y buena predisposición. A Marisa por los cubanitos (ja ja) y por poner buena onda.

A Nilda y Laura Radonic por compartir antibióticos, medios y también ayuda a las chicas del TEM. A Laura Ramos porque su llegada al laboratorio nos quito un montón de trabajo, ojala que pueda entrar mas gente con tu excelente predisposición.

A Paula y Vero N un poco por todo, charlas, momentos, consejos y ayuda. Apu por ser tan honesta, trabajadora y profundamente responsable, ojala vuelvas a la mesada. A Caro por charlas, papers y tu generosa predisposición. A Talia por tus risas.

A Dani porque sos un personaje. Por tu forma de ser, hablar y pensar.

A Vero Lia, por tu ayuda con los arbolitos y por ser la persona mas monona que conozco.

Al "culeado" de Ramon por habernos metido juntos a hacer cosas de bioinformática con la mejor onda y sin ningún problema. Es un placer trabajar con vos.

Thank all Beachy's lab for help me so much. I specially want to thank Roger because you support me in all aspects; you listen to me and taught me so many things. I will never forget "Keep in focus Alex, keep in focus!!"

To my roommates: Dr Umesh Katpally, you are one of the noblest man I have ever known, thank for your spicy food, talks and jokes. Dr Maria Soto, you are easily one of the easiest going people I have ever met. You are extremely clever, funny and "chevere". Dr Tomas Moravec, you were like an old brother for me, you taught me so many things (of science and especially of life). Your goodness has no limit. Our stay in US wouldn't be so pleasant without you guys. Thanks so much.

A Anita por estar siempre predispuesta para ver mis resultados y discutirlos.

A Luis, por el *clu*, las charlas, por tu humor y simpleza.

A Carlos y Ceci R por ser una nueva motivación para seguir ampliando el grupo.

A Diego, Guille, Lu y Juli porque mi divierten mucho, por todos los almuerzos y horas juntos.

A Tere por su trabajo pero mucho mas por todo lo que ella significa para mi, por adoptarme desde el primer día y por tantas cosas que no se por donde empezar. A Valerita por tu capacidad y calidad de trabajo, por ser tan sincera y porque me da mucho gusto trabajar con vos.

A Ceci VR, por todo los momentos, solo con la gente que uno quiere mucho puede hablar, molestarse, hablar y volver a molestarse. Ya te lo dije mil veces pero gracias por ser tan sincera, abierta y por no poner jamás ninguna traba en el rumbo que yo tome.

A Del vas, por se la persona mas nañosa que conozco, por haberme corregido todo lo que escribo, porque es muy divertido trabajar con y cerca de vos. En muchas cosas sus un ejemplo para mi en esta rara carrera.

A Vane y Cori, por todos los viajes, charlas, mañanas y tardes juntos. Pero también por extraordinariamente productivas discusiones sobre RNA pequeños, bioinformática y de la vida.

A Naty, por todo. Por la confianza que me das en todo lo que hago, por los mil momentos vividos antes y durante esta tesis. Por escucharme, contarme y compartir mil cosas. Te quiero mucho y con vos (o de vos) me río mucho.

A Seba, por la confianza que me dio, por darme plena libertad para rumbear los experimentos y líneas sin restricciones pero con crítica altamente discutida y analizada. Porque en las buenas y malas el trabajo fue de los dos, lo cual hizo que esto no sea un grupo sino un equipo. Porque creo que generamos mucho mas de lo que imaginamos hace unos años pero eso no hizo que bajemos la calidad y cantidad de trabajo. Porque trabajas mucho, tomas muy en serio lo que hablamos, discutimos y hacemos. Y porque cuando necesito una mano con guantes (no solo una opinión) también estas. Porque

sabes felicitar, dar el brazo (o idea) a torcer, motivar y porque siempre piensas en que se puede mejorar. También gracias a vos, Ceci (una de las personas más sociables y sencillas que conozco), a Pancho y especialmente a Tomy por habernos hecho tan agradable nuestra estadía en St Louis.

A la flia del Viso por dejarme entrar a sus vidas, ayudarla a Flor en viajar a St. Louis y por todos los asados, comidas, partidos, etc.

A mis tíos y primos por todo lo vivido especialmente en la Quinta. A mis sobrinos por repetir la historia y porque me encanta jugar con uds. Espero que vengan mucho más.

A mis amigos más cercanos simplemente por ser mis amigos, por los partidos, viajes y por todos los momentos juntos.

Al Gordo porque pase lo que pase siempre estas. Si estas desde salita verde, siempre vas a estar. Sos otro hermano más.

Vielen Dank meiner Tante Doris und Onkel Paul die mir und meiner Familie immer nahe stehen. Vielen Dank Omi Vilma für die Deutschstunden, dein Essen und die Behandlung wie wenn ich ein Enkel mehr wäre. Vielen Dank Andy, meinen Vetter, Freund und Bruder der auch seine Grosseltern mit mir teilte als ich meine verloren hatte und für alles was ich erlebte.

A mi hermana Mari porque cada vez te siento más cerca.

A mi hermano Adri y Jessi por todo, por cada momento juntos y por cada momento lejos de casa.

A Caco y Titi porque son la mayor alegría que por ahora he tenido, porque son pura alegría. Porque no hay nada más lindo en el mundo que estar tirado en el suelo jugando con ustedes.

A mi viejo por su bondad, simpleza e inigualada predisposición. Por todos los viajes y cosas que estamos haciendo juntos, sin vos nada hubiese sido posible. A mi Muty por mimarme, cocinarme y compartir todo lo que compartimos. A los dos por ser un ejemplo de persona y pareja y por haberme dado absolutamente todo.

Finalmente a la persona que más amo en el mundo, la que convive conmigo todos los días. La que dejó todo por venir a St Louis conmigo con un libro de cocina bajo el brazo, un libro de cocina!!!! Estoy enamorado de vos y no podría imaginar mi vida sin vos.

Muchas gracias a todos.

Premio otorgado a partes del trabajo

Premio Fundación Pérez Compañac, versión 2006 al trabajo científico de investigación "Estudio de la interacción planta-virus: efecto producido por las infecciones virales y por la expresión de proteínas virales sobre los miRNAs en plantas". Otorgado al Lic. Ariel A. Bazzini, al Dr. Esteban Hopp y Dr. Sebastián Asurmendi (Director del proyecto).

Publicaciones incluidas en la tesis

- **Bazzini AA**, Asurmendi S, Hopp HE, Beachy RN. Tobacco mosaic virus (TMV) and potato virus X (PVX) coat proteins confer heterologous interference to PVX and TMV infection, respectively. *Journal of General Virology*. 2006 Apr;87(Pt 4): 1005-12.

- **Bazzini AA**, Hopp HE, Beachy RN, and Asurmendi S. Posttranscriptional Gene Silencing Does Not Play a Significant Role in Potato virus X Coat Protein Mediated Resistance. *Phytopathology*. 2006 Nov 96 (No 11): 1175-8.

- **Bazzini AA**, Mongelli VC, Hopp HE, del Vas M and Asurmendi S. A practical approach to the understanding and teaching of RNA silencing in plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2007 Apr. 15. Vol. 10 (No 2).

- **Bazzini AA**, Hopp HE, Beachy RN, and Asurmendi S. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci (PNAS) U S A*. 2007 Jul 5; 007 Jul 17;104(29):12157-62.

- **Bazzini AA**, Hopp HE, Beachy RN, and Asurmendi S. miRNA alteration: a common feature in tobamovirus infection, (En preparación)

Publicaciones no incluidas pero desarrolladas en paralelo a la tesis doctoral

-Bendahmane M, Chen I, Asurmendi S, **Bazzini AA**, Szecsi J and Beachy RN. CP-MR to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by coat protein. *Virology* Vol. 2007 Vol. 366 no 107-116.

-Almasia NI, **Bazzini AA**, Hopp HE y Vazquez Rovere C. Overexpression of snakin-1 gene in transgenic potato plants confers protection against fungal pathogen *Rhizoctonia solani* and bacterial pathogen *Erwinia carotovora*. (Enviado a *Molecular Plant Pathology*).

INDICE

Abreviaturas	5
Acrónimos de virus.....	6
Introducción	7
1) Importancia de los virus vegetales para la agricultura.....	7
2) Biología de los virus de plantas	8
<i>Familia Tobamoviridae</i>	9
<i>Familia Potexviridae</i>	10
<i>Familia Potyviridae</i>	11
3) Mecanismos basados en Ingeniería Genética para conferir resistencia artificial a virus	12
Mecanismos de resistencia mediada por CP	13
i) Uso de cápsides mutantes	16
ii) Resistencia heteróloga mediada por proteínas	17
b) Resistencia mediada por RNA	19
4) Silenciamiento génico.....	20
a) Silenciamiento génico transcripcional	20
b) Silenciamiento génico post-transcripcional	21
i) Evidencias moleculares del PTGS	22
ii) Señal móvil de PTGS.....	23
iii) PTGS e infecciones virales. Proteínas supresoras del PTGS	24
c) Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)	24
5) El mundo de los miRNAs.....	26
a) Los genes miR.....	26
b) Clasificación de los miRNAs.	27
c) Análisis y predicción de miRNAs utilizando bioinformática.....	29
d) Biogénesis de los miRNAs	30
i) Transcripción.....	30
ii) Maduración.....	31
iii) RISC.....	31
e) Mecanismo de acción.....	32
i) Escisión de mensajeros mediada por miRNA.....	33
ii) Inhibición de la traducción	33

f) Predicción de genes blanco de miRNAs	34
g) Rol regulatorio de los miRNAs.....	35
i) Efecto de las proteínas supresoras de PTGS sobre los miRNAs	36
Materiales y métodos	39
Material vegetal utilizado.....	39
Mantenimiento cultivos celulares	39
Preparación de protoplastos a partir de células BY-2.....	39
Preparación de protoplastos de hojas	40
Extracción de RNAs de bajo peso molecular e hibridación	41
Geles de RNA de bajo peso molecular	41
<i>Preparación de las muestra de sRNA para cargar el gel</i>	<i>41</i>
<i>Transferencia de los sRNA a membrana.....</i>	<i>41</i>
<i>Pre-hibridación, marcado, e hibridación</i>	<i>41</i>
<i>Marcación de la sonda radioactiva</i>	<i>42</i>
<i>Solución de lavado de membranas de sRNA.....</i>	<i>42</i>
Infecciones	42
Transcripción <i>in vitro</i>	42
Bombardeo	42
Cuantificación viral	43
Acumulación de la proteína viral	43
Acumulación de RNAs virales	43
Cuantificación de mRNA transgénico de la CP de PVX.....	44
Análisis de fenotipo.....	44
Experimentos de BIFC	44
Estudios de PTGS	45
Ensayos de análisis de supresión de PTGS por infecciones virales	45
Ensayo de supresión de PTGS sistémico.....	45
Contrucción del miR artificial para GFP	45
Objetivos	47
Resultados.....	49
1) Resistencia heteróloga mediada por expresión de CPs.	49

a) Efectos de la CP de TMV sobre la infección viral de PVX.....	50
<i>i) Las CPs transgénicas de TMV interfieren en la replicación de PVX.....</i>	<i>50</i>
<i>ii) Las CPs transgénicas de TMV retrasan el movimiento célula a célula del virus PVX.....</i>	<i>52</i>
<i>iii) Análisis de la acumulación de CP de TMV en las líneas transgénicas utilizadas</i>	<i>55</i>
b) Efectos de la CP de PVX sobre la infección con el virus TMV	56
<i>I) La CP transgénica de PVX interfiere con la infección de TMV.....</i>	<i>56</i>
2) El silenciamiento post-transcripcional no juega un rol importante en la resistencia mediada por CP de PVX.....	60
a) Estudio de la CP-MR de PVX bajo condiciones de supresión del PTGS	61
<i>i) Supresión del PTGS mediante infección con PVY.....</i>	<i>61</i>
<i>ii) Supresión del PTGS mediante bajas temperaturas</i>	<i>63</i>
<i>iii) Las infecciones con el virus PVX no reducen la acumulación del mRNA de la CP transgénica de PVX... </i>	<i>65</i>
3) La co-expresión transgénica de la MP y la CP de TMV altera la acumulación de miRNAs y el desarrollo de la planta	67
a) Caracterización molecular de las plantas transgénicas para MP y CP^{T42W} de TMV	67
b) La co-expresión de MP y CP^{T42W} de TMV altera el desarrollo de la planta	68
<i>i) Caracterización fenotípica de las plantas de la línea MPxCP^{T42W}</i>	<i>69</i>
<i>ii) Determinación de la participación de la MP y la CP^{T42W} en la generación de malformaciones mediante injertos.....</i>	<i>71</i>
c) La acumulación de miRNAs se encuentra alterada en la línea MPxCP^{T42W}	72
d) Interacción <i>in vivo</i> de la MP con CP^{T42W}	74
<i>i) Descripción de las construcciones para realizar BiFC</i>	<i>75</i>
<i>ii) Ensayos de BiFC.....</i>	<i>75</i>
e) La MP y CP del TMV no suprimen el PTGS.....	77
<i>i) Silenciamiento inducido por un transgén.....</i>	<i>77</i>
<i>ii) Silenciamiento sistémico</i>	<i>78</i>
f) La co-expresión de MP y CP^{T42W} de TMV reduce la aparición de síntomas en infecciones con TMV	80
4) Las infecciones virales alteran la acumulación de los miRNAs y este efecto no correlaciona con su capacidad supresora del silenciamiento.....	82
a) Elección del panel de virus a utilizar en las infecciones virales.....	82
b) Evaluación del nivel de supresión del PTGS de los virus utilizados.....	84
c) Análisis de la alteración de la acumulación de los miRNAs en plantas de <i>N. tabacum</i> infectadas con distintos virus.....	85
5) Utilización de miRNAs sintéticos como herramienta biotecnológica.....	88
a) Diseño de un miRNA sintético contra GFP.....	88
b) Determinación de la actividad del miRNA sintético	89

Conclusiones	93
Discusión	95
1) Resistencia heteróloga mediada por expresión de CPs	95
2) El silenciamiento post transcripcional no juega un rol importante en la resistencia mediada por CP de PVX.....	99
3) La relación entre miRNAs y las infecciones virales.....	100
Referencias	111

Abreviaturas

35S = promotor del transcripto de 35S del virus del mosaico del coliflor.
aa = aminoácidos.
Ago = proteínas de la familia de las Argonautas.
BiFC = complementación de la fluorescencia biomolecular (“Biomolecular fluorescence complementation”).
BrEt = Bromuro de Etidio.
BY-2 = Brigh Yellow -2, línea celular de tabaco.
cDNA = ácido desoxirribonucleico copia.
CP = proteína de cápside viral.
CP-MR = resistencia mediada por cápside viral.
d.p.i.= días luego de la infección (“days post-infection”).
DNA = ácido desoxirribonucleico.
dsRNA = doble hebra de ácido desoxirribonucleico.
ELISA = “enzyme-linked immunosorbent assay”.
Fig.= Figura.
GFP = proteína verde fluorescente (green fluorescent protein).
GUS = gen de la enzima β -glucuronidasa.
h.p.i . = horas despues de la infección (“hours post-infection”).
HC-Pro = (“helper component proteinase”).
Hrs = Horas.
kDa = kilo Dalton.
LL = Lesiones locales.
Min = minutos.
miRNA o miR = micro ácido ribonucleico interferente (micro RiboNucleic Acid).
MP = proteína de movimiento viral.
mRNA = ácido ribonucleico mensajero.
NT = no transgénica.
nt = nucleótidos.
OD = densidad óptica.
p19 = proteína p19 del virus del achaparramiento del tomate.
p25 = proteína p25 del virus X de la papa.
pb = pares de bases.
PCR = reacción en cadena de la polimerasa.
PDS = gen de la fitoeno desaturasa.
POL = RNA polimerasa viral.
PR = proteína relacionada a la patogénesis (“pathogenesis related protein”).
PTGS = silenciamiento génico post transcripcional (“post-transcriptional gene silencing”).
RdRp = polimerasa celular dependientes de ácido ribonucleico.
RH = respuesta hipersensible.
RISC = complejo de silenciamiento inducido por RNA (“RNA-induced silencing complex”).
RNA = acido ribonucleico.
RT-PCR = retro transcriptasa – reacción en cadena de la polimerasa.
SAR = resistencia sistémica adquirida.
siRNA = ácido ribonucleico pequeño interferentes (“small interfering RNA”).
sRNA = pequeño ácido ribonucleico (“small RNA”).
ssRNA = simple hebra de ácido ribonucleico (“single strand”).
target = gen blanco.
TGB = bloque triple de genes (“triple gene block”).
TGS = silenciamiento génico transcripcional (“transcriptional gene silencing”).
VIGS = silenciamiento génico inducido por virus (“virus induce silencing”).
VLPs = particulas similares a virus (“virus like particles”).
VPg = (genome-linked viral protein).
VRC = complejo de replicación viral (“virus replication complex”).
YFP = proteína amarilla fluorescente (“yellow fluorescent protein”).
wt = salvaje (“wild type”).

Acrónimos de virus

ACLSV = virus de la mancha clorótica de la hoja de manzana (*Apple chlorotic leaf spot virus*).

AIMV = virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*).

CaMV = virus del mosaico del coliflor (*Cauliflower mosaic virus*).

CMV = virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*).

CPMV = virus del mosaico del caupí (*Cowpea mosaic virus*).

CTV = virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*).

CymRSV = virus de la mancha anillada de *Cymbidium* (*Cymbidium ringspot virus*).

LMV = virus del mosaico de la lechuga (*Lettuce mosaic virus*).

MRCV = virus del Mal de Río Cuarto (*Mal de Río Cuarto virus*).

ORSV = virus de la mancha anillada del *Odontoglossum* (*Odontoglossum ringspot virus*).

PCV = virus del apelmasamiento del maní (*Peanut clump virus*).

PLRV = virus del enrollamiento de la hoja de papa (*Potato leafroll virus*).

PRSV = virus de la mancha anular de la papaya (*Papaya ringspot virus*).

PVX = virus X de la papa (*Potato virus X*).

PVY = virus Y de la papa (*Potato virus Y*).

RMV = virus del mosaico del llantén (*Ribgrass mosaic virus*).

ShMV = virus del mosaico de la crotalaria (*Sunn-hemp mosaic virus*).

TBSV = virus del achaparramiento del tomate (*Tomato bushy stunt virus*).

TEV = virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*).

TMGMV = virus del mosaico verde atenuado del tabaco (*Tobacco mild green mosaic virus*).

TMV = virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*).

ToMV = virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*).

TRV = virus de la crepitación del tabaco (*Tobacco rattle virus*).

TSV = virus rayado del tabaco (*Tobacco streak virus*).

TuMV = virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*).

Introducción

1) Importancia de los virus vegetales para la agricultura

Las enfermedades provocadas por agentes fitopatógenos provocan grandes pérdidas en la producción de las especies cultivables. Es por esto que la búsqueda de resistencia genética es una prioridad para los mejoradores vegetales. Este tipo de resistencia es de especial importancia en el caso de las virosis debido a que la utilización de otro tipo de metodologías es complicada y en la mayoría de los casos se basa en el desarrollo de técnicas de manejo del cultivo preventivas que controlan, pero no impiden, la transmisión viral.

Dos ejemplos de cultivos muy representativos en nuestro país que se ven afectados por virosis, son la papa y el maíz. En el caso de la papa, en Argentina el consumo anual *per capita* es uno de los más altos de Latinoamérica (61,2 kg). Para su cultivo, los productores propagan al tubérculo de manera agámica. Este procedimiento trae aparejada la acumulación de numerosos patógenos (especialmente virus) en la papa que es utilizada como semilla. Por lo tanto, esta situación hace que para alcanzar altos niveles de rendimiento, el productor deba renovar permanentemente un porcentaje determinado de la papa a sembrar (alrededor del 15-20%) con la denominada papa-semilla. La cual, si bien es más costosa se encuentra libre de virus. Los costos de la papa-semilla involucran alrededor del 25% de los costos de producción en Argentina y llegan a ser del 40% en otros países como Brasil. Los principales virus que atacan a los cultivares de papa son el virus Y (PVY), X (PVX) y del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV) y llegan a causar grandes pérdidas.

La producción de maíz se ve afectada, entre otros, por el virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) (ver Fig. 1). Las pérdidas generadas por esta virosis pueden ascender hasta el 30% de la producción total como ocurrió en la campaña 1996/1997 (Lenardón y col. 1998) y probablemente ocurra en la campaña 2006/2007 (todavía no se cuantificaron los años, pero ya se sabe que el ataque de este año fue el mayor de la década). Además de las pérdidas directas, la enfermedad tiene consecuencias indirectas derivadas de su control. Si bien existen híbridos de maíz con mayor tolerancia al virus, estos no son los que poseen mayor potencial de rendimiento. Se estima que esta reducción en el rendimiento oscila entre 5 y el 15% (según el híbrido). Siendo Argentina el segundo exportador mundial de maíz, el impacto económico de la enfermedad es muy importante.



Figura 1. Síntomas del MRCV. Se observa en las hileras centrales plantas de maíz con grado severo de enanismo. (Tomado del informe PROMARC, IFFIVE-INTA).

Las plantas presentan un complejo mecanismo de defensa coordinado frente al ataque de patógenos. Este incluye, a nivel de la célula atacada por el patógeno, la producción de especies reactivas de oxígeno, la acumulación de ácido salicílico y ácido benzoico, la fortificación de la pared celular, un aumento de la actividad lipoxigenasa, la producción de compuestos antimicrobianos (fitoalexinas) y de proteínas relacionadas con la patogénesis: las proteínas PR (“*Pathogenesis Related proteins*”). Algunas de estas respuestas son conocidas como respuesta hipersensible (RH) la cual culmina con la muerte celular programada de las células atacadas, formando lesiones necróticas, que restringen al organismo patogénico al lugar de entrada. El establecimiento de este primer paso en el sistema de defensa vegetal induce finalmente la activación de un estado de alerta que involucra a la planta entera denominado resistencia sistémica adquirida (SAR) (Hammond-Kosack y Jones 1996). Si bien el desarrollo (duración e intensidad) de la RH y la posterior SAR pueden variar según las características particulares de cada infección, ninguno de estos procesos es específico para un patógeno.

2) Biología de los virus de plantas

Desde 1990 (Milne 1990) la clasificación de los distintos grupos virales se basa en diferentes criterios: 1) la naturaleza del ácido nucleico que compone el genoma del virus (DNA o RNA), 2) el tipo de genoma (cadena simple o doble / polaridad positiva o negativa), 3) el número de moléculas que conforman el genoma (fragmentado ó no fragmentado), 4) la morfología de las partículas virales (envueltas, esféricas, geminadas, baciloformes, en forma de bastón, filamentosas, etc), 5) el mecanismo de transmisión (mecánica, por semillas, por polen o mediada por un organismo vector), y 6) el efecto citopático que produce (inclusiones, asociación con cloroplastos, núcleos, floema, etc), entre otras características.

En esta Tesis se trabajó con virus pertenecientes a tres familias: tobamoviridae, potexviridae y potyviridae. Todos ellos son virus a RNA de cadena simple (ssRNA, "single strand") positiva y no fragmentados. Es decir, son virus cuyo genoma está conformado por una única hebra de RNA que puede ser traducida directamente en la totalidad de las proteínas virales. A continuación se reseñarán brevemente algunas de las características de los virus pertenecientes a estas familias.

Familia Tobamoviridae

Los virus de esta familia poseen un genoma ssRNA con partículas rígidas, alargadas, de 300 nm x 12 nm de diámetro (Fig. 2A). La rigidez de las partículas permitió su cristalización y el posterior esclarecimiento de su estructura tridimensional mediante el uso de difracción de rayos X (Fig. 2B y C) (Namba y col. 1989). Los tobamovirus se transmiten fácilmente por inoculación mecánica. No se conocen insectos vectores y solo eventualmente se pueden llegar a transmitir por semilla. El miembro tipo de esta familia es el virus del mosaico del tabaco (TMV). El genoma del TMV es de 6395 nucleótidos y codifica para un total de 4 proteínas: dos de ellas (126 kDa y 183 kDa) forman la replicasa viral, y las otras dos son la proteína de movimiento (MP) (30 kDa) y la de la cápside (CP) (17,5 kDa). Las proteínas de 126 y 183 kDa son traducidas a partir del RNA genómico. Se conocen dos RNAs sub-genómicos a partir de los cuales se traducen por un lado la MP y por otro la CP (Ver Fig. 3) (van Regenmortel y col. 2000).

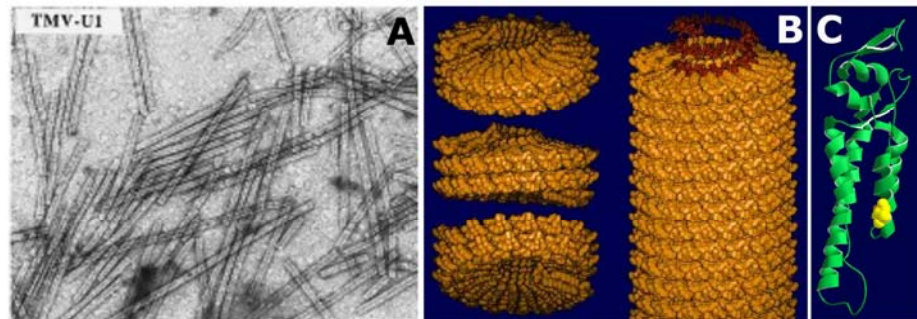


Figura 2. (A) Viriones de TMV observados al microscopio electrónico. (B) Reconstrucción tridimensional del virión a partir de la CP cristalizada, en rojo se esquematiza al ARN viral. Sobre el margen izquierdo de la parte B se muestran 3 discos helicoidales compuestos por 16,3 proteínas de la CP por cada vuelta. (C) Plegamiento tridimensional de la proteína de la CP de TMV, en amarillo se encuentra el aminoácido 42 marcado.

El ciclo viral comienza con la entrada del virus a la célula vegetal y el posterior desensamblado del virión en el citoplasma. A partir del ARN genómico se traducen las proteínas que componen la replicasa viral que se encarga de sintetizar la hebra complementaria (negativa) del genoma viral. Utilizando esta hebra como molde se transcriben los RNAs sub-genómicos. Su posterior traducción produce en primer lugar a la MP y luego a la CP (Ver Fig. 3). Si bien a fines didácticos el ciclo viral puede dividirse en etapas discretas, en realidad es un proceso dinámico y continuo.

Finalmente, el virus puede trasladarse desde la célula de ingreso a la célula contigua y así sucesivamente hasta alcanzar el sistema vascular y generar una infección sistémica. Este proceso puede demorar entre 5 a 10 días; en paralelo se acumula como virión (cadena positiva de ssRNA envuelta en CP) en cada una de las células infectadas. Los miembros de la familia *Tobamoviridae* son capaces de infectar a la mayoría de las solanáceas (tomate, papa, tabaco, etc), y algunos miembros pueden infectar *Arabidopsis thaliana* (crucífera) (van Regenmortel y col. 2000).

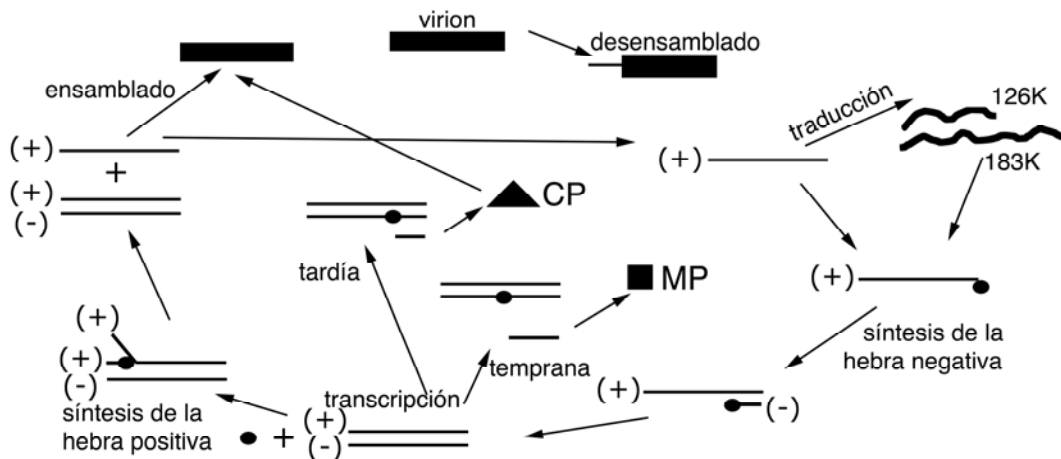


Figura 3. Esquema del ciclo viral del TMV en el citoplasma de una célula vegetal comenzando con el desensamblado viral y finalizando con la conformación del virión. El esquema está basado en el previamente mostrado en el libro (Fernandez Valiela 1995). K= kDa.

Familia Potexviridae

Los Potexvirus poseen un genoma ssRNA, producen partículas flexibles (ver Fig. 4) de 470-580 nm de largo. Se transmiten fácilmente por contacto; no se transmiten por semilla y no se les conoce vector biológico alguno. El virus X de la papa (PVX) es el miembro tipo. El genoma de PVX codifica para 5 proteínas: una replicasa, 3 proteínas involucradas en movimiento (llamadas proteínas del triple bloque o TGB) y la CP que es además responsable del ensamblado y del movimiento célula a célula (Fig. 4). Existen dos RNAs sub-genómicos. De uno de ellos se traduce mayoritariamente el TGB y ocasionalmente la CP (Fig. 4) y del otro se traduce la CP (Fig. 4). El ciclo viral es muy parecido al de TMV ya descrito. De manera resumida: el virus ingresa, se desensambla, la replicasa se traduce a partir del genoma, el RNA viral es replicado y luego se transcriben los RNAs sub-genómicos. En este virus también se traduce primero el TGB y finalmente la CP. Los potexvirus pueden infectar a la mayoría de las solanáceas (van Regenmortel y col. 2000).

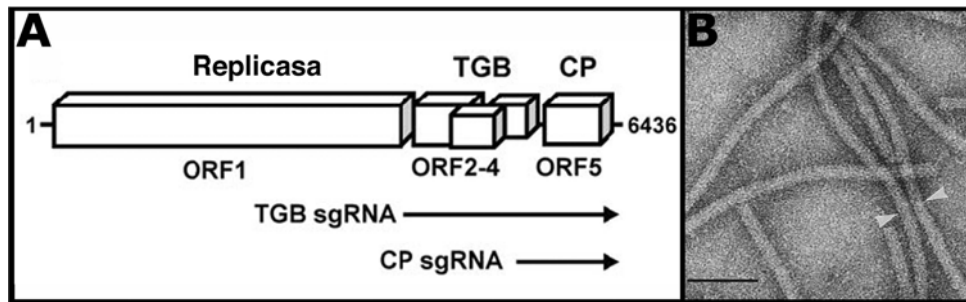


Figura 4. (A) Esquema del genoma del PVX, las cajas ilustran las 5 proteínas virales (ORF). sgRNA indica RNA subgenómico (Kim y col. 2002). (B) Imagen al microscopio electrónico de viriones de PVX en células del mesofilo infectadas (Barra= 50nm) (Cruz y col. 1996).

Familia Potyviridae

Es el grupo más numeroso de virus vegetales, representa casi el 40% de todos los virus vegetales conocidos. Poseen un genoma ssRNA con partículas alargadas y flexibles, de 680-900 nm x 12 nm de diámetro. Se transmiten por áfidos en forma no persistente, por inoculación mecánica y en algunos casos por semilla. El miembro tipo es el virus Y de la papa (PVY). El genoma de los potyvirus posee comúnmente, un único marco abierto de lectura de unos 9160 nt que codifica para una poliproteína de 340-368 kDa (Fig. 5). El marco abierto de lectura es transcrito y traducido en un único precursor polipeptídico, el cual es procesado por 3 proteasas diferentes (NIa, HC-PRO (“Helper component proteinase”) y P1, todas ellas proteínas virales) en forma co- y post-traducciona, para dar lugar a ocho o más productos maduros. Los productos finales (en orden, y a partir del codificado en extremo amino terminal) son:

- La proteína P1, cuyo dominio C-terminal tiene actividad de proteasa y es responsable de su propia escisión en *cis* (Verchot y col. 1991).
- La proteína componente auxiliar, involucrada en la transmisión mediada por áfidos, cuyo dominio C-terminal tiene actividad proteolítica y es responsable de clivarse autocatalíticamente a nivel de su extremo 3' (Carrington y col. 1989).
- La proteína P3, cuya función no ha podido ser dilucidada hasta el momento debido a la escasa similitud existente inclusive entre distintos potyvirus. En base a la posición que ocupa, y por analogía con una proteína del CPMV (“*Cowpea mosaic virus*”), se ha sugerido que estaría involucrada en la regulación del procesamiento de la poliproteína viral (Riechmann y col. 1992).
- Un péptido de 6 kDa (6K1, ausente en TEV (virus del grabado del tabaco), presumiblemente involucrado en la replicación del genoma viral por comparación con el péptido 2B de los picornavirus (Lain y col. 1989).
- La proteína CI, que forma cuerpos de inclusión citoplasmáticos en forma de molinete y tiene actividad de ARN helicasa y ATPasa (Riechmann y col. 1992).
- La proteína de inclusión nuclear “a” (NIa) con función de proteasa.

- Un segundo péptido de 6 kDa (6K2), anclaría a NIa a la membrana nuclear previo al procesamiento del dipéptido 6K2/Nia (Restrepo-Hartwig y Carrington 1992).
- La proteína de inclusión nuclear "b" (NIb), con función de RNA polimerasa-RNA dependiente.
- La CP viral, la cual además de su rol en el ensamblaje y estructura del virión, está involucrada en el movimiento de célula a célula (Dolja y col. 1995), la dispersión sistémica del virus en la planta (Dolja y col. 1994) y en la transmisión mediada por áfidos.
- La organización general del genoma de los potyvirus (en particular, el de TEV) se muestra en la figura a continuación.

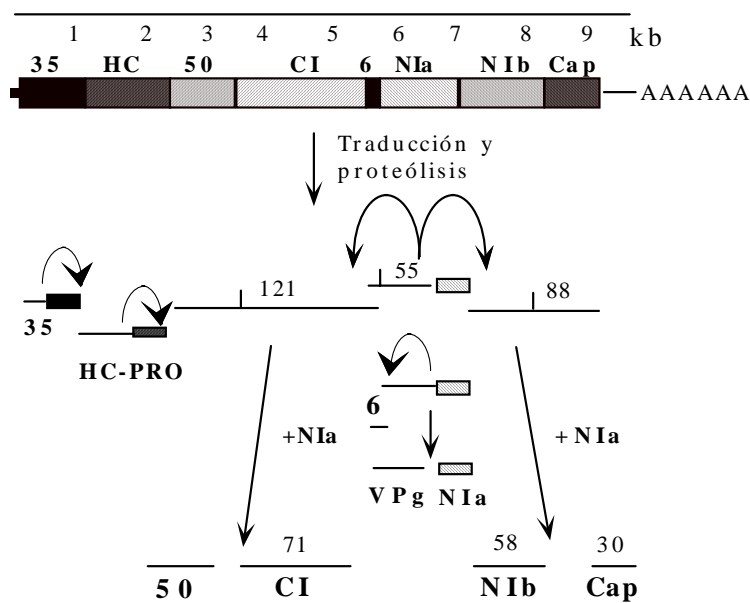


Figura 5. Organización genómica de un potyvirus. Las proteasas P1 y HC-Pro catalizan la proteólisis en sus respectivos extremos C-terminal únicamente. NIa cataliza el procesamiento proteolítico de la poliproteína en 5 posiciones diferentes (Carrington y Dougherty 1987; Carrington y Dougherty 1988) y, además, funciona como VPg ("genome-linked viral protein"). Las flechas indican los puntos de corte de las diferentes proteasas.

3) Mecanismos basados en Ingeniería Genética para conferir resistencia artificial a virus

Los virus causan grandes pérdidas anuales en los cultivos de todo el mundo, por lo que se han diseñado diferentes estrategias (convencionales y basadas en Ingeniería Genética) para reducir esas pérdidas. A los fines de esta Tesis, se explicarán únicamente las estrategias desarrolladas utilizando plantas transgénicas y "resistencia derivada del patógeno".

La prevención del desarrollo de enfermedades virales mediada por el patógeno fue propuesta por vez primera a comienzos de siglo, cuando se demostró que las plantas de tabaco podían ser

protegidas frente a la infección con una cepa severa del virus del mosaico del tabaco (TMV) si, previamente, se las había inoculado con una cepa menos virulenta del mismo virus. En 1985, Sanford y Johnston propusieron que la expresión de ciertos genes del patógeno en un hospedante alteraría el balance normal de los componentes virales, interfiriendo, por lo tanto, con la replicación del virus.

La estrategia de control de las virosis denominada “resistencia derivada del patógeno”, se basa en la utilización de plantas transgénicas expresando secuencias genómicas del propio patógeno que se desea controlar (por ej un virus), las cuales reducen la acumulación y/o multiplicación viral. Principalmente se utilizaron dos formas de conferir resistencia derivada del patógeno exitosamente. La primera fue la expresión de la CP viral y fue desarrollada por el grupo de Roger Beachy en 1986 para el control del virus del mosaico de tabaco.

Posteriormente, se encontró que aun expresando versiones no traducidas de la CP o de otras secuencias virales se podía llegar a conferir resistencia (Powell y col. 1989; Braun y Hemenway 1992). Este mecanismo fue llamado resistencia mediada por RNA, el cual era consecuencia del silenciamiento génico. El silenciamiento génico se explicará más adelante.

Mecanismos de resistencia mediada por CP

El primer ejemplo de “resistencia derivada del patógeno” fue la obtención de plantas de tabaco expresando un transgén codificante para la CP del TMV, (trabajo publicado en *Science* por el Dr Roger N. Beachy a mediados de los 80 (Abel y col. 1986) (Fig. 6). Este fenómeno fue llamado resistencia mediada por cápside (CP-MR, por sus siglas en inglés) (Anderson 1989). La resistencia mediada por la CP fue utilizada para numerosos virus como por ejemplo: TMV; virus mosaico de la alfalfa (AlMV) (Loesch-Fries 1987; van Dun y col. 1988a; Anderson 1989), virus mosaico del pepino (CMV), (Cuzzo 1988), PVX, (Hemenway 1988; Spillane y col. 1997), virus rayado del tabaco (TSV) (van Dun y col. 1988a) entre otros. Sin embargo, se demostró luego que las bases moleculares de la resistencia subyacentes en cada caso eran distintas.

Las plantas expresando la CP de TMV son extremadamente resistentes a infecciones con TMV (virion) pero susceptibles a infecciones con RNA de TMV (virus desnudo) (Abel y col. 1986; Anderson 1989; Powell y col. 1989). Desde entonces se publicaron decenas de trabajos similares con otros virus, e incluso llegaron al mercado algunas plantas transgénicas (calabaza, papaya, etc.) resistentes a virus basadas en esta estrategia. La resistencia mediada por expresión de la cápside es generalmente de amplio espectro entre miembros del mismo grupo de virus (Nejidat y Beachy 1990). Sin embargo, el nivel de resistencia puede variar desde inmunidad hasta un retardo en el desarrollo de los síntomas y la resistencia frente a virus relacionados no necesariamente ocurre en todos los casos (Anderson y col. 1989).

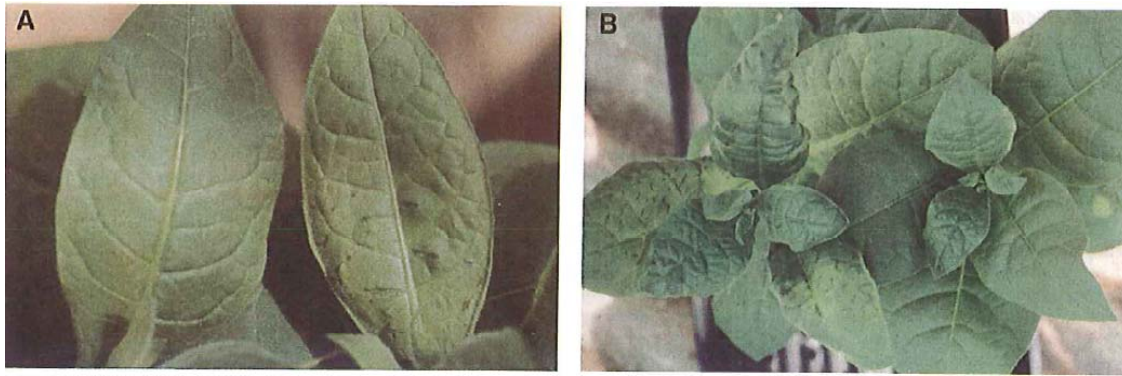


Figura 6. (A) Hoja de una planta de tabaco transgénica (izquierda) para la CP de TMV que no muestra síntomas de TMV 10 días luego de la infección. La hoja control (transgénica para un vector vacío) (derecha) presenta los típicos síntomas de TMV. (B) Plantas transgénicas para la CP de TMV (derecha) y para el vector vacío (izquierda) a los 14 días post infección con TMV, las plantas transgénicas para la CP de TMV no manifestaron síntomas (Abel y col. 1986).

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la resistencia mediada por CP en los Tobamovirus (Beachy 1999; Bendahmane y Beachy 1999; Culver 2002). A pesar que para el caso de TMV se cree que existe un mecanismo predominante, se piensa que varios mecanismos actúan de manera sinérgica y en diferentes etapas de la infección viral. Resumidamente se detallarán cada una de las hipótesis y datos más revelantes sobre el modo de acción de la CP-MR de TMV. Es preciso entender que las hipótesis no son contrastantes ni mutuamente excluyentes.

a) La principal hipótesis que explica el mecanismo de resistencia en TMV involucra la interferencia en la desencapsidación del genoma viral, lo cual se produce en las etapas más tempranas del ciclo de multiplicación viral. Los resultados que apoyan este mecanismo son:

i) Una clara correlación entre el nivel de expresión de la CP y la resistencia conferida (Powell y col. 1989; Bendahmane y col. 1997)).

ii) La resistencia es dependiente del inóculo, es decir, a mayor inóculo menor resistencia (Powell y col. 1989; Bendahmane y col. 1997).

iii) En el caso de TMV, AIMV y TSV la resistencia puede ser revertida por inoculación con RNA desnudo (no encapsidado) (Abel y col. 1986).

iv) La resistencia se correlaciona positivamente con la capacidad de la CP para autoensamblarse (Bendahmane y col. 1997; Bendahmane y col. 2007) y datos recientes la correlacionan también con una forma particular de agregación (Lu y col. 1998; Asurmendi y col. 2007).

b) Una segunda hipótesis explora la posibilidad de que la CP transgénica interactúe/bloquee un factor del hospedante o receptor que esté involucrado en la desencapsidación del virus. Este

factor/receptor puede también ser esencial para el establecimiento de factorías de replicación viral necesarias para el normal desenvolvimiento de la infección viral (Asurmendi y col. 2004). De acuerdo con la correlación entre la habilidad de agregación de la CP y la resistencia, se publicó en el caso de la interacción de la CP de TMV y el gen de resistencia N', que la estructura cuaternaria de la CP efectora puede alterar la respuesta de este tipo de resistencia (Culver y col. 1994).

c) Recientemente se propuso la existencia de un efecto regulador no esencial de la CP de TMV en la replicación del mismo. Por lo tanto la pre-existencia de la CP a la infección viral puede afectar la replicación viral actuando fuera del marco temporal normal. Esto sugiere que la interacción de la CP con el RNA del virus puede afectar la transcripción o traducción (Bendahmane y col. 2002; Asurmendi y col. 2004). Nuevamente, los datos sugieren que los diferentes estados de agregación de la CP estarían involucrados en este efecto (Asurmendi y col. 2007; Bendahmane y col. 2007). Este tipo de efecto no había sido descrito para TMV, pero existen evidencias en otros virus como en el caso de AIMV (Bol 1999).

Como ya se ha mencionado, la resistencia mediada por CP para otros virus no puede ser explicada de igual forma que la del TMV. En el caso particular de la resistencia mediada por CP de PVX nunca se dilucidó cómo la CP afecta a la infección. Por ejemplo, la resistencia fue efectiva tanto contra virus como contra RNA viral lo que sugiere que para PVX, el paso de desencapsidación no parece ser importante (Hemenway 1988; Spillane y col. 1997). Esto sugiere que, además de la interferencia en la desencapsidación viral, existen otros pasos en la replicación del virus o en su diseminación que podrían ser afectados. Se ha propuesto que la CP transgénica podría interactuar con el origen de ensamblado viral, por ende el virus no se podría ensamblar. También se propuso que la CP interactúa con el RNA viral (genómico) impidiendo la traducción de la replicasa viral y por lo tanto la infección fracasa. Estas hipótesis nunca fueron exploradas exhaustivamente.

En el caso de los potyvirus, como el TEV al igual que el PVY se sabe que la resistencia obtenida utilizando el gen de la CP es mediada mayormente por el mecanismo de silenciamiento (el cual se desarrollará más adelante), aunque existe evidencia que demuestra que la expresión de la CP de TEV es capaz de producir resistencia, si bien de menor nivel que la mencionada anteriormente (Dinant y col. 1993a; Voloudakis y col. 2005).

i) Uso de cápsides mutantes

La estructura molecular de la CP transgénica tiene un importante efecto que sobre la resistencia derivada del patógeno. Se demostró que mutantes puntuales de la CP de TMV producen según sea la estructura una disminución o un incremento de la resistencia mencionada, observando gran correlación entre la capacidad de formar agregados y la de conferir resistencia (Anderson 1989; Bendahmane y col. 1997; Bendahmane y col. 2002; Culver 2002; Asurmendi y col. 2004; Asurmendi y col. 2007; Bendahmane y col. 2007). En la figura 7 se muestra como interaccionan dos discos de CP silvestres o CP mutante. Se encontró que algunas CP mutadas de TMV podían interferir con la expresión de las proteínas virales de TMV, por ejemplo induciendo o reprimiendo la expresión de la MP o replicasa o alterando el movimiento célula-célula y por lo tanto disminuyendo la infección. A su vez la expresión de estas CP mutadas producían una mayor resistencia al infectar plantas transgénicas con RNA viral, mostrando que uno puede incrementar la resistencia secundaria o no relacionada con el desensamblado viral.

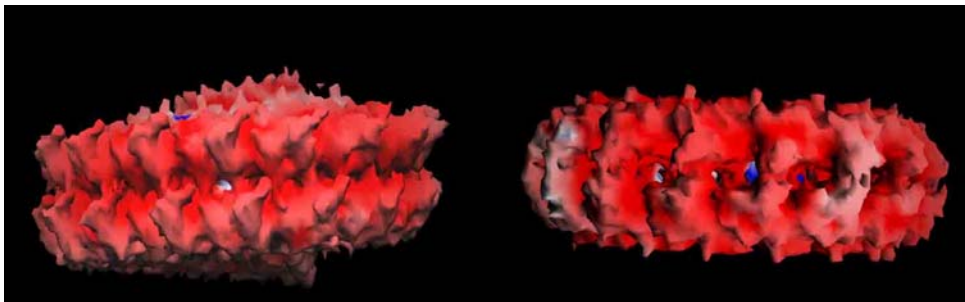


Figura 7. Representación de una simulación de la interacción de dos discos de proteínas de la CP. A la izquierda se ve la típica interacción entre dos discos de CP silvestres de TMV. A la derecha se ve como interaccionarían dos discos de la mutante CP^{T42W} de TMV (Asurmendi y col. 2007).

Asurmendi y colaboradores (2004) describieron, con alta resolución, la composición y la estructura tridimensional de los complejos de replicación viral de TMV y postularon que la CP de TMV tiene un efecto regulador de la formación de dichos complejos (Fig. 8). Se asoció este efecto con el mecanismo de resistencia mediado por la CP y se lo relacionó con la presencia de cierto tipo de estructuras cuaternarias de la CP de TMV. Se demostró que las mutaciones que son capaces de alterar el equilibrio de agregados de CP también modificaban varias de las funciones propuestas para la CP en los complejos de replicación viral y en la CP-MR. Estos conocimientos produjeron gran impacto en el entendimiento del mecanismo de resistencia derivado del patógeno.

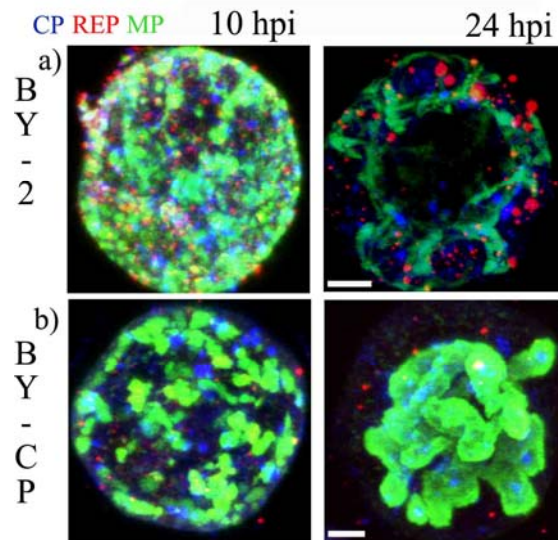


Figura 8. Protoplastos no transgénicos (BY-2) y transgénicos expresando la CP de TMV (BY-CP) infectados con TMV. Se utilizaron anticuerpos marcados con fluoróforos para determinar la localización de las proteínas virales CP, REP y MP a las 10 y 24 horas luego de la infección. Los puntos rojos corresponden a la replicasa, los verdes a la MP y los azules a las CP (Asurmendi y col. 2004).

ii) Resistencia heteróloga mediada por proteínas

Como se ha mencionado anteriormente, la expresión de una CP viral, puede conferir fuerte resistencia a infecciones con ese mismo virus (resistencia homóloga). Sin embargo, las plantas también puede presentar resistencia (por lo general de menor intensidad) con virus poco relacionados (resistencia heteróloga). En el caso particular de TMV se describió que plantas expresando la CP de TMV tardaban más tiempo en manifestar síntomas cuando son infectadas por virus no relacionados (AIMV, PVX, CMV, PVY) comparado con plantas no transgénicas (Anderson y col. 1989). Sin embargo en aquel momento, los autores no pudieron explicar el fenómeno. Uno de los capítulos de esta Tesis explica o profundiza en la CP-MR heteróloga para TMV con PVX, como en la relación recíproca de PVX con TMV. Por otro lado también se mostrará si las CPs mutantes de TMV actúan diferencialmente en la resistencia heteróloga con respecto a los casos de resistencia homóloga.

Un buen ejemplo de resistencia heteróloga es la expresión de la CP de virus del mosaico de la lechuga (LMV), para la cual se demostró que confiere protección heteróloga en plantas transgénicas de tabaco (cv. Xanthi) contra diferentes cepas de PVY (Dinant y col. 1993a) como así también contra otros potyvirus (Blaise y col. 1995). Si bien la protección fue asociada con niveles detectables de acumulación de CP, no se demostró una clara correlación entre los niveles de proteínas y los niveles de protección (Dinant y col. 1998). Más aún, dos cultivares de papa económicamente importantes (cv Spunta y Claustar) transformados con dicha CP mostraron inmunidad frente a PVY-0 (Hassairi y col. 1998).

Un ejemplo puntual de biotecnología aplicada al control de virus

La papaya es un cultivo tropical de importancia económica en algunos países o estados como Tailandia, Venezuela, Taiwan, México o Hawai (EEUU). En casi todas las regiones del mundo las plantaciones están afectadas en mayor o menor medida por el virus de la mancha anular de la papaya (*Papaya ringspot virus*, PRSV), que se transmite por pulgones. Los árboles afectados presentan unos frutos de aspecto irregular, falta de vigor y decaimiento generalizado. En Hawai en 1992 y en solamente dos años se infectó la totalidad de la región más importante de este cultivo, con consecuencias económicas muy graves para los productores ya que en esta región la papaya es el segundo producto agrícola en importancia económica detrás de la piña. Investigadores de la Universidad de Cornell (Nueva York) y de la Universidad de Hawai obtubieron una variedad transgénica de papaya resistente al PRSV, transformando árboles de papaya con una construcción capaz de expresar la CP del virus de la mancha anular. Previamente, los mejoradores habían buscado la resistencia genética natural en las variedades de papaya existentes sin resultado alguno. Actualmente el 40% de las plantaciones de papaya de Hawai y el 50% de los frutos provienen de variedades transgénicas, que por el momento solo se comercializan en EEUU al no haber sido autorizada en otros mercados. Como se ve en la figura 9, las plantas transgénicas fueron altamente resistentes al virus.

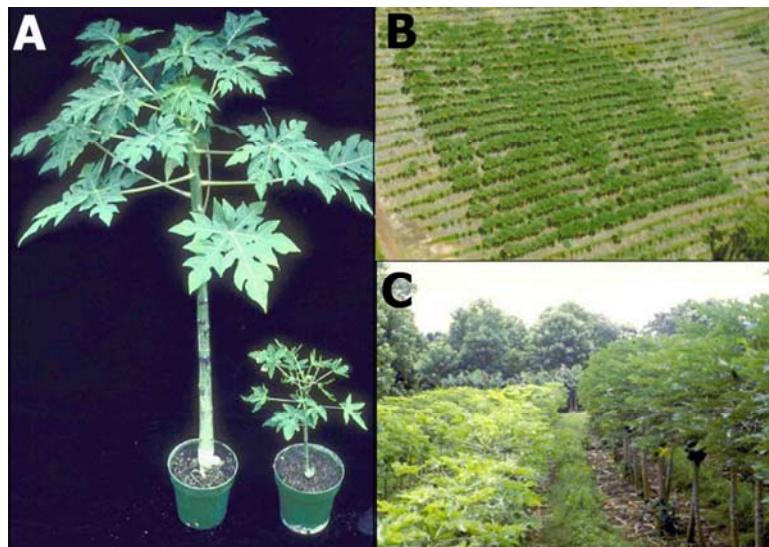


Figura 9. (A) Una planta de papaya transgénica (izquierda) y una planta no transgénica infectada con el PRSV. (B) y (C) Ensayos a campo de plantas de papaya transgénicas; únicamente las plantas transgénicas se desarrollan y producen papayas económicamente sustentables (Gonsalves 2004).

b) Resistencia mediada por RNA

Como se ha mencionado en la segunda estrategia desarrollada a partir de la resistencia derivada del patógeno, fue el silenciamiento génico de secuencias virales. Si bien el mecanismo del silenciamiento será explicado con mayor profundidad en otro capítulo se enumeraran algunas observaciones y características interesantes con el fin de conferir resistencia.

En los comienzos de los 90' se intentó expresar distintos fragmentos virales, por entonces se suponía que se debía acumular mucha proteína viral para poder conferir resistencia. Esta premisa nació a partir de los primeros ejemplos de CP-MR. Sin embargo algunos grupos empezaron a encontrar plantas resistentes en las cuales no se llegaba a detectar la proteína transgénica. En estos casos las plantas eran resistentes tanto a virus como a RNA viral, restando importancia a la desencapsidación.

Con el tiempo se demostró que dicha resistencia estaba mediada por RNA (no por proteína) y se la denominó silenciamiento. Muy brevemente el silenciamiento es un mecanismo por el cual un RNA se degrada en pequeños RNA interferentes (siRNA), los cuales reconocen y degradan a otros RNA de igual secuencia. Resumidamente si uno posee una planta transgénica silenciada para una secuencia viral, la planta tendrá siRNA homólogos a la secuencia viral. Por lo tanto si el virus (secuencia similar a la de los siRNA) infecta esas células, los siRNA reconocerán al virus y lo silenciarán, y por lo tanto la infección fracasará. La gran ventaja de esta estrategia es la efectividad del mecanismo, las plantas transgénicas silenciadas para una determinada secuencia viral son tan resistentes que varios autores mencionan a este tipo de plantas como “inmunes” al virus (Baulcombe 2004). La forma de gatillar PTGS puede darse de diferentes maneras pero en la actualidad se utiliza una estrategia diseñada por el grupo de investigación del Dr. Waterhouse (Helliwell y Waterhouse 2003; Wielopolska y col. 2005). Los autores demostraron que la sobre expresión en plantas transgénicas de una secuencia duplicada e invertida e interrumpida por un intrón (de manera que el mRNA resultante de la transcripción del transgén adopta estructuras de doble cadena (dsRNA, por sus siglas en inglés, double strand) provoca silenciamiento de cualquier secuencia con suficiente homología (homología muy alta) a la secuencia en cuestión de una manera muy eficiente. Esta clase de construcciones se utiliza tanto para silenciar genes endogenos como virales. Un ejemplo es la expresión de secuencias virales de la tristeza de los cítricos (CTV) duplicadas e invertidas, e interrumpidas por un intrón en plantas de *N. benthamiana* que confirieron alta resistencia a la infección viral (Goldbach y col. 2003; Batuman y col. 2006).

La desventaja de esta estrategia es que la resistencia es muy restringida por la homología de la secuencia expresada por lo tanto de muy reducido espectro protección. Por otro lado, se ha reportado que la protección mediada por silenciamiento pierde su eficacia a bajas temperaturas (menores a 16 °C) (Szitty y col. 2003). Esto constituye una gran desventaja cuando se quiere conferir resistencia a cultivos que se desarrollan a bajas temperaturas, como por ejemplo el de la papa en Argentina. Asimismo, en los últimos años, se han reportado proteínas supresoras del silenciamiento génico

(Voinnet y col. 2000; Voinnet 2001; Takahashi y col. 2002; Dinesh-Kumar y col. 2003; Ding y col. 2004; Mallory y Vaucheret 2004) en un gran número de virus, evidenciando que la resistencia mediada por silenciamiento puede ser vulnerada (Savenkov y Valkonen 2001). En el caso particular del campo Argentino, existen virus portadores de proteínas supresoras de silenciamiento, como por ejemplo el PVY, el cual contiene al primer supresor reportado, HC-Pro.

4) Silenciamiento génico

En eucariotas, el silenciamiento génico es un mecanismo de regulación de la expresión génica mediado de manera específica por RNA. Este fenómeno se establece a partir del reconocimiento de una dsRNA (Fire y col. 1998), que es degradada en pequeños fragmentos de dsRNA de 21 a 25 nt de largo (Fig. 10), conocidos como RNA pequeños interferentes (siRNA) (Jones y col. 1999). Los siRNA reconocen a las moléculas de RNA de igual secuencias e inducen a su degradación. Por lo tanto el resultado del silenciamiento es la degradación específica de un determinado RNA (mRNA o viral).

El ciclo celular eucariota suele ser descrito en tres pasos: DNA doble cadena, RNA simple cadena y proteína. Dentro de este modelo simplista no se encuentran moléculas de dsRNA. Sin embargo existen dsRNAs endógenos relacionados con el control fino de la expresión génica que serán tratadas con mayor detalle posteriormente. También se encuentra dsRNA cuando un mRNA es procesado inadecuadamente o cuando un virus replica o invade a una célula. Diferentes autores demostraron que el silenciamiento génico es un mecanismo de defensa antiviral y contra la expresión aberrante de genes endógenos. Se han descrito dos tipos distintos del silenciamiento: el silenciamiento génico post transcripcional (PTGS, por sus siglas en inglés) donde los siRNA actúan en “trans” dirigiendo la degradación específica por homología de secuencia de mRNAs; el silenciamiento génico transcripcional (TGS) donde los siRNAs actúan en “cis” promoviendo la metilación del DNA y la formación de heterocromatina en los loci en los que se originaron

a) Silenciamiento génico transcripcional

El silenciamiento génico transcripcional (TGS) es un mecanismo de regulación de la expresión génica que tiene como molécula blanco al DNA. Los siRNA homólogos a secuencias promotoras son capaces de metilar el DNA y así promover que los genes río abajo de estos promotores no se transcriban. Este sistema de control de la expresión génica fue asociado con el control de la expresión de transposones y accidentalmente de transgenes con características similares a transposones (Vaucheret y Fagard 2001). Sin embargo la metilación no es suficiente para el establecimiento del silenciamiento. Existen mutantes en los genes *sill* y *mom1*, en donde se pierde el TGS aunque las secuencias continúan metiladas (Furner y col. 1998; Amedeo y col. 2000).

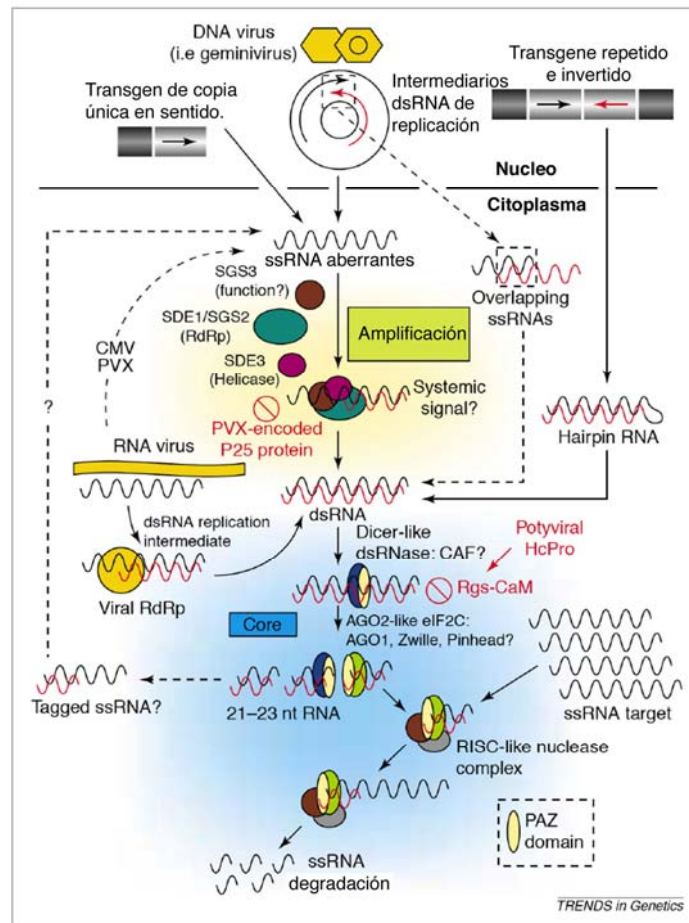


Figura 10. Esquema del silenciamiento génico inducido por virus, por sobre expresión de transgén o expresión de secuencias duplicadas invertidas. Se detalla como el RNA es procesado en siRNA de 21-25 pb (Voinnet 2001).

b) Silenciamiento génico post-transcripcional

En el silenciamiento génico post-transcripcional la molécula blanco es el RNA. El PTGS es un mecanismo inducible y específico de degradación de RNA que evolucionó como un sistema de defensa antiviral debido a que restringe la acumulación o la diseminación del virus dentro de las plantas (Vance y Vaucheret 2001; Dunoyer y col. 2004). Si bien se describió por primera vez en plantas, se lo ha encontrado también en hongos (donde se denomina “quelling”), y en sistemas animales como nematodos, *Drosophila* o mamíferos (donde se lo denomina interferencia mediada por RNA o RNAi). Es desencadenado eficientemente por intermediarios de dsRNA que pueden tener su origen en transgenes nucleares cuyos transcritos forman este tipo de estructuras naturalmente (similares a los que ya se han mencionado para conferir resistencia a virus); genes que se expresen en niveles altos ó que generen estructuras aberrantes que pueden ser convertidas a dsRNA por RNA polimerasas celulares dependientes de RNA (RdRps) (Fig. 11). En plantas el PTGS también puede ser desencadenado por la formación de estructuras de dsRNA generadas durante la replicación viral

(independientemente del tipo de genoma del virus, ver apartado VIGS). Cualquiera sea su origen, una vez formadas las estructuras de dsRNA, son reconocidas por una enzima similar a DICER llamada DCL-1 (Fire y col. 1998), y son procesadas dando lugar a siRNAs de 21 a 25 nt de longitud y de ambas polaridades. Los siRNAs se asocian luego a un complejo enzimático endógeno denominado RISC (“RNA-induced silencing complex”) que es capaz de degradar específicamente todo aquel RNA con homología a la secuencia desencadenante del proceso (los detalles moleculares y el funcionamiento de este mecanismo degradativo se explicarán mas adelante) (Hammond y col. 2000), como también pueden ser utilizados por RdRps para sintetizar la segunda hebra del gen a silenciar, de esta forma se amplifica la señal de silenciamiento (Fig. 11).

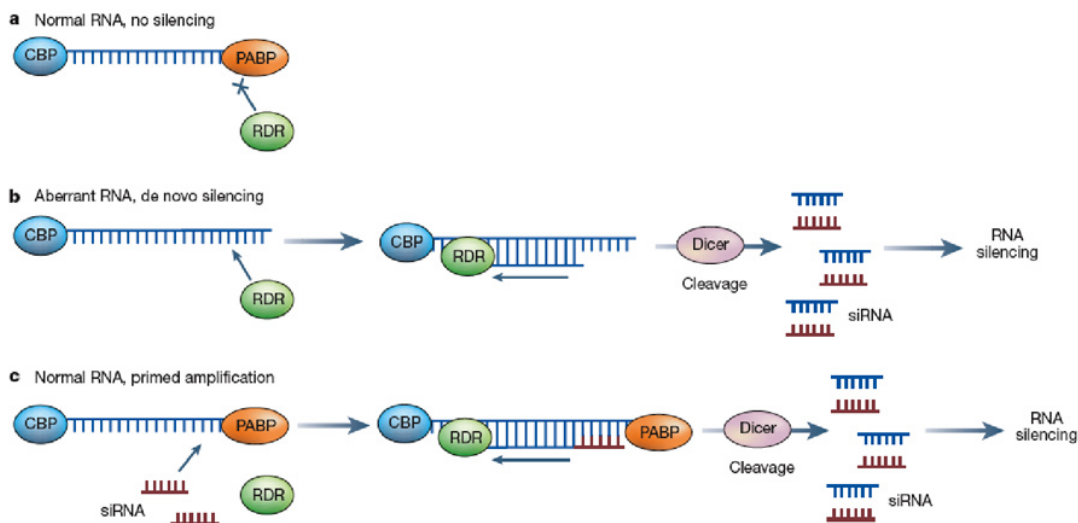


Figura 11. Acción de la RdRp (o RDR) en la iniciación o amplificación del silenciamiento. (a) mRNA normal, el cual no es reconocido por la RdRp porque se encuentra correctamente procesado conteniendo Cap (CBP, Cap binding protein) y poliadenilado (PABP, poly adenosine tail). (b) La RdRp reconoce al mRNA mal procesado (sin PABP) y genera la dsRNA. La dsRNA es degradada via Dicer en siRNA. (c) Los siRNA pueden ser utilizados como primers o cebadores por la RdRp para amplificar la señal (Baulcombe 2004).

i) Evidencias moleculares del PTGS

Las evidencias moleculares de la presencia de PTGS son: el análisis de acumulación de los mRNA blanco y la presencia de siRNAs. Por medio de las técnicas de “Northern blot” o RT-PCR semi-cuantitativa o de tiempo real, se puede analizar si un determinado RNAm se encuentra disminuido. Esta disminución puede ser parcial o total. Por último se pueden detectar los siRNAs homólogos al gen silenciado por PTGS mediante un “Northern blot” específico para detectar solo siRNAs utilizando un gel de poliacrilamida para separar el RNA de bajo peso molecular.

ii) Señal móvil de PTGS

El PTGS produce una señal móvil, es decir que los siRNAs asociados a distintas proteínas, pueden migrar desde la célula donde se han generado a células adyacentes. Una vez que en la célula colonizada se degrada al mRNA homólogo al siRNA, se generan nuevos siRNAs, amplificando así la señal y que se traslada por toda la planta. La amplificación de la señal se realiza a partir de la síntesis de dsRNA realizada por una RNA polimerasa dependiente de RNA (Baulcombe 2004).

El grupo del Olivier Voinnet ha propuesto un interesante modelo para describir el movimiento del PTGS (Fig. 12). Los autores postularon que inicialmente se producen siRNAs de 21 nt y 25 nt. Los siRNAs de 21 nt se moverían aproximadamente a 10 o 15 células adyacentes, independientemente de la presencia de un transcripto homólogo en esas células (Fig. 12A). Esta primera etapa de movimiento puede resultar en dos acciones. La primera, los siRNAs de 21 nt pueden inducir la síntesis de nuevos siRNAs de 21 nt (llamados siRNA secundarios) a partir de la acción de RNA polimerasas endógenas SDE1 y SDE3 utilizando transcriptos homólogos como templado. Los nuevos siRNA de 21 nt podrían moverse a una distancia similar a los primeros siRNAs y así se repetiría el proceso moviéndose por toda la planta (Fig. 12B). Una segunda posibilidad es que la señal no pueda seguir moviéndose por no existir en las células que reciben la señal un transcripto homólogo a partir del cual se generen nuevos siRNAs. En este caso el silenciamiento no se propagaría (Himber y col. 2003).

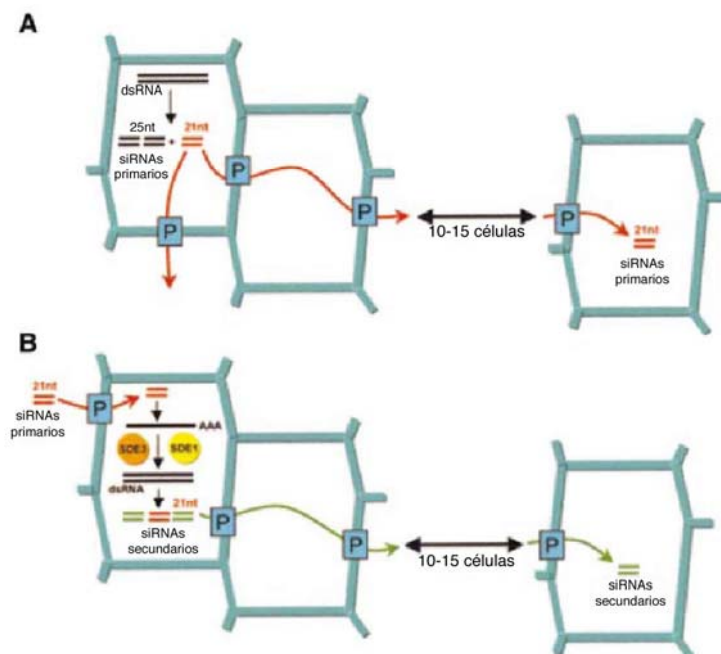


Figura 12. Modelo del movimiento célula a célula de silenciamiento génico en plantas. **(A)** En ausencia de amplificación, la señal del silenciamiento puede moverse hasta una distancia de 10-15 células de donde se originó por el movimiento de los siRNAs (21nt) a través de los plasmodesmos. **(B)** Movimientos a más de 15 células necesita de una síntesis *de novo* de dsRNA por acción de la SDE1 y SDE3 utilizando al mRNA como templado. P: plasmodesmos. (Himber y col. 2003).

iii) PTGS e infecciones virales. Proteínas supresoras del PTGS

Como ya se ha mencionado, el PTGS es un mecanismo de defensa antiviral en plantas, por lo tanto resulta esperable que se haya seleccionado en los virus la capacidad de contrarrestar a este mecanismo. Congruentemente con esta especulación, diversos grupos descubrieron que los virus de plantas codifican para proteínas capaces de interrumpir el proceso, conocidas como supresores del PTGS (Vaucheret y col. 1998; Dinesh-Kumar y col. 2003; Brigneti y col. 2004). Se encontró que prácticamente todos los virus llevan algún tipo de supresor de silenciamiento. Estos supresores tienen secuencias diferentes y un origen evolutivo diverso; y actúan inhibiendo el silenciamiento a distintos niveles de la vía (Jones y col. 1999). Algunos supresores virales tales como la proteína HC-Pro de los potyvirus previenen la acumulación de los siRNAs (Llave y col. 2002; Mallory y Vaucheret 2004). Otros supresores, como la proteína p25 del virus X del PVX interfieren con la señal de propagación sistémica (Voinnet y col. 2000), y finalmente otros, como el codificado por el virus del achaparramiento del tomate (TBSV), suprimen el silenciamiento sólo en las nervaduras (Jones y col. 1999). También se ha detectado un supresor de PTGS en un virus cuyo genoma es de dsRNA (Li y col. 2005) y dsDNA (Vanitharani y col. 2005). Es interesante destacar que varios de los supresores de silenciamiento virales identificados habían sido previamente caracterizados como proteínas determinantes de virulencia y del movimiento viral y/o del fenómeno de sinergismo.

Los medios de acción de los supresores son muy variados. Por ejemplo el P19 forma un homodímero capaz de secuestrar sRNA impidiendo su entrar al RISC y por ende su unión. El HC-Pro recluta reguladores endógenos negativos del PTGS (Voinnet 2005).

c) Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

Los virus pueden gatillar silenciamiento naturalmente durante su ciclo infectivo. En este caso el mecanismo de silenciamiento es dirigido al genoma viral. En base a esta característica del sistema de defensa vegetal durante una infección viral se ha desarrollado una tecnología conocida como silenciamiento génico inducido por virus (VIGS). El VIGS consiste en la construcción (ó diseño) de vectores virales que portan en su genoma insertos derivados de secuencias génicas vegetales. Utilizando este tipo de vectores se logra, no solamente el silenciamiento del genoma viral, sino además el silenciamiento específico de la región endógena homóloga en secuencia a cualquier inserto introducido en el vector. Por ejemplo, si se construye un vector viral capaz de establecer VIGS portando una secuencia de un mRNA vegetal se desencadena el PTGS del gen vegetal en cuestión y el mismo no se expresa. También es posible agregar en el vector viral secuencias de regiones génicas regulatorias de la planta de manera de provocar el TGS del gen vegetal estudiado (Jones y col. 2001).

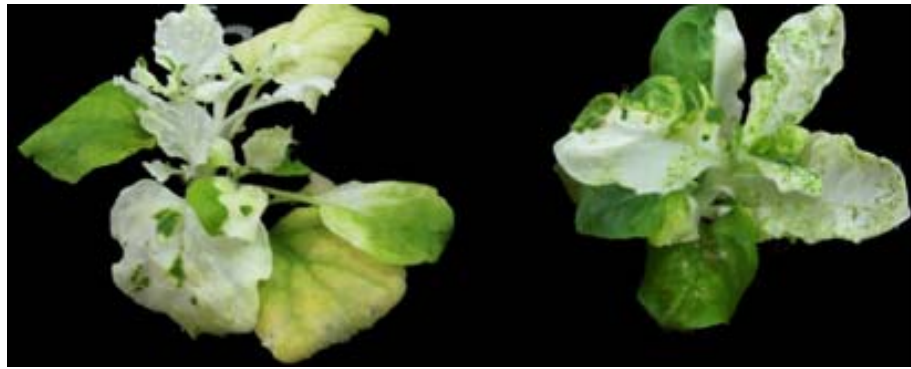


Figura 13. *N. benthamiana* y *N. tabacum* infectadas con TRV conteniendo un fragmento del gen de PDS. El silenciamiento del gen PDS endógeno, produce el fenotipo albino (Bazzini y col. 2007b).

El VIGS ha sido usado como herramienta para silenciar una gran variedad de genes para determinar su función (Robertson 2004). Asimismo, es una herramienta muy poderosa para analizar los factores en la respuesta de resistencia ante enfermedades en las plantas. Existen en la actualidad varios vectores para desencadenar VIGS con diferentes ventajas y desventajas (Burch-Smith y col. 2004). El vector viral debe ser estable con una alta capacidad de inducir silenciamiento y con una muy baja capacidad de generar síntomas (Liu y col. 2002a; Liu y col. 2002b). Por lo tanto uno de los sistemas de VIGS más utilizado en la actualidad es el vector basado en el *Tobacco rattle virus* (TRV); virus de ARN bipartito que es capaz de infectar, *Arabidopsis*, tabaco y papa, entre otras especies modelo (Brigneti y col. 2004). En la figura 13 se muestran plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* infectadas con un TRV modificado genéticamente portando el gen de la fitoeno desaturasa (PDS), enzima involucrada en la biosíntesis de carotenoides (Bazzini y col. 2007b). Al silenciar este gen endógeno, la planta pasa a tener un fenotipo blanco. El PVX también puede usarse para desencadenar VIGS aunque en la actualidad no es tan utilizado principalmente debido al acotado rango de huéspedes que puede infectar (Ruiz y col. 1998; Faivre-Rampant y col. 2004). Como el PVX es un buen disparador de VIGS en uno de los capítulos de esta Tesis se evaluará si la CP-MR producida por la CP de PVX no depende del silenciamiento producido por la infección con PVX.

5) El mundo de los miRNAs

Como ya se ha mencionado, los eucariotas multicelulares producen pequeñas moléculas de RNA (de aproximadamente 21 a 25 nt), algunas de las cuales controlan la expresión génica de su propio genoma. Los microRNAs (miRNAs) son un tipo de moléculas de bajo peso molecular (21 pb) que controlan la acumulación de mRNA endógenos regulando finamente la expresión de diferentes genes. Sin embargo, las vías de los miRNAs y de los siRNAs tienen muchos pasos en común y su resultante RNA pequeños (sRNA) son físico-químicamente indistinguibles (Fig. 14).

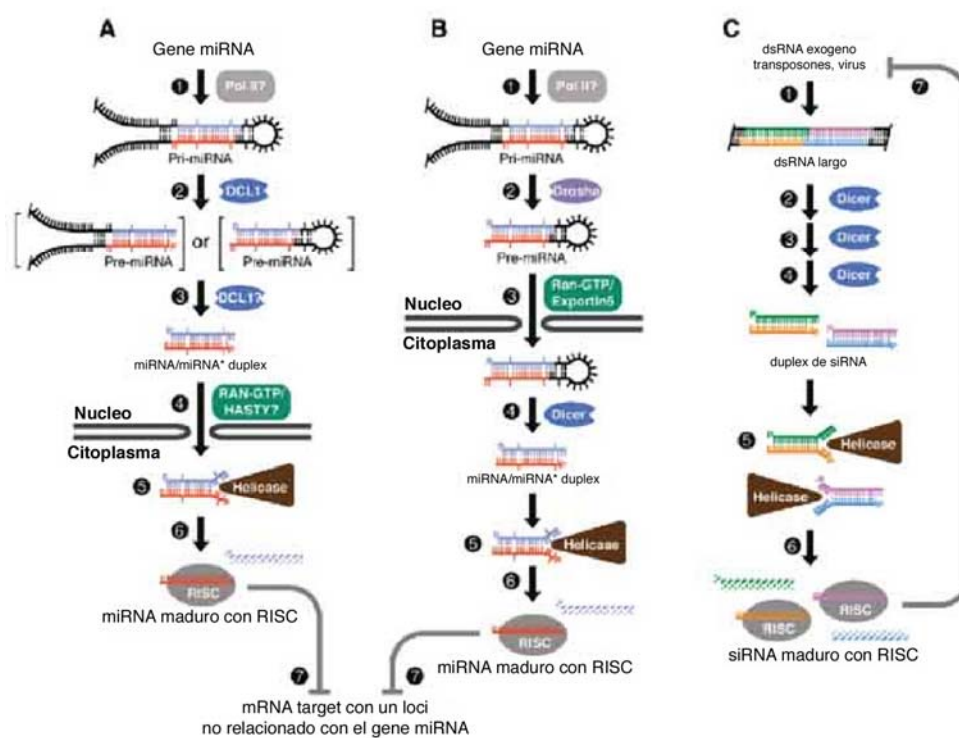


Figura 14. Biogénesis de los miRNAs y siRNAs. (A) Biogénesis de los miRNAs en plantas. El pre-miRNA (entre paréntesis) es un intermediario con una vida media muy corta (nunca fue detectado en plantas). El miRNA (rojo) se incorpora al RISC (paso 6) donde el miRNA* (azul) es degradado. (B) Biogénesis de miRNAs en metazoos. (C) Biogénesis de los siRNA en animales, mostrando la similitud entre la formación de miRNAs y siRNAs (Bartel 2004).

a) Los genes miR

Los miRNAs están presentes en los eucariotes desde humanos a plantas (Bartel 2004). Actualmente se están identificando rápidamente una gran cantidad de miRNAs y se estima que los genes controlados por miRNAs representan el 1% del genoma que se expresa en organismos complejos como gusanos, moscas y humanos (Bartel 2004). El descubrimiento de miRNAs en muchos

y diversos organismos sugiere que al igual que la vía de silenciamiento génico post-transcripcional la vía de los miRNAs surgió tempranamente en la evolución de los eucariontes.

Resumidamente, los miRNAs se originan a partir de transcriptos endógenos que se pliegan sobre sí mismos dando lugar a estructuras de RNA de doble cadena (denominados pre-miRNAs), los cuales son procesados de manera que se produce una única cadena de miRNA de pequeño tamaño (21-22 nt). La cadena complementaria, denominada miRNA*, es degradada (Ver figura 14). En la figura 15 se muestran ejemplos de las estructuras secundarias de los miRNAs.

Muchos miRNAs tienen un patrón de expresión particular. Por ejemplo, RNAs parálogos y ortólogos de *C.elegans lin-4* y *let-7* tienen un lugar y tiempo específico de expresión a lo largo del desarrollo (Pasquinelli y col. 2000; Lau y col. 2001; Lagos-Quintana y col. 2002; Bashirullah y col. 2003; Lim y col. 2003b). Otros interesantes ejemplos incluyen al miR-1, el cual es encontrado principalmente en corazón de mamíferos (Lee y Ambros 2001); el miR-122 se expresa únicamente en hígado (Lagos-Quintana y col. 2002); el miR-233, en granulocitos y macrófagos de médula ósea de ratón (Chen y col. 2004a); los miRNAs del cluster mir-35-mir-42 son encontrados en embriones de *C. elegans* (Lau y col. 2001); los mir-290-mir-295 son expresados en células embrionarias no diferenciadas de ratón (Houbaviy y col. 2003).

No sólo el sitio y el período de expresión son importantes para describir la expresión de un determinado gen miR. La abundancia relativa también es una característica importante, por ejemplo, el miR-124 está presente en gusanos adultos en un promedio de 800 moléculas por célula (Lim y col. 2003b), mientras que los miR-2, miR-52 y miR-58 se encuentran presentes en más de 50.000 moléculas en promedio por célula (Lim y col. 2003b). Estos valores proporcionan evidencia de que los niveles de acumulación pueden ser muy variados, desde una altísima acumulación, comparables a los del U6 snRNA del spliceosoma hasta niveles mucho menores, aunque igualmente altos comparados a los de un mRNA.

b) Clasificación de los miRNAs.

Aunque la mayoría de los miRNAs anotados están conservados en la mayor parte de las especies vegetales analizadas, otros solo fueron encontrados en una especie y éstos podrían haberse originado evolutivamente recientemente; a estos miRNAs se los conoce como “no conservados” o “jóvenes”. La similitud entre los precursores de los miRNAs (“jóvenes”) y los “targets” (o genes blanco) es una evidencia importante para proponer que éstos miRNAs provienen de la duplicación génica del “target” (Allen y col. 2004). Si bien a muchos miRNAs no conservados (incluyendo el miR161, el miR163, el miR173, el miR447, el miR475 y el miR476), se le conocen sus “targets” directos (Allen y col. 2004; Allen y col. 2005) (Vazquez y col. 2004a; Lu y col. 2005b; Sunkar y col. 2005), es muy difícil predecir todos sus “targets” porque no es posible utilizar la complementariedad de bases como filtro contra los posibles falsos positivos. Algunos autores postulan que algunos miRNAs “jóvenes” se originaron a partir de un gen de una determinada familia y este miRNA

controlaría a esa familia. Sin embargo, existen ejemplos donde los nuevos miRNAs controlan a otras familias no relacionadas con sus antecesores (Fahlgren y col. 2007). Por lo tanto se postula que muchos miRNAs “nacen” y “mueren” y que muy pocos se establecen o seleccionan e integran rutas o procesos biológicos (por lo general son los miRNAs conservados, “ancianos” o “viejos”) (Fahlgren y col. 2007).

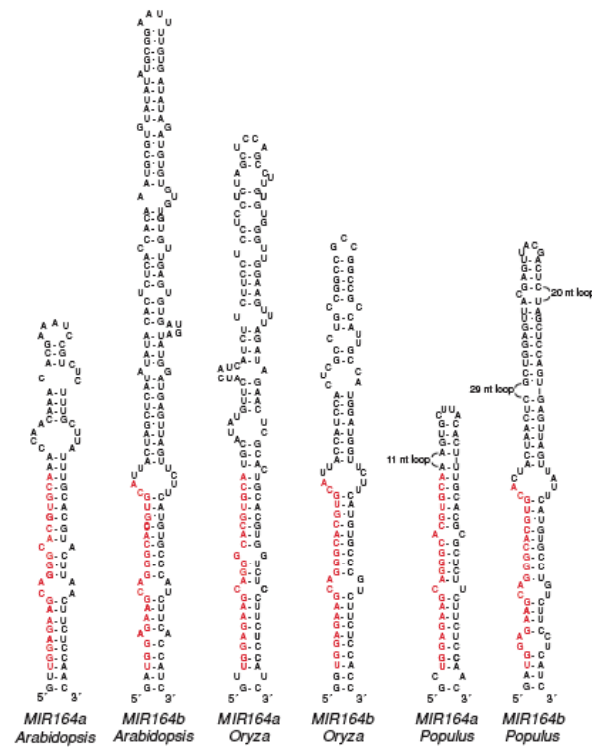


Figura 15. Se representan las típicas estructuras de rulo o “stem-loop” de los miRNAs. miR164 de *Arabidopsis* y sus homólogos de *Oryza* y *Populus*. El segmento correspondiente al miRNA maduro se muestra en color rojo (Jones-Rhoades y col. 2006).

Efectivamente, es difícil estar seguro de que todos los miRNAs no conservados anotados sean miRNAs y no sRNAs. Para poder anotar a un sRNA como miRNA, su expresión debe poder ser detectada y las secuencias lindantes (las que forman al pre-miRNA) al miRNA tienen que poder formar un “loop” o rulo (típica estructura de miRNA, ver Fig. 15). En la práctica, estos requerimientos son poco exigentes para categorizar a muchos sRNAs. Muchos sRNAs son experimentalmente detectables (geles de poliacrilamida) (Peragine y col. 2004; Vazquez y col. 2004b; Xie y col. 2004) y cientos de miles de regiones del genoma pueden llegar a formar estructuras similares a los precursores de miRNAs (Jones-Rhoades y Bartel 2004). Por lo tanto, es muy difícil estar seguro que un determinado sRNA clonado se originó de un “loop” o rulo (sería un miRNA) o de una hebra doble cadena de RNA (sería un siRNA), especialmente cuando el miRNA no es conservado (secuencia y

estructura). Sin ir muy lejos, muchos sRNAs clonados de *Arabidopsis* cumplen teóricamente con los requerimientos propuestos pero solo unos pocos serían verdaderos miRNAs.

El gran desafío de la anotación de los sRNAs no conservados entre especies es re-clasificar a los sRNAs que fueron clasificados como miRNAs. Algunos de estos sRNAs fueron reclasificados o llamados ta-siRNA (por “trans-acting” siRNA) (Peragine y col. 2004; Vazquez y col. 2004b) por tener un origen distinto. Como un típico miRNA, los ta-siRNA reconocen y cortan a un “target”, son detectables y requieren de muchas de las proteínas que los miRNAs utilizan en su biogénesis. Sin embargo, los ta-siRNAs no poseen una estructura tan definida o predecible como las de los miRNAs. Existen ejemplos donde los ta-siRNAs son generados a partir de largas hebras de dsRNA sintetizadas por RDR6 (RNA polimerasa dependiente de RNA) (Howell y col. 2007).

c) Análisis y predicción de miRNAs utilizando bioinformática.

Resulta un tanto peculiar que los miRNAs hayan permanecido durante tanto tiempo sin ser descubiertos. Como hemos mencionado, no solo se encuentran en la gran mayoría de los eucariotas, sino que también se acumulan en gran escala. Si bien hoy en día no es muy difícil clonar un miRNA, años atrás no era una tarea trivial. Si se considera que la expresión es muy específica (lugar y tiempo) se puede predecir la dificultad al clonar miRNAs que solo se expresan en determinadas células. Por otra parte, muchos genomas ya se encuentran secuenciados y las bases de datos genómicas siguen creciendo a gran velocidad. Mediante el uso de programas de computación se han identificado muchos genes que teóricamente codifican para miRNAs, de los cuales algunos ya han sido verificados experimentalmente (Dezulian y col. 2006; Lindow y Gorodkin 2007). También se ha utilizado este tipo de programas para buscar ortólogos y parálogos de miRNAs conocidos (Pasquinelli y col. 2000; Lau y col. 2001; Lee y Ambros 2001; Lagos-Quintana y col. 2002; Dezulian y col. 2006).

Otra aproximación, consistió en la búsqueda de secuencias nucleotídicas capaces de formar estructuras secundarias similares a las previamente encontradas para otros miRNAs. Este tipo de aproximación experimental, es muy útil para descubrir a los miRNAs pocos abundantes. Si bien hoy existen varios algoritmos de búsqueda de miRNAs, dos de los más utilizados y antiguos son el MIRscan (Lim y col. 2003a; Lim y col. 2003b) y el MIRseeker (Dinant y col. 1993b); al primero se lo ha utilizado en nematodos y vertebrados mientras que al segundo principalmente en insectos.

Las primeras estimaciones predijeron entre 200 y 255 genes de miRNAs en humanos (Lim y col. 2003a), entre 103 y 120 en *C. elegans* (Lim y col. 2003b; Ohler y col. 2004) y entre 96 y 124 en *Drosophila* (Dinant y col. 1993b). Estos valores representan aproximadamente el 1% de los genes totales. En plantas, muchos menos mRNAs son regulados directamente por miRNAs, aunque la mayoría de éstos son factores de transcripción, por ende las consecuencias directas e indirectas terminan siendo aproximadamente similares en importancia (Mallory y Vaucheret 2004; Jones-Rhoades y col. 2006).

Los algoritmos computacionales también son utilizados para descubrir genes “target” o blanco de los miRNAs. El tema se desarrollará en el sector correspondiente a genes blanco de miRNAs.

Otro de los enfoques más recientes ha sido el clonado y la secuenciación masiva de los miRNAs (Lagos-Quintana y col. 2001). Actualmente, se están utilizando técnicas de secuenciación y clonado rápidas y masivas (Lu y col. 2005a; Axtell y col. 2006; Henderson y col. 2006). Brevemente, se clonan gran cantidad de miRNAs de una planta, por lo tanto comparando la cantidad y tipo de miRNAs clonados de una planta silvestre con una planta mutante para una determinada proteína, se puede determinar que relación tiene esta proteína con la producción de todos los miRNAs clonados. A partir de esta gran cantidad de datos se crea una base de datos donde se puede acceder a la información de los miRNAs detectados, clonados y en algunos casos saber en que tipo de plantas (mutantes para proteínas de la síntesis de diferentes sRNA) se encontraron esos miRNA (Gustafson y col. 2005).

d) Biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de un miRNA puede dividirse en 3 etapas: transcripción, maduración y acción por medio del complejo RISC.

i) Transcripción

La RNA polimerasa (Pol) II sintetiza los mRNAs y a algunos RNA no codificantes, como los miRNAs. Primero se transcribe un miRNA inmaduro conocido como pri-miRNA o pri-pre-miRNA dependiendo los autores y/o reinos, el cual puede llegar a ser bastante largo (mas de 1 kb). Los pre-miRNA poseen el extremo 5' con “Cap” y su extremo 3' poliadenilado como todo mRNA clásico (Jones-Rhoades y col. 2006). El estudio de las regiones promotoras es muy importante para entender la acción de los miRNAs, ya que el patrón de expresión puede ser muy específico de tejido y por ende su acción está asociada a esos tejidos en especial. En la figura 16 se muestra una planta transgénica de *Arabidopsis* donde el gen de la β -glucuronidasa (GUS) se encuentra gobernado por el promotor del miR164a. Claramente se observa un patrón de expresión muy definido.

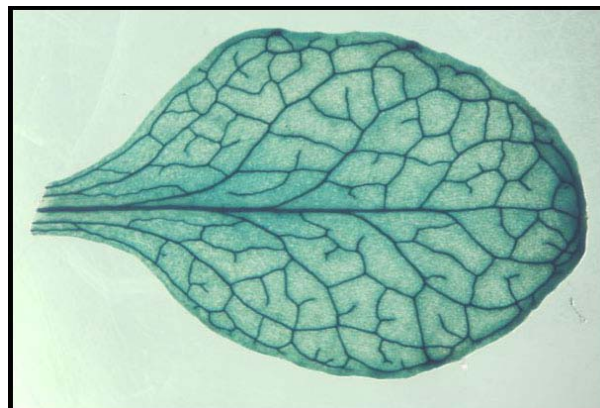


Figura 16. Hoja de una línea de *Arabidopsis* transgénica mostrando el patrón de expresión del gen de la β -glucuronidasa gobernado bajo el promotor del miR164a (Bazzini y col. Datos no publicados).

ii) Maduración

Los miRNAs maduros son procesados a partir de una cadena de simple hebra de RNA que adquiere una particular estructura tridimensional. Esta estructura de horquilla tiene aproximadamente 70 nucleótidos y es llamada precursor del miRNA (pre-miRNA). Este pre-miRNA se origina de un miRNA primario (pri-miRNA) (Ver Fig. 17) que es procesado por una enzima llamada drosha en animales y DCL-1 en plantas, produciendo un pre-miRNA. En plantas el pre-miRNA madura llegando a formarse el duplex entre el miRNA y el miRNA*. En células animales este paso ocurre en el citoplasma. El miRNA* corresponde al sRNA casi complementario al miRNA (Ver Fig. 17). Por último el miRNA* es degradado rápidamente mientras que el miRNA maduro se asocia al complejo RISC (Chen y Rajewsky 2007).

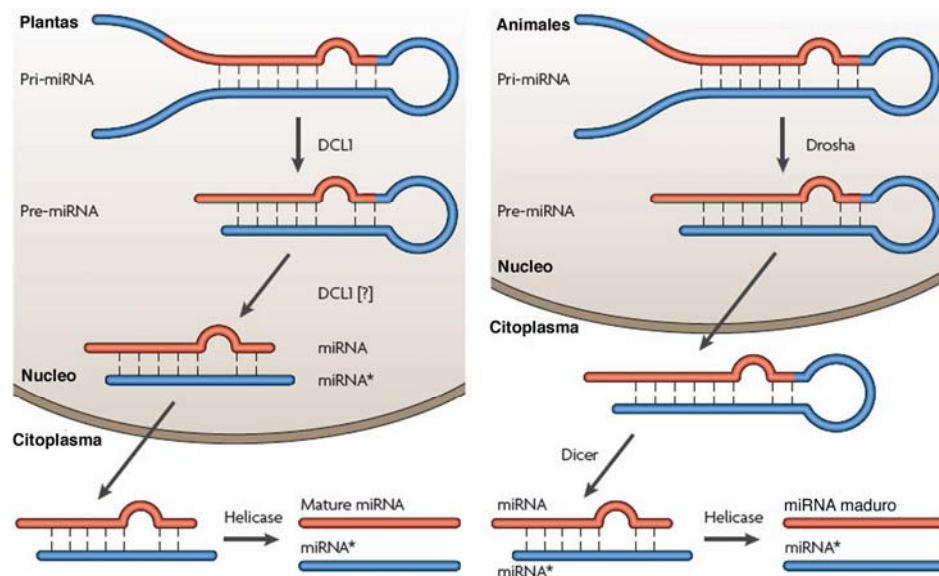


Figura 17. Los microRNAs maduros (miRNAs) son procesados a partir de una estructura en forma de orquilla de ~70-nucleótidos (en animales) llamados precursores de miRNAs (pre-mRNAs), por enzimas dicer (DCL). Los pre-miRNAs son procesados a partir de un miRNA primario (pri-mRNA). Dependiendo de los reinos, el procesamiento puede darse en distintos compartimentos celulares (Chen y Rajewsky 2007).

iii) RISC

El complejo ribonucleico inductor de silenciamiento (RISC, por sus siglas en inglés), es un complejo compartido tanto por la vía del silenciamiento génico, como por la ruta de los miRNAs

(Hammond y col. 2000; Llave y col. 2002; Tang y col. 2003). Este complejo proteico es quien selecciona qué molécula del miRNA (miRNA o miRNA*) será el miRNA maduro y cuál se degradará. Esta elección está basada en la estabilidad del dúplex ya que se selecciona la hebra que menor estabilidad tiene en el extremo 5' (Khvorova y col. 2003; Schwarz y col. 2003). Si bien aun no se conoce exactamente como se incorpora la hebra de RNA (miRNA) al RISC, se sabe que el complejo está formado por el miRNA y diferentes proteínas, que pueden diferir si el RISC incluye a un miRNA o si incluye a un siRNA. En todos los RISC hay proteínas Argonautas (Ago). Las proteínas Ago poseen dos dominios distintivos, PAZ y Piwi. El dominio PAZ tiene función de unión al RNA (Lingel y col. 2003; Song y col. 2003; Yan y col. 2003) y el Piwi tiene una estructura similar a la de una RNasa H (Liu y col. 2004; Song y col. 2004). Finalmente el complejo RISC conteniendo al miRNA reconoce y actúa sobre los mRNA reduciendo su traducción.

e) Mecanismo de acción

Los miRNAs dirigen al complejo RISC al mRNA blanco y reprimen la expresión génica por medio de mecanismos post-transcripcionales: degradación específica del mRNA o represión de la traducción (Fig. 18). En el caso de las plantas el proceso de degradación es el más común, mientras que en el reino animal la inhibición de la traducción es el más frecuentemente encontrado.

También existe cierta correlación entre la similitud del miRNA con el gen blanco y el mecanismo de acción. Si las dos secuencias (miRNA-gen blanco) baja homología (se pueden encontrar entre 3 y 4 bases desapareadas dentro de las 21 pb) se favorece la inhibición de la traducción mientras que con mayor homología se favorece la escisión del mRNA (Hutvagner y Zamore 2002) (Zeng y col. 2002; Doench y col. 2003; Zeng y col. 2003). Esto no se puede tomar como una regla ya que existen ejemplos que no cumplen con esta relación. Por ejemplo el miR172 de *Arabidopsis* controla al mRNA del gen *APETALA2* inhibiendo la traducción y al mismo tiempo presenta una complementación nucleotídica perfecta (Aukerman y Sakai 2003).

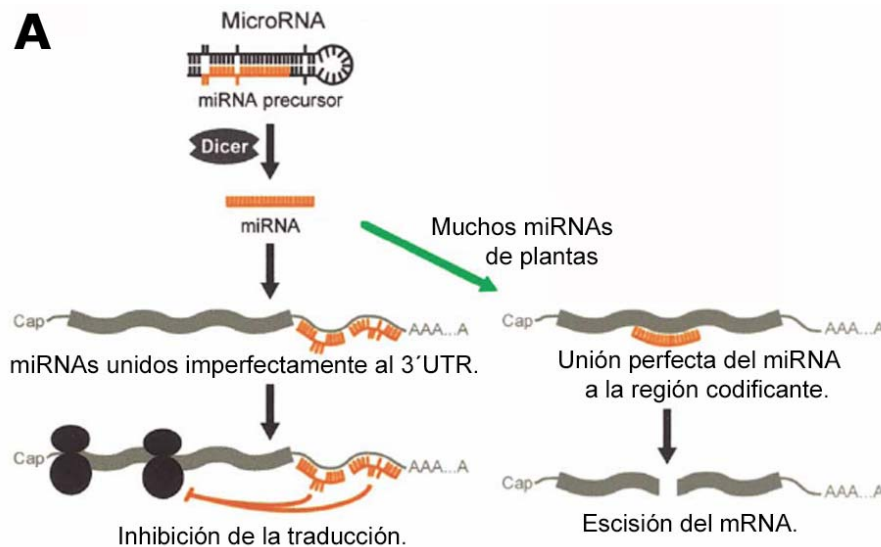


Figura 18. Esquema de las dos formas de acción de los miRNA. Esquema basado en lo publicado por (Rhoades y col. 2002).

i) Escisión de mensajeros mediada por miRNA

El corte del mRNA por parte del complejo RISC se da entre las bases homólogas a las bases 10 y 11 del miRNA (Elbashir y col. 2001; Hutvagner y Zamore 2002; Llave y col. 2002; Kasschau y col. 2003). El sitio de corte no cambia cuando el miRNA no aparea perfectamente en su extremo 5' (Kasschau y col. 2003; Palatnik y col. 2003). Por lo tanto el sitio de corte aparentemente está determinado por la secuencia del miRNA más que por la interacción miRNA-gen blanco.

Luego del corte, el miRNA permanece intacto y puede dirigir a RISC a cortar otras moléculas de mRNAs "targets" (Un mismo RISC puede cortar muchas moléculas). Los fragmentos resultantes del mRNA son degradados ya que uno de los fragmentos no se encuentra poliadenilado y el otro no posee "CAP", por lo tanto son reconocidos como aberrantes por la maquinaria celular. Todos estos pasos ocurren en el citoplasma.

ii) Inhibición de la traducción

Si bien se han realizado grandes esfuerzos en ese sentido, no se ha terminado de dilucidar de manera detallada cómo es que el miRNA produce la inhibición de la traducción de los mRNA blanco. Sin embargo a principio del 2007, Arianne Heinrichs (Heinrichs 2007) publicó una muy interesante carta de opinión titulada "Lost in translation" (en referencia a la película dirigida por Sofía Coppola) donde enfatiza el trabajo de dos grupos que demuestran que los miRNAs y los mRNAs blanco están presentes en polisomas, incluso cuando la síntesis de proteínas está inhibida. Nilsen y col. analizaron la distribución de la acumulación de diferentes miRNAs en células HeLa y encontraron que la mayoría de los miRNAs sedimentaban con polisomas activos en gradientes de sacarosa (Maroney y col. 2006).

El segundo grupo, liderado por Richter, también demostró sedimentación conjunta de polisomas activos y miRNAs en gradientes de sacarosa (Nottrott y col. 2006). A su vez, con una serie de experimentos de inmunoprecipitación demostraron que el polipéptido naciente proveniente de un mRNA controlado por un miRNA es destruido inmediatamente o enmascarado por otras proteínas o de alguna manera se pierde en el proceso de traducción.

Por lo tanto, si bien la inhibición de la traducción todavía no puede ser muy bien explicada, seguramente en los próximos años se realizarán nuevos hallazgos que permitirán avanzar en el conocimiento de este proceso (Maroney y col. 2006; Nottrott y col. 2006).

f) Predicción de genes blanco de miRNAs

La gran mayoría de los genes blanco de los miRNAs han sido identificados por medio de programas de bioinformática (Bentwich 2005; Rajewsky 2006; Sethupathy y col. 2006). Estos programas básicamente buscan, por homología de secuencia, en un mRNA, un fragmento limitado (aproximadamente de 21 pb) complementario a un determinado miRNA. Estos programas tienen en cuenta la cantidad de bases no apareadas y la localización de las mismas, ya que como ya se mencionó, para algunas posiciones del miRNA no se permiten errores de apareamiento, mientras que para otras sí.

En plantas, la complementariedad mRNA-miRNA es casi perfecta; esta cualidad permitió reconocer más fácilmente los RNAs blancos que para el caso animal (Rhoades y col. 2002; Schwab y col. 2005). A su vez, como el mecanismo más común de represión de los miRNAs de plantas es por escisión se puede verificar experimentalmente el sitio donde se aparea el miRNA predicho utilizando la técnica de 5'-RACE.

En el caso del reino animal, la identificación bioinformática tiene un grado mayor de complejidad ya que los miRNAs animales reconocen genes blancos con un mayor número de bases desapareadas entre el miRNA y el blanco o "target" (Bentwich 2005; Rajewsky 2006; Sethupathy y col. 2006). Por otro lado, se pueden utilizar con el mismo fin algoritmos de genómica comparativa (Rajewsky 2006). Por ejemplo, la conservación estimada entre "targets" de humanos, chimpancés, ratones, ratas y perros es del 50 al 85% (Kouassi y col. 2006; Rajewsky 2006).

Este tipo de programas únicamente busca "targets" directos o primarios, es decir los mRNAs que son reconocidos por el miRNA. Sin embargo existen genes "target" secundarios o indirectos, los cuales están regulados por "targets" directos de miRNA y no por los miRNAs. Como es de suponer estos "targets" secundarios no pueden ser encontrados utilizando programas bioinformáticos.

El miRanda (Enright y col. 2003) es uno de los programas más utilizados para buscar "targets", pero sin embargo existen varios programas más y su número probablemente aumente en un futuro cercano (Rehmsmeier 2006; Hsu y col. 2007).

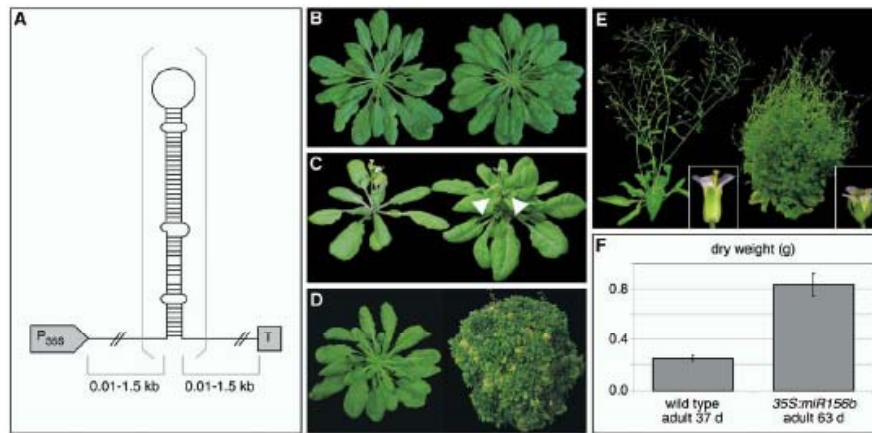


Figura 19. Sobre expresión de miRNAs. (A) Construcción plasmídica para sobre expresar distintos precursores de miRNAs, utilizando el promotor 35S y el precursor del miRNA. (B-F) A la izquierda plantas no transgénicas y a la derecha plantas transgénicas sobre expresando el miR156b en día corto (B-D) y en día largo (C-E). (F) Promedio del peso seco de dichas plantas (Schwab y col. 2005).

g) Rol regulatorio de los miRNAs

Los primeros miRNAs se descubrieron en *C. elegans* y se demostró que bloqueaban la traducción de ciertos mRNAs blanco porque se unían a la región 3'NC de los mismos (no presentan complementariedad perfecta). En este caso, los mRNAs blanco resultaron ser importantes reguladores del desarrollo (Olsen y Ambros 1999; Grishok y col. 2001). Es muy difícil asignar a los miRNAs un único rol porque día a día se descubre que los miRNAs intervienen en un creciente número de procesos celulares. En plantas se conocen una gran cantidad de miRNAs involucrados en el desarrollo debido a que es relativamente sencillo detectar fenotipos aberrantes (Palatnik y col. 2003; Schwab y col. 2005). Sin embargo se conocen además miRNAs relacionados con el metabolismo. También se debe mencionar la existencia de miRNAs que se inducen por sequía, salinidad etc (Chiou 2007; Sunkar y col. 2007; Zhao y col. 2007). Para analizar el rol de los miRNAs en plantas, la primera estrategia desarrollada fue la expresión transgénica de los precursores controlados por el promotor constitutivo 35S. En la mayoría de los casos, la sobre expresión del miRNA produjo una alteración en la acumulación de los “targets” del miRNA sobre expresado. Esto permitió observar fenotipos relacionados con la acumulación alterada de los “targets” directos del miRNA. Como se ve en la figura 19 a modo de ejemplo, la sobre expresión del miR156b causó grandes cambios fenotípicos (Schwab y col. 2005).

La segunda estrategia desarrollada, fue expresar “targets” de miRNA mutados en la región reconocida por el miRNA de manera que estos “target” mutantes no eran reconocidos y por lo tanto no estaban regulados por el miRNA (Jones-Rhoades y col. 2006). Como resultado de estos estudios se pudo demostrar la función de muchos “targets” y como la pérdida del control de los miRNA podían

provocar severos cambios morfológicos (Laufs y col. 2004; Mallory y col. 2004a; Mallory y col. 2004b).

Por otro lado, así como muchos seres vivos, los virus también codifican para miRNAs. Existen virus de mamíferos que poseen en su genoma su propio grupo de miRNAs que controlan directamente la regulación de algunos genes virales así como también algunos genes del huésped. La capacidad de un virus de codificar miRNAs fue descrita por primera vez para el virus de Epstein-Barr en el 2002 (Pfeffer y Voinnet 2006) y posteriormente en herpesvirus, cytomegalovirus humano, gamma herpesvirus 68 de ratón, virus herpes simples 1 y virus 40 de simio (Dinant y col. 1998; Dunoyer y col. 2002; Samols y col. 2005; Gupta y col. 2006; Pfeffer y Voinnet 2006; Fahlgren y col. 2007).

Si bien la capacidad de los virus de codificar miRNAs que controlan la regulación de sus genes y los del huésped, es una clara evidencia de la asombrosa adaptación y de la interacción entre el huésped y el virus; por motivos de espacio y focalización estos temas no se profundizarán en esta Tesis, pero es un tema de gran importancia y muy atractivo de estudiar. A partir de estos estudios se podrían encontrar genes virales y de plantas involucrados directamente en la interacción.

i) Efecto de las proteínas supresoras de PTGS sobre los miRNAs

Existen múltiples evidencias de que los supresores de PTGS virales no solamente afectan a la vía de los siRNAs sino también a la vía de los miRNAs (Chapman y col. 2004; Chen y col. 2004a). Esto no resulta sorprendente dado que, como se explicó anteriormente, ambas vías tienen varios elementos o pasos en común (Fig. 9). Como resultado del efecto de los supresores sobre la vía de los miRNAs se producen defectos de desarrollo de la planta, incluyendo la pérdida de la polaridad en las hojas, la pérdida del control de la división celular o disfunciones reproductivas (Fig. 20). La infección sistémica de plantas por virus o la expresión de determinadas proteínas virales en plantas transgénicas a menudo resulta en síntomas de la enfermedad que se asemejan a los fenotipos mencionados. Por ejemplo, la expresión del supresor de PTGS de Potyvirus HC-Pro en plantas transgénicas de *Arabidopsis* produjo una dramática acumulación (de entre 2 y 10 veces) de 4 miRNAs, lo cual posiblemente tiene implicancias en la patogénesis viral (Chapman y col. 2004; Dunoyer y col. 2004).

A partir de estas observaciones, diferentes autores han propuesto que los virus no solo interfieren con las rutas de los sRNAs (posiblemente miRNA) sino que también pueden llegar a hacer uso de ellas, para controlar determinados genes del huésped. (Kasschau y col. 2003; Szitty y col. 2003; Chapman y col. 2004; Dunoyer y col. 2004; Gong y col. 2004). Como ya se ha dicho, un solo miRNA puede controlar a muchos genes. Por lo tanto, si el virus puede controlar un grupo (o a todos) de miRNAs, estaría controlando un gran número de genes; los cuales a su vez podrían llegar a estar relacionados con resistencia o sintomatología. Dentro de este contexto, se plantearon dos hipótesis o posibilidades. La primera postula que se trata de una ventaja adaptativa, la cual ha seleccionado la capacidad del virus a alterar los miRNAs. Esta ventaja podría ser vista tanto del lado viral como del huésped, proponiendo que diferentes “targets” (directos o indirectos) podrían favorecer/disminuir la

infección viral. Sin embargo, como todos los virus analizados hasta ahora poseen supresores de PTGS, no se podía descartar una segunda hipótesis, que postula que la alteración de los miRNA es simplemente un efecto secundario o lateral (Chapman y col. 2004; Dunoyer y col. 2004; Silhavy y Burgyan 2004; Dunoyer y Voinnet 2005; Voinnet 2005). Los supresores de PTGS interrumpen o modifican la vía de los siRNAs, como esta vía tiene muchos pasos en común con la de los miRNA, los supresores podrían alterar a los miRNA simplemente como efecto secundario de la vía de los siRNA (Chapman y col. 2004; Dunoyer y col. 2004; Silhavy y Burgyan 2004; Dunoyer y Voinnet 2005; Voinnet 2005). Por lo tanto, esta hipótesis no plantea que alterar los miRNAs sea una ventaja adaptativa de los virus, sino simplemente una consecuencia de la acción de supresores de PTGS como respuesta en contra del sistema de defensa de las plantas (Chapman y col. 2004; Dunoyer y col. 2004; Silhavy y Burgyan 2004; Dunoyer y Voinnet 2005; Voinnet 2005).

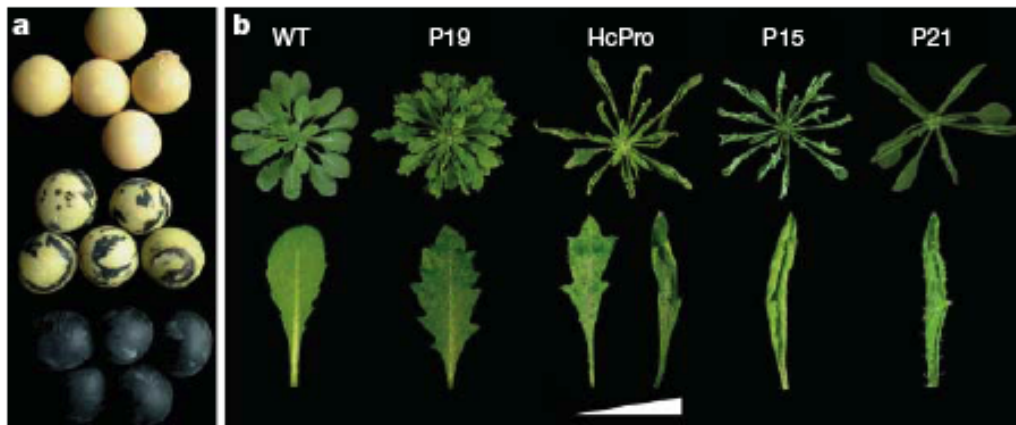


Figura 20. (A) Las manchas de las semillas de soja se generan en semillas infectadas con virus portadores de proteínas supresoras de PTGS. En semillas la chalcona sintetasa se encuentra silenciada naturalmente (semilla blanca); al expresar proteínas supresoras de PTGS, el color blanco desaparece (semillas oscuras). (B) Plantas de *Arabidopsis* expresando diferentes supresores de PTGS (Voinnet 2005).

En medio de esta dicotomía, esta Tesis muestra, por primera vez, que virus y proteínas virales sin actividad supresora de PTGS detectable, también pueden alterar la acumulación de miRNAs. Por lo tanto, provee evidencias fuertes que sorpotarían la primer hipótesis planteada, sugiriendo que la capacidad de alterar a los miRNA podría conferir una ventaja adaptativa y que es independiente de la capacidad supresora de PTGS.

Materiales y métodos

Material vegetal utilizado

Se utilizaron plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* Xanthi-*nn* que expresaban diferentes CPs de TMV, la CP^{WT} (línea 3646;(Abel y col. 1986)), CP^{T42W} (línea *nn* T42W; (Bendahmane y col. 1997)), CP^{T28W} (línea *nn*T28W; (Bendahmane y col. 1997)), y dos líneas: MPxCP^{T42W} y mp_xcp^{T42W*}, líneas homocigotas provenientes de un cruzamiento entre la línea CP^{T42W} y línea 277. La línea 277 transgénica para la MP de TMV (Deom y col. 1990).

Las plantas *N. tabacum* Samsun *nn* expresando la CP de PVX (línea 6665, (Hemenway 1988)) fueron provistas por Monsanto Company.

Las líneas transgénicas y las líneas salvajes fueron mantenidas en invernáculos o cámaras de cría en condiciones controladas de 24° a 26°C, con ciclos de 16 horas (hrs) luz y 8 hrs oscuridad. En los experimentos donde alguna condición fue modificada, ésta fue informada en la parte de resultados cuando se explica el experimento.

Mantenimiento cultivos celulares

Se utilizaron líneas celulares de tabaco BY-2 que producían CP^{WT}, CP^{T42W} o CP^{T28W} (Bendahmane y col. 2002) y BY-2 no transgénicas.

Los cultivos celulares de BY-2 se repicaron cada 7 días en medio MS (sales de MS 2,2g; KH₂PO₄ 0,2g/l; MYO-Inositol 0,1 g/l; Thiamin-HCL 1mg/l; 2,4D 0,2mg/l; Sucrosa 30g/l; MES 2 g/l; pH 5,8 ajustado con KOH para su mantenimiento. Los cultivos se crecieron a 28 °C con agitación a 130-150 rpm.

Preparación de protoplastos a partir de células BY-2

Se tomó un cultivo de células BY-2 de 2-3 días a partir de una dilución 1/10 de un cultivo saturado y se transfirió a un tubo descartable estéril de 50 ml.

-Se dejó decantar las células por 10 minutos (min).

-Se retiró el medio de cultivo y las células se resuspendieron en manitol 0,4M.

-Se mantuvo a temperatura ambiente o en una cámara a 30 °C durante 10 min, para provocar la plasmólisis celular.

-Se retiró el manitol y se adicionó la solución enzimática estéril (manitol 0,4M; celulasa Onozuka RS 1% (Japón); pectoliasa Y-23 0,1% (Japón)).

-Se transfirió a una placa de Petri estéril y se mantuvo a 28 °C por 2,5-4 hrs. Luego de los primeros 30 min se aspiró y liberó varias veces con una pipeta de 10 ml de punta gruesa la suspensión celular para liberar los conglomerados de células que pudieron haberse formado.

-Se centrifugó a 6000 g por 5-7 min, se descartaron los restos de solución enzimática y se agregó manitol 0,4M hasta completar la mitad del tubo.

-Se resuspendió y centrifugó a 6000 g y se retiró el manitol dejando las células en mínimo volumen.

-Se realizó el recuento del número de células en un hemocitómetro.

Electroporación.

-Se prepararon alícuotas conteniendo aproximadamente 1×10^6 células/ tubo en el caso de electroporar DNA y 1.5×10^6 células/ tubo cuando se electroporó RNA. Se centrifugaron a 6000 g y se removió el medio.

-Se adicionó a cada alícuota 0,6 ml de buffer de electroporación (manitol 0,3M, MES 5mM pH=5,8, KCl 70 mM).

-Se mezclaron con 10 μ g de DNA o la mitad de una reacción de transcripción *in vitro* previamente diluídos en 0,2 ml del mismo buffer de electroporación.

-Se transfirieron las células más el ácido nucleico a la cámara de electroporación.

-Se aplicó la descarga de voltaje (125 μ F, 300 V, utilizando el BioRad Gene Pulser, BioRad, USA)

-Se transfirió la mezcla al tubo original y se la mantuvo en hielo por 30 min.

-Se transfirieron por 5 min a temperatura ambiente, luego se les adicionó medio de cultivo de protoplastos (sales de MS 2,2g/l, tiamina-HCl 1 mg/l, mio-inositol 0,1g/l, sacarosa 10g/l, manitol 72,88 g/l, 2,4D 0,2 mg/l, pH=5,8) hasta una densidad $1-2 \times 10^5$ protoplastos/ml

-Se alicuotaron las células electroporadas en placas de Petri y se las incubó en oscuridad o iluminación muy suave a aproximadamente 28 °C.

Preparación de protoplastos de hojas

Se desinfectan hojas jóvenes con el siguiente esquema: se realizan varias inmersiones de 30 segundos en Etanol 70% y luego 5 min en lavandina 20%. Luego se realizan al menos 3 lavados con agua estéril y se deja secar las hojas en papel estéril. Este proceso se realiza en flujo laminar para mantener la esterilidad. Se cortan las hojas en fragmentos 1 a 2 mm², procurando no utilizar nervaduras. Se agrega una solución de Celulasa R-10 1%; Macerozima R-10 0,25%; Dextran Sulfato (potasio) 0,5%; Manitol 0,6M; pH 5,8. Se las incuba a 25 °C por 14 a 16 hrs en oscuridad. Se filtra la solución con el tejido en un embudo con una gasa o miracloth (estéril). Se centrifugan a 250 rpm (30g) por 30 min (Sin freno). Se resuspende cuidadosamente el precipitado en 20 ml de manitol 0,6M frío.. Se centrifugan a 250 rpm por 3 min. Se repite este paso una vez más. Finalmente, se resuspende el precipitado en 10 ml y se cuentan las células utilizando una cámara citométrica.

Electroporación:

Se separan alícuotas de 5×10^5 protoplastos. Se centrifugan y resuspenden en 0,6 ml de MES/KCl/0,55M manitol. Se agregan 0,2 ml del inóculo en MES/KCl/0,55M manitol. Se electroporan a 1500V/0,5 mF/ resistencia libre.

Extracción de RNAs de bajo peso molecular e hibridación

Se muele 1 g de tejido utilizando un mortero con suficiente N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Se homogeniza el tejido con 10 ml de Trizol (Invitrogen). Se incuba el homogenato 5 min a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12,000 x g por 10 min entre 2 y 8 °C. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo. Se agregan 3 ml de cloroformoy se agitan vigorosamente los tubos con la mano por 15 segundos y se incuban a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugan las muestras a 12,000 x g por 15 min a 4 °C y se conserva únicamente la fase superior (RNA). Las proteínas y DNA permanecen en la fase orgánica (fenol:cloroformo). Se repiten los pasos anteriores hasta que la interfase sea totalmente transparente; por lo general se repite dos veces (3 extracciones en total). Se transfiere la fase acuosa (fase superior) a un tubo nuevo (tipo Corex) y se agrega 1 volumen de isopropanol frío. Se incuban las muestras por 20-30 min a temperatura ambiente y luego se centrifuga a 9,000 rpm por 15 min a 4°C. Se remueve el sobrenadante y se seca el precipitado al aire. El RNA (precipitado) se resuspende en 60-80 µl de H₂O tratada con DEPC. Posteriormente, se conservan a -80 °C.

Geles de RNA de bajo peso molecular

Se prepara un gel de polyacrilamida 17% conteniendo 7 M Urea en 0.5X TBE. Se deja polimerizar por 1 hora y luego se lo pre-corre a 180 volts en 0.5X TBE buffer por 1 hora. Se limpian las calles con una pipeta.

Preparación de las muestra de sRNA para cargar el gel

Se calientan las muestras a 95 °C por 4 min e inmediatamente se ponen en hielo. Se les agrega buffer de carga: 2 volúmenes de formamida: 1 volumen 5X BPB buffer. Se siembran 10 µg de RNA total por calle (1.5 volúmenes del buffer de carga). No se debe superar un volumen total de 25µl por calle para una buena resolución. Se corre el gel a 180 volts en 0.5X TBE buffer hasta que el colorante llegue casi hasta el final del gel.

Transferencia de los sRNA a membrana

Se tiñe el gel una vez terminada la corrida con una solución de EtBr en 0.5X TBE por 5 min, y se observa y cuantifica el RNA total en un transiluminador UV. Luego se usa 0.5x TBE como buffer de transferencia y se transfiere por 1 hora a 50 Volts en equipo de transferencia de inmersión. Se utiliza una membrana de nitrocelulosa de marca NEL.

Pre-hibridación, marcado, e hibridación

La solución de PreHib/Hib (50 ml por membrana: 25 ml para prehibridación y 25 ml para hibridación) utilizada fue la siguiente: 5X SSC; 20 mM Na₂HPO₄ pH 7.2; 7% SDS; 2X Denhardt. A los 25 ml de solución de pre-hibridación se le agrega 1 mg de esperma de salmón desnaturalizado (100 µl del stock 10mg/ml). Se prehibridiza la membrana a 50 °C por al menos 2 horas.

Marcación de la sonda radioactiva

Se prepara la siguiente reacción: 2 µl del oligómero 10 mM, designado como sonda (~20mer, 20 pmoles); 2 µl 10X T4 PNKinase Buffer; 2 µl 32P g-ATP, >7000Ci/mmoles; 13 µl dH₂O y 1 µl T4 Poly Nucleotide Kinase. Se incuba durante 1 hr a 37 °C. Se utiliza una columna comercial adecuada (Qiagen) para separar los nucleótidos no marcados de la sonda. Finalmente, se desnaturaliza la sonda con NaOH y se procede a agregarla al tubo con la membrana prehibridada.

Solución de lavado de membranas de sRNA

Se utiliza una solución de baja astringencia (3X SSC; 25 mM NaH₂PO₄ pH 7.5; 5% SDS y 10X Denhardt). Se realizan 3 lavados de 10 min y se comprueba con Geiger el nivel de marca radioactiva remanente, o con un escaneo rápido en un “Phosphor Imagen”, se pueden hacer lavados de 30 min si aun queda pegado inespecífico. La membrana se expone durante toda la noche en un “Phosphor Imagen”.

Infecciones

Para las infecciones virales se usó una hoja expandida, se espolvoreó carborundum (limaduras de hierro), se inocularon 20 µl de solución viral diluida en 20 mM NaHPO₄ (pH 7) y por último se raspó delicadamente las hojas inoculadas con el dedo.

Transcripción in vitro

El clon (plásmido DNA) infectivo de TMV o PVX, codificando todo el genoma de cada uno de los virus bajo un promotor de transcripción fue linealizado con las enzimas *KpnI* o *SpeI* respectivamente. Al DNA linealizado se lo limpió de posibles RNAsas mediante una extracción con fenol-cloroformo, luego con otra de cloroformo y por último precipitando el DNA con EtOH y acetato de sodio. Se realizó la transcripción *in vitro* utilizando el kit MEGAscript Transcription (Ambion, Austin, TX), como se detalla en el manual. Las reacciones fueron suplementadas con m⁷G(5')ppp(5')G Cap Analog (Ambion).

Los transcriptos producidos *in-vitro* fueron diluidos (1/2) en PBS y 20 µl fueron esparcidos en microgotas sobre la hoja previamente espolvoreada con carborundum. Posteriormente, se acarició la hoja con un dedo (utilizando guantes) esparciendo el virus.

Bombardeo

El clon PVX-YFP, el cual contiene bajo el promotor 35S al genoma de PVX con la YFP clonada sobre el promotor duplicado de la CP viral (Fig. 23) fue bombardeado sobre hojas para realizar su inoculación. Las partículas fueron disparadas con el cañón génico PDS-1000/ He System gene-gun (Bio Rad). Aproximadamente 3 µg de plásmido fueron pegados a partículas de oro y luego resuspendidas en 95% de etanol por medio de sonicación o por vortex. Las partículas con el DNA unido fueron depositadas sobre membranas plásticas (Bio Rad) y aceleradas hacia las hojas de las plantas a 450-ms pulsos de helium (450 psi).

Cuantificación viral

Acumulación de la proteína viral

La proteína total fue extraída de protoplastos u hojas utilizando buffer fosfato salino (pH 7.2), fueron cuantificadas utilizando el kit Quick Start Bradford Protein Assay de Bio Rad. Los extractos proteicos fueron utilizados para ensayos de ELISA. En los ensayos para detectar CP de TMV, se pegaron los extractos a placas de ELISA y luego se utilizó un antisuero contra CP de TMV (realizado en conejo) como anticuerpo primario. Como segundo anticuerpo se utilizó uno realizado en Cabra el cual reconoce a los anticuerpos de conejo, este anticuerpo se encontraba conjugado con peroxidasa de rabanito, la reacción fue detectada utilizando 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiaziline) 6-sulfonic acid.

Para detectar la CP de PVX, un antisuero para la CP de PVX realizado en oveja fue pegado en placas de ELISA toda la noche, luego se agregaron los extractos proteicos y se incubaron por 2 horas. Posteriormente, se incubó con un segundo anticuerpo anti-CP de PVX CP extraído de conejo. Finalmente se utilizó un anticuerpo anti conejo realizado en cabra conjugado y se detectó la reacción como se describió anteriormente para el ELISA contra CP de TMV.

Los ELISA contra PVY fueron realizados como recomienda la empresa (BIOREBA AG, Switzerland).

Los Western-blot fueron realizados como se describe en (Sambrook y col.). Rápidamente, se extrajeron proteínas con PBS, se sembraron en un gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) y se separaron las proteínas por electroforesis. Posteriormente, se electro transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con TBS leche descremada 5%. Las inmuno-detecciones fueron realizadas utilizando antisuero policlonal de conejo que reconocía a la MP o CP de TMV o a la CP de PVX. Luego se utilizó un segundo anticuerpo anti conejo conjugado con la fosfatasa alcalina y se visualizó la reacción con la tinción de NBT-BCIP (Promega). Una solución de rojo Ponceau S fue utilizada para confirmar los niveles de proteína total sembrada. Para los “Dot-blot”, se transfirieron los extractos proteicos a una membrana de nitrocelulosa mediante vacío. La inmuno detección se realizó con un primer suero policlonal de conejo anti CP de PVX. Posteriormente se utilizó un anticuerpo de cabra anti conejo conjugado con fosfatasa alcalina, los niveles de detección se visualizaron mediante la reacción con NBT-BCIP (Promega).

Acumulación de RNAs virales

El RNA total fue purificado a partir de 5×10^5 células BY-2 utilizando el kit comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Aproximadamente 5 μ g de RNA fueron separados en geles de 1.6 % de agarosa conteniendo 6% de formaldehído. Posteriormente el RNA fue electro transferido a una membrana Hybond-XL (Amersham-Pharmacia Biotech). Fragmentos de DNA codificando para el TGB y CP (n.t. 5427-5796) de PVX fueron marcados con 32 P y utilizados como sonda. La intensidad de las distintas bandas detectadas (genómicas y sub-genómicas) fueron cuantificadas mediante un

Typhoon Imager (Amersham-Bioscience), y los datos fueron normalizados con los niveles de rRNA sembrados en el gel.

Cuantificación de mRNA transgénico de la CP de PVX

El RNA total fue purificado a partir de hojas transgénicas y no transgénicas expresando la CP de PVX inoculadas y no inoculadas con PVX. Las extracciones se realizaron utilizando Trizol (Invitrogen) como se describe en el manual del producto. Aproximadamente 10 µg de RNA total fueron separados en un gel de agarosa como ya se ha descrito anteriormente. Como sonda se utilizó la secuencia de la región no traducible de mRNA transgénico correspondiente a la señal de terminación de la transcripción (E9 3') de un gen de arveja. Esta fue la única secuencia que diferenciaba entre el mRNA transgénico y el viral de la CP de PVX. La sonda se marcó con ^{32}P y la banda se detectó con un Typhoon Imager (Amersham-Bioscience).

Análisis de fenotipo

Para el análisis de crecimiento y germinación de semillas, tres experimentos independientes fueron realizados. Más de 375 semillas fueron plantadas en tierra a 24-26 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. El número de plántulas y fenotipos fueron analizados a lo largo de 15 días pero fueron reportados a los 11 días luego de plantar las semillas. Los injertos fueron realizados con plantas de 5 semanas. Para esto, se cortó el pie en ángulo recto y se realizó un corte longitudinal. El injerto se cortó en forma de cuña y se introdujo en el corte longitudinal del pie. La unión se fijo con papel parafilm.

Experimentos de BIFC

Los fragmentos de YFP codificando para los aminoácidos (aa) del 1 al 155 (Fragmento amino terminal, N) y desde el aa 155 al 239 (Fragmento carboxi Terminal, C) fueron amplificados por PCR utilizando primers que agregaron cinco glicinas y un sitio de restricción BamHI. Estos fragmentos se clonaron en el vector pMON999 (pMON-YFP^N y pMON-YFP^C). La MP y la CP^{T42W} de TMV fueron amplificadas por PCR para eliminar el codón stop de la traducción y agregar el sitio de restricción BamHI en el marco de lectura correcto. El producto de PCR se clonó dentro del vector pMON999 con los fragmentos N o C de YFP previamente clonado. Finalmente los casetes de expresión fueron clonados en el vector binario pART, resultando en MP-YFP^N, MP-YFP^C, CP-YFP^N, CP-YFP^C, E-YFP^N y E-YFP^C. Las E corresponden a “empty”, por vacío en inglés y solo expresan los fragmentos de YFP. Todas las construcciones fueron transferidas *A. tumefaciens* cepa GV3101 e infiltrados en hojas de cuatro semanas de *N. benthamiana* utilizando una densidad óptica (OD) 600 de 0,5. La señal de YFP fue fotografiada entre los 2 y 4 días luego de la infección.

Estudios de PTGS

Ensayos de análisis de supresión de PTGS por infecciones virales

Plantas de *N. benthamiana* transgénicas para GFP (líneas 16c) de dos semanas (muy pequeñas) fueron agroinfiltradas con una construcción expresando la secuencia duplicada e invertida de GFP interrumpida por un intrón (35-dsGFP) utilizando una OD600 de 1. Por lo tanto plantas totalmente silenciadas (mínimo de 25 plantas) fueron inoculadas con cada uno de los virus en por lo menos tres experimentos independientes. Cuando las plantas mostraron síntomas virales, se observó bajo la luz ultravioleta para evaluar el nivel de fluorescencia proveniente de GFP. Se contó el número de plantas donde se revirtió el silenciamiento (GFP).

Ensayo de supresión de PTGS sistémico

Para analizar la posible actividad supresora de PTGS sistémico, se agroinfiltraron dos tipos de construcciones en la línea 16C (GFP), como se detalló anteriormente. Se utilizó la construcción 35S-dsGFP para gatillar PTGS de GFP y otra construcción expresando la proteína de interés (OD600=0.5). Entre los 16 a 18 días luego de la co-agroinfiltración, se contó el número de plantas donde se registraba señal de PTGS, sistémico, es decir silenciamiento de GFP en las hojas superiores.

Para analizar si la MP y/o CP^{T42W} de TMV podían suprimir el PTGS, se amplificaron por PCR a partir de la construcción pTMV-^{CP}T42W (Bendahmane y col. 1997), y fueron clonados en pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega), luego sub-clonados vía EcoRI dentro del vector pMon999, y finalmente dentro de pART27 vía NotI. Las construcciones resultantes se denominaron 35S-MP y 35S-CP^{T42W}, respectivamente.

Para los experimentos de PTGS local, volúmenes iguales de cultivos de *A. tumefaciens* cultivos (OD600 = 1 para 35-GFP y 35-dsGFP; OD600=0,3 para 35-Hc-PRO; 35S-MP y 35S-CP^{T42W}) fueron mezclados y agroinfiltrados en hojas grandes de *N. benthamiana* (no transgénicas). La aparición de fluorescencia, fue registrada y fotografiada a partir del 2^{do} o 3^{er} día. Para mayor detalle sobre las metodologías de trabajo (Bazzini y col. 2007b).

Construcción del miR artificial para GFP

In silico se creó el miR-GFP, reemplazando el miR164 maduro por las 21 pb de GFP y el miR164* por la secuencia complementaria al miR-GFP. Luego, mediante el programa RNA-fold se calculó la energía libre y entalpía del precursor del miR164a. Posteriormente se realizaron mutaciones puntuales sobre el miR-GFP* para obtener la secuencia que poseía la misma estructura y energía libre y entalpía mas parecida al miR164a. Una vez obtenida la secuencia deseada del precursor del miR-

GFP, se envió la secuencia a la compañía TOP gene Technologies quien sintetizó y clonó el fragmento deseado. En los extremos del precursor de miR-GFP se incluyeron sitios de restricción para sub clonarlo. El fragmento se liberó con SpeI y EcoRI y se sub clonó en el vector pMON999 en los sitios XbaI y EcoRI entre el promotor 35S y el terminador t-NOS. Finalmente se clonó el cassette de expresión en el vector binario pART. Por último se transfirió el clon elegido a *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 con la cual se realizaron las agroinfiltraciones. Las agroinfiltraciones se realizaron con una OD de 0.5, y las muestras u observaciones se realizaron a los 3 días.

Objetivos

El objetivo general fue profundizar los conocimientos de las bases moleculares de la relación hospedante-patógeno. Entender la relación hospedante-patógeno es de vital importancia para proponer estrategias antivirales efectivas o perfeccionar las que se emplean en la actualidad. Se enumerarán los objetivos específicos de cada una de las secciones que componen este trabajo.

- 1) Determinar el modo de acción de la CP-MR heteróloga en el caso de PVX con TMV y viceversa. Explorar qué efectos causa la expresión de la CP de PVX en la infección con TMV. Asimismo, la expresión de la CP de TMV sobre la infección de PVX. Se analizará si la replicación y/o movimiento viral se ven afectados en ambos casos. Como objetivo secundario de este capítulo se establecerá si la estructura de la CP transgénica modifica los efectos sobre la infección por parte del virus no relacionado.
- 2) Establecer si el silenciamiento post-transcripcional juega un rol importante en la resistencia mediada por CP de PVX. Para ello, se determinará si las plantas expresando la CP de PVX y pre-infectadas con PVY (portador de un supresor fuerte de PTGS) continúan siendo resistentes a PVX. También se establecerá si las plantas expresando la CP de PVX son resistentes a PVX a bajas temperaturas (considerando que las bajas temperaturas inhiben el silenciamiento post transcripcional). Por último se determinará si la acumulación del mRNA de la CP transgénica de PVX es reducida por la inoculación con PVX como resultado del posible silenciamiento inducido por el PVX.
- 3) Estudiar los efectos producidos por la co-expresión de la MP y la CP de TMV en plantas transgénicas. Se determinará si la co-expresión de MP y CP^{T42W} de TMV altera el desarrollo de la planta y si altera la acumulación de los miRNAs. A su vez, se analizará si las MP y CP^{T42W} interactúan *in vivo* y si su expresión puede suprimir el PTGS local y sistémico. Como objetivo secundario, se establecerá si la infección con TMV altera la acumulación de miRNAs en plantas de tabaco.
- 4) Determinar si la actividad supresora del silenciamiento viral es esencial para alterar la acumulación de miRNA durante la infección y si ésta tiene alguna implicancia en la severidad de los síntomas. Se establecerá dentro de un grupo de 9 virus distintos el grado de severidad de la infección o síntomas que puede generar cada uno de ellos, cuál de ellos posee capacidad supresora de PTGS y se estudiará cuales virus alteran la acumulación de miRNAs.

- 5) El último objetivo es explorar la utilización de miRNAs sintéticos como herramienta biotecnológica. Se diseñará un miRNA sintético y se evaluará la actividad específica del mismo *in vivo*.

Resultados

El primer capítulo versa sobre resistencia heteróloga mediada por CP. Describe un grupo de experimentos que muestran cómo la expresión de la CP del virus TMV puede modificar la replicación y movimiento de un virus no relacionado como PVX, y viceversa, es decir explora los efectos de la acumulación de la CP de PVX sobre la infección con TMV.

En el segundo capítulo se desarrollan una secuencia de experimentos que permiten investigar el rol que cumple el PTGS en la resistencia homóloga mediada por CP de PVX.

El tercer y cuarto capítulo abordan el tema de los miRNAs y de su novedosa relación con las infecciones virales. En particular, el tercer capítulo abarca el estudio de una línea transgénica de tabaco que co-expresa la MP y la CP de TMV; dos proteínas que en conjunto son capaces de alterar la acumulación de los miRNAs pero no suprimen al PTGS (siRNA). Ambos capítulos revelan que virus carentes de supresores de PTGS son capaces de alterar los miRNAs y demuestra una interesante correlación positiva entre nivel de alteración de la acumulación de miRNA y la severidad de los síntomas. Estas observaciones permiten finalmente sugerir que las alteraciones en los miRNAs podrían ser la causa de algunos de los síntomas virales o podrían contribuir a la generación de los síntomas virales.

El quinto y último capítulo, muestra brevemente un enfoque aplicado: la utilización de miRNA sintéticos para regular la expresión de genes de interés.

1) Resistencia heteróloga mediada por expresión de CPs.

Como se ha mencionado en la introducción, la expresión de la CP de un virus en una planta transgénica puede conferirle alta protección frente a una infección viral. Este fenómeno es conocido como CP-MR (Beachy 1999). La CP-MR, tiene alta eficiencia cuando el virus desafiante posee similitud estructural con el virus del cual se originó la CP expresada en la planta transgénica (CP expresada e infección del mismo virus o emparentado). En los casos en que la planta transgénica que expresa CP de un virus sea desafiada por un virus no relacionado, generalmente no se observa protección. La similitud estructural depende en cierta medida de la similitud de aminoácidos entre las dos CPs; sin embargo, dos CPs con una similitud aminoacídica baja como la del TMVcg con la CP de TMV-U1 (50% de similitud aminoacídica) pueden tener una similitud estructural muy alta debido a que, a pesar de tener secuencias distintas se pliegan de igual manera en el espacio produciendo estructuras comparables (Wang y col. 1998). Estudios previos han demostrado un retardo en el progreso de la infección de los virus PVX, PVY, CMV y AIMV debido a la expresión de la CP de

TMV en líneas de tabaco (Anderson y col. 1989). Con el fin de explorar el mecanismo responsable de este efecto, en el presente trabajo se realizaron estudios con plantas y cultivos celulares transgénicos expresando distintas CP virales, las cuales se infectaron con virus no relacionados.

En esta primera etapa, se estudió el efecto de la CP de TMV sobre la replicación y el movimiento de célula a célula del virus PVX. Asimismo, se analizó si la estructura de la CP del TMV era responsable de los efectos observados. A continuación, se evaluó si la CP de PVX interfiere con la replicación y movimiento célula a célula de TMV.

a) Efectos de la CP de TMV sobre la infección viral de PVX

i) Las CPs transgénicas de TMV interfieren en la replicación de PVX

Inicialmente se estudió el efecto de diversas mutantes de la CP de TMV sobre la replicación viral de PVX. Para ello, se emplearon líneas celulares de tabaco (BY-2) que expresan constitutivamente diferentes CPs mutantes de TMV: CP^{wt}, CP^{T28W} y CP^{T42W} (BY-CP^{wt}, BY-CP^{T28W} y BY-CP^{T42W}) (Bendahmane y col. 1997). Acorde a lo reportado, el mutante CP^{T42W} tiene aumentada la capacidad de formar agregados con lo que alcanza equilibrios de agregados diferentes a los de la CP^{wt}, en tanto que confiere mayor resistencia a TMV comparado con la CP^{wt} (Bendahmane y col. 1997; Asurmendi y col. 2007). Por otro lado la mutante CP^{T28W} no confiere resistencia a TMV y no es capaz de formar agregados mayores a trímeros o tetrámeros, por lo que tiene un equilibrio de agregación muy distinto al resto de las CPs (Bendahmane y col. 1997). Como ya se ha reportado, la expresión de la CP^{wt} de TMV retrasa la aparición de síntomas de PVX (Anderson y col. 1989) pero no se conoce qué ocurre con las otras mutantes.

En primer lugar, se analizó la acumulación de la CP viral de PVX a distintos tiempos luego de la infección de las líneas celulares ya mencionadas de tabaco BY-2 (BY-CP^{wt}, BY-CP^{T28W} y BY-CP^{T42W}) con el PVX. En la figura 21A se observa que la acumulación de la CP de PVX, se detectó inicialmente por Western-blot a las 11 horas luego de la infección (h.p.i.) en los protoplastos no transgénicos y continuó acumulándose hasta las 24 h.p.i. Por el contrario, en las células que expresaban la CP^{T42W} la acumulación de la CP de PVX fue detectada recién a las 16 h.p.i y continuó incrementando hasta las 36 h.p.i. (Fig. 21A). Para confirmar estos resultados, se cuantificó la acumulación de la CP de PVX en protoplastos expresando las distintas CP mutantes (CP^{wt}, CP^{T28W} y CP^{T42W}) y en los no transgénicos mediante la técnica de ELISA. Como se observa en la figura 21B, la acumulación de la CP de PVX fue menor y más lenta en las células BY-CP^{wt} y BY-CP^{T42W}, comparado con la acumulación en las BY-CP^{T28W} o en las BY no transgénicas.

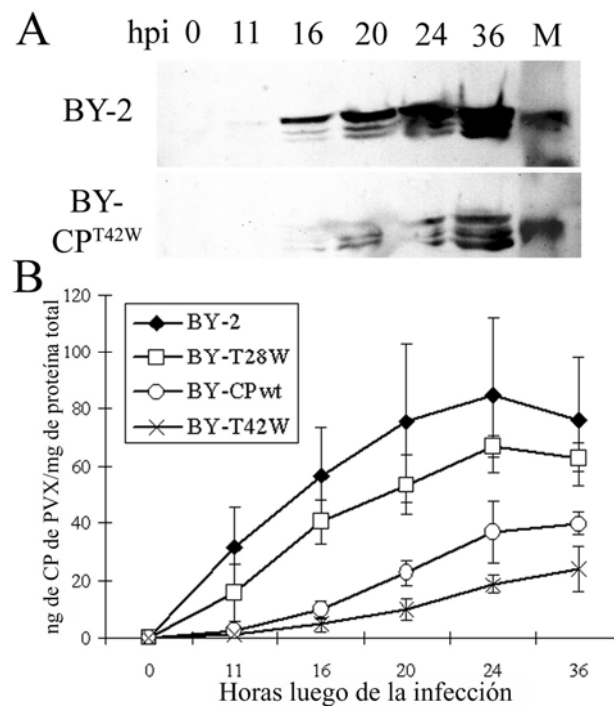


Figura 21. Acumulación de la CP de PVX en protoplastos transgénicos expresando mutantes de CP de TMV y no transgénicos infectados con PVX. **(A)** Western blot mostrando la acumulación de la cápside de PVX a diferentes tiempos luego de la infección de BY-2 no transgénicos y transgénicos expresando CP^{T42W} de TMV (BY-CP^{T42W}). M= marcador de peso molecular 25KDa. **(B)** Cuantificación de la acumulación de PVX en protoplastos no transgénicos y de líneas expresando CP wt o distintas mutantes de CP (BY-CP^{wt}, BY-CP^{T28W} y BY-CP^{T42W}) por ELISA. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes y su respectiva desviación estándar (Bazzini y col. 2006a).

Para determinar a qué nivel actuaban las CPs de TMV al reducir la acumulación de la CP de PVX, se monitoreó la acumulación de los distintos RNA virales en función del tiempo. Se realizó un “Northern blot” para detectar la acumulación a lo largo del tiempo de los diferentes RNAs de PVX en protoplastos de las líneas en estudio infectados con PVX (Fig. 22). Los RNAs de PVX (genómico y dos sub genómicos) fueron detectados con una sonda homóloga al TGB y a la CP de PVX (ver esquema Fig. 23) marcada radioactivamente con ³²P y cuantificados utilizando un scanner de radioactividad *Typhoon Trio*. En la figura 22, paneles B, C y D, se observa una reducción de la acumulación del RNA genómico y de ambos subgenómicos correspondientes a las líneas BY-CP^{wt} y CP^{T42W} comparado a la línea BY-CP^{T28W} y a la no transgénica. Por lo tanto, estos resultados indicarían que la reducción de la acumulación de CP de PVX (Fig. 21) es consecuencia de la disminución de su replicación viral producida o causada por la expresión de la CP de TMV.

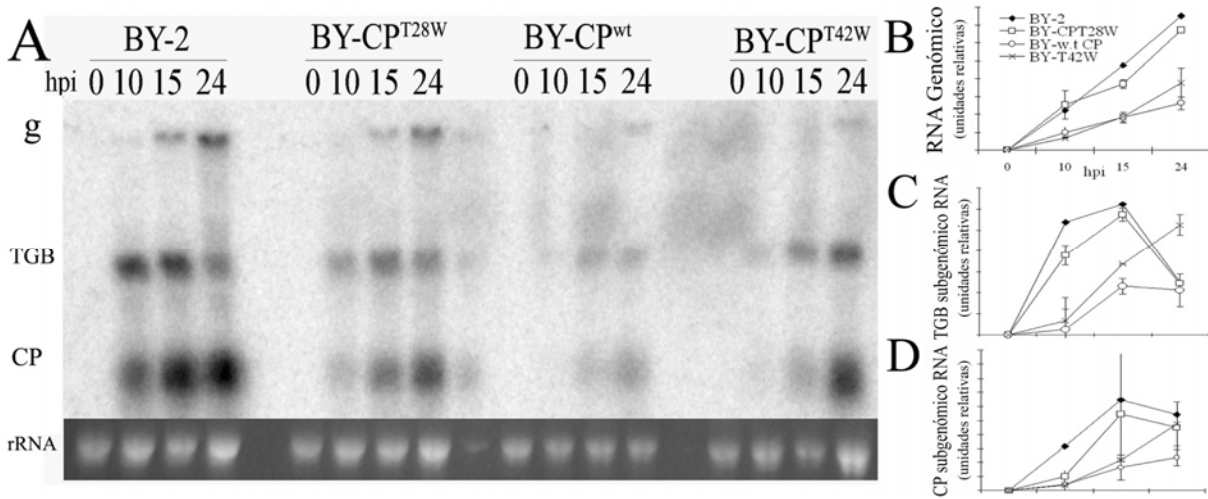


Figura 22. Acumulación de RNA de PVX en protoplastos transgénicos y no transgénicos infectados con PVX. **(A)** Northern blot sobre RNA total extraído de las distintas líneas (BY-CP^{wt}, BY-CP^{T28W} y BY-CP^{T42W}) y no transgénicas utilizando una sonda homóloga al genoma de PVX. Se indican la posición del RNA genómico (g), del triple bloque (TGB) y de la cápside (CP). **(B, C y D).** Acumulación promedio relativa de cada familia de RNA en dos experimentos independientes y su respectiva desviación estándar (Bazzini y col. 2006a).

ii) Las CPs transgénicas de TMV retrasan el movimiento célula a célula del virus PVX

Una vez demostrado que la expresión de la CP de TMV reduce la replicación de PVX en células BY-2 de tabaco, se resolvió analizar si el movimiento célula a célula del virus también estaba afectado. Inicialmente se inocularon con PVX plantas de distintas líneas de tabaco transgénicas para las CPs de TMV (CP^{wt}, CP^{T28W}, CP^{T42W}) que acumulaban niveles equivalentes del transgén (Bendahmane y col. 1997) y no transgénicas como plantas control. Para este ensayo se empleó una variante de PVX que expresa la proteína amarilla fluorescente de aguaviva (YFP) (PVX-YFP) (ver esquema de la construcción en la Fig. 23B). El vector viral empleado ha sido desarrollado por el grupo del Dr. David Baulcombe y contiene un sitio de clonado río abajo del promotor subgenómico de la CP el cual está duplicado de modo que es posible clonar un fragmento de interés y sobreexpresarlo durante la infección viral (Chapman y col. 1992). Este tipo de vectores ha sido utilizado para analizar el movimiento viral en otros sistemas. Para realizar esta parte del trabajo se clonó la YFP dentro del vector viral.

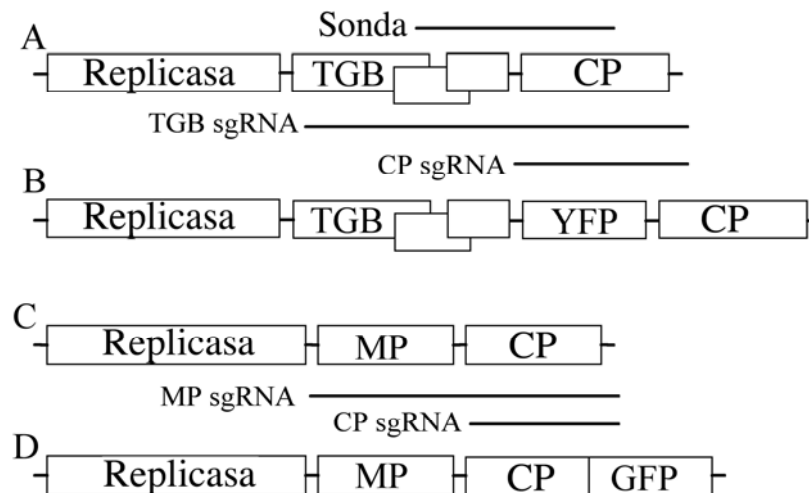


Figura 23. Diagrama esquemático de los virus y mutantes utilizados. **(A)** Genoma de PVX, con sus 5 marcos abiertos de lectura que codifican para la replicasa, los genes del triple bloque (TGB) y cápside viral (CP); se indican los dos RNAs sub genómicos y el fragmento utilizado como sonda para los ensayos de Northern blot. **(B)** PVX-YFP: PVX portando el gen de YFP bajo el control del promotor sub-genómico duplicado de la cápside. **(C)** Genoma de TMV, con sus principales marcos abiertos de lectura: replicasa, proteína de movimiento (MP) y cápside. Se indican los dos RNAs sub genómicos. **(D)** TMV-CP-GFP; GFP fue fusionada al extremo carboxi-terminal de la cápside en el genoma de TMV (Bazzini y col. 2006a).

Las plantas fueron inoculadas con virus purificado o bombardeadas con un clon infectivo de PVX-YFP (clon infectivo, no requiere el paso de desencapsidación). A los 4 días luego de la infección (d.p.i.), se midió el diámetro de los focos de infección utilizando un microscopio estereoscópico de fluorescencia (Fig. 24). En la figura 24 se observa un foco de infección del PVX-YFP. El foco desarrollado en la planta no transgénica es de mayor tamaño comparado al observado en la planta expresando CP^{T42W} . En las plantas CP^{wt} y CP^{T42W} el tamaño e intensidad de los focos de infección fue significativamente menor a aquellos observados en las plantas no transgénicas (Fig. 24B) demostrando que el movimiento célula a célula se encuentra alterado en estas plantas. Estos resultados sugieren que la CP^{wt} y CP^{T42W} interfieren tanto en la replicación como en el movimiento célula a célula del virus PVX. Por el contrario, la CP^{T28W} no presentó ninguna disminución del diámetro ni de la intensidad de los puntos de infección respecto a las plantas no transgénicas. El dato de intensidad, si bien es cualitativo ya que no se puede medir, permite inferir la tasa de replicación, dado que cuanto más virus contenga una célula mayor será la proporción de YFP acumulada. Estos datos son consistentes con lo observado en la figura 22 donde se mostraba que sólo en las líneas de tabaco transgénicas CP^{wt} y CP^{T42W} se registró una disminución de la replicación de PVX.

Los resultados obtenidos en ambos tipos de inoculación (con virus purificado o bombardeo con un clon infectivo), no presentaron diferencias significativas (Fig. 24B). Esto indicaría que el

mecanismo de interferencia mediado por estas CPs sobre el PVX no está relacionado con el desnudamiento del RNA viral como se registrara para el caso de la CP-MR en TMV (Register y Beachy 1988). Cabe recordar que en el caso de la CP-MR homóloga producida en plantas que expresan la CP de TMV, éstas son extremadamente resistentes a desafíos con el virión mientras que no alcanzan altos niveles de resistencia ante el desafío con RNA viral. Por lo tanto, el hecho de no registrar diferencias significativas entre los dos métodos de inoculación permite estimar que la resistencia heteróloga no depende de la desencapsidación viral.

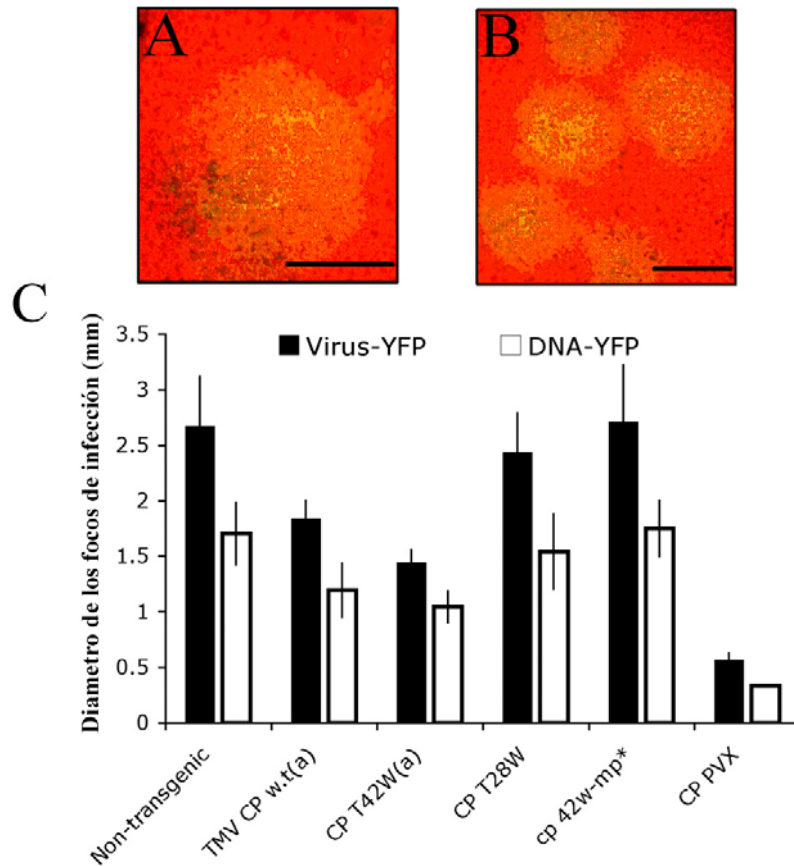


Figura 24. Visualización de los focos de infección del PVX-YFP en hojas de plantas no transgénicas (A) y de plantas transgénicas de tabaco que expresan CP^{T42W} (B) bajo iluminación de luz ultravioleta. (C) Diámetro de los focos de infección en hojas de plantas de tabaco transgénicas y no transgénicas. Diámetro (mm) de los sitios de infección del PVX-YFP visualizado bajo luz azul a 4 días post infección con DNA (PVX-YFP) (barras blancas) o virus (barras negras). CP^{wt} TMV = plantas transgénicas expresando la CP de TMV; CP^{T42W} = CP mutante de TMV; CP^{T28W} = CP mutante de TMV; mp-cp^{T42W*} = línea transgénica silenciada para la expresión de la MP y CP^{T42W}. CP PVX = planta transgénica expresando la CP de PVX. (a) Diferencias significativas entre los tamaños medios de los sitios de infección comparado a los observados en las plantas no transgénicas (*t*, 0.05 con desviación estándar graficada) (Bazzini y col. 2006a).

Como control adicional de este experimento, se utilizó una línea llamada $mpxcp^{T42W*}$ portadora de los genes que codifican para la MP y para la CP^{T42W} de TMV (la descripción de esta planta se ampliará más adelante). Es importante aclarar que si bien la planta $mpxcp^{T42W*}$ es transgénica para las dos proteínas virales, no acumula ninguna de ellas porque ambas se encuentran silenciadas. La línea $mpxcp^{T42W*}$ fue originada a partir de un cruzamiento entre plantas portadoras de la MP y de la CP^{T42W} ; por lo tanto el sitio de inserción del transgén (CP^{T42W}) es exactamente el mismo al de la línea CP^{T42W} . Acorde a lo esperado, el tamaño de los focos de infección de PVX-YFP observados en la línea $mp-cp^{T42W*}$ fue similar al de los focos presentes en la línea no transgénica (Fig. 24C).

Aunque las líneas que expresan CP^{wt} y CP^{T42W} causaron un retardo en el movimiento de célula a célula de PVX, todas las plantas mostraron síntomas de infección a los 15 d.p.i. Por lo tanto, si bien las plantas presentan un cierto grado de resistencia (reflejado en la menor tasa de replicación y movimiento), éste no es lo suficientemente potente como para frustrar la infección y por lo tanto considerarlo una herramienta biotecnológica de interés.

Como control se desafiaron plantas expresando la CP de PVX, las cuales no mostraron síntomas de PVX, esta resistencia (homóloga) a la infección con PVX concuerda con lo previamente reportado (Hemenway 1988; Spillane y col. 1997). Además, los focos de infección permanecieron pequeños a lo largo de todo el experimento (Fig. 24B), en tanto que no se registró acumulación del virus en hojas no inoculadas (dato no mostrado).

iii) Análisis de la acumulación de CP de TMV en las líneas transgénicas utilizadas

Inicialmente las líneas de BY-2 y las plantas que expresan las distintas CP de TMV fueron seleccionadas por presentar una acumulación comparable de dicha proteína (Bendahmane y col. 2002). Aún así, fue necesario corroborar los niveles de acumulación de cada CP, ya que no se puede descartar un efecto dosis dependiente. Con tal motivo, se realizaron ensayos de “Western blot” de las tres líneas de BY-2 ($BY-CP^{wt}$, CP^{T28W} y CP^{T42W}) y de las plantas CP^{wt} , CP^{T28W} y CP^{T42W} a partir de una extracción de proteínas totales. Los resultados indicaron que las tres líneas de BY-2 y las plantas transgénicas acumulan niveles similares de CP de TMV (Fig. 25). Esto permitió independizarse de un efecto debido a la masa de proteína presente y atribuirle los diferentes niveles de acción observados a su estructura tridimensional.

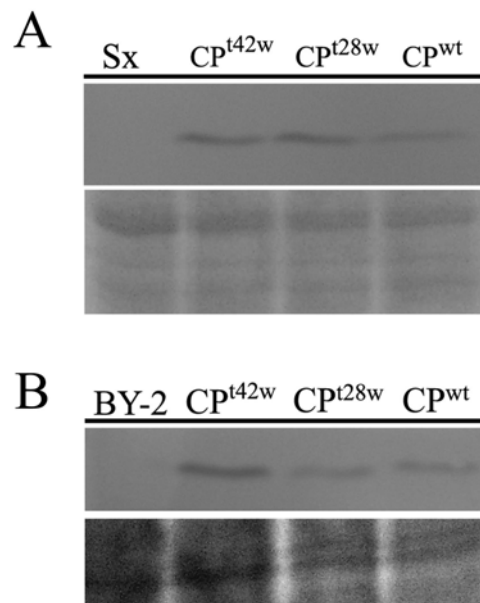


Figura. 25. Análisis de la acumulación de CP transgénicas en las plantas y células BY-2 transgénicas. **(A)** Western blot mostrando la acumulación de CPs de TMV en plantas transgénicas de tabaco: CP^{T42W}, CP^{T28W} y CP^{wt} y **(B)** en protoplastos de las líneas transgénicas de BY-2: BY-CP^{T42W}, BY-CP^{T28W} y BY-CP^{wt}. La tinción con rojo Ponceau S (paneles inferiores) fue utilizada para mostrar los niveles comparables de proteína sembrada en los geles (Bazzini y col. 2006a).

b) Efectos de la CP de PVX sobre la infección con el virus TMV

1) La CP transgénica de PVX interfiere con la infección de TMV

La siguiente hipótesis implicó evaluar la existencia de un efecto recíproco con la CP de PVX, es decir si la CP de PVX puede interferir con la replicación y/o movimiento del TMV. Resumidamente se analizó el efecto producido por la expresión de la CP de PVX sobre la replicación de TMV. Se aislaron protoplastos a partir de la línea transgénica 6665 de tabaco que expresa la CP de PVX (provista por la Dra Cynthia Hemenway y por la empresa Monsanto) los cuales se inocularon con RNA de TMV U1 (ver esquema en la Fig. 23C). Se evaluó la acumulación de la CP de TMV a lo largo de la infección mediante ensayos de ELISA. De esta manera, se registró una marcada reducción en los niveles de CP de TMV en aquellas células que expresaban la CP de PVX con respecto a la acumulación registrada en las células no transgénicas (Fig. 26).

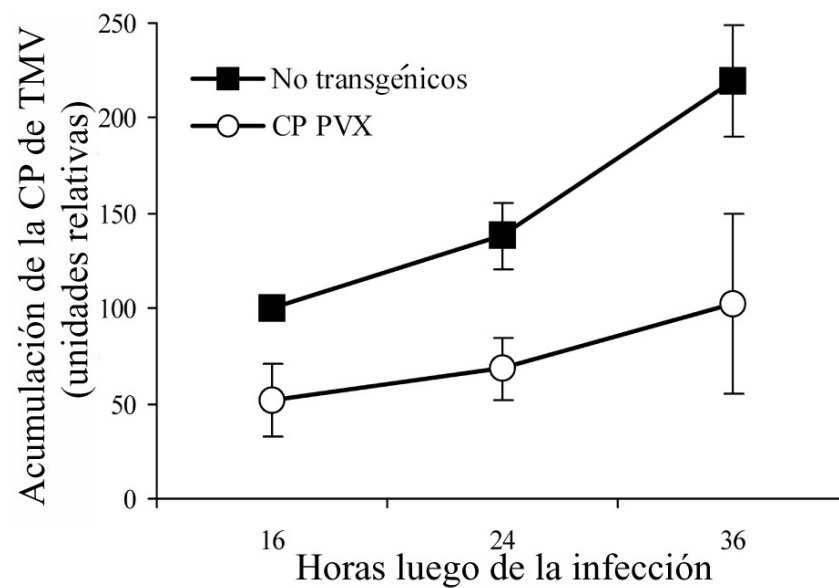


Figura 26. Acumulación de TMV en protoplastos derivados de plantas de tabaco transgénicas expresando la CP de PVX y no transgénicas medida por ELISA. Los protoplastos fueron inoculados con RNA de TMV. Los valores representan la media de tres experimentos independientes. Barras = desviación estándar (Bazzini y col. 2006a).

Con el fin de evaluar si la CP de PVX interfiere con el movimiento de célula a célula del TMV, plantas de líneas transgénicas que expresaban la CP del PVX y plantas no transgénicas fueron inoculadas mediante bombardeo con RNA genómico de TMV. Este RNA del TMV codifica para la replicasa, la MP y una CP fusionada traduccionalmente a la proteína verde fluorescente (GFP) (Fig. 23D). Los focos de infección fueron analizados a los 5 d.p.i. En la figura 27 se advierte que el tamaño de los sitios de infección en las plantas transgénicas que expresan la CP de PVX fue significativamente menor al observado en las plantas no transgénicas; esto indicaría que la CP de PVX retrasa el movimiento célula a célula del TMV.

Estos resultados concuerdan con los efectos observados en infecciones con PVX de células que expresan la CP de TMV sugiriendo que en este último caso, al igual que en los casos descritos (Fig. 20 y 22), la reducción de la CP de TMV en las células que expresan la CP de PVX, podría ser una consecuencia de la reducción de la replicación viral.

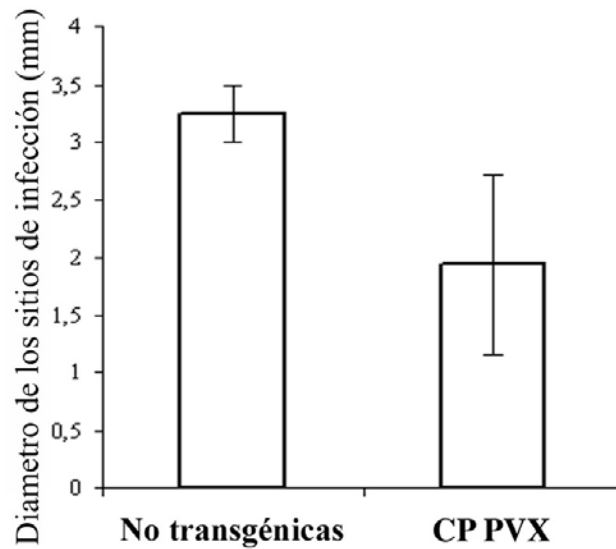


Figura 27. Tamaño de los sitios de infección del TMV sobre hojas de tabaco a los 5 días post infección, observado con microscopía estereoscópica fluorescente. Se inocularon plantas de tabaco no transgénicas y transgénicas produciendo CP de PVX con transcriptos infecciosos de la construcción TMV-CP-GFP. Barras = desviación estándar (Bazzini y col. 2006a).

A fin de determinar si la CP de PVX retrasa el movimiento sistémico del TMV, se infectaron con TMV plantas de tabaco que expresan la CP de PVX (línea 6665) y plantas no transgénicas. Para las infecciones se empleó virus y RNA de TMV (usando transcriptos *in vitro* de un clon infeccioso de cDNA). La acumulación de la CP de TMV en hojas sistémicas fue cuantificada mediante ensayos de ELISA. A los 15 d.p.i. el nivel de acumulación de la CP de TMV fue un 50% menor en las plantas transgénicas que en las no transgénicas (Fig. 28). Sin embargo, a los 20 d.p.i. todas las plantas mostraron niveles similares de acumulación de CP de TMV, y la misma severidad de los síntomas. Por otro lado, no se registraron diferencias significativas entre ambas formas de inoculación (virus o RNA), indicando que este mecanismo de resistencia heteróloga también sería independiente de la desencapsidación.

Desafortunadamente, en el caso de PVX, no se disponía de mutantes de la CP que permitiesen estudiar el rol de la estructura de la misma como se demostrara en el caso de las CPs de TMV. Esta deficiencia se debe principalmente a que, por diversas razones en la bibliografía no se encuentran muchos trabajos sobre la estructura de la CP de PVX. Quizás la razón principal se deba a que como el virus PVX es flexuoso, es muy difícil de cristalizar, hecho que dificulta la obtención de una buena aproximación estructural, la cual es muy importante en el diseño de mutantes.

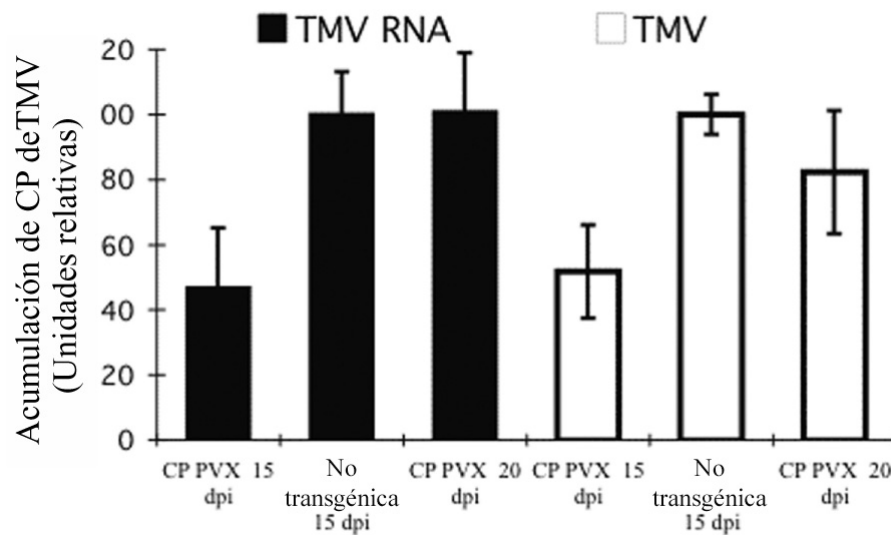


Figura 28. Acumulación de TMV en hojas superiores al sitio de infección de plantas de tabaco transgénicas y no transgénicas. Las muestras fueron colectadas de las hojas expresando la CP de PVX (CP PVX) y no transgénicas a los 15 y 20 días luego de la infección con TMV RNA o TMV (virus). Los niveles de TMV fueron cuantificados mediante ELISA y normalizados con los niveles obtenidos en las plantas no transgénicas para cada día luego de la infección. Barras = desviación estándar (Bazzini y col. 2006a).

2) El silenciamiento post-transcripcional no juega un rol importante en la resistencia mediada por CP de PVX

En este segundo capítulo, se describirán una serie de experimentos que permitieron estudiar el rol del PTGS en la CP-MR de PVX. Como se mencionara anteriormente, el primer reporte de CP-MR fue descrito para el virus TMV (Abel y col. 1986) siendo el paso de desencapsidación viral el principal (Register y Beachy 1988) (aunque no único) responsable de la resistencia (Asurmendi y col. 2004; Asurmendi y col. 2007; Bendahmane y col. 2007). Posteriormente se reportaron numerosos casos de CP-MR para distintos virus como el AIMV (Loesch-Fries 1987; Tumer 1987; van Dun 1987), el CMV (Cuozzo 1988), el PVX (Hemenway 1988; Spillane y col. 1997) y el TSV (van Dun y col. 1988b), entre otros. Para la mayoría de los casos si bien se sabe que la resistencia es independiente de la desencapsidación, no se conoce en detalle el mecanismo de acción. En el caso de PVX se estableció una hipótesis en la cual la CP transgénica podría interactuar con el origen de ensamblado viral interfiriendo en la replicación o inhibiendo la traducción de la replicasa (Hemenway 1988; Spillane y col. 1997). Sin embargo cuando estos estudios se publicaron (Hemenway 1988; Spillane y col. 1997) no se conocían en profundidad las bases moleculares del PTGS, ni tampoco la gran capacidad del virus PVX de desencadenar silenciamiento. Cabe destacar que Spillane y col., realizaron un ensayo de “northern blot” de protoplastos transgénicos que expresaban la CP de PVX infectados asimismo con una construcción de PVX carente del gen de la CP. Por lo tanto si la CP-MR dependiera del PTGS la construcción empleada habría tenido la capacidad de replicar ya que, precisamente, no poseía la secuencia en cuestión. El resultado experimental indicó que no hubo replicación y arribaron a la conclusión de que la resistencia observada no dependía del PTGS. La construcción y el transgén empleados compartían unas 120 pb. Para ese entonces no se creía que 120 pb fuesen suficientes para conferir resistencia mediante PTGS. Sin embargo, hoy se conoce que con menos de 100 pb es posible desencadenar PTGS (Wesley y col. 2001). Por lo tanto, a partir de los experimentos de Spillane y col (1997) no se puede descartar la intervención o no del PTGS en la CP-MR observada en plantas transgénicas para CP-PVX. Ajenos a cuestionar la calidad científica del trabajo, es importante reconocer que los autores resultaron ser pioneros en un tema, para el cual hasta el momento, los conocimientos eran muy preliminares.

A su vez, teniendo en cuenta que el PVX es uno de los virus con alta capacidad de producir VIGS, algunos investigadores propusieron que cuando PVX infectaba plantas transgénicas para CP, desencadenaba el silenciamiento y que por ello las plantas eran extremadamente resistentes al virus (comunicaciones personales). Esta hipótesis no podía ser refutada con los datos previamente publicados. Por lo tanto, la hipótesis debía ser re-evaluada a la luz de los nuevos hallazgos, datos y materiales para estudiar el silenciamiento génico. Esta información tendría mucha relevancia para futuros usos de una tecnología capaz de producir resistencia heteróloga de amplio espectro ya que suponemos es producida por la expresión de la proteína en sí y no por el silenciamiento.

a) Estudio de la CP-MR de PVX bajo condiciones de supresión del PTGS

Se propone estudiar si la CP-MR depende o no del PTGS mediante dos estrategias. En la primera (i y ii) se suprime de formas distintas el mecanismo de PTGS (por medio de infección viral o bajas temperaturas) y se evalúa si el grado de resistencia de las plantas expresando la CP de PVX es alterado en consecuencia. En la segunda parte (iii) se analiza si los niveles de mRNA de CP transgénica disminuyen luego de la infección con PVX.

i) Supresión del PTGS mediante infección con PVY

Se ha reportado que infecciones conjuntas de PVX y de PVY actúan sinérgicamente, registrándose un aumento de entre 3 y 10 veces de los niveles de CP de PVX acumulada respecto a plantas infectadas sólo con el virus PVX (Pruss y col. 1997). Por el contrario los niveles de infección de PVY no parecen verse afectados por la presencia de PVX (Pruss y col. 1997). Hoy se sabe que la proteína responsable de este efecto es la Hc-Pro, la cual es codificada por el PVY y posee actividad supresora del PTGS (Shi y col. 1997). En una infección natural con PVX, el progreso de la infección se ve controlado por el mecanismo PTGS desencadenado en la planta por la replicación viral. En presencia de Hc-Pro al no encontrarse controlado negativamente por el PTGS el virus PVX puede replicar con una tasa mayor (Roth y col. 2004).

Inicialmente, se pre-infectaron plantas que expresaban la CP de PVX y plantas no transgénicas con el virus PVY. Diez días después, las mismas fueron infectadas con el virus PVX. Paralelamente, se infectaron plantas con cada uno de los virus por separado como controles. Esto último se debe a que el objetivo implicaba comparar el grado de resistencia de las plantas transgénicas infectadas sólo con PVX con aquellas infectadas con ambos virus en las cuales el PTGS se encontraría reprimido.

Como se observa en la figura 29B, las plantas transgénicas y los controles no transgénicos mostraron síntomas característicos de la infección con PVY a los 21 d.p.i. En concordancia con trabajos previos y con nuestros propios datos, las plantas transgénicas para la CP de PVX resultaron ser extremadamente resistentes a PVX ya que no mostraron síntomas (Fig. 29C) ni acumulación de la CP de PVX medido vía “dot blot” (Fig. 29H). Más aún, las plantas no transgénicas exhibieron los típicos síntomas de la infección con el virus PVX (Fig. 29D) y acumularon altos niveles de CP de PVX a las 3 semanas p.i. (Fig. 29H).

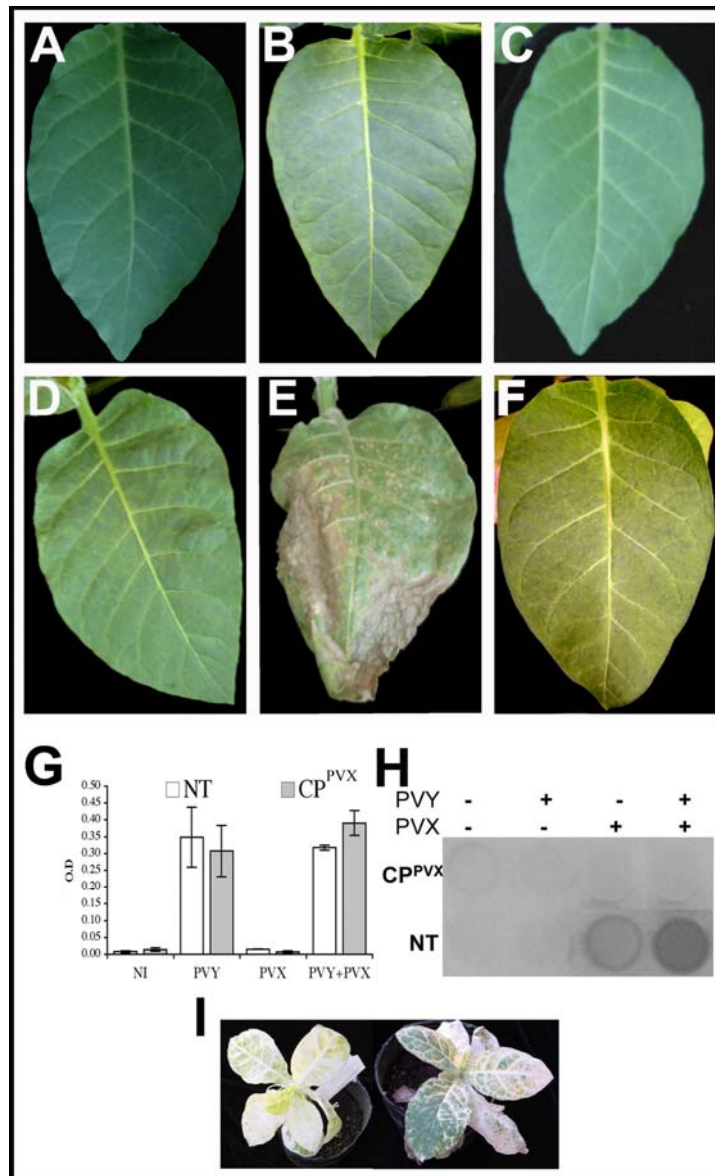


Figura 29. Estudio del posible rol del PTGS sobre la CP-MR de PVX mediante infecciones con PVY. (A) Hoja de planta no transgénica 3 semanas luego de una inoculación con solución sin virus. (B) Hoja de planta no transgénica 3 semanas luego de la inoculación con PVY. (C) Hoja de planta transgénica produciendo la CP de PVX (CP^{PVX}) 3 semanas luego de la inoculación con PVX. (D) Hoja de planta no transgénica 3 semanas luego de la inoculación con PVX. (E) Hoja de planta no transgénica y (F) CP^{PVX} transgénica pre-infectadas con PVY e inoculadas con PVX luego de 10 días. (G) ELISA detectando la CP de PVY en extractos de proteínas de plantas no transgénicas y transgénicas infectadas con PVY, PVX o con ambos virus (primero con PVY y luego de 10 días, con PVX). (H) Inmuno dot-blot sobre proteína total de plantas no transgénicas (NT) y CP^{PVX} transgénicas inoculadas con PVY, PVX o con ambos virus. La reacción fue revelada con un antisero anti- CP de PVX. (I) Plantas de tabaco transgénicas para el gen de la quelatasa de magnesio silenciado (fenotipo albino) no infectada (panel izquierdo) y 3 semanas luego de infectarlas con PVY (panel derecho) (Bazzini y col. 2006b).

Las plantas no transgénicas pre-infectadas con PVY y luego infectadas con PVX mostraron el típico sinergismo en los síntomas de una infección conjunta PVX-PVY (Fig. 29E) y acumularon altos niveles de CP de PVX (Fig. 29H). Por otro lado, las plantas transgénicas pre-infectadas con PVY y luego infectadas con PVX, mostraron síntomas comparables a los de las plantas infectadas únicamente con PVY (comparar Fig. 29F con 29B) y acumularon solamente CP de PVY (Fig. 29G y H).

Para verificar si el PTGS se suprimía en las condiciones utilizadas en este trabajo se infectaron con el virus PVY plantas transgénicas de tabaco que exhibían un fenotipo albino debido a que el gen de la quelatasa de magnesio se encontraba silenciado (Fofana y col. 2004). Como se ve en la figura 29I, las plantas infectadas con PVY revirtieron el fenotipo causado por el PTGS. De este modo, se corroboró que la infección con PVY en las condiciones utilizadas en este trabajo, era capaz de suprimir el silenciamiento.

Evaluados en conjunto estos resultados sugirieron que el PTGS no juega un rol importante en la resistencia mediada por CP de PVX.

ii) Supresión del PTGS mediante bajas temperaturas

En el 2003, Szittyta y colaboradores demostraron que el PTGS se encuentra inhibido a bajas temperaturas. Probaron que en plantas cuyo fenotipo dependía del PTGS, el mismo se modificaba cuando se exponían a bajas temperaturas. Por ejemplo, plantas que se encontraban silenciadas para un gen del virus *Cymbidium ringspot* (CymRSV) eran extremadamente resistentes a infecciones con el virus a 24°C, pero susceptibles a 15°C. Otros estudios mostraron resultados similares para el caso del virus CMV (Kalantidis y col. 2002). Asimismo, se reportó que los niveles de siRNA originados a partir de infecciones virales o de transgenes eran menores a bajas que a altas temperaturas (Szittyta y col. 2003). Sin embargo, otros trabajos demostraron que en algunos casos el silenciamiento originado a partir de un RNA antisentido no siempre es inhibido a bajas temperaturas (Sos-Hegedus y col. 2005). Se reportaron numerosos casos de supresión del PTGS por bajas temperaturas tanto en *Arabidopsis thaliana*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* y *Solanum tuberosum* como en células de insectos y mamíferos (Fortier y Belote 2000; Kalantidis y col. 2002; Mou y col. 2002; Szittyta y col. 2003; Kameda y col. 2004)

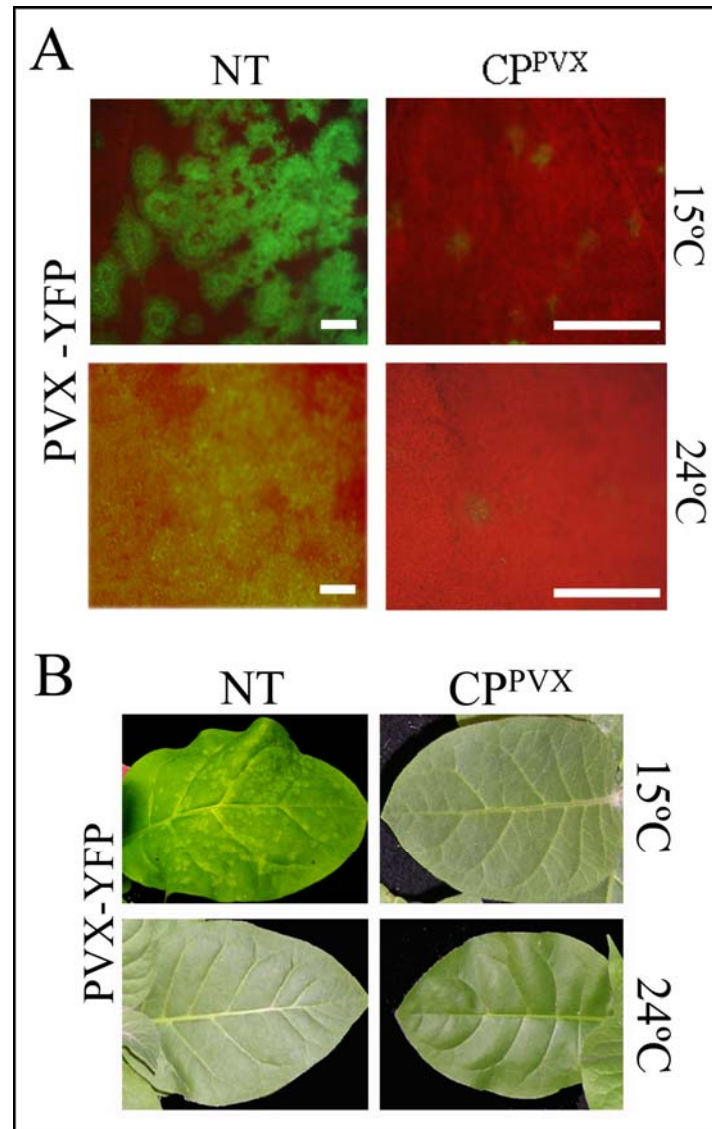


Figura 30. Estudio del posible rol del PTGS sobre la CP-MR de PVX mediante infecciones con PVX-YFP a distintas temperaturas. **(A)** Células de plantas no transgénicas (NT) y transgénicas produciendo la CP de PVX (CP^{PVX}) mantenidas a distintas temperaturas a los 12 días p.i. con la construcción de PVX expresando YFP libre (PVX-YFP) observadas bajo un microscopio de fluorescencia y fotografiadas bajo luz UV. **(B)** Hojas de plantas no transgénicas (NT) y CP^{PVX} infectadas con PVX a 24°C y 15°C, fotografiadas con luz blanca (Bazzini y col. 2006b).

Con el objetivo de confirmar que el PTGS no juega un papel importante en la CP-MR de PVX, se decidió analizar cómo se modifica dicha resistencia a baja temperatura (15°C). La hipótesis planteada fue que si el PTGS cumple un rol importante en la CP-MR de PVX, entonces a baja temperatura las plantas transgénicas de PVX deberían perder o ver reducida dicha resistencia. Así, grupos de plantas transgénicas para la CP de PVX (línea 6665) y plantas controles no transgénicas fueron mantenidas a 15 ó a 24 °C durante 10 días. Luego, todas las plantas fueron inoculadas por

bombardero con un clon infeccioso, PVX-YFP y posteriormente analizadas con una lupa de fluorescencia a los 2 d.p.i. Como se observa en la figura 30A, la línea 6665 fue extremadamente resistente al desafío con PVX tanto a 24°C como a 15°C. En ambas temperaturas se observaron pequeños sitios de infección en la hoja inoculada, los cuales se mantuvieron invariables hasta el final del experimento. En las plantas control (no transgénicas) se observó un mayor tamaño y un número aumentado de los sitios de infección (YFP) respecto a las plantas transgénicas independientemente de la temperatura en la cual habían sido mantenidas (Fig. 30B). Dichos sitios continuaron aumentando de tamaño hasta cubrir la hoja. En consecuencia, los datos indican que la resistencia mediada por la CP de PVX no se ve afectada por el crecimiento de las plantas a temperaturas que se sabe inhiben el PTGS. Esto corrobora los datos obtenidos el apartado anterior.

Por otro lado, las plantas no transgénicas infectadas mantenidas a 15 °C presentaron síntomas más severos comparados con las plantas no transgénicas infectadas a 24 °C. Este dato indicaría que el PTGS se encontraba inhibido a baja temperatura, lo que favoreció una mayor tasa de replicación. Existen reportes de que las infecciones de PVX son más eficaces o severas a menor temperatura así como también por medio de pre-infecciones con TEV o PVY o utilizando plantas transgénicas que expresan Hc-Pro. En todos los ejemplos mencionados se suprime o inhibe al PTGS, por lo tanto se supone que el aumento en la severidad de los síntomas se encuentra asociado a la inhibición del PTGS por cualquiera de los métodos mencionados (Roth y col. 2004).

iii) Las infecciones con el virus PVX no reducen la acumulación del mRNA de la CP transgénica de PVX

Como se ha mencionado al comienzo de este capítulo, la replicación inicial de PVX podría inducir el silenciamiento del transgén (CP) lo cual podría ser la causa de la resistencia a la infección. Una evidencia molecular de esta hipótesis sería una reducción en los niveles del mRNA de la CP transgénica luego de la infección.

Para determinar si el virus PVX es capaz de inducir el silenciamiento de la CP transgénicamente expresada por homología de secuencia, una vez establecida la infección viral, se realizó un “Northern blot” con RNA de plantas transgénicas inoculadas y no inoculadas. Para poder diferenciar entre el mRNA transgénico y el viral se empleó como sonda la secuencia del terminador de la transcripción del transgén (terminador del gen E9 de arveja). Los datos muestran que los niveles de mRNA transgénicos de CP no se vieron disminuidos en las hojas inoculadas respecto a las no inoculadas (Fig. 31). Estas observaciones sugieren que la infección con el virus PVX no reduce la acumulación de la CP transgénica, y esto último apoya la hipótesis inicial que afirma que el PTGS no jugaría un rol importante en la resistencia.

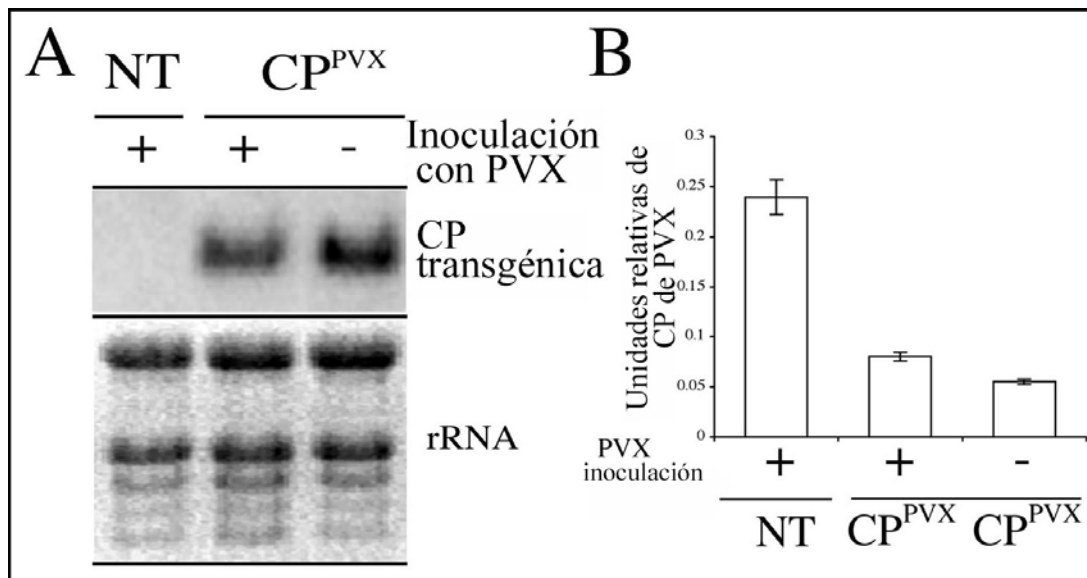


Figura 31. Efectos de la infección de PVX sobre la acumulación del mRNA de la CP de PVX transgénica. **(A)** Northern blot de plantas no transgénicas y transgénicas (CP^{PVX}) inoculadas y no inoculadas con PVX. Como sonda se utilizó la secuencia 3' no traducible del transgén. En el panel inferior se observan los RNA ribosomales (rRNA) teñidos con BrEt. **(B)** ELISA detectando la CP de PVX en extractos solubles de proteínas de plantas transgénicas y no transgénicas a los 10 días luego de la inoculación con PVX (Bazzini y col. 2006b).

Cabe mencionar que este experimento puede resultar controversial, ya que si bien se empleó una hoja completa para la extracción de las proteínas que se emplearon en el ELISA y para el RNA del Northern-blot, la misma presentaba pequeños focos de infección (porque es resistente a PVX). Como ya se comentó anteriormente esos focos son característicos de los tejidos transgénicos infectados. Por lo tanto se podría pensar que el resultado negativo obedezca a una cuestión de sensibilidad de la técnica debido a que los focos de infección se encuentran “diluidos” en la hoja analizada. Quizás lo correcto hubiese sido coleccionar muestras sólo de los sitios de infección (menos de 15 células), pero prácticamente es imposible realizar dicha disección con los medios disponibles. Aún así consideramos que la aproximación empleada en la toma de muestras para el análisis de los niveles de mRNA del transgén fue acertada.

3) La co-expresión transgénica de la MP y la CP de TMV altera la acumulación de miRNAs y el desarrollo de la planta

Como se ha detallado anteriormente la CP-MR puede ser mejorada mediante la expresión de CP mutadas como en el caso de la mutante CP^{T42W} de TMV (Bendahmane y col. 1997; Bendahmane y col. 2002; Asurmendi y col. 2007; Bendahmane y col. 2007). Por otro lado, la expresión de la MP de TMV también interfiere con las infecciones virales (Ares y col. 1998). A partir de estos datos, se decidió cruzar dos líneas transgénicas, una que expresa la CP^{T42W} de TMV (Bendahmane y col. 1997) con otra que expresa la MP de TMV (Deom y col. 1990) con el fin de analizar si la expresión de ambas proteínas alteraba la infección viral.

Sin embargo, inesperadamente las plantas que expresaban simultáneamente ambas proteínas virales presentaron importantes malformaciones. Se debe aclarar que las dos líneas parentales habían sido extensamente estudiadas y caracterizadas (Sleat y col. 1988; Deom y col. 1990; Patricio Arce Johnson 1995; Ares y col. 1998; Bendahmane y col. 2002; Kawakami y col. 2004; Bazzini y col. 2007b). Por lo tanto si bien el objetivo inicial del cruzamiento era analizar los niveles de resistencia a TMV, este imprevisible resultado redirigió el enfoque de los estudios planteados.

Como muchas de las malformaciones observadas se asemejaban a anomalías descritas en publicaciones previas de plantas en las cuales los miRNAs estaban alterados, se decidió derivar los esfuerzos en el estudio de los miRNAs estableciendo nuevas hipótesis sobre el rol que estos pueden cumplir en la infección viral.

a) Caracterización molecular de las plantas transgénicas para MP y CP^{T42W} de TMV

La F1 del cruzamiento entre las líneas CP^{T42W} y MP de TMV presentó un fenotipo normal. En cambio, la F2 presentó severos problemas de fertilidad y desarrollo, aunque eventualmente las plantas se pudieron autofecundar hasta alcanzar la F3. De estas últimas se eligieron las líneas 18, 21 y 22 que eran homocigotas para ambos transgenes para continuar con el trabajo. Se confirmó la presencia de ambos transgenes en todas las líneas seleccionadas por PCR (Fig. 32A). Así, en la F3 de las tres líneas (líneas 18, 21 y 22) se detectaron la presencia de los dos transgenes. En la figura 32 se muestran los resultados de las líneas 18 (mpxcp^{T42W*}) y 22 (MPxCP^{T42W}). La nomenclatura empleada al enunciar las líneas será explicada más adelante.

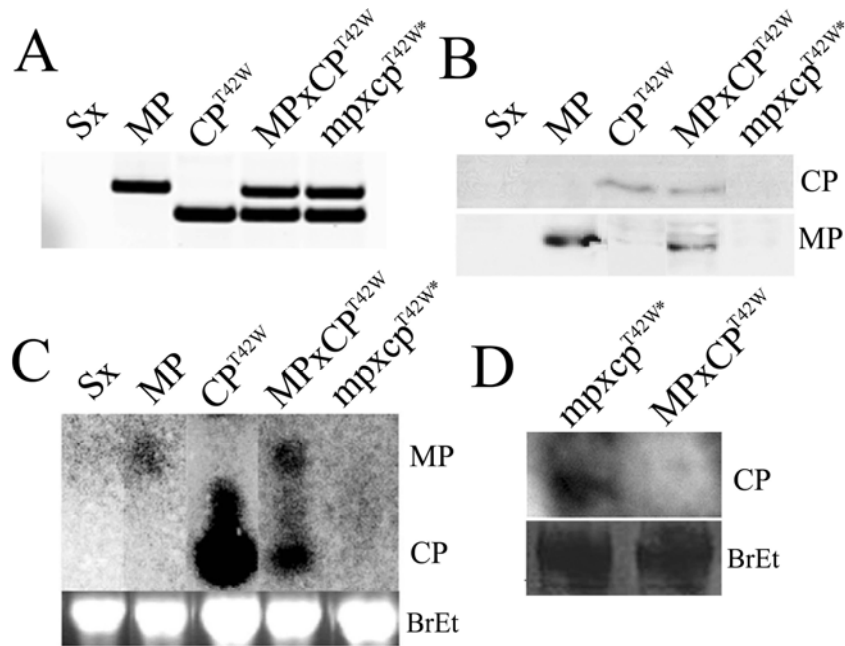


Figura 32. Caracterización molecular de las líneas transgénicas obtenidas del cruzamiento entre la planta que sobre expresaba CP^{T42W} de TMV con la de MP. (A) PCR detectando la MP y CP transgénicas de TMV en líneas de tabaco expresando MP, CP^{T42W} y ambos genes (MPxCP^{T42W} y mpxcp^{T42W*}). Se utilizaron plantas no transgénicas de *N. tabaccum* cv Xanthi nn (Sx) como control negativo. (B) “Western blot” y (C) “Northern blot” de muestras provenientes de plantas control y transgénicas mostrando la acumulación de mRNAs y proteínas de MP y CP^{T42W}. (D) Detección de siRNA homólogo de CP^{T42W} en la línea mpxcp^{T42W*} (Bazzini y col. 2007a).

En primer lugar, se estudió la acumulación de los mRNAs y de las proteínas transgénicas mediante “Northern” y “Western-blot”, confirmando que los parentales expresan y acumulan sólo una de las proteínas virales (Fig. 32B y C). Como las líneas 21 y 22 acumulaban ambas proteínas (MP y CP) en niveles similares a los parentales, se continuaron los estudios con la línea 22, a la que se la denominó MPxCP^{T42W} por expresar ambas proteínas. Por otro lado, la línea 18 no acumulaba ninguna de las dos proteínas, ni sus respectivos mRNAs, sugiriendo que ambos transgenes podían estar silenciados. Debido a esta posibilidad, se la denominó mpxcp^{T42W*}. Para confirmar si se trataba de silenciamiento, se buscó detectar la presencia de siRNA homólogos a la CP^{T42W}. En la figura 32D se muestra la existencia de siRNA homólogos a CP de TMV provenientes de la CP transgénica en la línea silenciada (mpxcp^{T42W*}). Como era de esperar, estos siRNA están totalmente ausentes en el resto de las líneas (a modo de ejemplo en la figura 32D sólo se incluyó a la línea MPxCP^{T42W}).

b) La co-expresión de MP y CP^{T42W} de TMV altera el desarrollo de la planta

Las líneas MPxCP^{T42W} (21 y 22) exhibieron severos problemas morfológicos y de fertilidad en las F2, F3, F4 y F5 que se describirán en detalle en el apartado siguiente. Algunos de los fenotipos

observados fueron similares a los que se observan en plantas infectadas con TMV, como hojas con mosaicos, malformación de hojas, reducción del número de flores, reducción de altura, etc. Otros de los cambios morfológicos no guardaron relación con infecciones de TMV: malformación de plántulas, reducción de la germinación, enanismo y malformación de flores (Tabla 1 y Fig. 33). Cabe destacar que existen registros que en algunas condiciones de luz y temperatura, las hojas de la línea MP pueden presentar una clorosis leve y tener forma alargada (Deom y Beachy, comunicación personal). En contraste, los parentales y las $mpxcp^{T42W*}$ nunca presentaron problemas morfológicos o de fertilidad. Esta falta de alteraciones morfológicas en la línea $mpxcp^{T42W*}$ fue considerada relevante ya que indicaría que los fenotipos observados están relacionados con la co-expresión de las proteínas transgénicas. Además como ésta línea proviene del mismo cruzamiento que la $MPxCP^{T42W}$, los transgenes se encuentran insertados en el mismo *locus*, por lo cual nos permitió descartar la posibilidad de que el fenotipo aberrante fuera consecuencia de la interrupción de un gen endógeno.

i) Caracterización fenotípica de las plantas de la línea $MPxCP^{T42W}$

Como se mencionó anteriormente, las plantas de la línea $MPxCP^{T42W}$ exhibieron un fenotipo similar al observado en plantas transgénicas de *Arabidopsis* con miRNAs o “targets” de miRNAs alterados (Kasschau y col. 2003; Palatnik y col. 2003; Chapman y col. 2004; Laufs y col. 2004; Mallory y Vaucheret 2004; Baker y col. 2005; Mallory y col. 2005; Fahlgren y col. 2006; Maroney y col. 2006). Las flores de la línea $MPxCP^{T42W}$ presentaron pérdida de la simetría (Fig. 33C), alteración en número y forma de los órganos reproductivos (Fig. 33B, H, J y M), así como también un aumento en la frecuencia de estigmas tripartitos (Fig. 33E y Tabla 1). En varios casos los androceos eran de menor altura que los gineceos y los pistilos muchas veces no contenían polen. Todas estas deformaciones pueden explicar la baja tasa de fertilidad de la línea $MPxCP^{T42W}$ (Fig. 33L y M). Plantas transgénicas de *N. benthamiana* sobre expresando el miR172 mostraron problemas similares en los estigmas (Mlotshwa y col. 2006).

Un alto porcentaje de plántulas de $MPxCP^{T42W}$ mostraron problemas en el desarrollo de los cotiledones (Fig. 33F y G) y asimetría en la forma de las hojas (Fig. 33O). Ambos fenotipos fueron muy similares a los reportados en plantas de *Arabidopsis* con en las cuales los niveles del miR164 se hallaban alterados (Laufs y col. 2004; Mallory y Vaucheret 2004; Baker y col. 2005).

Las hojas de la línea $MPxCP^{T42W}$ mostraron una peculiar forma redondeada. La relación entre el largo y ancho de la hoja fue de 0,68 lo cual resultó estadísticamente diferente al 0,5 registrado en las plantas silvestres: (Tabla 1 y Fig. 33K). Además, las hojas parecían ser más cerosas. Por último, las células epidérmicas de la línea $MPxCP^{T42W}$, observadas al microscopio electrónico de barrido, presentaron un tamaño mayor comparado a las no transgénicas o a los parentales (Tabla 1, Fig. 33P, Q y R). Este tipo de cambios también fueron reportados en plantas de *Arabidopsis* con el miR160 alterado (Mou y col. 2002; Mallory y col. 2005).

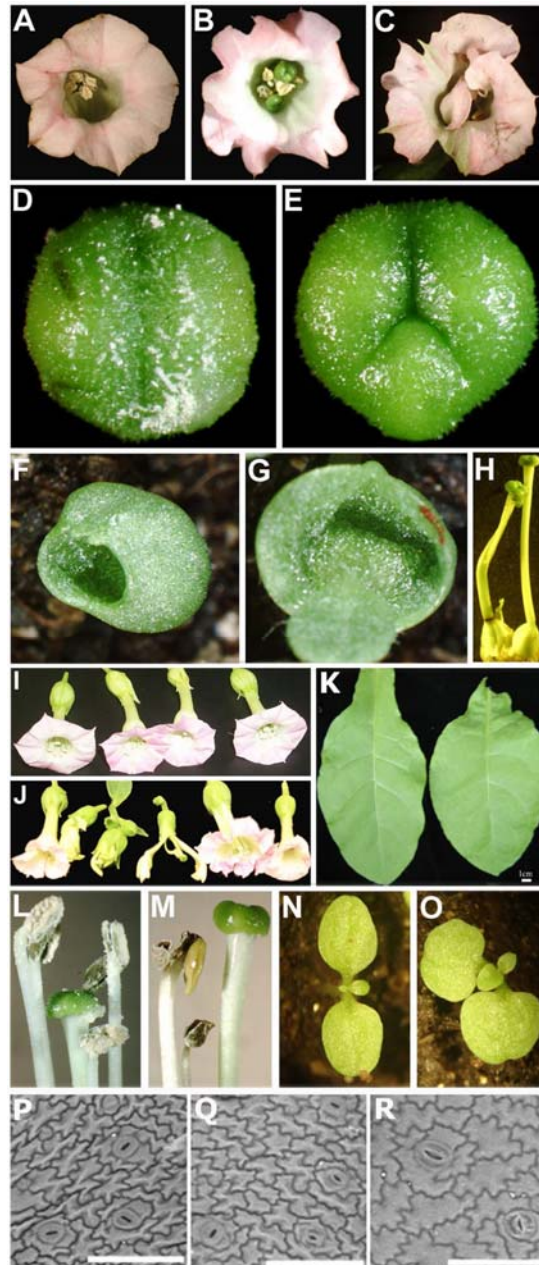


Figura 33. Alteración en el desarrollo presentes en plantas y flores de la línea MPxCP^{T42W}.

(A) Flores de tabaco silvestre (*N. tabacum*, cv Xanthi nn; Sx) y (B) (C) de la línea MPxCP^{T42W}. (D) Estigma silvestre bipartito y (E) tripartitos de la línea MPxCP^{T42W}. (F) y (G) Plántulas MPxCP^{T42W} presentando cotiledones fusionados y formando una estructura estilo taza. (H) Duplicación de pistilos en la línea MPxCP^{T42W}. (I) Morfología normal de flores Sx, MP, CP^{T42W} y mp MCP^{T42W}*, respectivamente. (J) Diferentes fenotipos de flores de MPxCP^{T42W}. (K) Hojas de tabaco silvestre Sx (izquierda) y hojas de una planta MPxCP^{T42W} para ilustrar la forma redonda de esta última (derecha). (L) Pistilos y estambres silvestres: anteras cubiertas de polen. (M) Los estambres de MPxCP^{T42W} son más cortos que los pistilos y las anteras suelen estar secas, sin polen. (N) Plántulas silvestres con hojas simétricas y (O) plántulas MPxCP^{T42W} con hojas asimétricas. (P), (Q) y (R) Fotografías al microscopio electrónico de barrido de la superficie abaxial de hojas de las líneas MP, CP^{T42W} y MPxCP^{T42W} (respectivamente) mostrando las alteraciones en la forma y tamaño de células de la epidermis en el caso de (R) (Bazzini y col. 2007a).

Por lo tanto, los cambios observados en el fenotipo de plantas de la línea MPxCP^{T42W}, y su similitud con lo reportado en plantas en las cuales los niveles de los miRNAs estaban alterados, nos permitió considerar que posiblemente en dicha línea algunos miRNAs estarían afectados.

Plantas	Nº semillas germinadas/plantadas (%) ^a	Nº de plantas anormales/normales (%) ^a	ancho/largo de hojas (SD)	Superficie de células epidérmicas mm ² (SD)	Altura (cm) ^b	Porcentaje de plantas con flores ^b	Porcentaje de plantas con capullos ^b	Nº de flores por planta ^b	Estigma tripartitos (%) ^b
Sx	272/424 (64)	0/272 (0)	0.56 (0.02)	1419 (216)	90.17	100	100	17.33	0/35 (0)
MP	262/436 (60)	0/262 (0)	0.51 (0.2)	1360 (175)	63.5 ‡	100	100	-	0/35 (0)
CP ^{T42W}	247/375 (65)	0/247 (0)	0.53 (0.02)	1236 (196)	86.36	100	100	-	0/35 (0)
mpxcp ^{T42W*}	253/400 (63)	0/253 (0)	0.54 (0.03)	1305 (202)	81.28	100	100	15.50	0/35 (0)
MPxCP ^{T42W}	87/387 (22) †	19/87 (22) †	0.68 (0.05) ‡	2517 (299) ‡	43.9 ‡	22.2 †	44.4 †	5.57 ‡	16/39 (41) †
MPxCP ^{T42W} / mpxcp ^{T42W*} (Estaca/pie)	-	-	-	-	83.47	91.6	100	12.27	12/135 (8.8)
mpxcp ^{T42W*} / MPxCP ^{T42W} (Estaca/pie)	-	-	-	-	79.58	90	100	15.14	0/106 (0)

^a Medidos a los 11 días de plantado.

^b Medido a los dos meses luego de realizar los injertos.

† p menor a 0,001

‡ t student 95% .

Tabla 1. Descripción cuantitativa de las modificaciones en el desarrollo de la planta MPxCP^{T42W}. Se resumen una serie de características genotípicas cuantificables de las líneas Sx, MP, CP^{T42W}, MPxCP^{T42W}, mpxcp^{T42W*} y de injertos entre distintas líneas. Número y porcentaje de germinación en tres experimentos independientes a los once días luego de plantarlas. Número de plántulas presentando fenotipo anormal sobre el total de plantas germinadas en tres experimentos independientes. Relación entre el ancho/largo de más de diez hojas. Tamaño de la superficie de células epidérmicas de cada línea observada con un microscopio electrónico de barrido y medido (mínimo 25 células por línea) con el programa *Image J*. Se indica la altura, porcentaje de plantas presentando flores y capullos, como también el número de flores por plantas y relación entre estigmas tripartitos sobre el total medido en más de diez plantas a los dos meses luego de realizar los injertos (Bazzini y col. 2007a).

ii) Determinación de la participación de la MP y la CP^{T42W} en la generación de malformaciones mediante injertos

Para corroborar que la expresión de las dos proteínas virales era la responsable de los defectos en el desarrollo, se aprovechó la característica del movimiento sistémico del PTGS. Como se explicó

en la introducción, el PTGS no sólo involucra la formación de siRNA y la degradación del mRNA homólogo sino que también produce una señal móvil, la cual se transporta a través de la unión de un injerto, induciendo silenciamiento en la parte superior del mismo (Vaucheret y col. 1998; Voinnet y col. 1998; Mlotshwa y col. 2002). Se realizaron injertos utilizando plantas de la línea $mpxcp^{T42W*}$ como pie y plantas de la línea $MPxCP^{T42W}$ como estaca. De este modo, los siRNAs (presentes en la $mpxcp^{T42W*}$) podrían desplazarse a la parte superior, atravesar la unión del injerto y silenciar a los mRNA transgénicos (MP y CP^{T42W}) por homología de secuencia. Si la señal de silenciamiento estaba de alguna manera involucrada en el fenotipo anormal de las plantas, se esperaba que el desplazamiento de los siRNAs desde el pie silenciado al esqueje superior ($MPxCP^{T42W}$) trajera como consecuencia la reversión del fenotipo anormal. Efectivamente, los injertos ensayados mostraron una reversión del fenotipo anormal hacia el normal. Como se observa en la tabla 1, a los 2 meses de realizar los injertos ciertos parámetros como la altura, el porcentaje de plantas con flor o capullos, el número y forma de las flores (estigmas bipartitos), resultaron similares en las plantas injertadas a los de las plantas no transgénicas, o a las plantas MP, CP^{T42W} o $mpxcp^{T42W*}$. Para confirmar que efectivamente se había inducido el silenciamiento en el esqueje superior, se realizaron “Western Blots” sobre los mismos. Como el establecimiento del silenciamiento no es homogéneo, es decir pueden encontrarse parte silenciadas y partes sin silenciar, se realizaron 3 extracciones por planta de distintas hojas del esqueje superior. Los resultados indicaron que sólo una planta presentaba acumulación de MP y CP en todas sus muestras y como era de esperar, era la única planta que no había recuperado el fenotipo normal. El resto de las plantas, solo dieron ocasionalmente positivo en alguna de la muestras.

Como controles, se desarrollaron distintas combinaciones de injertos. Como se describe en la tabla 1, cuando se utilizó a $MPxCP^{T42W}$ como pie y a $mpxcp^{T42W*}$ como estaca, la línea $mpxcp^{T42W*}$ no presentó alteraciones. Asimismo, cuando se realizaron injertos con plantas transgénicas CP o MP (parentales) tampoco se advirtieron cambios (datos no mostrados). Estos controles muestran que la reversión no es una consecuencia de la metodología en sí.

Mediante estos experimentos concluimos que la expresión simultánea de la MP y la CP^{T42W} es la responsable de las malformaciones y de los problemas de desarrollo presentes en las plantas de la línea $MPxCP^{T42W}$.

c) La acumulación de miRNAs se encuentra alterada en la línea $MPxCP^{T42W}$

Como se mencionó en el subcapítulo 3b, todas las similitudes ya descritas entre la línea $MPxCP^{T42W}$ y los diversos reportes de plantas con miRNAs alterados, apuntaban a que se debía investigar si existía en esta línea alguna alteración en los miRNAs. Se investigó entonces el nivel de acumulación de algunos miRNAs relacionados con desarrollo en la línea $MPxCP^{T42W}$, mediante “Northern blot”. Los miRNAs utilizados se eligieron en función de su abundancia, y principalmente por su correlación con algún fenotipo similar. En primer lugar, se diseñaron sondas específicas para miRNAs ya descritos en *A. thaliana* las cuales resultaron, en su gran mayoría, efectivas a pesar de

que los miRNAs utilizados nunca habían sido descritos en *N. tabacum*. Se analizó la acumulación relativa de los diferentes miRNAs en plantas no transgénicas, parentales, de la línea mp_{xcp}^{T42W*}, de la línea MP_{xCP}^{T42W} y en plantas no transgénicas infectadas con TMV. En la figura 34 se muestran los resultados de un “Northern blot” típico de RNAs de bajo peso molecular. Los datos numéricos mostrados en la figura 34 representan la media y el error estándar (entre paréntesis) de dos replicas biológicas. Para obtener los datos se cuantificó la señal utilizando un escáner de radiactividad que luego fue normalizada acorde a la cuantificación de los rRNAs de cada una de las muestras teñida con Bromuro de Etidio, empleando para ello el mismo escáner. Posteriormente, se relativizaron con respecto al valor obtenido para las plantas no transgénicas, a las cuales se les asignó arbitrariamente el valor de 1.

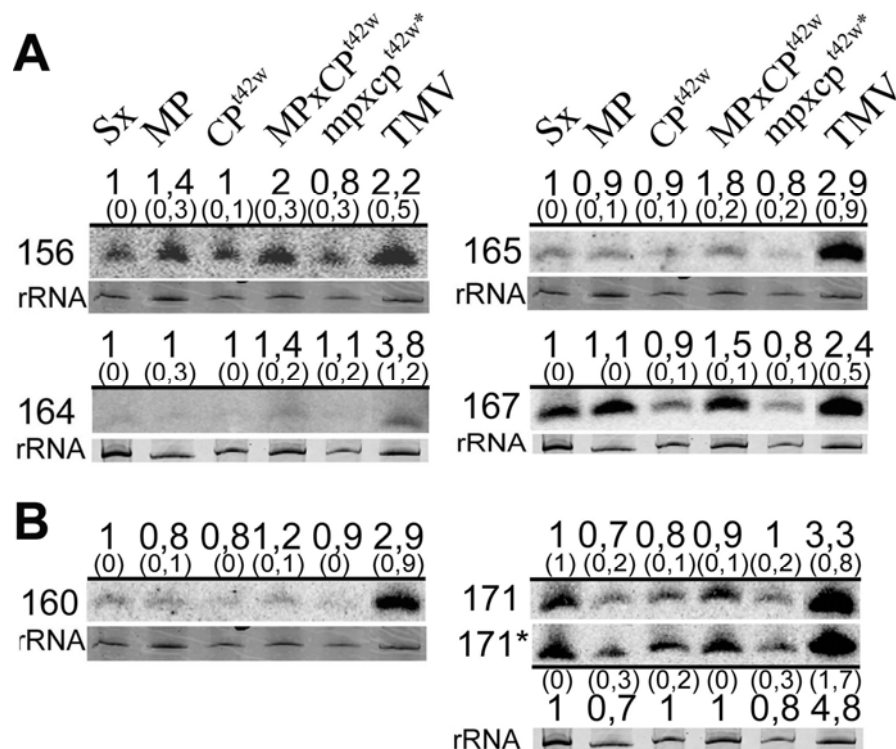


Figura 34. Efectos de la expresión simultánea de MP y CP^{T42W} de TMV y de infecciones con TMV en la acumulación de miRNAs. (A) y (B) Ensayo de "Northern blot" detectando la acumulación de miRNAs y miRNAs* (secuencia complementaria) en plantas no transgénicas (Sx), transgénicas (MP, CP^{T42W}, MP_{xCP}^{T42W} y mp_{xcp}^{T42W*}) y Sx infectadas con TMV (TMV). Se analizaron las muestras de sRNAs por duplicado utilizando oligonucleótidos homólogos a los miRNAs de *Arabidopsis* miR156, miR160, miR164, miR165, miR167 y miR171 como sondas. Los rRNA fueron teñidos con bromuro de etidio para normalizar los datos. Se indica la acumulación relativa de los miRNAs presentes en las distintas situaciones con respecto a los obtenidos en las plantas Sx y normalizado con RNA total sembrado en los geles. Se grafica el promedio de dos experimentos independientes y su desviación estándar se muestra entre paréntesis (Bazzini y col. 2007a).

De todas las sondas empleadas sólo con la correspondiente al miR172 no se detectó la señal esperada. Sin embargo este resultado se puede explicar debido a que se trata de un miRNA muy poco abundante en *A.thaliana*. Para superar este problema se suelen utilizar ribosondas para mejorar su detección. Las plantas MPxCP^{T42W} y las no transgénicas infectadas con TMV acumularon niveles más altos de miR156, miR164, miR165 y miR167 comparados a los de las plantas no transgénicas, a las parentales o a las mp_{xcp}^{T42W*} (Fig. 34A). Considerando los niveles de los miRNAs en las plantas de la línea MPxCP^{T42W} que presentaban severos problemas morfológicos y en las plantas no transgénicas infectadas las cuales poseían los mismos síntomas de deformación de las hojas y de pigmentación, podemos concluir que existe una correlación positiva entre la alteración de los miRNAs y las malformaciones observadas. Además la acumulación del miR156 también estaba aumentada en la planta MP respecto a la no transformada, aunque los niveles fueron menores que los de la línea MPxCP^{T42W}. En el caso del miR160, si bien la tendencia fue similar, las diferencias no fueron tan marcadas (Fig. 34B). En el caso del miR171 y de su complementario miR171*, sólo se encontraron alterados en plantas infectadas (Fig. 34B). Es importante mencionar que si bien se analizaron las hebras complementarias de todos los miRNAs estudiados, sólo la del miR171 fue detectada.

d) Interacción *in vivo* de la MP con CP^{T42W}

A partir de los datos y observaciones anteriores, concluimos que la presencia simultánea de las proteínas MP y CP^{T42W} de TMV producen alteraciones morfológicas, lo cual no ocurre en plantas que expresan sólo una de estas proteínas virales. Consecuentemente, una posible explicación para estos nuevos efectos producidos por la acumulación de ambas proteínas virales podía involucrar a una interacción entre ambas produciendo nuevos efectos o acciones. Si bien se conocía que los monómeros de CP interactúan *in vivo* (Butler y Klug 1978), y de MP *in vitro* (Citovsky y col. 1990; Brill y col. 2000) no se había investigado si la MP y la CP lo hacen. Por otro lado, en el 2004, Asurmendi y colaboradores mostraron claramente que la CP y la MP co-localizan durante la infección de TMV, lo cual indica que posiblemente interactúen *in vivo*.

En consecuencia, se decidió investigar si existe interacción entre ambas proteínas *in vivo*. Para realizar los estudios de interacción proteína-proteína se adaptó la técnica de complementación de la fluorescencia (BiFC, por su sigla en inglés de “Biomolecular Fluorescence Complementation”) descrita previamente en células de mamíferos (Hu y col. 2002; Citovsky y col. 2006). El BiFC se basa en la formación de un complejo compuesto por dos fragmentos de una proteína fluorescente, como YFP (Hu y col. 2002; Hu y Kerppola 2003) que se forma solamente cuando dos proteínas interactúan *in vivo*. Las proteínas en estudio se fusionan por separado a las mitades amino y carboxilo de la proteína fluorescente. Ninguna de las dos mitades de YFP son capaces de fluorescer por sí mismas. Si las dos proteínas en estudio interactúan entre sí, ambos fragmentos de YFP se acercarán espacialmente de modo que sean capaces de fluorescer.

i) Descripción de las construcciones para realizar BiFC

Tanto la MP como la CP^{T42W} fueron fusionadas al fragmento amino-terminal (155 a.a.) y al carboxi-terminal (156 a 239 a.a.) de la YFP (YFP^N y YFP^C, respectivamente). De esta manera se generaron las siguientes proteínas de fusión: MP-YFP^N, MP-YFP^C, CP-YFP^N y CP-YFP^C. Para permitirle cierta flexibilidad a la fusión, fueron introducidas 5 glicinas entre las proteínas virales y los distintos fragmentos de YFP. Luego, se clonó el gen que codifica para las proteínas de fusión en un vector para expresión en plantas bajo el promotor 35S de virus del mosaico del coliflor (CaMV) y posteriormente en un vector binario apto para realizar ensayos de agroinfiltración (Fig. 35A). Como control negativo se utilizaron construcciones vacías, denominadas: E-YFP^N y E-YFP^C, (E por "empty" que significa vacío en inglés) (Fig. 35A).

ii) Ensayos de BiFC

A fin de llevar a cabo este ensayo se agroinfiltraron hojas de plantas de *N. benthamiana* con las construcciones de BiFC descritas anteriormente solas o en conjunto y se observaron bajo un microscopio con sistema de detección de fluorescencia. Como se esperaba, la combinación de la E-YFP^N con E-YFP^C no produjo fluorescencia (Fig. 35C) al igual que cualquier combinación entre éstas y las construcciones con proteínas virales. Estos resultados muestran claramente que los fragmentos de YFP no fluorescen por sí solos, sin proteínas que interactúen entre sí y los acerquen físicamente.

Por el contrario, las zonas infiltradas con las construcciones MP-YFP^N+MP-YFP^C y CP-YFP^N+CP-YFP^C efectivamente mostraron fluorescencia indicando que tanto la MP como la CP son capaces de interactuar con ellas mismas *in vivo* (Fig. 35B).

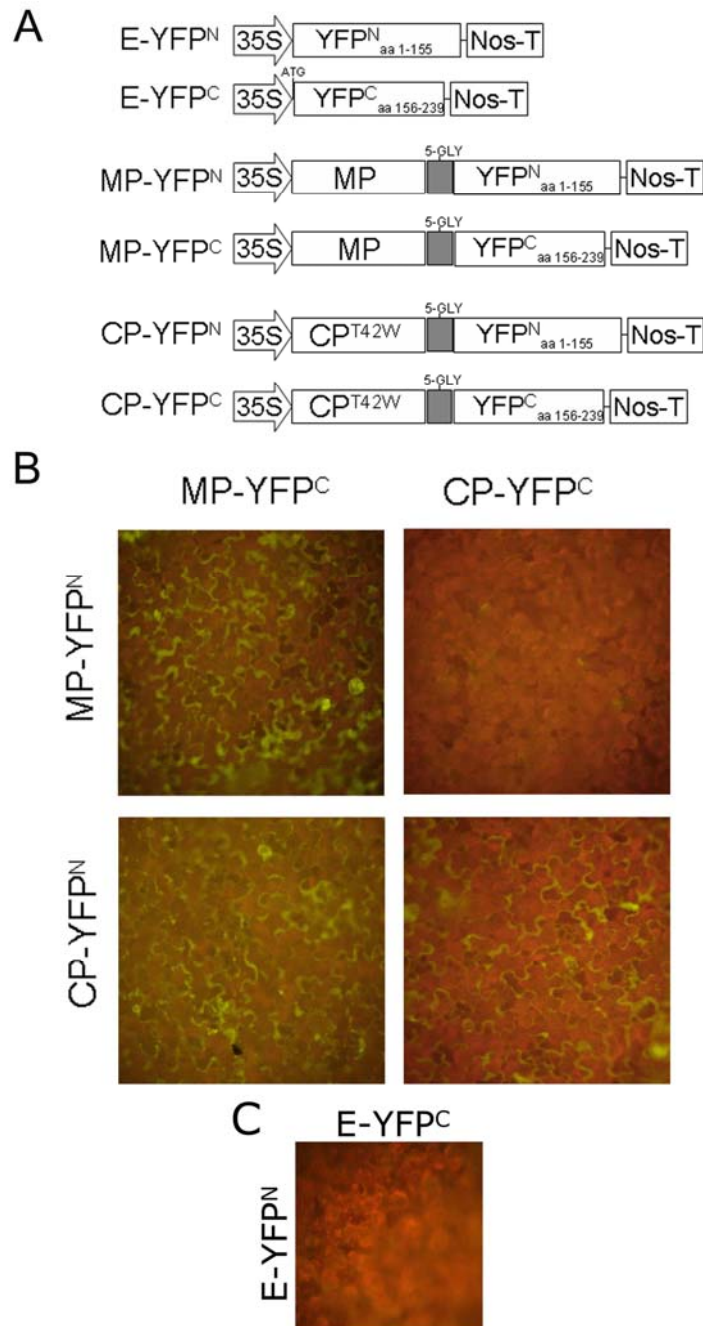


Figura 35. La MP de TMV interactúa con la CP^{T42W} de TMV *in vivo*. (A) Detalles de los plásmidos construidos para ensayos de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC): **35S**, promotor del virus del mosaico del coliflor; **NosT**, secuencia del terminador de la transcripción del gene *nos*; **YFP^N**_{aa 1-155}, Fragmento N-terminal de la YFP incluyendo desde el aminoácido 1 al 155; **YFP^C**_{aa 156-239}, fragmento C-terminal conteniendo el fragmento de YFP desde el aa 156 al 239; **MP**, MP de TMV y **CP^{T42W}**, CP mutante de TMV. (B) Imágenes del microscopio de epifluorescencia de células de epidermis de hoja de *N. benthamiana* agroinfiltradas con una mezcla de *Agrobacterium* portando las construcciones indicadas con las distintas fusiones. Cada imagen es representativa de varias repeticiones. (C) Células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con E-YFP^N y E-YFP^C (Bazzini y col. 2007a).

Los ensayos de BiFC que combinaban la MP-YFP^C+CP-YFP^N mostraron que se restauraba la fluorescencia. Sin embargo la combinación recíproca (MP-YFP^N+ +CP-YFP^C) no fue capaz de restaurar la fluorescencia (Fig. 35B). Consecuentemente, este estudio nos permitió evidenciar que la MP interactúa con la CP *in vivo* en condiciones similares a las obtenidas en las plantas transgénicas y que esa interacción probablemente dependa de la orientación de las proteínas. Resultados similares fueron reportados en ensayos de BiFC con otras proteínas donde la fluorescencia sólo se restauraba en una orientación determinada (Bracha-Drori y col. 2004; Diaz y col. 2005). Hay que mencionar que en muchos ensayos de BiFC suelen dar falsos negativos, es decir, dos proteínas con interacción conocida pueden no dar positivo (Bracha-Drori y col. 2004; Diaz y col. 2005) dependiendo en la orientación de la fusión con las proteínas responsables de dar la señal, en este caso los fragmentos de YFP.

A partir de estos resultados podemos sugerir que la MP y CP formarían un complejo con características o funciones desconocidas y diferentes a los que se observan con las proteínas por separado, como por ejemplo el de alterar la acumulación de los miRNAs.

e) La MP y CP del TMV no suprimen el PTGS

Como se ha detallado en la introducción, muchas proteínas virales con actividad supresora de silenciamiento alteran el desarrollo de la planta y la acumulación o actividad de los miRNAs. En realidad muchas de ellas pueden interactuar directamente con los siRNA así como también con los miRNAs. Por lo tanto se decidió explorar si la MP y la CP juntas o por separado son capaces de suprimir el silenciamiento.

i) Silenciamiento inducido por un transgén

Para verificar si las MP y/o CP poseen la capacidad de suprimir el PTGS, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con una cepa de *Agrobacterium* que portaba una construcción capaz de expresar GFP, junto con otra cepa portando una construcción que codifica para una secuencia sentido-antisentido de GFP (dsGFP) capaz de formar una horquilla de RNA de doble cadena una vez transcrita (Fig. 36). Esta estructura de RNA de doble cadena es capaz de gatillar el silenciamiento de GFP. Si se agroinfiltra solo con la construcción capaz de expresar GFP, se observa una fluorescencia típica de este reportero a la luz UV. Por el contrario si se agroinfiltran la construcción capaz de expresar GFP junto con la construcción que da lugar a una dsGFP, no se observa fluorescencia (Fig. 36) (Jones y col. 1999). Ahora, si se expresa un supresor como HC-Pro en conjunto con estas dos construcciones de GFP y dsGFP, el silenciamiento no puede establecerse por la presencia del supresor y en consecuencia se observa fluorescencia (Fig. 36) (Xie y col. 2004). Este sistema se utiliza de rutina para identificar supresores del silenciamiento. De este modo, se analizó la capacidad de suprimir el silenciamiento de la MP, de la CP^{T42W} y de ambas juntas (MP+ CP^{T42W}). En ninguno de los casos se

observó fluorescencia, por lo tanto, ni la MP, ni la CP^{T42W}, ni ambas proteínas juntas son capaces de suprimir el PTGS en este tipo de ensayos (Fig. 36).

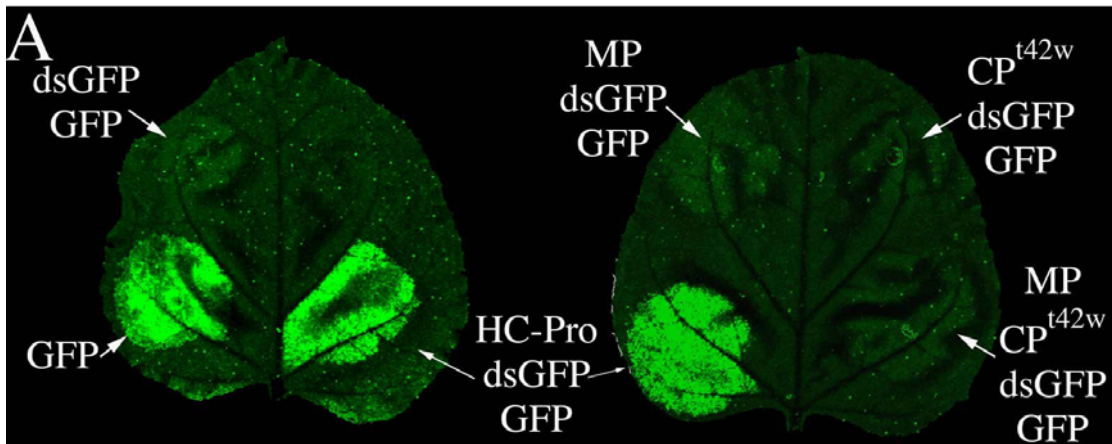


Figura 36. La expresión de MP y/o CP^{T42W} de TMV no suprimen el PTGS inducido por transgén.

(A) Hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con: 35S-GFP o co-agroinfiltrada con 35S-GFP y una cepa portando una secuencia de GFP repetida e invertida, separada por un intrón (35S-dsGFP), la cual induce eficientemente el PTGS de GFP y causa la falta de fluorescencia. La co-infiltración con 35S-GFP más 35S-dsGFP, más una tercer cepa expresando una proteína supresora del PTGS como el HC-Pro (35S-HC-Pro) restaura la señal fluorescente. Sin embargo, la fluorescencia no se restaura al agroinfiltrar con 35S-GFP, 35S-dsGFP y MP (MP), o CP^{T42W} de TMV o con ambas juntas (MP/CP^{T42W}) (Bazzini y col. 2007a).

ii) Silenciamiento sistémico

No todas las proteínas supresoras de PTGS actúan a un mismo nivel, la proteína supresora p25 de PVX si bien es capaz de suprimir el movimiento de la señal de PTGS no puede suprimir el PTGS en las condiciones de los ensayos anteriores cuando se encuentra en un vector replicativo. Otro ejemplo, es la p50 del *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), la cual es un supresor del silenciamiento sistémico, por lo tanto no interfiere con el silenciamiento a nivel local en plantas de *N. benthamiana*. (Yaegashi y col. 2007). Consecuentemente, se decidió determinar si la MP y la CP^{T42W} de TMV actúan a un nivel distinto al evaluado en el ensayo previo, por ejemplo previniendo la dispersión de la señal sistémica del silenciamiento génico. Cuando se agroinfiltran plantas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan GFP (línea 16C) de tan sólo 3 semanas de edad con una cepa de *Agrobacterium* portadora de la construcción 35S-dsGFP, en la zona agroinfiltrada se generan siRNA capaces de moverse hacia el resto de la planta silenciando la expresión de GFP en zonas no infiltradas (Himber y col. 2003). Por lo tanto a medida que pasa el tiempo el silenciamiento se expande por toda la planta con la consiguiente pérdida de la fluorescencia en todas sus hojas (Brigneti y col. 2004). En la figura 37 se observa la cinética del silenciamiento en función del tiempo (Bazzini y col. 2007b). Sin embargo, si se agroinfiltra con 35-dsGFP con un supresor de silenciamiento capaz de

inhibir ya sea el propio silenciamiento o el movimiento del mismo, las plantas no pierden la fluorescencia en las zonas sistémicas o la pérdida se ve muy retardada (Voinnet y col. 2000).

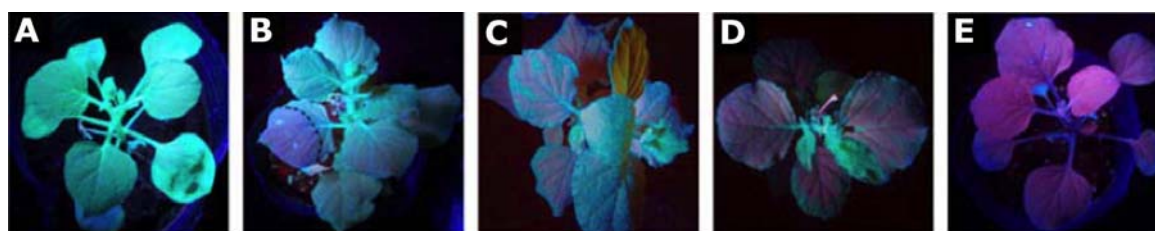


Figura 37. (A) Plantas transgénicas expresando GFP (línea 16C) observadas bajo luz UV. (B) Hojas transgénicas de la línea 16C agroinfiltradas con 35S-dsGFP después de 1 semana. La línea punteada negra marca la zona de agroinfiltrado. (C) y (D) Plantas 16C agroinfiltradas con 35S-dsGFP luego de 2 y 3 semanas respectivamente: la señal de GFP es reducida mientras la señal de PTGS se va diseminando hacia arriba. (E) Plantas no transgénicas bajo la luz UV (Bazzini y col. 2007b).

Consecuentemente, se agroinfiltraron plantas transgénicas expresando constitutivamente GFP (denominada línea 16C) de 3 semanas de edad con la construcción 35-dsGFP sola o en combinación con la construcción 35S-HC-Pro; o con la 35S-p25 (Voinnet y col. 2000); con la 35S-MP; o con la 35S-CP^{T42W}, o con una mezcla de 35S-MP+35S-CP^{T42W}. La aparición del silenciamiento sistémico, evidenciado por pérdida de la fluorescencia fue analizada durante 16 a 18 días. La tabla 2 muestra que ni la MP, ni la CP^{T42W} de TMV, ni ambas en simultáneo pudieron prevenir la dispersión de la señal del silenciamiento génico, como si lo hicieron los controles con los supresores HC-Pro y p25 (Voinnet y col. 2000).

Construcciones	Silenciamiento sistémico
dsGFP	68/76
dsGFP+HC-Pro	0/32
dsGFP+p25	3/42
dsGFP+MP	55/62
dsGFP+CP ^{T42W}	51/57
dsGFP+MP+CP ^{T42W}	56/63

Tabla 2. Silenciamiento sistémico de GFP inducido por expresión de dsGFP. En la tabla se indica el número de plantas co-agroinfiltradas con dsGFP+HC-Pro, dsGFP+p25 (PVX), dsGFP+MP (TMV), dsGFP+CP^{T42W} (TMV) y dsGFP+MP+CP^{T42W} que exhibieron silenciamiento sistémico de GFP y su relación con el número total de plantas evaluadas en 3 experimentos independientes. Las plantas fueron observadas a los 15 días de la agroinfiltración (Bazzini y col. 2007a).

- Todos los ensayos de silenciamiento génico fueron puestos a punto en conjunto con la Licenciada Vanesa Mongelli miembro del laboratorio de la Dra Mariana del Vas (Bazzini y col. 2007b).

f) La co-expresión de MP y CP^{T42W} de TMV reduce la aparición de síntomas en infecciones con TMV

Finalmente se decidió realizar ensayos de resistencia a TMV para evaluar si la co-expresión de MP y CP^{T42W} aumentaba la resistencia de las plantas respecto a aquellas que sólo expresan CP^{T42W}. Más aún, la alteración en la acumulación de los miRNAs puede involucrar cambios (directos o indirectos) sobre la expresión de genes involucrados en la resistencia los cuales podrían facilitar o dificultar la infección viral. Por lo tanto, se analizó el grado de resistencia de las líneas ante una infección de TMV, empleando distintos tipos de inóculo. Así, se infectaron plantas no transgénicas; MP; CP^{T42W}; MPxCP^{T42W} y mp_xcp^{T42W*} ya sea con RNA infectivo o con virus, y con alta y baja concentración de inóculos. Posteriormente, se analizó el porcentaje de plantas con síntomas en función del tiempo (Tabla 3).

Como se esperaba de acuerdo a resultados previos, la línea CP^{T42W} de TMV fue altamente resistente a las infecciones con TMV tanto con alto como con bajo inóculo viral pero muy poco resistente al inóculo del tipo RNA (Bendahmane y col. 1997) (Tabla 3). Las plantas que expresaban sólo la MP exhibieron un débil retraso en la aparición de los síntomas luego de la infección con TMV con ambos niveles de inóculo viral pero no así con RNA (Ares y col. 1998) (Tabla 3). Como era predecible, las plantas en las cuales ambos transgenes se hallan silenciados (línea mp_xcp^{T42W*}) fueron extremadamente resistentes a la infección tanto con virus como con RNA, ya se ha comentado que las plantas resistentes por medio de PTGS suelen ser inmunes e independientes de la desencapsidación (Tabla 3). Las plantas MPxCP^{T42W} mostraron un grado mayor de resistencia en los desafíos tanto con RNA como con TMV comparadas con las plantas de la línea MP y las de la línea CP^{T42W} (Tabla 3). Existen diferentes explicaciones para los resultados observados sin embargo las siguientes dos parecen ser las mas probables: (1) la MP y la CP^{T42W} interfieren directamente y sinérgicamente con el ciclo viral; (2) la alteración en la acumulación de los miRNAs provoca un cambio en la expresión de genes que indirectamente reducen la acumulación del virus, en la línea MPxCP^{T42W}.

		% de plantas mostrando síntomas de TMV.								
	Plantas	D'as luego de la infección								
		6	8	12	17	20	26	31	34	
A	Sx	80	100	100	100	100	100	100	100	TMV alto in-entlo
	MP	40	80	100	100	100	100	100	100	
	CP ^{T42W}	0	0	20	80	80	80	80	80	
	mpxcp ^{T42W*}	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MPxCP ^{T42W}	0	10	20	30	60	60	60	60	
B		8	11	16	23	29	36	47	51	TMV bajo in-entlo
	Sx	60	100	100	100	100	100	100	100	
	MP	60	60	60	60	60	60	60	60	
	CP ^{T42W}	0	0	0	0	20	20	20	40	
	mpxcp ^{T42W*}	0	0	0	0	0	0	0	0	
MPxCP ^{T42W}	0	0	0	0	0	0	0	0		
C		9	11	16	19	24	31	37	45	TMV RNA in-entlo
	Sx	60	60	60	60	100	100	100	100	
	MP	60	60	100	100	100	100	100	100	
	CP ^{T42W}	0	0	60	60	60	60	100	100	
	mpxcp ^{T42W}	0	0	0	0	0	0	0	0	
MPxCP ^{T42W}	0	0	60	60	60	60	60	60		

Tabla 3. Porcentaje de plantas mostrando síntomas de TMV sistémico a distintos tiempos post-infección

Se inocularon plantas de cuatro semanas con RNA (A) o bajo (B) o alto (C) inóculo de TMV. La infección con baja concentración de inóculo produjo ~50 lesiones locales (LL) por hoja inoculada de tabaco Xanthi nc (NN); la infección con alta concentración de inóculo produjo > 200 LL; TMV- RNA produjo ~10 LL. Se midió el porcentaje de plantas mostrando síntomas hasta los 51 días luego de la inoculación (Bazzini y col. 2007a).

4) Las infecciones virales alteran la acumulación de los miRNAs y este efecto no correlaciona con su capacidad supresora del silenciamiento

En el capítulo anterior se demostró que las infecciones con TMV alteraban la acumulación de miRNAs y que a su vez esta alteración correlacionaba con la expresión de proteínas virales las cuales no poseen función supresora de silenciamiento. Esto fue un resultado sorprendente, ya que en la bibliografía no se habían reportado casos similares: solamente se habían encontrado alteraciones en la acumulación de los miRNAs que correlacionan con la expresión de proteínas supresoras del PTGS o virus portándolas.

Nos interesó por lo tanto explorar la existencia de asociación entre la capacidad supresora del PTGS, la severidad de los síntomas y la alteración de los miRNAs producida por un panel de virus con diferentes características.

a) Elección del panel de virus a utilizar en las infecciones virales

Para analizar los efectos fenotípicos causados por los diversos tipos de virus de plantas, se infectaron mecánicamente más de 20 plantas de *N. tabacum* con virus provenientes de 3 familias distintas: *Tobamoviridae*, *Potyviridae* y *Potexviridae*. De la familia *Tobamoviridae* se utilizaron el TMV, el ToMV, el TMGMV (Virus del mosaico verde atenuado del tabaco), el RMV (*Ribgrass mosaic virus*), el ORSV (Virus de la mancha anillada del *Odontoglossum*) y el ShMV (*Sunn-hemp mosaic virus*); de la familia *Potyviridae* los virus PVY y TEV, en tanto que de la familia *Potexviridae* se empleó PVX. En la figura 38A se ilustra la relación filogenética existente entre los virus elegidos basada en la comparación de las secuencias nucleotídicas y mostrando su diversidad evolutiva.

Las plantas de tabaco inoculadas tanto con TMV y ToMV mostraron los síntomas más severos, exhibiendo un característico mosaico de distintas tonalidades de verdes, así como también deformación en las hojas. Las infecciones con los virus TMGMV, ORSV y RMV produjeron fenotipos similares pero de menor severidad, entre ellos el TMGMV fue el más severo. Por otro lado, el ShMV produjo un mosaico muy leve, casi imperceptible. Respecto a infecciones con virus de otras familias cabe destacar que las plantas infectadas con PVX mostraron las clásicas decoloraciones y deformaciones en las hojas. En tanto que para el caso de los *Potyvirus*, el TEV causó tanto deformaciones foliares fuertes como manchas cloróticas mientras que plantas infectadas con PVY mostraron una pigmentación amarillenta muy débil (Fig. 38B).

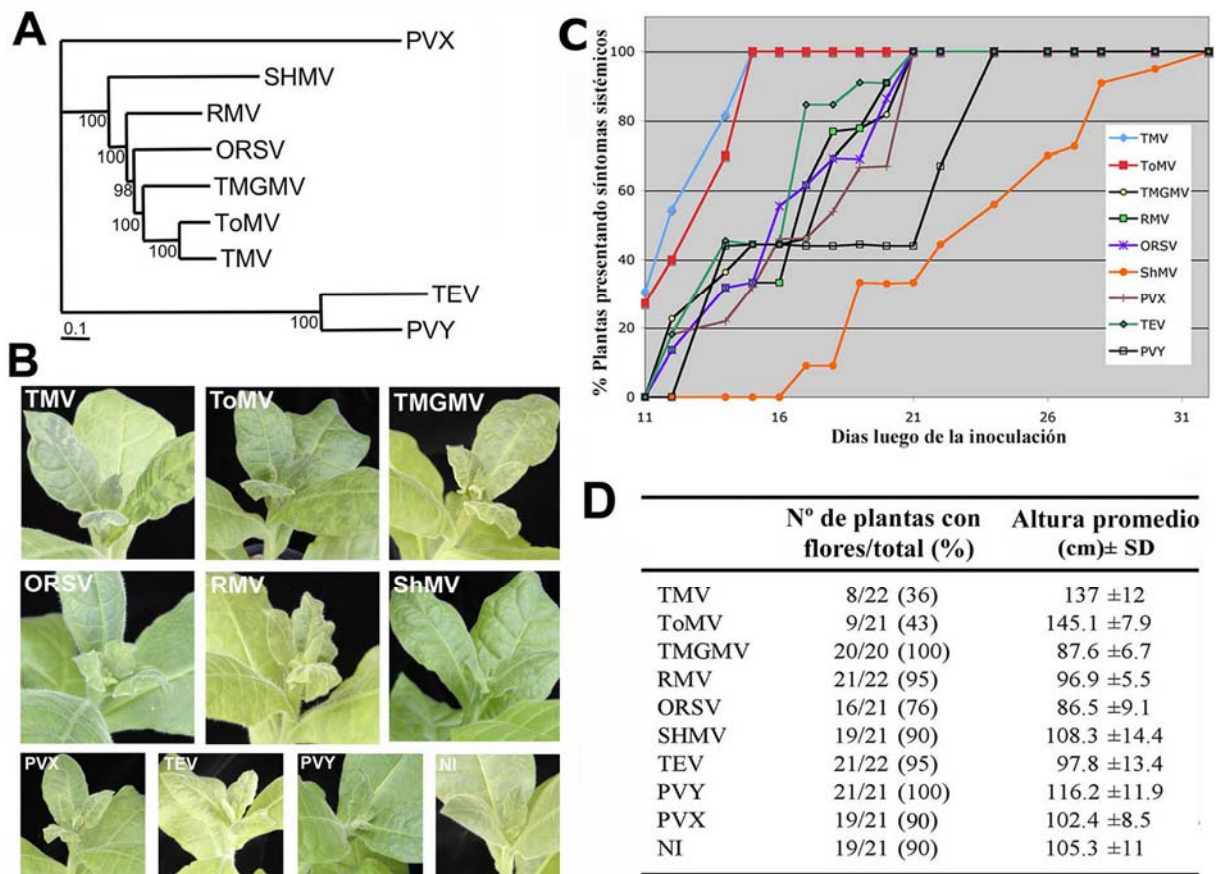


Figura 38. (A) Árbol filogenético comparando los genomas virales de un grupo de virus. Se muestran los valores de *bootstrap* (1000 replicas al azar). (B) Síntomas virales sistémicos en tabaco a los 30 días luego de la infección con los virus indicados en la figura. (C) Se calculó el porcentaje de plantas mostrando síntomas sistémicos sobre plantas infectadas con distintos virus (TMV, ToMV, TMGMV, RMV, ORSV, ShMV, PVY, TEV y PVX) en dos experimentos independientes con un mínimo de diez plantas por ensayo. En todos los casos se utilizaron concentraciones similares de virus como inóculo (2.5 ug/ml). (D) Número de plantas con flores y promedio de la altura calculados sobre el total de las plantas a los 30 días luego de la infección en dos experimentos independientes.

A fin de comparar la velocidad de aparición de síntomas para cada uno de los virus, se midió el porcentaje de plantas que exhibían síntomas a lo largo del tiempo. Se utilizaron más de 20 plantas para cada uno de los virus y se llevaron a cabo dos experimentos independientes. Como se observa en la figura 38C, el TMV y ToMV fueron los dos virus más rápidos en producir síntomas visibles; en segundo lugar se agruparon los virus TMGMV, RMV, ORSV, TEV y PVX con una velocidad intermedia, y finalmente en el grupo de los virus más lentos se ubicaron los virus PVY y ShMV.

También se midieron otras características fenotípicas como el número de plantas con flores y la altura de las plantas (ambas relevadas a los 30 d.p.i). Así, el número de plantas con flores resultó significativamente menor en las plantas infectadas con los virus TMV y ToMV respecto a plantas no inoculadas, mientras que los otros virus no alteraron significativamente este parámetro (Fig. 38D).

Más aún, sólo las plantas infectadas con TMV o con ToMV mostraron una altura significativamente mayor comparada a las no infectadas.

Para facilitar el análisis de los datos, se decidió hacer un ranking de severidad asignándole distinto grado de severidad de la infección dependiendo de los datos mostrados en la figura.38. En la tabla 4 se muestra que los virus más agresivos fueron el TMV y ToMV y un escalón mas abajo: TMGMV, RMV, ORSV, TEV y PVX. Finalmente, los virus que causaron síntomas menos severos fueron el PVY y ShMV.

Virus	Severidad de la infección
TMV	+++
ToMV	+++
TMGMV	++
RMV	++
ORSV	++
ShMV	+
TEV	++
PVY	+
PVX	++

Tabla 4. Resumen de los valores de severidad de la infección otorgados según los datos de la figura 38.

b) Evaluación del nivel de supresión del PTGS de los virus utilizados

Para analizar el nivel de supresión del PTGS de los virus en estudio, se utilizaron nuevamente plantas de la línea 16C (Brigneti y col. 2004). Como ya se mencionara estas plantas exhiben un color verde fluorescente al iluminarlas con luz UV debido a que expresan altos niveles del reportero GFP. Sin embargo cuando se las agroinfiltra con una construcción capaz de silenciar la expresión de GFP las plantas pierden dicho color y se ven rojas a la luz ultravioleta. Para llevar a cabo este experimento se partió de plantas silenciadas para GFP las cuales se infectaron con los 9 virus mencionados en forma separada. Se inocularon como mínimo 21 plantas para cada caso. Cuando las plantas silenciadas e infectadas presentaron síntomas de la enfermedad se analizó el color de sus hojas bajo luz UV. Como era de esperarse, las plantas infectadas con PVY o con TEV mostraron reversión del silenciamiento (por lo tanto fluorescencia), indicando que ambos virus son capaces de suprimir el PTGS de la GFP transgénica (Tabla 5) (Jones y col. 1999). Por el contrario en el resto de las plantas infectadas no se detectó fluorescencia, con la excepción de algunos parches, demostrando que ninguno de los virus estudiados posee una fuerte capacidad de supresión del PTGS (Tabla 5). Si bien otros autores habían reportado el débil nivel supresor de los virus TMV, ToMV y PVX mediante este tipo de ensayos (Jones y col. 1999), este es, a nuestro entender, el primer reporte de este tipo de ensayos para los virus TMGMV, RMV, ORSV y ShMV (Tabla 5).

Virus	Familia	Proteína supresora	Supresión del PTGS	
			Nº de plantas con reversión del silenciamiento /Total de las plantas infectadas	% de plantas con reversión del silenciamiento
TMV	<i>Tobamovirus</i>	Replicasa	7/21*	33,33
ToMV	<i>Tobamovirus</i>	Replicasa	8/28*	28,57
ORSV	<i>Tobamovirus</i>	-	4/27*	14,81
RMV	<i>Tobamovirus</i>	-	5/25*	20
SHMV	<i>Tobamovirus</i>	-	6/33*	18,18
TMGMV	<i>Tobamovirus</i>	-	5/22*	22,73
PVX	<i>Potexvirus</i>	(TGB1)	0/25	0
PVY	<i>Potyvirus</i>	HcPro	14/16	87,50
TEV	<i>Potyvirus</i>	HcPro	13/16	81,25

* La señal de GFP fue observada mayormente en la vena.

Tabla 5. Se silenciaron plantas de *N. benthamiana* transgénicas expresando GFP (línea 16c) por infiltración con *Agrobacterium*, como se describió anteriormente (Voinnet y col. 1998). Se inocularon plantas completamente silenciadas con los siguientes virus: TMV, ToMV, TMGMV, RMV, ORSV, ShMV, PVY, TEV y PVX. Se observaron las plantas presentando síntomas sistémicos bajo la luz UV y se contaron el número de plantas con supresión de PTGS, es decir fluorescentes.

c) Análisis de la alteración de la acumulación de los miRNAs en plantas de *N. tabacum* infectadas con distintos virus

Finalmente, se decidió investigar la capacidad de los virus ya analizados de alterar la acumulación de los miRNAs. Para ello se infectaron por lo menos 10 plantas con cada uno de los virus y luego de 10 días se colectó material (hojas superiores) de cada grupo, se aislaron sRNAs del grupo infectado (haciendo un pool de materiales de todas las plantas infectadas) y se realizaron “Northern blots” para detectar diferentes miRNAs. Las sondas de los miRNAs fueron las mismas que las utilizadas en el tercer capítulo (diseñadas a partir de secuencias de miRNAs de *Arabidopsis* involucrados en desarrollo) a las cuales se les agregaron tres sondas nuevas (miRNAs: 166, 169 y 159). Se utilizó como referencia (y arbitrariamente se le asignó el valor de 1) al nivel de los miRNAs detectado en el grupo de las plantas no infectadas (control) a fin de relativizar los valores obtenidos para los grupos infectados. Cabe aclarar que previa a la relativización, se normalizaron los valores de intensidad de la señal radiactiva obtenidos para cada miRNA con la cantidad de RNA total teñido con

BrEt y cuantificado por densidad en el mismo gel antes de la transferencia. Este experimento fue repetido dos veces y a partir de los datos obtenidos se calcularon la media y el desvío estándar.

Así, se detectó que los virus TMV, ToMV, TMGMV y ShMV alteraron fuertemente la acumulación de muchos de los miRNAs analizados; y finalmente los virus ORSV (fue el que más alteró la acumulación de miRNAs entre los más débiles), RMV, TEV, PVY y PVX modificaron muy sutilmente la acumulación de los miRNAs en las condiciones evaluadas en este experimento (Fig. 39A y B).

Más aún, no todos los miRNAs fueron alterados de la misma forma: los miRNAs miR166, miR171, miR171*, miR169, miR160, miR164 y miR156 resultaron altamente afectados mientras que miR159, miR165 y miR167 fueron menos afectados. Estos datos permitirían suponer que los efectos virales sobre los miRNAs pueden estar dirigidos sobre un grupo específico de ellos y no necesariamente sobre todos por igual. Es importante mencionar que sólo se pudo detectar el miR171* (complementario al mir171 maduro).

Estos datos evidencian que los virus con un nivel de actividad supresora baja o indetectable en el tipo de ensayo realizado (TMV, ToMV, ShMV y TMGMV) (Tabla 3) pueden alterar la acumulación de los miRNAs (Fig. 38A y B) mientras que virus con un fuerte poder supresor (TEV y PVY) (Table 3) no necesariamente alteran la acumulación de los miRNAs, por lo menos en los tiempos y condiciones utilizadas en este trabajo (Fig. 38A y B). Los virus TMV y ToMV fueron los que produjeron síntomas más severos y asimismo los que más alteraron los niveles de acumulación de los miRNAs. Conjuntamente el virus TMGMV mostró una tendencia similar. Estos datos permiten sugerir que la alteración en los niveles de acumulación de los miRNAs podría ser la causa de alguno de los síntomas virales observados.

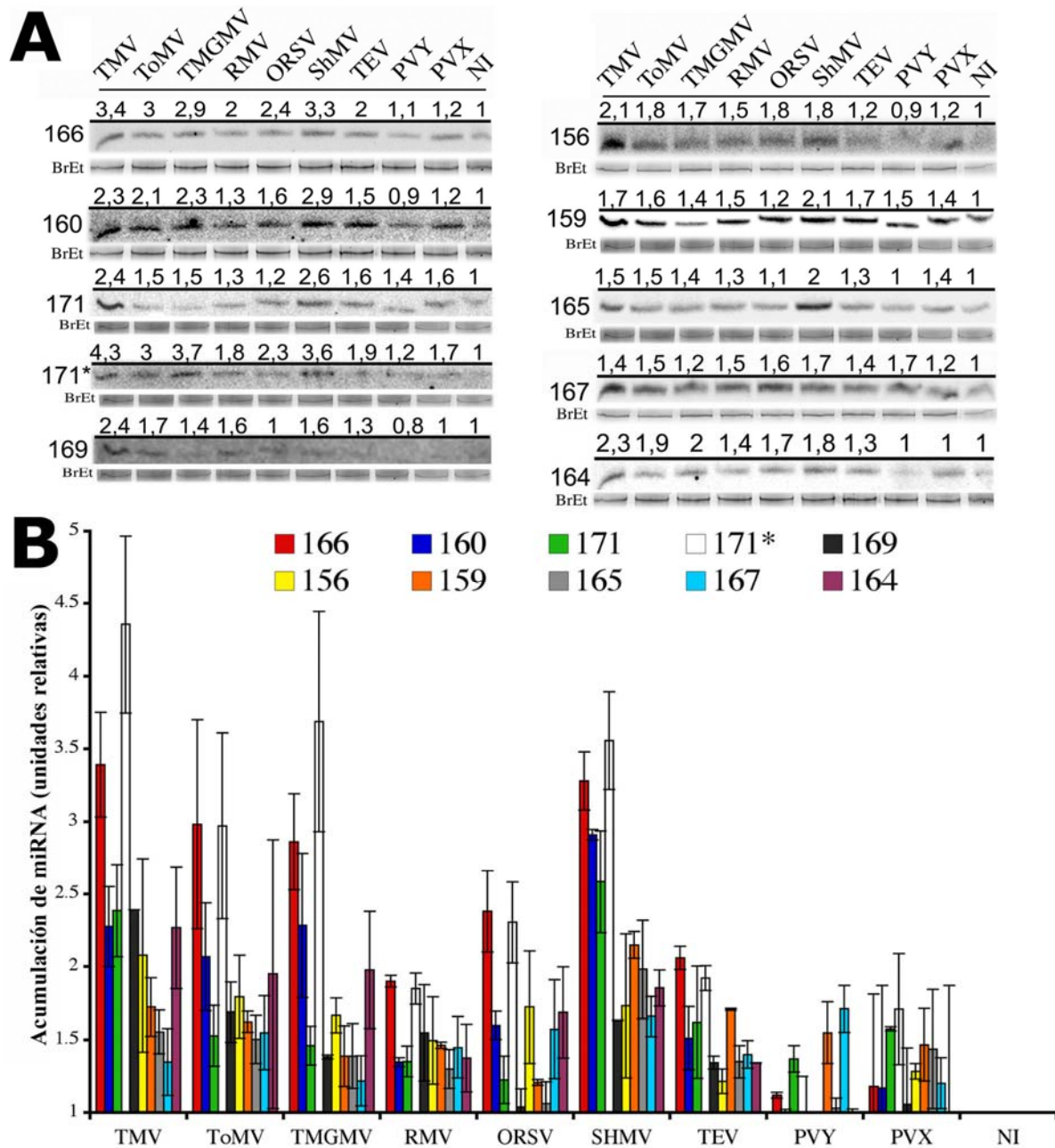


Figura 39. (A) “Northern-blot” detectando la acumulación de miRNAs en plantas de tabaco no infectadas e infectadas con los virus indicados. La acumulación relativa de los miRNAs se calculó en referencia a la no infectada (se fijó en 1), con todos los datos normalizados en función del RNA sembrado en los geles. (B) Se muestran el promedio y los errores estándar de dos experimentos independientes. Las sondas se diseñaron a partir de los miR156, miR159, miR160, miR164, miR165, miR166, miR167, miR169, miR171 y miR171* de *Arabidopsis*.

5) Utilización de miRNAs sintéticos como herramienta biotecnológica

Este último capítulo tiene como objetivo mostrar resumidamente un posible uso biotecnológico de los miRNAs sintéticos. Un miRNA sintético o artificial es un pre-miRNA natural al cual se le cambian las 21-22 pb del miRNA maduro y del miRNA* por una nueva secuencia de interés manteniendo en el pre-miRNA sintético, las características estructurales lo más parecidas posibles al original. Este miRNA sintético ahora es capaz de reconocer y controlar a un determinado gen blanco. Es decir, que uno puede teóricamente elegir qué gen quiere controlar y diseñar un miRNA sintético específico para regularlo negativamente. Los miRNAs sintéticos pueden ser una excelente herramienta biotecnológica o biológica para realizar “knock out” funcionales.

En la bibliografía ya se han reportado casos donde se controlan distintos genes con distintos miRNAs artificiales (Parizotto y col. 2004; Du y col. 2006; Niu y col. 2006; Schwab y col. 2006; Sun y col. 2006). El primer caso reportado fue controlando GFP mediante un miRNA sintético basado en el esqueleto del miR171 de *Arabidopsis* (Parizotto y col. 2004). Por otro lado, ya se lo ha utilizado para conferir resistencia a virus, diseñando miRNAs artificiales complementarios a 22 pb del genoma de un virus (Niu y col. 2006). Para este caso se utilizó el esqueleto del miR159. Las plantas transgénicas para este miRNA fueron resistentes al virus, y a esta nueva forma de conferir resistencia se la llamó resistencia mediada por miRNA. También se diseñaron miRNAs para controlar genes endógenos de *Arabidopsis* que originalmente no eran blanco de miRNAs, para este caso utilizaron el esqueleto del miR172a y miR319a (Schwab y col. 2006). También se realizaron trabajos en células de mamíferos (Du y col. 2006; Sun y col. 2006) y, desde ya, se ha convertido en una interesante herramienta para terapia génica (Dorsett y Tuschl 2004).

a) Diseño de un miRNA sintético contra GFP

Se decidió utilizar el miR164a como esqueleto porque su precursor posee un tamaño reducido y porque por otro lado en el laboratorio se estaba estudiando el promotor este miRNA (Fig. 11, introducción). Se decidió diseñar el miRNA artificial dirigiéndolo contra GFP para estandarizar la tecnología en el laboratorio. El objetivo principal fue diseñar miRNA artificiales, para poder pasar a una segunda etapa donde se diseñarían miRNA artificiales “al gusto del consumidor”.

En la figura 40 se muestra al miR164a endógeno de *Arabidopsis*, luego se esquematiza el esqueleto sin el miR maduro, ni el miR*. Por último se muestra el miR-GFP, el cual contiene un nuevo miRNA complementario a GFP y su respectivo miR*. El miR* no es exactamente complementario al miR-GFP sino que se realizaron diferentes mutaciones que le confieran al miRNA sintético la misma una energía libre y entalpía similar al del miR164 natural. Estos parámetros son requeridos para mantener la estructura y por ello ser reconocidos por la maquinaria de procesamiento.

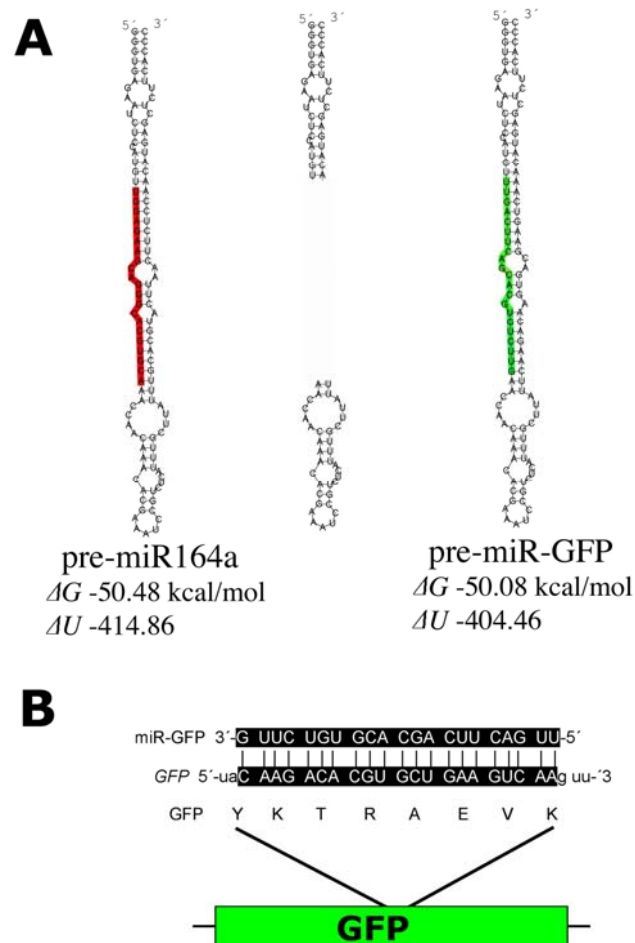


Figura 40. (A) Esquema de los pre-miR164a de *Arabidopsis* y el pre-miR-GFP sintético. En rojo se encuentra el miR164 maduro y en verde el miR-GFP maduro. Se muestra la energía libre (ΔG) y la entalpía (ΔU) del ensamblado. **(B)** Se muestra cómo el mRNA de GFP es reconocido por el miR-GFP sintético.

b) Determinación de la actividad del miRNA sintético

Para analizar si el miRNA artificial se procesaba correctamente y controlaba la acumulación de GFP, una vez diseñado se encargó a una empresa la síntesis del pre-miR-GFP. Luego, se lo clonó bajo el promotor 35S en un vector binario obteniéndose el miR-GFP y se introdujeron en agrobacterium via electroporación. En segunda instancia, se realizaron co-agronfiltraciones de hojas de *N. benthamiana* con diferentes agrobacterias, conteniendo un plásmido expresando GFP (GFP), otro expresando GFP repetida e invertida (dsGFP) y dos más expresando dos supresores de PTGS (Hc-Pro y P19). Todas estas construcciones son las mismas que las utilizadas para los ensayos de PTGS, excepto la de P19, la cual sobre expresa la proteína P19 del TBSV.

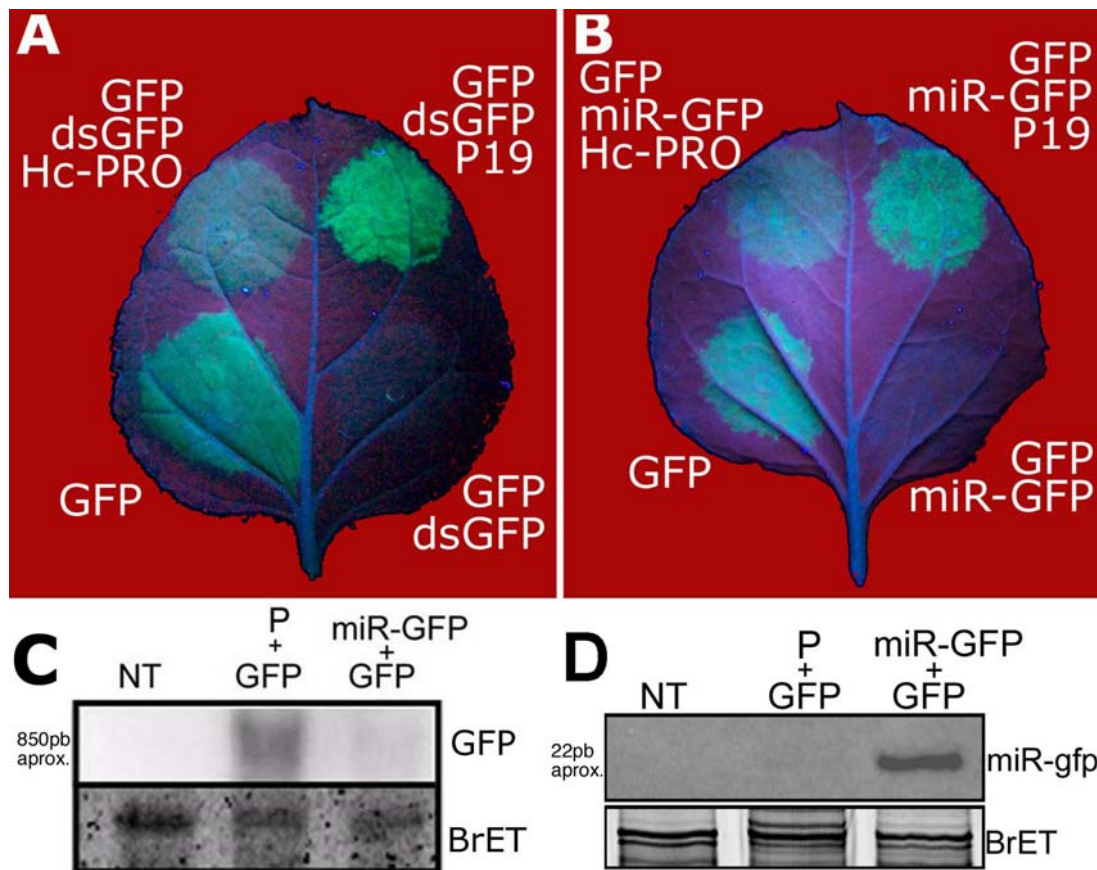


Figura 41. (A) y (B) Hoja de *N. benthamiana* agroinfiltrada con distintas combinaciones de GFP o dsGFP, Hc-Pro, P19 y miR-GFP (micro artificial) observada bajo luz UV. (C) “Northern blot” de RNA total extraído de las zonas infiltradas utilizando una sonda que reconoce al mRNA de GFP. (D) Detección del miR-GFP en gel de poliacrilamida de material extraído de las zonas infiltradas. **P**= vector vacío.

En la figura 41A se muestra el típico ensayo de inducción de PTGS en agroinfiltraciones de hoja de *N. benthamiana*. Se observa fluorescencia cuando se agroinfiltra con GFP. Sin embargo no se observa fluorescencia cuando se co-infiltra con dsGFP ya que esta construcción induce el silenciamiento de GFP. Por último, cuando se infiltran en presencia de un supresor, este interfiere con el desencadenamiento del PTGS por lo tanto se observa fluorescencia.

En la figura 41B se observan los mismos resultados pero utilizando el vector que expresa el miR-GFP en vez del la construcción plasmídica que expresa a dsGFP. Este resultado muestra por un lado que el miR-GFP es capaz de regular negativamente la expresión de GFP y por lo tanto no dar fluorescencia cuando se lo co-agroinfiltra con una construcción que expresa GFP bajo el control del promotor 35S. Por otro lado, muestra que la regulación negativa de GFP a partir del miR-GFP es suprimida por los supresores de PTGS P19 y HC-Pro. Ya se ha reportado que virus portando

supresores de PTGS pueden alterar a miRNAs artificiales (Niu y col. 2006), aunque no se había reportado que la expresión de un supresor a partir de un plásmido también podía suprimirlos.

Para analizar el correcto procesamiento del pre-miR-GFP, se realizaron “Northern blot” del mensajero de GFP y del miR-GFP sobre material extraído de las zonas infiltradas. En la figura 41C se muestra una disminución en la acumulación del mRNA de GFP en las zonas infiltradas con GFP+miR-GFP comparado las zonas únicamente infiltradas con GFP. Este resultado permite proponer que el miR artificial regula la expresión de GFP a nivel de mRNA. Por último, la figura 41D muestra que sólo se acumula miR-GFP de bajo peso molecular en la zona infiltrada con GFP+miR-GFP evidenciando que el pre-miR-GFP (123 pb) se procesa correctamente dando un miRNA reconocido por la sonda de 21pb complementaria al miR-GFP.

En conclusión, el miR-GFP diseñado a partir del miR164a de *Arabidopsis* fue funcional en *N. benthamiana*.

- El “Northern-blot” de la figura 41C fue realizado por la Dra. Cecilia Vazquez Rovere quien colabora, junto con el Dr Oscar Taboga con el estudio de la funcionalidad del miRNA artificial en plantas y animales.

Conclusiones

Con el trabajo de esta Tesis se han podido profundizar los conocimientos de la CP-MR heteróloga y de la CP-MR homóloga de PVX. Se ha mostrado fuertes evidencias sobre la implicancia de los miRNAs en la interacción hospedante-patógeno. Esta información redundará en futuras nuevas metodologías para obtener resistencia viral o asintomatología en plantas luego de la infección viral. Finalizando el trabajo mostramos una herramienta biotecnológica molecular nueva para reducir la acumulación de genes de interés o, en un futuro, infecciones virales.

A continuación se enumeran las conclusiones principales del trabajo.

- 1) La CP-MR “heteróloga” en los casos estudiados (PVX-TMV, TMV-PVX) actúa reduciendo el nivel de replicación viral, e impactando a su vez en el movimiento célula-célula.
- 2) La supresión del PTGS no altera la CP-MR de PVX, por lo tanto, el PTGS no parece jugar un rol importante en la CP-MR de PVX.
- 3) La co-expresión de las proteínas MP y la CP^{T42W} de TMV en plantas de tabaco transgénicas produce cambios morfológicos y alteración en la acumulación de determinados miRNAs.
- 4) La expresión de MP y CP^{T42W} de TMV de forma individual o conjunta no tienen capacidad supresora del PTGS local y sistémico; mostrando, por primera vez, que proteínas sin actividad supresora de PTGS pueden alterar la acumulación de miRNAs.
- 5) Las proteínas MP y CP^{T42W} interactúan *in vivo* en ensayos de BiFC, lo que permitiría suponer la formación de complejos con distinta actividad que la de las dos proteínas por sí mismas.

- 6) La actividad supresora de PTGS viral no es esencial para alterar la acumulación de miRNAs.
- 7) Se observó una asociación entre la capacidad de alterar la acumulación de miRNAs y la severidad de los síntomas producidos por la infección de diversos virus.
- 8) La alteración en la acumulación de miRNAs durante la infección viral o mediante expresión transgénica de proteínas virales sugeriría cierto rol de los miRNAs en la interacción planta-virus, y no apoya la hipótesis que postula que los virus alteran a los miRNAs simplemente como efecto secundario por codificar supresores de PTGS.
- 9) Se diseñó un sistema de expresión de miRNA sintético capaz de reconocer y reducir los niveles de acumulación del mRNA de GFP, provocando consecuentemente una disminución elevada de la expresión de GFP. Consiguientemente, el miRNA sintético podría ser utilizado con una herramienta de biología molecular para disminuir la expresión de un gen de interés.

Discusión

1) Resistencia heteróloga mediada por expresión de CPs

Como se mencionó, se ha reportado que plantas transgénicas que expresan la CP de TMV retrasan la aparición de síntomas de la infección con PVX y de un grupo de virus no relacionados (Anderson y col. 1989). A este fenómeno se lo conoce como CP-MR heteróloga. Sin embargo, no se han propuesto hipótesis sobre el modo de acción. El principal objetivo de este capítulo es discutir el posible modo de acción.

En este trabajo se demostró que la expresión de diferentes CPs de TMV reduce el nivel de replicación (en protoplastos, Fig. 22) y el movimiento célula-célula de PVX (en plantas, Fig. 24). La reducción observada en el movimiento célula a célula puede ser consecuencia de la reducción en la replicación. Es esperable, que si un virus replica a menor velocidad necesitará más tiempo para formar los complejos de movimiento necesarios para moverse de una célula a otra.

También se demostró que no existían diferencias entre las infecciones realizadas con partículas virales o con el genoma viral desnudo; indicando que la resistencia heteróloga no depende de la desencapsidación del virus (Fig. 24). Estos datos se diferencian a los obtenidos con la resistencia homóloga en plantas expresando la CP de TMV, ya que estas plantas transgénicas son altamente resistentes al virus TMV, pero no a la infección con RNA genómico desnudo de TMV (Register y Beachy 1988).

En el experimento recíproco, la acumulación de TMV fue menor en las plantas transgénicas expresando la CP de PVX comparado con las que no lo expresaron; tanto cuando fueron inoculadas con TMV (partículas virales) como con RNA genómico de TMV. Este resultado también sugiere que el mecanismo de CP-MR heteróloga no depende de la desencapsidación. Asimismo, se comprobó que los protoplastos que expresaban la CP de PVX mostraron una menor acumulación de CP de TMV comparados a los no transgénicos. El movimiento de célula a célula de TMV, también resultó disminuido en las plantas expresando la CP de PVX comparado a las no transgénicas (Fig. 27). Si bien en este caso, no se realizaron "Northern blots" para analizar la replicación viral (como se hizo en el caso de PVX), se puede suponer que la disminución en la acumulación de CP de TMV en los protoplastos produciendo CP de PVX (Fig. 26), se debe a una baja en la tasa de replicación del virus y por lo tanto la disminución de movimiento podría ser la consecuencia de la disminución en la replicación viral.

En 1996 Culver (Culver 1996) y colaboradores publicaron un trabajo con resultados similares; donde en plantas pre-infectadas con PVX se observaba un leve retraso en la aparición de síntomas de TMV aunque los autores no profundizaron en el modo de acción de lo observado. Es posible entonces

que estos resultados respondieran a un mecanismo similar al descrito en esta Tesis. Es decir, una reducción en la replicación de TMV y por lo tanto en el movimiento viral.

Diferentes CPs mutantes de TMV produjeron diferentes efectos en la replicación y el movimiento de PVX (Fig. 21, 22 y 24). Estos datos nos permiten suponer que la estructura cuaternaria de la CP sería importante para disminuir la replicación del virus heterólogo. Las variantes CP^{WT} y CP^{T42W} fueron las que alteraron en mayor proporción la infección de PVX y ambas comparten la capacidad de formar VLPs (partículas parecidas a virus) y agregados de alto peso molecular, incluyendo agregados con coeficientes de sedimentación mayores a 4S (Bendahmane y col. 1997). Por lo contrario, la CP^{T28W}, que no forma VLPs y no produce agregados mayores a 4S (Bendahmane y col. 1997; Klug 1999), no alteró la replicación y/o movimiento de PVX (Fig. 21, 22 y 24).

Es importante destacar que si bien CP^{WT} y CP^{T42W} producen agregados y VLPs, las VLPs no son exactamente idénticas. Sin embargo, ambas proteínas confirieron un grado de CP-MR heteróloga comparable. La CP^{T42W} confiere una mayor protección que la CP^{WT} en la CP-MR homóloga de TMV (Bendahmane y col. 1997; Bendahmane y col. 2002; Asurmendi y col. 2004). Quizás existan diferencias entre las CP (WT y T42W) en la CP-MR heteróloga pero no son detectadas ya que al ser una resistencia más débil que la homóloga, las diferencias entre ellas resultan indetectables para nuestro sistema. En el caso de la CP^{T28W} las diferencias son mucho mayores por lo que claramente no confirió CP-MR heteróloga (Fig. 21, 22 y 24).

La línea mp_{xcp}^{T42W*} (es el resultado del cruzamiento entre una línea transgénica para la MP de TMV con una línea transgénica para CP^{T42W}) no acumulaba ni mRNA ni proteína de ninguna de las proteínas virales por estar silenciada. Esta línea no produjo CP-MR heteróloga indicando que este proceso es dependiente de la expresión proteica en sí misma. Además, este resultado permite aseverar que el efecto negativo sobre la replicación y movimiento de PVX no fue resultado de un efecto posicional de la inserción del T-DNA, ya que el evento de transformación es exactamente el mismo en ambas líneas, por lo tanto se encuentra insertado en el mismo lugar en las líneas CP^{T42W} y mp_{xcp}^{T42W*}.

La fuerte correlación positiva entre la estructura y la función de las CPs de TMV en las células BY-2 y en las plantas, ya había sido mostrada en la CP-MR homóloga (Bendahmane y col. 1997; Lu y col. 1998). Mediante la nueva información obtenida en esta Tesis, se puede afirmar que la misma asociación se observa en la CP-MR heteróloga. Este dato podría dar indicios de que algunos aspectos de ambas resistencias podrían estar compartidos. Sin embargo, esta hipótesis debe ser confirmada mediante otros experimentos.

Se proponen tres posibles modelos, no mutuamente excluyentes, para explicar la reducción de la replicación de PVX en plantas expresando la CP de TMV. Estos modelos también podrían ser extrapolados para explicar la resistencia heteróloga producida por la CP de PVX ante el desafío de TMV.

En el primer modelo, la CP de TMV podría interactuar con el PVX, secuestrar el RNA viral, y por lo tanto reducir la replicación del virus heterólogo. En 1987 y 1988 respectivamente, Hemenway y col. y Spillane y col. (Hemenway 1988; Spillane y col. 1997) sugirieron este mecanismo para explicar el fenómeno de la CP-MR homóloga de PVX. Asimismo, se conoce que la CP de TMV es capaz de encapsidar RNA heterólogo (Sleat y col. 1988; Mlotshwa y col. 2005). El segundo modelo, propone que las CPs transgénicas interfieren con un posible receptor o sitio de establecimiento de las factorías de replicación (Fig. 42A). Si bien la entrada de los virus de plantas en las células vegetales no está mediada por receptores (como si lo está para los virus animales), existe evidencia que demuestra una interacción entre las factorías de replicación viral y el retículo endoplásmico en células vegetales (Reichel y Beachy 1998; Mas y Beachy 1999; Carette y col. 2000; Asurmendi y col. 2004). Además, se ha reportado la existencia de genes endógenos de las plantas necesarios para permitir la multiplicación viral, genes que codifican para proteínas que permitirían la unión de las factorías de replicación con los sistemas de endomembranas. La carencia de estos genes (plantas mutantes) impide la infección (Ishikawa 2002; Yamanaka y col. 2002; Fujisaki y col. 2006). Esta hipótesis sugiere la existencia de un receptor o grupo de receptores que sería utilizado por los virus para establecer su replicación (Fig. 42A) y la utilización de este receptor aumentaría la eficiencia de replicación. En el caso de las plantas transgénicas para CP, el receptor se encontraría ocupado por una proteína viral transgénica. Por lo tanto, se podría postular una competencia de los complejos virales de replicación (VRC) con la CP transgénica por dicho receptor, lo cual resultaría en un retraso y por ende en una reducción en la tasa de replicación del virus. La diferencia en la afinidad de las CP transgénicas con el receptor podría explicar los datos experimentales observados para las distintas mutantes. Resumidamente, la CP transgénica impediría el correcto ensamblado y funcionamiento de los VRC uniéndose al receptor del virus heterólogo, ya que la similitud estructural de las cápsides es alta o también podría implicar la existencia de receptores generales compartidos. En el caso de TMV se observa en la resistencia homóloga que, al infectar con RNA genómico plantas transgénicas que expresan proteínas virales, se reduce consecuentemente la eficiencia de replicación, hecho que podría explicarse de forma similar, es decir debido a que no se forman correctamente los VRC porque no se pueden ensamblar correctamente en el posible receptor.

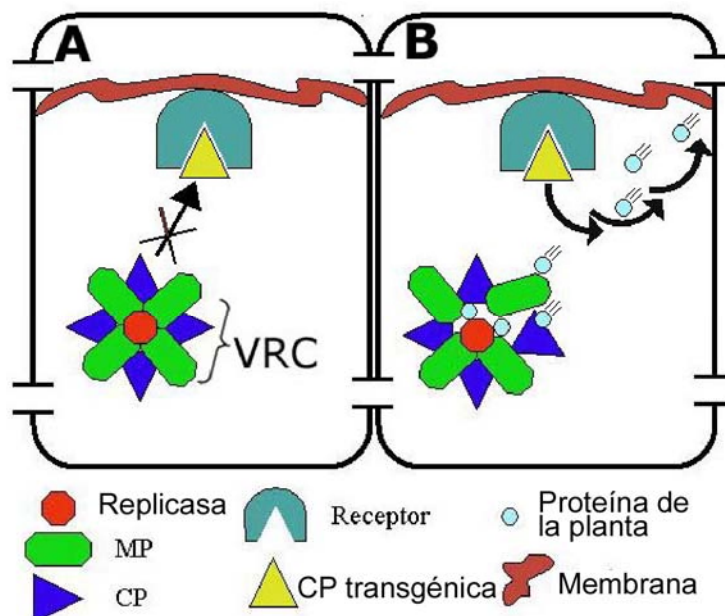


Figura 42. Esquema hipotético de una célula transgénica para una CP (triángulo amarillo), de un virus no relacionado al que se usara para el desafío (triángulo en azul). **(A)** La CP transgénica ocupa el lugar de un posible receptor donde el complejo de replicación (VRC) podría anclarse para replicar velozmente. La eficiencia de replicación del VRC libre sería menor que el del unido al receptor. **(B)** La interacción de la CP transgénicas y un posible receptor puede desencadenar la expresión de proteínas endógenas que afecten la replicación.

El tercer modelo plantea una interacción entre las CPs transgénicas y un componente de la respuesta del huésped (Fig. 42B). En este modelo, los agregados mayores a 4S podrían ser capaces de interactuar con proteínas del huésped y activar la expresión de genes relacionados con la defensa. Por lo tanto las CPs capaces de agregar podrían conferir una CP-MR heteróloga de amplio espectro detectable, mientras que las que no se agregan, no. Aunque el desencadenante de esta respuesta sea virus específico, la respuesta es inespecífica o sea de amplio espectro. Se ha reportado que plantas de papa que poseen el gen Rx (un gen de resistencia extrema a PVX) son resistentes a algunas cepas de PVX, pero no ante el desafío con TMV (Bendahmane y col. 1995). Cuando plantas portando el gen mencionado son inoculadas con ambos virus simultáneamente o con un TMV portando la CP de PVX (donde se sabe que está el determinante de la resistencia) los niveles de acumulación de TMV se ven altamente reducidos, indicando que, una vez que la respuesta es disparada por PVX, la misma sería de amplio espectro y efectiva ante TMV (Bendahmane y col. 1995). Asimismo se describió un efecto similar con el gen *AvrPto*, que produce resistencia ante *Pseudomonas syringae* y PVX (Tobias y col. 1999). Sobre esta hipótesis, hay que aclarar que la expresión de la CP de TMV en plantas de tabaco no estimula la expresión de elevados niveles de proteínas PR conocidas (Carr y col. 1989).

En conclusión, en el primer capítulo de esta Tesis se demostró que la expresión de las CPs de TMV y PVX interfiere con la infección del otro virus (heterólogo), reduciendo la replicación, el movimiento de célula a célula y la dispersión sistémica del virus. También se evidenció la importancia

de la estructura de las CPs de TMV para conferir resistencia heteróloga. Para poder utilizar la resistencia heteróloga como una aplicación biotecnológica será necesario seguir profundizando sobre las bases moleculares de este fenómeno. La expresión de proteínas diseñadas específicamente permitiría conferir una resistencia fuerte y duradera de amplio espectro. Además se ha observado que la expresión de cápsides virales no producen un detrimento en las características agronómicas de las plantas transgénicas (Kaniewski y Thomas 1999); haciendo aún más interesante ya que se ha demostrado que los métodos para obtener resistencia a patógenos que se basan en la expresión constitutiva de algunos genes de defensa de plantas sí conllevan una penalidad agronómica.

2) El silenciamiento post transcripcional no juega un rol importante en la resistencia mediada por CP de PVX

El segundo capítulo, describe una serie de experimentos que permitieron dilucidar el rol que juega el PTGS en la CP-MR de PVX. Como se ha mencionado previamente, en 1987 y 1988 Spillane y Hemenway (Hemenway 1988; Spillane y col. 1997) propusieron diferentes modelos para explicar el mecanismo de resistencia producido por la CP de PVX. Sin embargo, en ese momento aún no se conocía el fenómeno de silenciamiento génico; el cual es fácilmente inducido por el PVX (Favre-Rampant y col. 2004).

Nuestros datos indican que al suprimir el PTGS de forma general vía dos diferentes estrategias, el nivel de resistencia mediado por la CP de PVX no fue reducido lo que llevó a la conclusión de que el PTGS no era un componente importante de este mecanismo de resistencia. Las metodologías empleadas para reducir/suprimir el silenciamiento fueron: el uso de infecciones virales portando un supresor fuerte (Fig. 29) y bajas temperaturas (Fig. 30) de probada eficacia para suprimir los efectos del silenciamiento (Shi y col. 1997; Silhavy y Burgyan 2004).

Por último, se analizó si la expresión del transgén (CP de PVX) era reducida durante la infección. Como se mencionó previamente, el PVX, tiene la capacidad de inducir silenciamiento hacia sí mismo, fácilmente. Por lo tanto, la replicación del virus podría llegar a desencadenar el silenciamiento de la expresión de las CPs transgénicas en paralelo con el silenciamiento del propio virus, lo cual sería la causa de la resistencia observada. Para determinar si este era el caso, se realizó un “Northern blot” sobre plantas transgénicas inoculadas y no inoculadas con PVX. Se utilizó la secuencia del terminador de la transcripción del mensajero transgénico de la CP de PVX como sonda, de manera de detectar inequívocamente el mRNA de la CP transgénica. Los resultados mostraron que los niveles del mRNA de la CP transgénica no disminuyeron (Fig. 31). Este resultado puede deberse a que la infección no progresa lo suficiente como para disparar PTGS sistémico, por lo menos en los tiempos analizados.

Un aspecto muy interesante a tener en cuenta en este trabajo es el de la velocidad de gatillado del PTGS. Es decir, desde que se gatilla PTGS hasta que se logra silenciar un gen o virus, ¿cuánto tiempo pasa? Sobre este tema no hay demasiados trabajos en la bibliografía ya que es muy difícil poder medir la velocidad de gatillado. Un trabajo interesante muestra que, en menos de 24 hrs, se puede inducir silenciamiento de GFP en protoplastos mediante electroporación de siRNA homólogos a GFP (Vanitharani y col. 2003), aunque hay que aclarar que al utilizar siRNA sintéticos, no se tiene en cuenta todo el tiempo que se necesita en generarlos. Cuando se induce PTGS de GFP mediante expresión transitoria, se necesitan por lo menos 48 hrs para evidenciarse (Voinnet y col. 1998; Voinnet 2005; Bazzini y col. 2007b). En el caso de CP-MR de PVX la resistencia es extremadamente rápida por lo tanto la hipótesis de que el PTGS disparado a partir de la inoculación del virus podría jugar un rol importante en la resistencia, es difícil de imaginar, simplemente por poseer una cinética más lenta a la resistencia observada. En conclusión, se demostró que el PTGS no juega un rol preponderante (o no juega ningún rol) en la resistencia al virus PVX mediada por la CP de PVX.

3) La relación entre miRNAs y las infecciones virales

En esta sección se discutirá en conjunto sobre los últimos capítulos de la Tesis, donde se estudió la relación entre la expresión de proteínas virales (capítulo 3) o las infecciones virales (capítulo 4) y la vía de los miRNAs.

En el tercer capítulo se reportó que plantas de tabaco transgénicas que acumulaban la MP y la CP^{T42W} de TMV (MPxCP^{T42W}) (Fig. 32) exhibían problemas en el desarrollo (Fig. 33 y tabla 1). Estas malformaciones eran similares a las reportadas en *A. thaliana* sobre expresando miRNAs o genes blanco de miRNAs (Kasschau y col. 2003; Palatnik y col. 2003; Chapman y col. 2004; Laufs y col. 2004; Mallory y col. 2004a; Mallory y col. 2004b; Baker y col. 2005; Mallory y col. 2005; Fahlgren y col. 2006; Maroney y col. 2006).

Como ya se ha indicado, tanto la línea de tabaco MPxCP^{T42W} como la mp_{xcp}^{T42W*} provienen del cruzamiento entre una línea expresando MP por otra expresando CP^{T42W} de TMV. Tanto las líneas parentales como la silenciada (mp_{xcp}^{T42W*}, es una línea isogénica con MPxCP^{T42W}) eran perfectamente normales e indistinguibles de las plantas no transgénicas (Tabla 1). Esto indica que el fenotipo anormal se debía a la co-expresión de ambas proteínas virales. Sabiendo que los siRNAs de una línea silenciada son capaces de cruzar la unión de injertos (Roth y col. 2004), se realizaron injertos entre la línea silenciada (mp_{xcp}^{T42W*}) y la anormal (MPxCP^{T42W}) (Tabla 1). Si las proteínas virales eran las responsables de las malformaciones, entonces los injertos de la línea MPxCP^{T42W} sobre pies de mp_{xcp}^{T42W*} tendrían que recuperar un fenotipo normal. Como los parentales no presentaron alteraciones morfológicas, con solo silenciar a uno de los genes virales, el fenotipo normal se debería restaurar. Como se mostró en la tabla 1, varias de las características normales se restauraron en la línea MPxCP^{T42W} cuando se utilizó la línea mp_{xcp}^{T42W*} como pie del injerto. Estos resultados concuerdan

con la conclusión previa en la cual concluimos que la co-expresión de la MP y la CP^{T42W} de TMV es la responsable de las alteraciones morfológicas observadas.

Una vez demostrada que la co-expresión de las proteínas virales era la responsable de los fenotipos observados, surgió el interrogante de cómo estas dos proteínas virales causaban las alteraciones morfológicas. Debido a que la expresión de cualquiera de estas proteínas por separado no causaba alteraciones morfológicas visibles (Fig. 33), se decidió estudiar si ambas proteínas eran capaces de interactuar *in vivo*. Los experimentos de BiFC entre MP y CP^{T42W} mostraron que éstas interactúan *in vivo* (Fig. 35). Si bien, nunca se había analizado si estas proteínas podían interactuar cuando se encontraban a las concentraciones alcanzadas *in vivo* a partir de la transcripción del promotor 35S, se suponía que sí lo hacían, ya que las inmuno precipitaciones de extractos de células infectadas con TMV, utilizando anti-MP o anti-CP como primer anticuerpo, recapturaban a la otra proteína viral (S. Kawakami y R.N. Beachy, comunicación personal). Asimismo, la MP y la CP colocalizan en células infectadas (Asurmendi y col. 2004). En contraposición, no se había logrado demostrar interacciones entre ambas proteínas en ensayos de doble híbrido en levaduras (P. Arce-Johnson y R.N. Beachy, comunicación personal). En conclusión, los resultados de BiFC sugieren que la MP y CP interactúan *in vivo* en condiciones similares a la de las plantas transgénicas estudiadas. Esto nos permite suponer que el complejo podría tener efectos que las dos proteínas por separado no tienen y que a su vez estas funciones serían las responsables de las alteraciones morfológicas.

Si bien optimizar la técnica de BiFC no fue el objetivo de esta Tesis, vale la pena destacar sus ventajas y desventajas, ya que es una técnica muy novedosa. La principal ventaja del BiFC es que se estudia la interacción *in vivo*, lo que implica observar la interacción en el mismo entorno donde realmente se encuentran las proteínas en cuestión. Cuando se realizan ensayos en otros sistemas, como puede ser el caso del doble híbrido (en levaduras o bacterias) pueden ocurrir (o dejar de ocurrir) modificaciones post-traduccionales distintas a los que ocurrirían en plantas, plegamientos erróneos u otros efectos, que llevan a obtener resultados inexactos. Como toda técnica de interacción, un dato negativo no puede interpretarse como tal, ya que se observan falsos negativos con relativa asiduidad: puede ocurrir que dos proteínas interactúen pero, por la orientación que presentan al estar fusionadas a YFP, no lo hagan, y consecuentemente no se observe fluorescencia.

Los fenotipos observados en la línea MPxCP^{T42W} se asemejaron a los reportados para líneas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* transgénicas sobre expresando pre-miRNAs (Mou y col. 2002; Kasschau y col. 2003; Palatnik y col. 2003; Mallory y col. 2004b; Li y col. 2005; Mallory y col. 2005; Mlotshwa y col. 2006). Por ejemplo, la sobre expresión del miR164 altera el desarrollo embrionario, vegetativo y floral, incluyendo fusiones de los cotiledones muy similares los observados en la línea MPxCP^{T42W} (Fig. 33 F y G) (Laufs y col. 2004; Mallory y col. 2004a; Baker y col. 2005). El miR165 juega un rol en la simetría de la hoja y en la formación de los meristemas, características que estaban alteradas en la línea MPxCP^{T42W} (Fig. 33 C, O y K) (Kasschau y col. 2003; Mallory y col. 2004b; Li y col. 2005).

El miR156 regula el tiempo de floración y el desarrollo de la hoja (Kasschau y col. 2003). El miR167 está involucrado en la respuesta a auxina y en el desarrollo (Mou y col. 2002; Kasschau y col. 2003).

Como se observa en la figura 34, los miRNAs 156, 164, 165 y 167 se acumularon a mayor nivel en la línea MPxCP^{T42W} y, como dichos miRNAs están involucrados en el desarrollo, es probable que este aumento en su acumulación sea el responsable de las alteraciones morfológicas observadas. Aunque no se observó un cambio estadísticamente significativo en la acumulación del miR160 sino solo una tendencia (Fig. 34), no se puede descartar un posible efecto en la actividad del mismo. La alteración en el tamaño y la forma de las células epidérmicas de la línea MPxCP^{T42W} (Fig. 33 P, Q, R), son caracteres controlados por el miR160 en *Arabidopsis*, (Mou y col. 2002; Mallory y col. 2005). De igual modo, Dunoyer y col. (2004) reportaron que, si bien la acumulación de algunos miRNAs no se alteró al sobre expresar la proteína P15 del *Peanut clump virus* (PCV), sí se observó una alteración en la acumulación de los “target” de dichos miRNAs.

El análisis de acumulación de miRNAs se realizó también en una planta no transgénica infectada con TMV. Como se observa en la figura 34, la acumulación de los miRNAs también se vio aumentada en la planta infectada comparada con la planta no inoculada. Si bien este dato era esperable a la luz de los datos previos, no se conocían datos sobre virus capaces de alterar la acumulación de miRNAs sin actividad supresora de PTGS. Posteriormente, se volverá a discutir sobre la línea MPxCP^{T42W} y la planta infectada con TMV y su relación con la capacidad de suprimir el PTGS. En el caso de las dos proteínas virales, tanto la expresión de la MP como la CP^{T42W} juntas o separadas no suprimieron el PTGS local (Fig. 36) ni el sistémico (Tabla 2). Evidenciando que las dos proteínas separadas o como complejo no tienen actividades supresoras de PTGS, por lo menos en los ensayos realizados.

Se ha propuesto que los virus no solo interfieren con las rutas de los sRNAs (posiblemente miRNA) sino que también pueden hacer uso de ellas, para controlar determinados genes del huésped (Kasschau y col. 2003; Chapman y col. 2004; Chen y col. 2004b; Dunoyer y col. 2004; Silhavy y Burgyan 2004). Controlando un número reducido de miRNAs se podrían controlar un gran número de genes; los cuales a su vez podrían llegar a estar relacionados con resistencia o virulencia. Si bien lo más sencillo sería pensar que la alteración de los miRNAs mediada por el virus le confiere al virus una ventaja adaptativa (regulando positivamente el nivel de expresión de genes que ayuden a la infección o reduciendo la expresión de los que la dificulten), los resultados experimentales deben interpretarse como la resultante de una co-evolución entre el virus y la planta. Como consecuencia, también se podría esperar que ésta alteración tuviera ventaja evolutiva para la planta. Por ejemplo, algunos autores sugieren que la compleja organización de los genes R (genes involucrados en defensa), dispuestos en agrupamiento físicos en el genoma, incluyendo genes invertidos y/o duplicados, pudieron dar lugar a la génesis de genes miR (formación de dúplex) y sus genes blanco. Por lo tanto, si los virus pueden alterar los miRNAs, entonces podrían estar alterando a los genes R en forma conjunta y organizada (Voinnet 2004; Dunoyer y Voinnet 2005; Voinnet 2005). El caso de los genes R, es

simplemente un ejemplo hipotético de genes o grupos de genes que pueden llegar a estar regulados por miRNAs y que de una forma u otra intervienen en la relación entre la planta y el virus.

En el tercer capítulo de la Tesis se demostró que la expresión de dos proteínas virales sin actividad supresora evidente de PTGS pueden alterar la acumulación de los miRNAs. Este dato no había sido reportado anteriormente y da sustento a la hipótesis en la cual se postula que los virus hacen uso de la vía de los miRNAs. Esta hipótesis se profundizará posteriormente al agregar los datos experimentales del cuarto capítulo.

A pesar de que las alteraciones morfológicas observadas en la línea MPxCP^{T42W} tienen varios puntos en común con los síntomas producidos por TMV (por ejemplo malformaciones o decoloración de la hoja, menor número de flores con respecto a las plantas no infectadas o no transgénicas), hay otras alteraciones, en particular las observadas en la flor, en la cuales difieren. Esto podría explicarse pensando en la existencia de diferencias en el lugar/tiempo donde estas proteínas se expresan en un caso u otro. Las proteínas virales transgénicas se expresan en todas las células (tanto meristemáticas, como no) ya que su expresión está dirigida por el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico del coliflor. Por el contrario, en las infecciones, los virus rara vez alcanzan el meristema (Chapman y col. 2004). Si bien no fue un objetivo de esta Tesis analizar por qué los virus no pueden invadir el tejido meristemático, se podría especular que los miRNAs quizás estén involucrados con este fenómeno. Los virus alteran los miRNAs y los miRNAs controlan entre otras cosas, genes relacionados con el desarrollo. Por consiguiente, si el tejido meristemático fuese infectado, seguramente sus miRNAs serían alterados resultando en cambios morfológicos severos, lo cual hipotéticamente resultaría en una presión evolutiva negativa para esta característica, ya que estaría poniendo en riesgo su propagación al comprometer la correcta formación de las flores y/o semillas. La mayoría de los virus no se propagan por semilla, lo cual apoya a esta hipótesis.

Cuando se obtuvieron los resultados del tercer capítulo, nos preguntamos si el TMV era un virus excepcional por modificar la acumulación de los miRNAs o si realmente era un ejemplo de que los virus podrían alterar a los miRNAs independientemente de su actividad supresora de PTGS. Hasta entonces, sólo se habían reportado cambios en los miRNAs mediados por infecciones virales con virus portadores de supresores de PTGS (Kasschau y col. 2003; Chapman y col. 2004).

Consiguientemente, se decidió explorar si existía alguna relación entre la capacidad de nueve especies virales de alterar la acumulación de varios miRNAs y su relación con la severidad de los síntomas y la actividad supresora de PTGS. Como se ha mencionado en la introducción las nueve especies virales provenían de 3 familias diferentes y 6 de ellos eran tobamovirus, familia que no caracterizada por suprimir el PTGS. En el cuarto capítulo, se demostró que virus con muy baja o nula capacidad de suprimir PTGS (Tabla 5) (especialmente: TMV y ToMV) tienen la capacidad de alterar la acumulación de los miRNAs (Fig. 39). También se mostró que había cierta correlación entre alteración de los miRNAs y la severidad de los síntomas (Fig. 38 y tabla 4). Por ejemplo, TMV y ToMV causaron los síntomas más severos y también fueron los que más alteraron la acumulación de

los miRNAs. Por otro lado, PVY no provocó síntomas evidentes en las condiciones utilizadas y alteró muy suavemente a los miRNAs. Por lo tanto, esto permitiría suponer que la alteración en los miRNAs puede ser responsable de los síntomas virales o al menos de una parte de ellos (Tabla 5 y 6 y Fig. 38). El único caso que no cumplió con esta generalización fue el ShMV que alteró a los miRNAs tanto como el TMV o ToMV pero no causó síntomas severos; aunque en este caso hay otro factor en juego que es el tiempo en que se establece la infección: este virus que fue el más lento en desarrollar los síntomas que todos los otros virus estudiados. Este hecho nos permite suponer que la acción de los miRNAs alterados sería funcional en estadios tempranos de desarrollo de los órganos, ya que si esta alteración sucede *a posteriori* no es funcional, por lo tanto no produce síntomas fuertes.

Se demostró, además, que la alteración de los miRNAs no tiene correlación con la capacidad supresora de PTGS, ya que TEV o PVY, alteraron la acumulación de los miRNAs en las condiciones utilizadas en bajo nivel siendo dos virus con conocida capacidad supresora de PTGS (Voinnet y col. 1999). Es preciso mencionar que en la bibliografía ya se ha mostrado que el TuMV (virus del mosaico del nabo, potyvirus) que posee Hc-Pro, altera la acumulación de miRNAs en *Arabidopsis* en alto grado (Kasschau y col. 2003). Sin embargo hay que tomar cada dato simplemente como una fotografía en un momento dado de un modelo en especial. No se puede generalizar, hay que tomar cada virus con cada planta y tener mucho cuidado con los tiempos y lugares de muestreos. Esto es un buen ejemplo para pensar en la co-evolución de estos fenómenos entre hospedante y virus, es decir que la capacidad de un virus para producir síntomas podría estar relacionado con la capacidad y el momento de alteración de los miRNAs y que esto depende evolutivamente de ambas integrantes de la interacción. El PVY no tiene como huésped habitual el tabaco; por lo tanto, su capacidad de producir síntomas se vería reducida en ese huésped alternativo. Sin embargo, el TuMV que sí tiene como huésped de *Arabidopsis* produce muchos síntomas en esta especie y esto se correlaciona con la capacidad de estos virus de alterar los miRNAs en este hospedante. Como consecuencia, en el futuro se deberán hacer análisis en función del tiempo y en distintos huéspedes. No se podrá definir a un virus como capaz de alterar generalmente a los miRNAs sino que se deberá ser muy cuidadoso investigando los efectos producidos por un virus en hospedantes diferentes y en distintas condiciones de infección. Consecuentemente, para ser preciso se debe decir que en las condiciones utilizadas en este trabajo tanto el TEV como PVY alteraron levemente los niveles de los miRNAs. Lo cual no implica que dichos virus en otras condiciones (inóculo, temperatura, condiciones fisiológicas de la planta al momento de ser infectada, hospedante, etc) no alteren fuertemente la acumulación de los miRNAs. Por último, quizás en general la falta de capacidad para alterar a los miRNAs impacte en la tasa de replicación y por ende en la velocidad de movimiento del virus, lo que a su vez permitiría a la planta ser más efectiva en su defensa. A pesar de que el sistema en estudio es muy complejo, esto permitiría suponer que la capacidad de “manipular” miRNAs sea uno de varios factores que restrinjan la amplitud de hospedantes para un virus determinado. Sin embargo, se deben explorar un mayor número de virus y un mayor número de hospedantes, para poder afirmar que existe una correlación entre capacidad de

generar síntomas y alterar los miRNAs, donde se podría encontrar virus que generen síntomas y alteren miRNAs en determinados hospedantes y que no generen síntomas ni alteren miRNAs en otros hospedantes.

Finalmente, en este trabajo se evidenció que, para que un virus sea capaz de alterar la acumulación de los miRNAs, no es necesario que posea supresores fuertes de PTGS (Fig. 39 y tabla 5). Este dato no había sido reportado con anterioridad y sugiere que la alteración en los miRNAs no es un efecto lateral de los supresores sobre la vía de los RNAs pequeños, ya que si éste fuera el caso los virus que carecen de supresores (o que llevan supresores débiles, especialmente, TMV y ToMV) no deberían alterar los miRNAs. Estos resultados sugieren una relación mucho más directa entre virus y hospedantes mediada por miRNAs.

Si bien existen datos experimentales que sugieren que los virus pueden usar a los siRNAs, el mecanismo de acción aun no está dilucidado (Silhavy y Burgyan 2004; Dunoyer y Voinnet 2005; Voinnet 2005; Pfeffer y Voinnet 2006).

Para virus patógenos de mamíferos con genoma de DNA, se describió un grupo de miRNAs, codificados en el genoma viral, los cuales pueden directamente regular negativa o positivamente mRNAs tanto del hospedante como propios. El primer miRNA descrito en el genoma de un virus fue en el Epstein–Barr virus (Pfeffer y Voinnet 2006). Luego se encontraron miRNAs en otros virus como por ejemplo herpes virus sarcoma del Kaposi's, cytomegalovirus humano, gammaherpesvirus 68 de ratón, virus herpes simple 1 y virus SV40 de simio (Dunoyer y col. 2002; Samols y col. 2005; Sullivan y Ganem 2005; Pfeffer y Voinnet 2006). Se ha demostrado que algunos de estos miRNAs mencionados más arriba regulan negativamente genes de defensa y dicha reducción favorece la infección viral. Los miRNAs codificados por virus claramente evidencian una sorprendente capacidad de adaptación biológica de los virus para manipular la expresión génica del hospedante. En el caso de virus vegetales hasta la actualidad no se conocen virus que codifiquen miRNAs; sin embargo es probable que muchos grupos de investigación estén trabajando en ello. Por ejemplo, el grupo de Dr. Claude Fauquet (Donald Danforth Plant Science Center, USA) se encuentra buscando miRNAs virales de geminivirus (comunicación personal).

Un segundo mecanismo de acción podría estar asociado a proteínas virales con capacidad supresora de PTGS. Diferentes autores han demostrado que la expresión de supresores de PTGS puede interferir con la expresión de genes controlados por miRNAs los cuales podrían causar malformaciones fenotípicas (Kasschau y col. 2003; Chapman y col. 2004; Chen y col. 2004b; Dunoyer y col. 2004; Silhavy y Burgyan 2004). A su vez, algunas de estas malformaciones son similares a los síntomas de las infecciones virales. Estos datos, proponen diferentes interrogantes como: ¿existe alguna ventaja adaptativa en que un virus pueda alterar la expresión génica mediante los miRNAs? ¿De existir la ventaja adaptativa: será para el virus o para el hospedante? ¿Será simplemente un efecto lateral de los supresores de PTGS al tener la capacidad de interferir con sRNAs? Estos puntos serán discutidos en profundidad a medida que se discutan los datos del cuarto capítulo.

El tercer mecanismo posible (puede que no sea el más probable) es que las infecciones virales produzcan una redistribución del flujo metabólico, causando alteraciones en rutas biológicas no relacionadas (Pfeffer y Voinnet 2006). Por lo tanto los cambios observados podrían no tener ninguna ventaja adaptativa sino que simplemente serían la resultante de la falta de energía para ciertas rutas. Si bien en la bibliografía no se encuentran evidencias que avalen esta hipótesis, ésta debería ser tenida en cuenta. En un futuro cercano nuestro grupo espera poder relacionar datos de perfiles metabólicos de la planta a distintos tiempos luego de la infección con virus, con los datos de la alteración de los miRNAs en los mismos tiempos post-infección.

Otra cuestión que resulta de sumo interés es el tema de la producción de síntomas es ¿Por qué los virus generan síntomas? ¿Qué ventaja adaptativa puede otorgar la producción de síntomas? ¿No es peculiar que tanto algunos virus vegetales como animales generen malformaciones? Ahora, bien, a lo largo de esta Tesis se ha mostrado que las infecciones virales alteran la homeostasis de miRNAs. Por otro lado, se demostró que los virus que producen síntomas más severos fueron los que produjeron una mayor alteración en la acumulación relativa de miRNAs. Asimismo, se sabe que una gran cantidad de miRNAs están relacionados con el desarrollo en los distintos reinos (Palatnik y col. 2003; Giraldez y col. 2005; Callis y col. 2007). Entonces, se podría suponer que si se altera a los miRNAs entonces se alterará el desarrollo, especialmente si el tejido está en desarrollo en el momento de la infección. Esta aclaración permitiría explicar por qué las hojas inoculadas rara vez manifiestan síntomas de malformación estructural, mientras que las hojas que surgen luego de la infección sí los tienen. De todos modos, esta explicación carece de datos experimentales que la avalen por el momento por lo que se debería analizar la acumulación de los miRNAs en hojas inoculadas comparado a las no inoculadas. Esta aclaración nos lleva a suponer que la velocidad de infección tendría que ser tomada en cuenta para poder explicar la hipótesis de aparición de síntomas relacionados con la alteración de los miRNAs. Por ejemplo, el caso de ShMV, el cual altera la acumulación de los miRNAs pero no causa muchos síntomas, podría atribuirse a que tiene una velocidad de propagación de la infección comparativamente lenta. Como consecuencia, cuando el virus llega en forma sistémica a una hoja superior respecto al sitio de infección, cambia los niveles de acumulación de miRNAs, pero, como la hoja ya se encuentra desarrollada, el cambio en los miRNAs no provoca sintomatología. Esta es simplemente una hipótesis, la cual aún debería ser demostrada.

Por otro lado, si bien ya no hay dudas que los miRNAs están involucrados en desarrollo y otros procesos, esto no indica que no haya miRNAs controlando genes que puedan tener que ver específicamente con la infección (Mallory y Vaucheret 2004; Wang y col. 2005; Zhang y col. 2006). Para explicarlo de otra manera, puede ser que la ventaja adaptativa, de existir, de alterar los miRNAs resida en alterar algunos miRNAs, los cuales no tendrían por qué estar relacionados con el desarrollo; sin embargo, al alterar toda la vía, se estaría alterando a todos los miRNAs. La resultante fenotípica sería producción de síntomas, es decir malformaciones, problemas en el desarrollo, etc. Ahora bien, la pregunta que surge es: ¿los síntomas no serán simplemente un efecto lateral de la alteración de los

miRNAs? O sin ser tan reduccionista, ¿los miRNAs no serán responsables de parte de la sintomatología producida por el virus? También es esperable que en esta co-evolución se seleccionen genes antivirales o de defensa, controlados por miRNAs cuya transcripción se activaría luego de la infección.

En resumen, se podría plantear una teoría donde el virus altera a los miRNAs en general, alguno de ellos tendrá una ventaja evolutiva para el virus, otros tendrán una ventaja para la planta y, por último podría existir un tercer grupo que no conlleve a ventajas evolutivas. Este último grupo podría estar relacionado con los miRNAs del desarrollo o por lo menos con algunos de ellos que serían los que generan los síntomas. Finalmente, una conclusión podría ser que los síntomas virales son la consecuencia de la alteración de algunos miRNAs. Por lo tanto en el futuro, se debería investigar qué miRNAs están involucrados y cuales no. Resumidamente, se podrán infectar plantas con algún miRNA silenciado, otras sobre expresando ese mismo miRNA y analizar si la infección se ve alterada (aumentada o disminuida) comparado a la infección en una planta no transgénica (sin miRNA alterados).

Por último no se puede dejar de mencionar la falta de información sobre los blancos (“target”) de los miRNAs en este trabajo. Todos los trabajos realizados sobre miRNAs a lo largo de esta Tesis fueron realizados en plantas de tabaco. Lamentablemente la base de datos del genoma o transcriptoma de tabaco no está aun completa y resulta bastante escasa comparada a otras como la de *Arabidopsis*, arroz o tomate. Es por ello que no se han reportado aún “targets” de miRNAs en tabaco. De haberlos conocido, se hubiese podido analizar la acumulación de los mismos en plantas infectadas y en plantas de la línea MPxCP^{T42W}. Es necesario comentar que durante la obtención de los datos, se intentó identificar bioinformáticamente las secuencias homólogas de tabaco de algunos de estos “target” de *Arabidopsis*. Para ello, se realizó una búsqueda (blast) con parámetros de búsqueda determinados, aportados por el Dr Ramiro Rodriguez (miembro del laboratorio del Dr. Javier Palatnik) sobre la base de secuencias de tabaco. Si bien se encontró una posible homología en un gen codificante para un factor de transcripción, el cual conservaba la secuencia de reconocimiento de un miRNA y era homólogo al “target” en *Arabidopsis*, no fue posible detectar su acumulación mediante “Northern blot”. Probablemente este posible factor de transcripción presenta una muy baja acumulación de mRNA más allá del límite de detección de nuestro sistema. También se debe aclarar que al final de este trabajo de Tesis doctoral, hemos podido avanzar en nuestros conocimientos sobre bioinformática y manejo del sistema operativo Linux, con el cual estamos realizando búsqueda de genes “targets” utilizando un algoritmo llamado miRanda. Gracias a este manejo bioinformático, hemos podido comparar una base de datos de todos los miRNAs reportados en plantas contra todos los ESTs de tomate, UNIGENES, como también contra todos los BACs de tomate secuenciados. De esta forma rápidamente uno puede formar una lista de los posibles “targets”. Consecuentemente, se deberá volver a buscar otras potenciales secuencias en tabaco utilizando los nuevos conocimientos en manejo de base de datos.

Es importante aclarar que, en todos los trabajos en *Arabidopsis* en los que se mostraron alteraciones en la acumulación de los miRNAs, también se demostró alteraciones en la acumulación de algún gen “target” (Kasschau y col. 2003; Palatnik y col. 2003; Chapman y col. 2004; Dunoyer y col. 2004; Mallory y col. 2004a; Mallory y col. 2004b; Chellappan y col. 2005; Mallory y col. 2005; Schwab y col. 2005). Sin embargo, también se puede alterar el nivel de acumulación de “targets” de un miRNA sin tener cambiada la acumulación de dicho miRNA. Un ejemplo ya citado es el que se observó al expresar la p15 del *Peanut clump virus* (Dunoyer y col. 2004). Por lo tanto, uno podría suponer que las alteraciones encontradas en las plantas MPxCP^{T42W} y en las infectadas con virus, también resultarían en la alteración de “targets” de miRNAs. Se espera que mediante nuevas aproximaciones, como estudios transcriptómicos con micromatrices de mRNA, geles de dos dimensiones y nuevas búsquedas bioinformáticas, sea posible identificar los genes “target” de los miRNAs en tabaco. Los candidatos que surjan serán evaluados como candidatos en el marco de infecciones virales. Por otro lado, si bien en esta Tesis no se ha intentado dilucidar cómo es el mecanismo por el cual la infección viral altera la acumulación de los miRNAs, se podrían plantear algunas hipotéticas explicaciones. En los trabajos publicados donde se sobre expresaron supresores de PTGS y se observó alteración de los miRNAs (Kasschau y col. 2003; Chapman y col. 2004; Dunoyer y col. 2004); la explicación proporcionada por los autores fue muy sencilla: los supresores podían inhibir alguna de las enzimas involucradas en el mecanismo de acción de los miRNAs (por ejemplo: DCL2) o capturar los miRNAs ya que algunos supresores tiene la capacidad de interactuar con sRNAs. De esta manera el complejo miR/miR* no se separa, el miR* no se degrada y aumenta la vida media (por ende la acumulación) de los miRNAs, (especialmente el del miR*) y se altera su actividad. Ahora bien, según esta explicación, no hay una forma sencilla o intuitiva de explicar cómo proteínas que no son supresoras de PTGS como las estudiadas en esta Tesis pueden alterar los miRNAs. Para abordar este tema deberían considerarse dos posibles instancias: la vida media de los miRNAs y su nivel de transcripción, ya que cualquiera de estas vías llevaría a un aumento o disminución en la acumulación de los mismos. Pensando en la alteración de la vida media, se podrían realizar experimentos utilizando plantas mutantes para determinadas proteínas que intervienen en la síntesis de miRNAs o en la formación del complejo RISC. Una limitante de estos estudios es la falta de plantas de tabaco con dichos genes alterados. Hasta la fecha únicamente se han reportado mutantes de este tipo en *Arabidopsis* (Deleris y col. 2006; Dunoyer y col. 2007; Howell y col. 2007). Por lo tanto, por el momento se deberán utilizar virus capaces de infectar *Arabidopsis* y que posean las características deseadas (no llevar un supresor de PTGS pero sí alterar los miRNAs). Para estudiar la posibilidad de que las infecciones virales produzcan un aumento de la transcripción de los precursores de un miRNA, actualmente nuestro grupo produjo plantas transgénicas de *Arabidopsis* expresando el gen *uidA* (GUS) bajo el promotor del miR164a (Fig. 16, introducción). Utilizando estas plantas se espera poder estudiar si la transcripción a partir de este promotor es inducida por infecciones virales.

Existe un punto más a tratar: la localización y posible movimiento de los miRNAs. Se debe mencionar que los virus y/o proteínas virales estudiadas en este trabajo podrían cambiar la localización de los miRNAs, ya que podrían movilizar los miRNAs acumulados en una determinada célula a otras células, en la cual el miRNA no se acumula cuando la planta no está infectada. El posible movimiento de miRNAs podría cambiar la vida media o la expresión de los mismos, por ende su acumulación aumentaría. A lo largo de la Tesis se analizó la acumulación de miRNA en hojas, sin saber en qué tipo particular de células se expresaban los miRNAs en hojas no infectadas o infectadas. Teniendo en cuenta los datos de expresión del promotor del miR164a (Fig. 16) uno puede darse cuenta que la expresión es muy específica y se requiere de nuevos experimentos a la luz de estos datos.

Por último se diseñó y utilizó un miRNA artificial para silenciar GFP (quinto capítulo). La utilización de miRNAs artificiales es una herramienta muy interesante, especialmente cuando se necesita silenciar algún gen de una familia y no se puede utilizar la técnica clásica de silenciamiento porque el gen a silenciar no posee 100 pb únicas y específicas. Al utilizar miRNAs artificiales se utilizan solamente 21 pb, lo cual es una gran ventaja comparado al silenciamiento clásico. Utilizando miR artificiales, se tiene la mínima unidad silenciadora descrita hasta el momento (sRNA de 21 nt), mientras que usando silenciamiento clásico como es el caso de la utilización de horquillas, se requiere de una población grande de sRNAs, los cuales podrían reconocer y silenciar a otros genes no relacionados. Por lo tanto la utilización de miRNA artificiales es más segura y controlada (Schwab y col. 2006).

Este último capítulo fue incluido en este trabajo para mostrar una aplicación desarrollada a partir de investigar en tema de los miRNAs desde un punto de vista básico. Como ya se ha comentado, se pueden diseñar miRNAs artificiales contra virus, se podría pensar en controlar las infecciones de *Agrobacterium*, diseñando el miR contra el T-DNA o contra cualquier otro gen o fragmento de RNA que se desee silenciar. A su vez se podría clonar al miR artificial sobre promotores específicos de tejido o inducibles, para controlar su acción. También se podrían apilar distintos miRNAs en una misma construcción para silenciar a más de un gen a la vez (Sun y col. 2006).

Resumiendo la discusión del tercer y cuarto capítulo, se puede concluir que tanto determinadas proteínas así como virus sin actividad supresora de silenciamiento significativa detectada, son capaces de alterar la acumulación de los miRNAs en la planta. Esta alteración seguramente repercute en la acumulación de los “targets” de los miRNAs y en su actividad. Estos cambios se evidencian a través de las alteraciones morfológicas, tanto de la línea MPxCP^{T42W}, como en los síntomas virales en plantas infectadas con virus. La correlación positiva entre la alteración de los miRNAs y la severidad de los síntomas virales, sugiere un alto grado de responsabilidad de los miRNAs en la sintomatología viral. La independencia en la alteración de los miRNAs con respecto a la actividad supresora de PTGS, sugiere que la alteración de la vía de los miRNAs es una característica componente de la infección viral.

A lo largo de esta Tesis se han contestado muchas preguntas y se han mostrado evidencias importantes y novedosas sobre el rol de los miRNAs en la interacción hospedante-patógeno. Sin embargo, lo más provechoso no es la cantidad de interrogantes que se han contestado sino las preguntas que se generaron a partir de los resultados obtenidos. ¿Porqué los virus producen síntomas? ¿Qué ventajas adaptativas existen en la capacidad de generar síntomas? ¿Qué relación tienen con los miRNAs? En términos biotecnológicos, ¿es importante conferir resistencia viral a la planta o que ésta sea totalmente asintomática? (hay que recordar que los virus de plantas no representan ningún tipo de peligro para los mamíferos). ¿Qué función tendrán los “targets” de los miRNAs alterados en la infección? ¿Su sobre expresión o silenciamiento: podrá conferir resistencia? ¿Se podrá utilizar la capacidad viral de alterar los miRNAs como sistema inducible de expresión o silenciamiento de “targets” transgénicos?

Referencias

- ABEL, P. P., NELSON, R. S., DE, B., HOFFMANN, N., ROGERS, S. G., FRALEY, R. T. and BEACHY, R. N. "Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene." *Science*, May 9, 1986 Vol. 232, no. 4751, p. 738-43.
- ALLEN, E., XIE, Z., GUSTAFSON, A. M. and CARRINGTON, J. C. "microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants." *Cell*, Apr 22, 2005 Vol. 121, no. 2, p. 207-21.
- ALLEN, E., XIE, Z., GUSTAFSON, A. M., SUNG, G. H., SPATAFORA, J. W. and CARRINGTON, J. C. "Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*." *Nat Genet*, Dec, 2004 Vol. 36, no. 12, p. 1282-90.
- AMEDEO, P., HABU, Y., AFSAR, K., MITTELSTEN SCHEID, O. and PASZKOWSKI, J. "Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes." *Nature*, May 11, 2000 Vol. 405, no. 6783, p. 203-6.
- ANDERSON, E.J., STARK, D.M., NELSON, R.S., TUMER, N.E. and BEACHY, R.N. "Transgenic plants that express the coat protein genes of TMV or AIMV interfere with disease development of some non-related viruses." *Phytopathology*, 1989 Vol. no. 79, p. 1284-1290.
- ANDERSON, E.J., STARK, D.M., NELSON, R.S., TUMER, N.E. AND BEACHY, R.N. "Transgenic plants that express the coat protein genes of TMV or AIMV interfere with disease development of some non-related viruses." *Phytopathology*, 1989 Vol. no. 79, p. 1284-1290.
- ARES, X., CALAMANTE, G., CABRAL, S., LODGE, J., HEMENWAY, P., BEACHY, R. N. and MENTABERRY, A. "Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamoviruses." *J Virol*, Jan, 1998 Vol. 72, no. 1, p. 731-8.
- ASURMENDI, S., BERG, R. H., KOO, J. C. and BEACHY, R. N. "Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Feb 3, 2004 Vol. 101, no. 5, p. 1415-20.
- ASURMENDI, S., BERG, R. H., SMITH, T. J., BENDAHMANE, M. and BEACHY, R. N. "Aggregation of TMV CP plays a role in CP functions and in coat-protein-mediated resistance." *Virology*, May 9, 2007 Vol. no.
- AUKERMAN, M. J. and SAKAI, H. "Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes." *Plant Cell*, Nov, 2003 Vol. 15, no. 11, p. 2730-41.
- AXTELL, M. J., JAN, C., RAJAGOPALAN, R. and BARTEL, D. P. "A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants." *Cell*, Nov 3, 2006 Vol. 127, no. 3, p. 565-77.
- BAKER, C. C., SIEBER, P., WELLMER, F. and MEYEROWITZ, E. M. "The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*." *Curr Biol*, Feb 22, 2005 Vol. 15, no. 4, p. 303-15.
- BARTEL, D. P. "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell*, Jan 23, 2004 Vol. 116, no. 2, p. 281-97.
- BASHIRULLAH, A., PASQUINELLI, A. E., KIGER, A. A., PERRIMON, N., RUVKUN, G. and THUMMEL, C. S. "Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis." *Dev Biol*, Jul 1, 2003 Vol. 259, no. 1, p. 1-8.
- BATUMAN, O., MAWASSI, M. and BAR-JOSEPH, M. "Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to Citrus tristeza virus sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus." *Virus Genes*, Dec, 2006 Vol. 33, no. 3, p. 319-27.
- BAULCOMBE, D. "RNA silencing in plants." *Nature*, Sep 16, 2004 Vol. 431, no. 7006, p. 356-63.
- BAZZINI, A. A., ASURMENDI, S., HOPP, H. E. and BEACHY, R. N. "Tobacco mosaic virus (TMV) and potato virus X (PVX) coat proteins confer heterologous interference to PVX and TMV infection, respectively." *J Gen Virol*, Apr, 2006a Vol. 87, no. Pt 4, p. 1005-12.
- BAZZINI, A. A., HOPP, H. E., BEACHY, R. N. and ASURMENDI, S. "Posttranscriptional gene silencing does not play a significant role in Potato virus X coat protein-mediated resistance." *Phytopathology* 2006b Vol. 96, no. 11, p. 1175-1178
- BAZZINI, A. A., HOPP, H. E., BEACHY, R. N. and ASURMENDI, S. "Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jul 17, 2007a Vol. 104, no. 29, p. 12157-62.
- BAZZINI, A.A., MONGELLI, V.C., HOPP, H.E., DEL VAS, M. and ASURMENDI, S. "A practical approach to the understanding and teaching of RNA silencing in plants." *Electronic Journal of Biotechnology*, April, 17, 2007b Vol. no.
- BEACHY, R. N. "Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, Mar 29, 1999 Vol. 354, no. 1383, p. 659-64.

- BENDAHDANE, A., KOHN, B. A., DEDI, C. and BAULCOMBE, D. C. "The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato." *Plant J*, Dec, 1995 Vol. 8, no. 6, p. 933-41.
- BENDAHDANE, M. and BEACHY, R. N. "Control of tobamovirus infections via pathogen-derived resistance." *Advances in Virus Research*, 1999 Vol. 53, no., p. 369-86.
- BENDAHDANE, M., CHEN, I., ASURMENDI, S., BAZZINI, A. A., SZECSEI, J. and BEACHY, R. N. "Coat protein-mediated resistance to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by coat protein." *Virology*, 2007 Vol. 366 no 107-116.
- BENDAHDANE, M., FITCHEN, J. H., ZHANG, G. and BEACHY, R. N. "Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance." *J Virol*, Oct, 1997 Vol. 71, no. 10, p. 7942-50.
- BENDAHDANE, M., SZECSEI, J., CHEN, I., BERG, R. H. and BEACHY, R. N. "Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Mar 19, 2002 Vol. 99, no. 6, p. 3645-50.
- BENTWICH, I. "Prediction and validation of microRNAs and their targets." *FEBS Lett*, Oct 31, 2005 Vol. 579, no. 26, p. 5904-10.
- BLAISE, F., KUSIAK, C., DINANT, S., ASTIER-MANIFACIER, S. and ALBOUY, J. "Heterologous resistance to PVY in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of lettuce mosaic virus (LMV)." *Annual du tabac*, 1995 Vol. 27, no., p. 87-94.
- BOL, J. F. "Alfalfa mosaic virus and ilarviruses: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle." *J Gen Virol*, May, 1999 Vol. 80 (Pt 5), no., p. 1089-102.
- BRACHA-DRORI, K., SHICHRUR, K., KATZ, A., OLIVA, M., ANGELOVICI, R., YALOVSKY, S. and OHAD, N. "Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation." *Plant J*, Nov, 2004 Vol. 40, no. 3, p. 419-27.
- BRAUN, C. J. and HEMENWAY, C. L. "Expression of Amino-Terminal Portions or Full-Length Viral Replicase Genes in Transgenic Plants Confers Resistance to Potato Virus X Infection." *Plant Cell*, Jun, 1992 Vol. 4, no. 6, p. 735-744.
- BRIGNETI, G., MARTIN-HERNANDEZ, A. M., JIN, H., CHEN, J., BAULCOMBE, D. C., BAKER, B. and JONES, J. D. "Virus-induced gene silencing in *Solanum* species." *Plant J*, Jul, 2004 Vol. 39, no. 2, p. 264-72.
- BRILL, L. M., NUNN, R. S., KAHN, T. W., YEAGER, M. and BEACHY, R. N. "Recombinant tobacco mosaic virus movement protein is an RNA-binding, alpha-helical membrane protein." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jun 20, 2000 Vol. 97, no. 13, p. 7112-7.
- BURCH-SMITH, T. M., ANDERSON, J. C., MARTIN, G. B. and DINESH-KUMAR, S. P. "Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants." *Plant J*, Sep, 2004 Vol. 39, no. 5, p. 734-46.
- BUTLER, P. J. and KLUG, A. "The assembly of a virus." *Sci Am*, Nov, 1978 Vol. 239, no. 5, p. 62-9.
- CALLIS, T. E., CHEN, J. F. and WANG, D. Z. "MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development." *DNA Cell Biol*, Apr, 2007 Vol. 26, no. 4, p. 219-25.
- CARETTE, J. E., STUIVER, M., VAN LENT, J., WELLINK, J. and VAN KAMMEN, A. "Cowpea mosaic virus infection induces a massive proliferation of endoplasmic reticulum but not Golgi membranes and is dependent on de novo membrane synthesis." *J Virol*, Jul, 2000 Vol. 74, no. 14, p. 6556-63.
- CARR, J. P., BEACHY, R. N. and KLESSIG, D. F. "Are the PR1 proteins of tobacco involved in genetically engineered resistance to TMV?" *Virology*, Apr, 1989 Vol. 169, no. 2, p. 470-3.
- CARRINGTON, J. C. and DOUGHERTY, W. G. "Small Nuclear Inclusion Protein Encoded by a Plant Potyvirus Genome Is a Protease." *J Virol*, Aug, 1987 Vol. 61, no. 8, p. 2540-2548.
- CARRINGTON, J. C. and DOUGHERTY, W. G. "A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing." *Proc Natl Acad Sci U S A*, May, 1988 Vol. 85, no. 10, p. 3391-5.
- CARRINGTON, J. C., FREED, D. D. and SANDERS, T. C. "Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro." *J Virol*, Oct, 1989 Vol. 63, no. 10, p. 4459-63.
- CITOVSKY, V., KNORR, D., SCHUSTER, G. and ZAMBRYSKI, P. "The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein." *Cell*, Feb 23, 1990 Vol. 60, no. 4, p. 637-47.
- CITOVSKY, V., LEE, L. Y., VYAS, S., GLICK, E., CHEN, M. H., VAINSTEIN, A., GAFNI, Y., GELVIN, S. B. and TZFIRA, T. "Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta." *J Mol Biol*, Oct 6, 2006 Vol. 362, no. 5, p. 1120-31.
- CRUZ, S. S., CHAPMAN, S., ROBERTS, A. G., ROBERTS, I. M., PRIOR, D. A. and OPARKA, K. J. "Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jun 25, 1996 Vol. 93, no. 13, p. 6286-90.
- CULVER, J. N. "Tobamovirus cross protection using a potyvirus vector." *Virology*, Dec 15, 1996 Vol. 226, no. 2, p. 228-35.

- CULVER, J. N. "Tobacco mosaic virus assembly and disassembly: determinants in pathogenicity and resistance." *Annu Rev Phytopathol*, 2002 Vol. 40, no., p. 287-308.
- CULVER, J. N., STUBBS, G. and DAWSON, W. O. "Structure-function relationship between tobacco mosaic virus coat protein and hypersensitivity in *Nicotiana glauca*." *J Mol Biol*, Sep 16, 1994 Vol. 242, no. 2, p. 130-8.
- CUOZZO, M., O'CONNELL, K. M., KANIEWSKI, W., FANG, R. X., CHUA, N. H., AND TUMER, N. E. "Viral protection in transgenic plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA." *BioTechnology*, 1988 Vol. 6, no., p. 549-557.
- CHAPMAN, E. J., PROKHNEVSKY, A. I., GOPINATH, K., DOLJA, V. V. and CARRINGTON, J. C. "Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step." *Genes Dev*, May 15, 2004 Vol. 18, no. 10, p. 1179-86.
- CHAPMAN, S., KAVANAGH, T. and BAULCOMBE, D. "Potato virus X as a vector for gene expression in plants." *Plant J*, Jul, 1992 Vol. 2, no. 4, p. 549-57.
- CHELLAPPAN, P., VANITHARANI, R. and FAUQUET, C. M. "MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jul 19, 2005 Vol. 102, no. 29, p. 10381-6.
- CHEN, C. Z., LI, L., LODISH, H. F. and BARTEL, D. P. "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." *Science*, Jan 2, 2004a Vol. 303, no. 5654, p. 83-6.
- CHEN, J., LI, W. X., XIE, D., PENG, J. R. and DING, S. W. "Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression." *Plant Cell*, May, 2004b Vol. 16, no. 5, p. 1302-13.
- CHEN, K. and RAJEWSKY, N. "The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs." *Nat Rev Genet*, Feb, 2007 Vol. 8, no. 2, p. 93-103.
- CHIOU, T. J. "The role of microRNAs in sensing nutrient stress." *Plant Cell Environ*, Mar, 2007 Vol. 30, no. 3, p. 323-32.
- DELERIS, A., GALLEGO-BARTOLOME, J., BAO, J., KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J. C. and VOINNET, O. "Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense." *Science*, Jul 7, 2006 Vol. 313, no. 5783, p. 68-71.
- DEOM, C. M., SCHUBERT, K. R., WOLF, S., HOLT, C. A., LUCAS, W. J. and BEACHY, R. N. "Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants." *Proc Natl Acad Sci U S A*, May, 1990 Vol. 87, no. 9, p. 3284-8.
- DEZULIAN, T., REMMERT, M., PALATNIK, J. F., WEIGEL, D. and HUSON, D. H. "Identification of plant microRNA homologs." *Bioinformatics*, Feb 1, 2006 Vol. 22, no. 3, p. 359-60.
- DIAZ, I., MARTINEZ, M., ISABEL-LAMONEDA, I., RUBIO-SOMOZA, I. and CARBONERO, P. "The DOF protein, SAD, interacts with GAMBYB in plant nuclei and activates transcription of endosperm-specific genes during barley seed development." *Plant J*, Jun, 2005 Vol. 42, no. 5, p. 652-62.
- DINANT, S., BLAISE, C., KUSIAK, S., ASTIER-MANIFACIER and ALBOUY, J. "Heterologous resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of lettuce mosaic potyvirus." *Phytopathology* 1993a Vol. 83 no., p. 818-824.
- DINANT, S., BLAISE, F., KUSIAK, C., ASTIER-MANIFACIER, S. and ALBOUY, J. "Heterologous resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of lettuce mosaic potyvirus." *Phytopathology*, 1993b Vol. 83, no. 8, p. 818-824.
- DINANT, S., KUSIAK, C., CAILLETEAU, B., VERRIE, R.J.L., CHUPEAU, M.C., CHUPEAU, Y., HONG LE, T.A., DELON, R. and ALBOUY, J. "Field resistance against potato virus Y infection using natural and genetically engineered resistance genes." *Journal of Plant Pathology*, 1998 Vol. no. 104, p. 377-382.
- DINESH-KUMAR, S. P., ANANDALAKSHMI, R., MARATHE, R., SCHIFF, M. and LIU, Y. "Virus-induced gene silencing." *Methods Mol Biol*, 2003 Vol. 236, no., p. 287-94.
- DING, X. S., LIU, J., CHENG, N. H., FOLIMONOV, A., HOU, Y. M., BAO, Y., KATAGI, C., CARTER, S. A. and NELSON, R. S. "The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing." *Mol Plant Microbe Interact*, Jun, 2004 Vol. 17, no. 6, p. 583-92.
- DOENCH, J. G., PETERSEN, C. P. and SHARP, P. A. "siRNAs can function as miRNAs." *Genes Dev*, Feb 15, 2003 Vol. 17, no. 4, p. 438-42.
- DOLJA, V. V., HALDEMAN-CAHILL, R., MONTGOMERY, A. E., VANDENBOSCH, K. A. and CARRINGTON, J. C. "Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus." *Virology*, Feb 1, 1995 Vol. 206, no. 2, p. 1007-16.
- DOLJA, V. V., HALDEMAN, R., ROBERTSON, N. L., DOUGHERTY, W. G. and CARRINGTON, J. C. "Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants." *Embo J*, Mar 15, 1994 Vol. 13, no. 6, p. 1482-91.
- DORSETT, Y. and TUSCHL, T. "siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics." *Nat Rev Drug Discov*, Apr, 2004 Vol. 3, no. 4, p. 318-29.

- DU, G., YONEKUBO, J., ZENG, Y., OSISAMI, M. and FROHMAN, M. A. "Design of expression vectors for RNA interference based on miRNAs and RNA splicing." *Febs J.*, Dec, 2006 Vol. 273, no. 23, p. 5421-7.
- DUNOYER, P., HIMBER, C., RUIZ-FERRER, V., ALIOUA, A. and VOINNET, O. "Intra- and intercellular RNA interference in Arabidopsis thaliana requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways." *Nat Genet.*, Jul, 2007 Vol. 39, no. 7, p. 848-56.
- DUNOYER, P., LECELLIER, C. H., PARIZOTTO, E. A., HIMBER, C. and VOINNET, O. "Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing." *Plant Cell.*, May, 2004 Vol. 16, no. 5, p. 1235-50.
- DUNOYER, P., PFEFFER, S., FRITSCH, C., HEMMER, O., VOINNET, O. and RICHARDS, K. E. "Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus." *Plant J.*, Mar, 2002 Vol. 29, no. 5, p. 555-67.
- DUNOYER, P. and VOINNET, O. "The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways." *Curr Opin Plant Biol.*, Aug, 2005 Vol. 8, no. 4, p. 415-23.
- ELBASHIR, S. M., LENDECKEL, W. and TUSCHL, T. "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev.*, Jan 15, 2001 Vol. 15, no. 2, p. 188-200.
- ENRIGHT, A. J., JOHN, B., GAUL, U., TUSCHL, T., SANDER, C. and MARKS, D. S. "MicroRNA targets in Drosophila." *Genome Biol.*, 2003 Vol. 5, no. 1, p. R1.
- FAHLGREN, N., HOWELL, M. D., KASSCHAU, K. D., CHAPMAN, E. J., SULLIVAN, C. M., CUMBIE, J. S., GIVAN, S. A., LAW, T. F., GRANT, S. R., DANGL, J. L. and CARRINGTON, J. C. "High-Throughput Sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for Frequent Birth and Death of MIRNA Genes." *PLoS ONE*, 2007 Vol. 2, no., p. e219.
- FAHLGREN, N., MONTGOMERY, T. A., HOWELL, M. D., ALLEN, E., DVORAK, S. K., ALEXANDER, A. L. and CARRINGTON, J. C. "Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis." *Curr Biol.*, May 9, 2006 Vol. 16, no. 9, p. 939-44.
- FAIVRE-RAMPANT, O., GILROY, E. M., HRUBIKOVA, K., HEIN, I., MILLAM, S., LOAKE, G. J., BIRCH, P., TAYLOR, M. and LACOMME, C. "Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato." *Plant Physiol.*, Apr, 2004 Vol. 134, no. 4, p. 1308-16.
- FERNANDEZ VALIELA, M. V. "Los virus patógenos de las plantas y su control." 1995 Vol. 4ta. EDICION, no.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. and MELLO, C. C. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." *Nature*, Feb 19, 1998 Vol. 391, no. 6669, p. 806-11.
- FOFANA, I. B., SANGARE, A., COLLIER, R., TAYLOR, C. and FAUQUET, C. M. "A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava." *Plant Mol Biol.*, Nov, 2004 Vol. 56, no. 4, p. 613-24.
- FORTIER, E. and BELOTE, J. M. "Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in Drosophila." *Genesis*, Apr, 2000 Vol. 26, no. 4, p. 240-4.
- FUJISAKI, K., RAVELO, G. B., NAITO, S. and ISHIKAWA, M. "Involvement of THH1, an Arabidopsis thaliana homologue of the TOM1 gene, in tobamovirus multiplication." *J Gen Virol.*, Aug, 2006 Vol. 87, no. Pt 8, p. 2397-401.
- FURNER, I. J., SHEIKH, M. A. and COLLETT, C. E. "Gene silencing and homology-dependent gene silencing in Arabidopsis: genetic modifiers and DNA methylation." *Genetics*, Jun, 1998 Vol. 149, no. 2, p. 651-62.
- GIRALDEZ, A. J., CINALLI, R. M., GLASNER, M. E., ENRIGHT, A. J., THOMSON, J. M., BASKERVILLE, S., HAMMOND, S. M., BARTEL, D. P. and SCHIER, A. F. "MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish." *Science*, May 6, 2005 Vol. 308, no. 5723, p. 833-8.
- GOLDBACH, R., BUCHER, E. and PRINS, M. "Resistance mechanisms to plant viruses: an overview." *Virus Res.*, Apr, 2003 Vol. 92, no. 2, p. 207-12.
- GONG, W., SHEN, Y. P., MA, L. G., PAN, Y., DU, Y. L., WANG, D. H., YANG, J. Y., HU, L. D., LIU, X. F., DONG, C. X., MA, L., CHEN, Y. H., YANG, X. Y., GAO, Y., ZHU, D., TAN, X., MU, J. Y., ZHANG, D. B., LIU, Y. L., DINESH-KUMAR, S. P., LI, Y., WANG, X. P., GU, H. Y., QU, L. J., BAI, S. N., LU, Y. T., LI, J. Y., ZHAO, J. D., ZUO, J., HUANG, H., DENG, X. W. and ZHU, Y. X. "Genome-wide ORFeome cloning and analysis of Arabidopsis transcription factor genes." *Plant Physiol.*, Jun, 2004 Vol. 135, no. 2, p. 773-82.
- GONSALVES, D. "Transgenic Papaya in Hawaii and Beyond." *AgBioForum*, 2004 Vol. 7, no. 1&2, p. 36-40.
- GRISHOK, A., PASQUINELLI, A. E., CONTE, D., LI, N., PARRISH, S., HA, I., BAILLIE, D. L., FIRE, A., RUVKUN, G. and MELLO, C. C. "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing." *Cell*, Jul 13, 2001 Vol. 106, no. 1, p. 23-34.
- GUPTA, A., GARTNER, J. J., SETHUPATHY, P., HATZIGEORGIOU, A. G. and FRASER, N. W. "Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript." *Nature*, Jul 6, 2006 Vol. 442, no. 7098, p. 82-5.

- GUSTAFSON, A. M., ALLEN, E., GIVAN, S., SMITH, D., CARRINGTON, J. C. and KASSCHAU, K. D. "ASRP: the Arabidopsis Small RNA Project Database." *Nucleic Acids Res.*, Jan 1, 2005 Vol. 33, no. Database issue, p. D637-40.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. and JONES, J. D. "Resistance gene-dependent plant defense responses." *Plant Cell*, Oct, 1996 Vol. 8, no. 10, p. 1773-91.
- HAMMOND, S. M., BERNSTEIN, E., BEACH, D. and HANNON, G. J. "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." *Nature*, Mar 16, 2000 Vol. 404, no. 6775, p. 293-6.
- HASSAIRI, A., MASMOUDI, K., ALBOUY, J., ROBAGLIA, C., JULLIEN, M. and ELLOUZ, R. "Transformation of two potato cultivars "Spunta" and "Claustar" (*Solanum tuberosum*) with lettuce mosaic virus coat protein gene and heterologous immunity to potato virus Y. ." *Plant Science* 1998 Vol. 136 no., p. 31-42.
- HEINRICH, A. "Lost in translation." *Nature Reviews*, January, 2007 Vol. 8, no., p. 3.
- HELLIWELL, C. and WATERHOUSE, P. "Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants." *Methods*, Aug, 2003 Vol. 30, no. 4, p. 289-95.
- HEMENWAY, C., FANG, R.-X., KANIEWSKI, W. K., CHUA, N.-H. AND TUMER, N. E. " Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA." *EMBO J.* 1988 Vol. 7, no., p. 1273-1280.
- HENDERSON, I. R., ZHANG, X., LU, C., JOHNSON, L., MEYERS, B. C., GREEN, P. J. and JACOBSEN, S. E. "Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning." *Nat Genet.* Jun, 2006 Vol. 38, no. 6, p. 721-5.
- HIMBER, C., DUNOYER, P., MOISSIARD, G., RITZENTHALER, C. and VOINNET, O. "Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing." *Embo J.* Sep 1, 2003 Vol. 22, no. 17, p. 4523-33.
- HOUBAVIY, H. B., MURRAY, M. F. and SHARP, P. A. "Embryonic stem cell-specific MicroRNAs." *Dev Cell*, Aug, 2003 Vol. 5, no. 2, p. 351-8.
- HOWELL, M. D., FAHLGREN, N., CHAPMAN, E. J., CUMBIE, J. S., SULLIVAN, C. M., GIVAN, S. A., KASSCHAU, K. D. and CARRINGTON, J. C. "Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting." *Plant Cell*, Mar, 2007 Vol. 19, no. 3, p. 926-42.
- HSU, P. W., LIN, L. Z., HSU, S. D., HSU, J. B. and HUANG, H. D. "ViTa: prediction of host microRNAs targets on viruses." *Nucleic Acids Res.* Jan, 2007 Vol. 35, no. Database issue, p. D381-5.
- HU, C. D., CHINENOV, Y. and KERPPOLA, T. K. "Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation." *Mol Cell*, Apr, 2002 Vol. 9, no. 4, p. 789-98.
- HU, C. D. and KERPPOLA, T. K. "Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis." *Nat Biotechnol.* May, 2003 Vol. 21, no. 5, p. 539-45.
- HUTVAGNER, G. and ZAMORE, P. D. "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." *Science*, Sep 20, 2002 Vol. 297, no. 5589, p. 2056-60.
- ISHIKAWA, M. "[Host membrane proteins essential for the growth of plant viruses]." *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, Sep, 2002 Vol. 47, no. 12 Suppl, p. 1728-9.
- JONES-RHOADES, M. W. and BARTEL, D. P. "Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA." *Mol Cell*, Jun 18, 2004 Vol. 14, no. 6, p. 787-99.
- JONES-RHOADES, M. W., BARTEL, D. P. and BARTEL, B. "MicroRNAs and their regulatory roles in plants." *Annu Rev Plant Biol.* 2006 Vol. 57, no., p. 19-53.
- JONES, L., HAMILTON, A. J., VOINNET, O., THOMAS, C. L., MAULE, A. J. and BAULCOMBE, D. C. "RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing." *Plant Cell*, Dec, 1999 Vol. 11, no. 12, p. 2291-301.
- JONES, L., RATCLIFF, F. and BAULCOMBE, D. C. "RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance." *Curr Biol.* May 15, 2001 Vol. 11, no. 10, p. 747-57.
- KALANTIDIS, K., PSARADAKIS, S., TABLER, M. and TSAGRIS, M. "The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus." *Mol Plant Microbe Interact.* Aug, 2002 Vol. 15, no. 8, p. 826-33.
- KAMEDA, T., IKEGAMI, K., LIU, Y., TERADA, K. and SUGIYAMA, T. "A hypothermic-temperature-sensitive gene silencing by the mammalian RNAi." *Biochem Biophys Res Commun.* Mar 12, 2004 Vol. 315, no. 3, p. 599-602.
- KANIEWSKI, W. K. and THOMAS, P. E. "Field testing for virus resistance and agronomic performance in transgenic plants." *Mol Biotechnol.* Aug, 1999 Vol. 12, no. 1, p. 101-15.

- KASSCHAU, K. D., XIE, Z., ALLEN, E., LLAVE, C., CHAPMAN, E. J., KRIZAN, K. A. and CARRINGTON, J. C. "PI/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function." *Dev Cell*, Feb, 2003 Vol. 4, no. 2, p. 205-17.
- KAWAKAMI, S., WATANABE, Y. and BEACHY, R. N. "Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Apr 20, 2004 Vol. 101, no. 16, p. 6291-6.
- KHVOROVA, A., REYNOLDS, A. and JAYASENA, S. D. "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell*, Oct 17, 2003 Vol. 115, no. 2, p. 209-16.
- KIM, K. H., KWON, S. J. and HEMENWAY, C. "Cellular protein binds to sequences near the 5' terminus of potato virus X RNA that are important for virus replication." *Virology*, Sep 30, 2002 Vol. 301, no. 2, p. 305-12.
- KLUG, A. "The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly." *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1999 Vol. 354, no., p. 531-535.
- KOUASSI, N. K., CHEN, L., SIRE, C., BANGRATZ-REYSER, M., BEACHY, R. N., FAUQUET, C. M. and BRUGIDOU, C. "Expression of rice yellow mottle virus coat protein enhances virus infection in transgenic plants." *Arch Virol*, Nov, 2006 Vol. 151, no. 11, p. 2111-2122.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W. and TUSCHL, T. "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." *Science*, Oct 26, 2001 Vol. 294, no. 5543, p. 853-8.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., YALCIN, A., MEYER, J., LENDECKEL, W. and TUSCHL, T. "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." *Curr Biol*, Apr 30, 2002 Vol. 12, no. 9, p. 735-9.
- LAIN, S., RIECHMANN, J. L., MARTIN, M. T. and GARCIA, J. A. "Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins." *Gene*, Oct 30, 1989 Vol. 82, no. 2, p. 357-62.
- LAU, N. C., LIM, L. P., WEINSTEIN, E. G. and BARTEL, D. P. "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." *Science*, Oct 26, 2001 Vol. 294, no. 5543, p. 858-62.
- LAUFS, P., PEAUCELLE, A., MORIN, H. and TRAAS, J. "MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems." *Development*, Sep, 2004 Vol. 131, no. 17, p. 4311-22.
- LEE, R. C. and AMBROS, V. "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." *Science*, Oct 26, 2001 Vol. 294, no. 5543, p. 862-4.
- LENARDÓN, S.L., MARCH, G.J., NOME, S.F. and ORNAGHI, J.A. "Recent outbreak of Mal de Río Cuarto virus on corn in Argentina." *Plant Disease*, 1998 Vol. 448, no.
- LI, H., XU, L., WANG, H., YUAN, Z., CAO, X., YANG, Z., ZHANG, D., XU, Y. and HUANG, H. "The Putative RNA-dependent RNA polymerase RDR6 acts synergistically with ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 to repress BREVIPEDICELLUS and MicroRNA165/166 in Arabidopsis leaf development." *Plant Cell*, Aug, 2005 Vol. 17, no. 8, p. 2157-71.
- LIM, L. P., GLASNER, M. E., YEKTA, S., BURGE, C. B. and BARTEL, D. P. "Vertebrate microRNA genes." *Science*, Mar 7, 2003a Vol. 299, no. 5612, p. 1540.
- LIM, L. P., LAU, N. C., WEINSTEIN, E. G., ABDELHAKIM, A., YEKTA, S., RHOADES, M. W., BURGE, C. B. and BARTEL, D. P. "The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*." *Genes Dev*, Apr 15, 2003b Vol. 17, no. 8, p. 991-1008.
- LINDOW, M. and GORODKIN, J. "Principles and Limitations of Computational MicroRNA Gene and Target Finding." *DNA Cell Biol*, May, 2007 Vol. 26, no. 5, p. 339-51.
- LINGEL, A., SIMON, B., IZAURRALDE, E. and SATTLER, M. "Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain." *Nature*, Nov 27, 2003 Vol. 426, no. 6965, p. 465-9.
- LIU, J., CARMELL, M. A., RIVAS, F. V., MARSDEN, C. G., THOMSON, J. M., SONG, J. J., HAMMOND, S. M., JOSHUA-TOR, L. and HANNON, G. J. "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science*, Sep 3, 2004 Vol. 305, no. 5689, p. 1437-41.
- LIU, Y., SCHIFF, M. and DINESH-KUMAR, S. P. "Virus-induced gene silencing in tomato." *Plant J*, Sep, 2002a Vol. 31, no. 6, p. 777-86.
- LIU, Y., SCHIFF, M., MARATHE, R. and DINESH-KUMAR, S. P. "Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus." *Plant J*, May, 2002b Vol. 30, no. 4, p. 415-29.
- LOESCH-FRIES, L. S., MERLO, D., ZINNEN, T., BURHOP, L., HILL, K., KRAHN, K., JARVIS, N., NELSON, S., AND HALK, E. "Expression of alfalfa mosaic virus RNA4 in transgenic plants confers virus resistance." *EMBO J*, 1987 Vol. 31, no., p. 585-591.
- LU, B., STUBBS, G. and CULVER, J. N. "Coat protein interactions involved in tobacco mosaic tobamovirus cross-protection." *Virology*, Sep 1, 1998 Vol. 248, no. 2, p. 188-98.
- LU, C., TEJ, S. S., LUO, S., HAUDENSCHILD, C. D., MEYERS, B. C. and GREEN, P. J. "Elucidation of the small RNA component of the transcriptome." *Science*, Sep 2, 2005a Vol. 309, no. 5740, p. 1567-9.
- LU, S., SUN, Y. H., SHI, R., CLARK, C., LI, L. and CHIANG, V. L. "Novel and mechanical stress-responsive MicroRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from Arabidopsis." *Plant Cell*, Aug, 2005b Vol. 17, no. 8, p. 2186-203.

- LLAVE, C., XIE, Z., KASSCHAU, K. D. and CARRINGTON, J. C. "Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA." *Science*, Sep 20, 2002 Vol. 297, no. 5589, p. 2053-6.
- MALLORY, A. C., BARTEL, D. P. and BARTEL, B. "MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes." *Plant Cell*, May, 2005 Vol. 17, no. 5, p. 1360-75.
- MALLORY, A. C., DUGAS, D. V., BARTEL, D. P. and BARTEL, B. "MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs." *Curr Biol*, Jun 22, 2004a Vol. 14, no. 12, p. 1035-46.
- MALLORY, A. C., REINHART, B. J., JONES-RHOADES, M. W., TANG, G., ZAMORE, P. D., BARTON, M. K. and BARTEL, D. P. "MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region." *Embo J*, Aug 18, 2004b Vol. 23, no. 16, p. 3356-64.
- MALLORY, A. C. and VAUCHERET, H. "MicroRNAs: something important between the genes." *Curr Opin Plant Biol*, Apr, 2004 Vol. 7, no. 2, p. 120-5.
- MARONEY, P. A., YU, Y., FISHER, J. and NILSEN, T. W. "Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells." *Nat Struct Mol Biol*, Dec, 2006 Vol. 13, no. 12, p. 1102-7.
- MAS, P. and BEACHY, R. N. "Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA." *J Cell Biol*, Nov 29, 1999 Vol. 147, no. 5, p. 945-58.
- MILNE, R.G. (*Rev. Invest. Agrop.*) *INTA*, 1990 Vol. 22, no. Bs As, p. 206.
- MLOTSHWA, S., SCHAUER, S. E., SMITH, T. H., MALLORY, A. C., HERR, J. M., JR., ROTH, B., MERCHANT, D. S., RAY, A., BOWMAN, L. H. and VANCE, V. B. "Ectopic DICER-LIKE1 expression in P1/HC-Pro Arabidopsis rescues phenotypic anomalies but not defects in microRNA and silencing pathways." *Plant Cell*, Nov, 2005 Vol. 17, no. 11, p. 2873-85.
- MLOTSHWA, S., VOINNET, O., METTE, M. F., MATZKE, M., VAUCHERET, H., DING, S. W., PRUSS, G. and VANCE, V. B. "RNA silencing and the mobile silencing signal." *Plant Cell*, 2002 Vol. 14 Suppl, no., p. S289-301.
- MLOTSHWA, S., YANG, Z., KIM, Y. and CHEN, X. "Floral patterning defects induced by Arabidopsis APETALA2 and microRNA172 expression in Nicotiana benthamiana." *Plant Mol Biol*, Jul, 2006 Vol. 61, no. 4-5, p. 781-93.
- MOU, Z., WANG, X., FU, Z., DAI, Y., HAN, C., OUYANG, J., BAO, F., HU, Y. and LI, J. "Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in Arabidopsis." *Plant Cell*, Sep, 2002 Vol. 14, no. 9, p. 2031-43.
- NAMBA, K., PATTANAYEK, R. and STUBBS, G. "Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction." *J Mol Biol*, Jul 20, 1989 Vol. 208, no. 2, p. 307-25.
- NEJIDAT, A. and BEACHY, R. N. "Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses." *Mol Plant Microbe Interact*, Jul-Aug, 1990 Vol. 3, no. 4, p. 247-51.
- NIU, Q. W., LIN, S. S., REYES, J. L., CHEN, K. C., WU, H. W., YEH, S. D. and CHUA, N. H. "Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance." *Nat Biotechnol*, Nov, 2006 Vol. 24, no. 11, p. 1420-8.
- NOTTROT, S., SIMARD, M. J. and RICHTER, J. D. "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes." *Nat Struct Mol Biol*, Dec, 2006 Vol. 13, no. 12, p. 1108-14.
- OHLE, U., YEKTA, S., LIM, L. P., BARTEL, D. P. and BURGE, C. B. "Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification." *Rna*, Sep, 2004 Vol. 10, no. 9, p. 1309-22.
- OLSEN, P. H. and AMBROS, V. "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation." *Dev Biol*, Dec 15, 1999 Vol. 216, no. 2, p. 671-80.
- PALATNIK, J. F., ALLEN, E., WU, X., SCHOMMER, C., SCHWAB, R., CARRINGTON, J. C. and WEIGEL, D. "Control of leaf morphogenesis by microRNAs." *Nature*, Sep 18, 2003 Vol. 425, no. 6955, p. 257-63.
- PARIZOTTO, E. A., DUNOYER, P., RAHM, N., HIMBER, C. and VOINNET, O. "In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA." *Genes Dev*, Sep 15, 2004 Vol. 18, no. 18, p. 2237-42.
- PASQUINELLI, A. E., REINHART, B. J., SLACK, F., MARTINDALE, M. Q., KURODA, M. I., MALLER, B., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., DEGNAN, B., MULLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E. and RUVKUN, G. "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." *Nature*, Nov 2, 2000 Vol. 408, no. 6808, p. 86-9.

- PATRICIO ARCE JOHNSON, THEODORE W. KAHN, ULRICH REIMANN-PHILIPP, RAFAEL RIVERA-BUSTAMANTE, AND ROGER N. BEACHY. "The Amount of Movement Protein Produced in Transgenic Plants Influences the Establishment, Local Movement, and Systemic Spread of Infection by Movement Protein-Deficient Tobacco Mosaic Virus. ." *Mol Plant Microbe Interact.* 1995 Vol. 8, no. 0424 p. 424-434.
- PERAGINE, A., YOSHIKAWA, M., WU, G., ALBRECHT, H. L. and POETHIG, R. S. "SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis." *Genes Dev.* Oct 1, 2004 Vol. 18, no. 19, p. 2368-79.
- PFEFFER, S. and VOINNET, O. "Viruses, microRNAs and cancer." *Oncogene.* Oct 9, 2006 Vol. 25, no. 46, p. 6211-9.
- POWELL, P. A., STARK, D. M., SANDERS, P. R. and BEACHY, R. N. "Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep, 1989 Vol. 86, no. 18, p. 6949-52.
- PRUSS, G., GE, X., SHI, X. M., CARRINGTON, J. C. and BOWMAN VANCE, V. "Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses." *Plant Cell.* Jun, 1997 Vol. 9, no. 6, p. 859-68.
- RAJEWSKY, N. "microRNA target predictions in animals." *Nat Genet.* Jun, 2006 Vol. 38 Suppl, no., p. S8-13.
- REGISTER, J. C., 3RD and BEACHY, R. N. "Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection." *Virology.* Oct, 1988 Vol. 166, no. 2, p. 524-32.
- REHMSMEIER, M. "Prediction of microRNA targets." *Methods Mol Biol.* 2006 Vol. 342, no., p. 87-99.
- REICHEL, C. and BEACHY, R. N. "Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 15, 1998 Vol. 95, no. 19, p. 11169-74.
- RESTREPO-HARTWIG, M. A. and CARRINGTON, J. C. "Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis." *J Virol.* Sep, 1992 Vol. 66, no. 9, p. 5662-6.
- RHOADES, M. W., REINHART, B. J., LIM, L. P., BURGE, C. B., BARTEL, B. and BARTEL, D. P. "Prediction of plant microRNA targets." *Cell.* Aug 23, 2002 Vol. 110, no. 4, p. 513-20.
- RIECHMANN, J. L., LAIN, S. and GARCIA, J. A. "Highlights and prospects of potyvirus molecular biology." *J Gen Virol.* Jan, 1992 Vol. 73 (Pt 1), no., p. 1-16.
- ROBERTSON, D. "VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools." *Annu Rev Plant Biol.* 2004 Vol. 55, no., p. 495-519.
- ROTH, B. M., PRUSS, G. J. and VANCE, V. B. "Plant viral suppressors of RNA silencing." *Virus Res.* Jun 1, 2004 Vol. 102, no. 1, p. 97-108.
- RUIZ, M. T., VOINNET, O. and BAULCOMBE, D. C. "Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing." *Plant Cell.* Jun, 1998 Vol. 10, no. 6, p. 937-46.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. "Molecular Cloning a laboratory manual." *Second edition.* Vol. no.
- SAMOLS, M. A., HU, J., SKALSKY, R. L. and RENNE, R. "Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *J Virol.* Jul, 2005 Vol. 79, no. 14, p. 9301-5.
- SAVENKOV, E. I. and VALKONEN, J. P. "Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus." *J Gen Virol.* Sep, 2001 Vol. 82, no. Pt 9, p. 2275-8.
- SCHWAB, R., OSSOWSKI, S., RIESTER, M., WARTHMAN, N. and WEIGEL, D. "Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis." *Plant Cell.* May, 2006 Vol. 18, no. 5, p. 1121-33.
- SCHWAB, R., PALATNIK, J. F., RIESTER, M., SCHOMMER, C., SCHMID, M. and WEIGEL, D. "Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome." *Dev Cell.* Apr, 2005 Vol. 8, no. 4, p. 517-27.
- SCHWARZ, D. S., HUTVAGNER, G., DU, T., XU, Z., ARONIN, N. and ZAMORE, P. D. "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." *Cell.* Oct 17, 2003 Vol. 115, no. 2, p. 199-208.
- SETHUPATHY, P., MEGRAW, M. and HATZIGEORGIOU, A. G. "A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets." *Nat Methods.* Nov, 2006 Vol. 3, no. 11, p. 881-6.
- SHI, X. M., MILLER, H., VERCHOT, J., CARRINGTON, J. C. and VANCE, V. B. "Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism." *Virology.* Apr 28, 1997 Vol. 231, no. 1, p. 35-42.
- SILHAVY, D. and BURGYN, J. "Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs." *Trends Plant Sci.* Feb, 2004 Vol. 9, no. 2, p. 76-83.
- SLEAT, D. E., GALLIE, D. R., WATTS, J. W., DEOM, C. M., TURNER, P. C., BEACHY, R. N. and WILSON, T. M. "Selective recovery of foreign gene transcripts as virus-like particles in TMV-infected transgenic tobaccos." *Nucleic Acids Res.* Apr 25, 1988 Vol. 16, no. 8, p. 3127-40.

- SONG, J. J., LIU, J., TOLIA, N. H., SCHNEIDERMAN, J., SMITH, S. K., MARTIENSSEN, R. A., HANNON, G. J. and JOSHUA-TOR, L. "The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes." *Nat Struct Biol*, Dec, 2003 Vol. 10, no. 12, p. 1026-32.
- SONG, J. J., SMITH, S. K., HANNON, G. J. and JOSHUA-TOR, L. "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." *Science*, Sep 3, 2004 Vol. 305, no. 5689, p. 1434-7.
- SOS-HEGEDUS, A., LOVAS, A., KONDRAK, M., KOVACS, G. and BANFALVI, Z. "Active RNA silencing at low temperature indicates distinct pathways for antisense-mediated gene-silencing in potato." *Plant Mol Biol*, Nov, 2005 Vol. 59, no. 4, p. 595-602.
- SPILLANE, C., VERCHOT, J., KAVANAGH, T. A. and BAULCOMBE, D. C. "Concurrent suppression of virus replication and rescue of movement-defective virus in transgenic plants expressing the coat protein of potato virus X." *Virology*, Sep 15, 1997 Vol. 236, no. 1, p. 76-84.
- SULLIVAN, C. S. and GANEM, D. "MicroRNAs and viral infection." *Mol Cell*, Oct 7, 2005 Vol. 20, no. 1, p. 3-7.
- SUN, D., MELEGARI, M., SRIDHAR, S., ROGLER, C. E. and ZHU, L. "Multi-miRNA hairpin method that improves gene knockdown efficiency and provides linked multi-gene knockdown." *Biotechniques*, Jul, 2006 Vol. 41, no. 1, p. 59-63.
- SUNKAR, R., CHINNUSAMY, V., ZHU, J. and ZHU, J. K. "Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation." *Trends Plant Sci*, Jun 15, 2007 Vol. no.
- SUNKAR, R., GIRKE, T., JAIN, P. K. and ZHU, J. K. "Cloning and characterization of microRNAs from rice." *Plant Cell*, May, 2005 Vol. 17, no. 5, p. 1397-411.
- SZITTYA, G., SILHAVY, D., MOLNAR, A., HAVELDA, Z., LOVAS, A., LAKATOS, L., BANFALVI, Z. and BURGYAN, J. "Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation." *Embo J*, Feb 3, 2003 Vol. 22, no. 3, p. 633-40.
- TAKAHASHI, H., MILLER, J., NOZAKI, Y., TAKEDA, M., SHAH, J., HASE, S., IKEGAMI, M., EHARA, Y. and DINESH-KUMAR, S. P. "RCY1, an Arabidopsis thaliana RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism." *Plant J*, Dec, 2002 Vol. 32, no. 5, p. 655-67.
- TANG, G., REINHART, B. J., BARTEL, D. P. and ZAMORE, P. D. "A biochemical framework for RNA silencing in plants." *Genes Dev*, Jan 1, 2003 Vol. 17, no. 1, p. 49-63.
- TOBIAS, C. M., OLDROYD, G. E., CHANG, J. H. and STASKAWICZ, B. J. "Plants expressing the Pto disease resistance gene confer resistance to recombinant PVX containing the avirulence gene AvrPto." *Plant J*, Jan, 1999 Vol. 17, no. 1, p. 41-50.
- TUMER, N. E., O'CONNELL, K. M., NELSON, R. S., SANDERS, P. R., AND BEACHY, R. N. "Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants." *EMBO J*, 1987 Vol. 6, no., p. 1181-1188.
- VAN DUN, C. M., OVERDUIN, B., VAN VLOTEN-DOTING, L. and BOL, J. F. "Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein does not cross-protect against alfalfa mosaic virus infection." *Virology*, Jun, 1988a Vol. 164, no. 2, p. 383-9.
- VAN DUN, C. M. P., BOL, J. F., AND VAN VLOTEN-DOTING, L. "Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants." *Virology*, 1987 Vol. 159, no., p. 299-305.
- VAN DUN, C. M. P., OVERDUIN, B., VAN VLOTEN-DOTING, L. and BOL, J. F. "Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein does not cross-protect against alfalfa mosaic virus infection." *Virology*, Jun, 1988b Vol. 164, no. 2, p. 383-9.
- VAN REGENMORTEL, MARC H. V., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L. and VIRUSES, INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF. "Seventh report of the international Committee on taxonomy of viruses." 2000 Vol. no., p. 1162 pages.
- VANCE, V. and VAUCHERET, H. "RNA silencing in plants--defense and counterdefense." *Science*, Jun 22, 2001 Vol. 292, no. 5525, p. 2277-80.
- VANITHARANI, R., CHELLAPPAN, P. and FAUQUET, C. M. "Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Aug 5, 2003 Vol. 100, no. 16, p. 9632-6.
- VANITHARANI, R., CHELLAPPAN, P. and FAUQUET, C. M. "Geminiviruses and RNA silencing." *Trends Plant Sci*, Mar, 2005 Vol. 10, no. 3, p. 144-51.
- VAUCHERET, H., BECLIN, C., ELMAYAN, T., FEUERBACH, F., GODON, C., MOREL, J. B., MOURRAIN, P., PALAUQUI, J. C. and VERNHETTES, S. "Transgene-induced gene silencing in plants." *The Plant Journal*, 1998 Vol. 16, no. 6, p. 651-659.
- VAUCHERET, H. and FAGARD, M. "Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators." *Trends Genet*, Jan, 2001 Vol. 17, no. 1, p. 29-35.

- VAZQUEZ, F., GASCIOLLI, V., CRETE, P. and VAUCHERET, H. "The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing." *Curr Biol*, Feb 17, 2004a Vol. 14, no. 4, p. 346-51.
- VAZQUEZ, F., VAUCHERET, H., RAJAGOPALAN, R., LEPERS, C., GASCIOLLI, V., MALLORY, A. C., HILBERT, J. L., BARTEL, D. P. and CRETE, P. "Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs." *Mol Cell*, Oct 8, 2004b Vol. 16, no. 1, p. 69-79.
- VERCHOT, J., KOONIN, E. V. and CARRINGTON, J. C. "The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase." *Virology*, Dec, 1991 Vol. 185, no. 2, p. 527-35.
- VOINNET, O. "RNA silencing as a plant immune system against viruses." *Trends Genet*, Aug, 2001 Vol. 17, no. 8, p. 449-59.
- VOINNET, O. "Shaping small RNAs in plants by gene duplication." *Nat Genet*, Dec, 2004 Vol. 36, no. 12, p. 1245-6.
- VOINNET, O. "Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections." *Nat Rev Genet*, Mar, 2005 Vol. 6, no. 3, p. 206-20.
- VOINNET, O., LEDERER, C. and BAULCOMBE, D. C. "A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*." *Cell*, Sep 29, 2000 Vol. 103, no. 1, p. 157-67.
- VOINNET, O., PINTO, Y. M. and BAULCOMBE, D. C. "Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nov 23, 1999 Vol. 96, no. 24, p. 14147-52.
- VOINNET, O., VAIN, P., ANGELL, S. and BAULCOMBE, D. C. "Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA." *Cell*, Oct 16, 1998 Vol. 95, no. 2, p. 177-87.
- VOLOUDAKIS, A. E., ALEMAN-VERDAGUER, M. E., PADGETT, H. S. and BEACHY, R. N. "Characterization of resistance in transgenic *Nicotiana benthamiana* encoding N-terminal deletion and assembly mutants of the tobacco etch potyvirus coat protein." *Arch Virol*, Dec, 2005 Vol. 150, no. 12, p. 2567-82.
- WANG, H., PLANCHART, A. and STUBBS, G. "Caspar carboxylates: the structural basis of tobamovirus disassembly." *Biophys J*, Jan, 1998 Vol. 74, no. 1, p. 633-8.
- WANG, J. W., WANG, L. J., MAO, Y. B., CAI, W. J., XUE, H. W. and CHEN, X. Y. "Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*." *Plant Cell*, Aug, 2005 Vol. 17, no. 8, p. 2204-16.
- WESLEY, S. V., HELLIWELL, C. A., SMITH, N. A., WANG, M. B., ROUSE, D. T., LIU, Q., GOODING, P. S., SINGH, S. P., ABBOTT, D., STOUTJESDIJK, P. A., ROBINSON, S. P., GLEAVE, A. P., GREEN, A. G. and WATERHOUSE, P. M. "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants." *Plant J*, Sep, 2001 Vol. 27, no. 6, p. 581-90.
- WIELOPOLSKA, A., TOWNLEY, H., MOORE, I., WATERHOUSE, P. and HELLIWELL, C. "A high-throughput inducible RNAi vector for plants." *Plant Biotechnol J*, Nov, 2005 Vol. 3, no. 6, p. 583-90.
- XIE, Z., JOHANSEN, L. K., GUSTAFSON, A. M., KASSCHAU, K. D., LELLIS, A. D., ZILBERMAN, D., JACOBSEN, S. E. and CARRINGTON, J. C. "Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants." *PLoS Biol*, May, 2004 Vol. 2, no. 5, p. E104.
- YAEGASHI, H., TAKAHASHI, T., ISOGAI, M., KOBORI, T., OHKI, S. and YOSHIKAWA, N. "Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*." *J Gen Virol*, Jan, 2007 Vol. 88, no. Pt 1, p. 316-24.
- YAMANAKA, T., IMAI, T., SATOH, R., KAWASHIMA, A., TAKAHASHI, M., TOMITA, K., KUBOTA, K., MESHII, T., NAITO, S. and ISHIKAWA, M. "Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes." *J Virol*, Mar, 2002 Vol. 76, no. 5, p. 2491-7.
- YAN, K. S., YAN, S., FAROOQ, A., HAN, A., ZENG, L. and ZHOU, M. M. "Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain." *Nature*, Nov 27, 2003 Vol. 426, no. 6965, p. 468-74.
- ZENG, Y., WAGNER, E. J. and CULLEN, B. R. "Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells." *Mol Cell*, Jun, 2002 Vol. 9, no. 6, p. 1327-33.
- ZENG, Y., YI, R. and CULLEN, B. R. "MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A*, Aug 19, 2003 Vol. 100, no. 17, p. 9779-84.
- ZHANG, B., PAN, X., COBB, G. P. and ANDERSON, T. A. "Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact." *Dev Biol*, Jan 1, 2006 Vol. 289, no. 1, p. 3-16.
- ZHAO, B., LIANG, R., GE, L., LI, W., XIAO, H., LIN, H., RUAN, K. and JIN, Y. "Identification of drought-induced microRNAs in rice." *Biochem Biophys Res Commun*, Mar 9, 2007 Vol. 354, no. 2, p. 585-90.

Autor:

Director:

Lic. Ariel A. Bazzini

Dr. Sebastian Asurmendi