

Tesis Doctoral

Estudios sobre la fosforilación de la proteína de movimiento TGBp1 del Potato Virus X

Módena, Natalia A.

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Módena, Natalia A.. (2011). Estudios sobre la fosforilación de la proteína de movimiento TGBp1 del Potato Virus X. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Módena, Natalia A.. "Estudios sobre la fosforilación de la proteína de movimiento TGBp1 del Potato Virus X". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Estudios sobre la fosforilación de la proteína de movimiento TGBp1 del *Potato Virus X*

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

Lic. Natalia A. Módena

Director de tesis: Dr. Alejandro N. Mentaberry

Director Asistente: Dra. Alicia M. Zelada

Consejero de Estudios: Dr. Alejandro N. Mentaberry

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET).

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA)

Buenos Aires, 2011

Estudios sobre la fosforilación de la proteína de movimiento TGBp1 del *Potato Virus X*

RESUMEN

El *Potato virus X* (PVX) es un virus de plantas, miembro tipo del género *Potexvirus*. Su genoma está compuesto por una única molécula de ARN que codifica una replicasa viral, tres proteínas de movimiento (MPs: TGBp1, TGBp2 y TGBp3) y la proteína de la cápside (CP). La proteína TGBp1 es una proteína multifuncional requerida para el movimiento viral de célula a célula en la planta hospedera. Diferentes líneas de investigación sugieren que la fosforilación de las proteínas virales puede regular la replicación y el movimiento viral. En este estudio, se demostró que la proteína TGBp1 es fosforilada por al menos una proteína quinasa, presente en extractos de plantas de *Nicotiana tabacum* infectadas con PVX y no infectadas, que posee características distintivas de la caseína quinasa 2 (CK2). El análisis en geles bidimensionales de extractos de plantas infectadas permitió determinar que la proteína TGBp1 producida durante la infección viral presenta múltiples isoformas de diferentes puntos isoeléctricos; el tratamiento con fosfatasas de los extractos de plantas infectadas indicó la presencia de isoformas fosforiladas. A través de la combinación de estudios de determinación de aminoácidos fosforilados por espectrometría de masa, comparación de secuencias aminoacídicas de TGBp1 de distintos virus y evaluación de la fosforilación *in vitro* de mutantes puntuales y de delección de la proteína TGBp1, se identificaron tres probables sitios de fosforilación por la quinasa CK2 de *N. tabacum*: S-165, T-193, T-214. Se observó que la simulación de la fosforilación en los residuos T-193 y T-214 regula negativamente la dispersión viral y la capacidad de la proteína TGBp1 de hidrolizar ATP. Los resultados sugieren firmemente que una proteína quinasa de la familia de CK2 estaría involucrada en la fosforilación de TGBp1 durante el curso de la infección viral de *N. tabacum*. Además, se discute el modo en que la fosforilación podría regular las actividades de la proteína TGBp1 durante la infección viral.

Palabras clave: TGBp1 – *Potato virus X* – fosforilación – movimiento viral – CK2

Studies on the phosphorylation of the TGBp1 movement protein of Potato virus X

SUMMARY

Potato virus X (PVX) is the type member of the *Potexvirus* genus. Its genome is based on a single RNA molecule encoding one viral replicase protein, three movement proteins (MPs: TGBp1, TGBp2 and TGBp3) and the capsid protein (CP). In particular, TGBp1 is a multifunctional protein required for virus cell-to-cell movement inside the host plant. Recent work on other plant viruses has indicated that viral proteins phosphorylation by host kinases can regulate processes such as viral replication and mobilization. The results obtained during this Thesis work show that TGBp1 is phosphorylated by at least one kinase protein with properties characteristic of Casein-kinase 2 (CK2). This kinase activity is present in crude extracts prepared from both non-infected and PVX infected *Nicotiana tabacum* plants. Bi-dimensional gel experiments with crude extracts from PVX infected plants showed that TGBp1 expressed during infection presented several isoforms with different Isoelectrical points. Some of these isoforms were sensitive to phosphatase treatment, suggesting that TGBp1 is phosphorylated in multiple residues. Several experimental approaches (mass spectrometer identification of phosphorylated aminoacids, sequence comparison among TGBp1 homologues from several viruses, and *in vitro* phosphorylation experiments with mutated versions of TGBp1), allowed the identification of three potential phosphorylation sites by recombinant alpha subunit *N. tabacum* CK2: S-165, T-193 and T-214. Mimicking phosphorylation on residues T-193 and T-214 had a negative impact on viral spreading and TGBp1 ATP hydrolysis activity.

The results presented in this Thesis strongly suggest that a *N. tabacum* kinase protein belonging to CK2 family is involved in the phosphorylation of TGBp1 during PVX infection. How the phosphorylation regulates TGBp1 activities is discussed.

Key words: TGBp1 – *Potato virus X* – phosphorylation – viral movement – CK2

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Mentaberry por darme la oportunidad de realizar este trabajo en el laboratorio en un ámbito de gran calidad científica, y por el privilegio de trabajar bajo su dirección.

A la Dra. Alicia Zelada por ser mi guía científica y mi compañera de experimentos, por sus valiosas discusiones y sugerencias, por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo y confianza.

A ambos, ¡gracias por respaldarme durante estos años de trabajo!

Al CONICET por el otorgamiento de la beca para la realización de este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Dr. Héctor Torres y la Dra. Mirta Flawiá por haberme permitido llevar a cabo este trabajo en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI).

Al Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, de la Universidad de Buenos Aires por permitirme llevar a cabo la última etapa de mi trabajo en el laboratorio de Agrobiotecnología.

A la Lic. María Binaghi y la Lic. Florencia Conte por su valiosa colaboración y aportes al desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Blumwald por gestionar el análisis de espectrometría de masa a través del *Scripps Center for Mass Spectrometry* (La Jolla, California, Estados Unidos).

Al Dr. Muschietti por permitirme utilizar el equipamiento necesario para realizar los experimentos de análisis de isoformas en geles bidimensionales. ¡A Diego y Tamara por ayudarme y ser mis asesores de 2D!

Al Dr. Fernando Bravo Almonacid por permitirme trabajar en su laboratorio para la realización de algunos experimentos necesarios durante la última etapa del desarrollo de este trabajo.

Especialmente a la Dra. Mirta Flawiá, la Dra. Cristina Paveto y la Dra. María Teresa Téllez de Iñón por sus invaluable consejos.

A toda la gente que alguna vez transito el laboratorio de los "Papas", ¡y eso es mucha gente! A Juan Pablo, Roberto, Silvia, Patri, Nico F, Sergio, Mercedes, Mauro y Exe. Especialmente a Flor, Mery, Pau, Naty F, Sonia y Euge gracias por tantas horas compartidas dentro (y fuera) del laboratorio.

Y especialmente a Fernando, Mauro, Exe y Euge por adoptarme temporalmente entre los cloroplastos y compartir su laboratorio conmigo ¡Gracias!

A todos los integrantes del laboratorio de Agrobiotecnología, incluidos los Trypanosomas!

A todos los chicos del INGEBI por haber hecho del Instituto un excelente lugar de trabajo. A Briardo, Guille, Pato, Vero, Fede, Esteban, Vani, Pablo, Gaby, Diego, Tamara, Romi... tanta gente!!

Al personal de apoyo del Instituto. A Irma, Marta, Mariano, Mary, Francisco y Gladys, ¡no puedo imaginar el INGEBI sin pensar en ustedes!

A mi familia y a mis amigos. No tengo palabras, gracias por apoyarme siempre y en todas las circunstancias. A Facundo, gracias por la paciencia, el apoyo, la compañía... ¡por el amor!

¡Gracias a todos los que fueron parte del camino recorrido!

**Dedicado a mis abuelos,
a mi familia, a Facu,
y a mis amigos.
¡Gracias por apoyarme incondicionalmente!**

El trabajo expuesto en esta Tesis es parte de los siguientes manuscritos:

Módena N.A., Zelada A.M., Conte F., Mentaberry A.N. 2008. Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of Potato virus X by a *Nicotiana tabacum* CK2-like activity. *Virus Research*, 137 (1): 16-23.

Binaghi, M., Módena N.A., Mentaberry A.N., Zelada A. *Mimicking carboxyterminal phosphorylation of PVX TGBp1 prevents viral spreads and subcellular localization.* Manuscrito en preparación

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Familia <i>Flexiviridae</i>	4
2. Los <i>Potexvirus</i>: el <i>Potato virus X</i>	7
2.1 Características generales.....	7
2.2 Multiplicación viral: replicación y traducción de proteínas virales.....	9
2.3 Estructura de las partículas virales.....	10
2.3.1 <i>Desensamblaje y activación de la traducción</i>	11
3. El Triple Bloque de Genes (TGB)	12
3.1 Distribución y conservación del arreglo del TGB.....	12
3.2 TGBp1: una proteína de movilización multifuncional.....	13
3.2.1 <i>Actividades de TGBp1 in vitro: ARN helicasa y unión de ARN</i>	13
3.2.2 <i>Actividades de TGBp1 in vivo</i>	17
3.3 Características de las proteínas TGBp2 y TGBp3.....	19
3.4 Interacciones de las proteínas del TGB.....	20
3.5 Localización subcelular de las proteínas del TGB.....	21
4. Estrategias de movilización viral	23
4.1 Movimiento de célula a célula.....	24
4.2 Movimiento sistémico.....	26
5. Fosforilación de proteínas	27
5.1 Regulación de la función de proteínas por fosforilación.....	27
5.2 Fosforilación de proteínas de movimiento viral.....	28
II. OBJETIVOS	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Material vegetal y condiciones de cultivo	34
2. Aislamientos virales	34
3. Infección mecánica de plantas	34
4. Cepas bacterianas	35
4.1 <i>Escherichia coli</i>	35
4.1.1 <i>Condiciones de cultivo</i>	35
4.1.2 <i>Preparación de células electrocompetentes</i>	35
4.1.3 <i>Transformación de células electrocompetentes</i>	35
4.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
4.2.1 <i>Condiciones de cultivo</i>	36
4.2.2 <i>Preparación de células electrocompetentes</i>	36
4.2.3 <i>Transformación de células electrocompetentes</i>	36
5. Métodos de ingeniería genética	36
5.1 Aislamiento de ADN plasmídico.....	37
5.1.1 <i>Mini preparación de ADN plasmídico</i>	37
5.2 Preparación de plásmido e insertos.....	37
5.2.1 <i>Amplificación de insertos por PCR</i>	37
5.2.2 <i>Corte con enzimas de restricción</i>	38
5.2.3 <i>Rellenado de extremos 5' protruyentes</i>	38
5.2.4 <i>Desfosforilación de extremos compatibles</i>	38
5.2.5 <i>Purificación de plásmidos y fragmentos de ADN</i>	38
5.3 Reacciones de ligación.....	39

6.	Electroforesis de ADN	39
7.	Plásmidos	39
7.1	Plásmidos comerciales.....	39
7.2	Construcciones desarrolladas previamente	40
7.3	Construcciones desarrolladas en el presente trabajo.....	40
8.	Electroforesis y transferencia de proteínas	45
8.1	Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).	45
8.2	Tinción con <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	45
8.3	Transferencia de proteínas	45
9.	Expresión y purificación de proteínas recombinantes	46
9.1	Expresión de proteínas recombinantes en pequeña escala	46
9.2	Expresión a gran escala y purificación por cromatografía de afinidad	46
10.	Inmunodetección de proteínas (<i>Western blot</i>)	48
10.1	Anticuerpos utilizados	48
10.2	Revelado con sustrato cromogénico.....	48
10.3	Revelado por quimioluminiscencia.....	49
11.	Extracción de ARN total y ensayo de <i>Northern blot</i>	49
12.	Preparación de extractos de proteínas como fuente enzimática para reacciones de fosforilación	50
13.	Purificación parcial de actividad quinasa por cromatografía de afinidad en heparina-Sepharose	51
14.	Fosforilación de proteínas	51
14.1	Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	51
14.2	Ensayos de fosforilación <i>in situ</i>	52
15.	Electroforesis de proteínas en geles bidimensionales	53
15.1	Preparación del extracto de proteínas a partir de tejido de hojas de plantas no infectadas	53
15.2	Tratamiento de desfosforilación de proteínas totales en extractos de hojas infectadas por PVX.....	53
15.3	Separación de proteínas en geles bidimensionales	54
16.	Determinación de fosfoaminoácidos	55
17.	Ensayos de agroinfiltración	55
18.	Ensayos de actividad de hidrólisis de ATP	56
19.	Análisis por espectrometría de masa	56
20.	Herramientas de bioinformática y análisis estadístico de datos	57
21.	Medios de cultivo y soluciones	58
IV.RESULTADOS		60
1.	Producción de proteína recombinante TGBp1	61
2.	Fosforilación <i>in vitro</i> de rTGBp1 con la fracción de proteínas solubles de hojas de <i>N. tabacum</i> infectadas con PVX y de hojas no infectadas	64
3.	Caracterización de la actividad quinasa de rTGBp1 presente en la fracción de proteínas solubles de hojas de <i>N. tabacum</i> infectadas con PVX y de hojas no infectadas	68
4.	Caracterización de los residuos fosforilados por una actividad quinasa presente en la FPS de hojas de <i>N. tabacum</i> infectadas con PVX y en hojas no infectadas	71

5.	Fosforilación <i>in situ</i> de la TGBp1 nativa por una actividad quinasa celular tipo CK2 presente en la FPS de hojas de <i>N. tabacum</i> infectadas con PVX.....	73
6.	Purificación parcial de una quinasa celular de tipo CK2.....	76
7.	Fosforilación de rTGBp1 con la subunidad catalítica alfa recombinante de CK2 de <i>N. tabacum</i>	78
8.	Caracterización de las isoformas de TGBp1 presentes durante la infección viral por electroforesis bidimensional.....	83
9.	Comparación de las secuencias de las proteínas TGBp1 de virus pertenecientes a la familia <i>Flexiviridae</i>	87
10.	Caracterización de posibles sitios de fosforilación en el extremo C-terminal de TGBp1	90
11.	Caracterización de versiones de rTGBp1 mutadas en los residuos T-193 y T-214	96
12.	Efecto de la mutación de los residuos T-193 y T-214 de TGBp1 sobre la capacidad infectiva de PVX.....	98
13.	Efecto de la mutación de los residuos T-193 y T-214 sobre la actividad ATPasa de TGBp1	105
14.	Análisis de los sitios de fosforilación de rTGBp1 por espectrometría de masa.....	107
V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES		110
1.	La proteína TGBp1 es fosforilada por una quinasa celular con características de CK2	111
2.	Identificación de los residuos fosforilados en rTGBp1	114
3.	Posible rol regulatorio de la fosforilación de TGBp1.	116
VI. REFERENCIAS		120

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

μl	Microlitro
ADN	Acido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
ADP	Adenosina difosfato
ARN	Acido ribonucleico
ARNdc	ARN doble cadena
ARNg	ARN genómico
ARNm	ARN mensajero
ARNsg	ARN subgenómico
ARNv	ARN viral
ATP	Adenosina trifosfato
ATPasa	Actividad de hidrólisis de ATP
BaMV	<i>Bamboo mosaic virus</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CBB	Azul Brillante de <i>Coomassie</i> (del inglés, <i>Coomassie Brilliant Blue</i>)
cf	Concentración final
CK1	Caseína quinasa 1
CK2	Caseína quinasa 2
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CP	Cápside viral
CsCMV	<i>Cassava common mosaic virus</i>
CVB	<i>Chrysanthemum virus B</i>
CVX	<i>Cactus virus X</i>
CYMMV	<i>Cymbidium mosaic virus</i>
CYMV	<i>Clover yellow mosaic virus</i>
DO	Densidad óptica
d.p.i	Días post infección
FoMV	<i>Foxtail mosaic virus</i>
FPAPC	Fracción de proteínas asociadas a la pared celular
FPS	Fracción de proteínas solubles
GTP	Guanosina trifosfato
h	Horas
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
kb	Kilopares de bases
kDa	KiloDalton

L	Litro
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MP(s)	Proteína/s de movimiento
nm	Nanometros
NMV	<i>Narcissus mosaic virus</i>
nt	Nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés, <i>open reading frame</i>)
PapMV	<i>Papaya mosaic virus</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pi	Fósforo inorgánico
pI	Punto isoelèctrico
PlaMV	<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>
PopMV	<i>Poplar mosaic virus</i>
PPV	<i>Plum pox potyvirus</i>
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional (del inglés <i>post-transcriptional gene silencing</i>)
PTM	Modificaciones post-traduccionales
PTMV	<i>Potato mop top virus</i>
PVA	<i>Potato virus A</i>
PVM	<i>Potato virus M</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RE	Retículo endoplásmico
Rep	Replicasa viral
RNP	Complejo de ribonucleoproteínas
rNtCK2	Subunidad alfa recombinante de <i>N. tabacum</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodio dodecil sulfato
SEL	Límite de exclusión del plasmodesmo (del inglés, <i>size exclusion limit</i>)
ShVX	<i>Shallot virus X</i>
TamMV	<i>Tamarillo mosaic potyvirus</i>
TGBp(s)	proteínas del triple bloque de genes (<i>triple gene block proteins</i>)
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
WCIMV	<i>White clover mosaic virus</i>

I. INTRODUCCIÓN

1. Familia *Flexiviridae*.

La familia *Flexiviridae* agrupa a los géneros: *Allexivirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus* y *Vitivirus*, al género putativo *Citrivirus*, y a algunas especies aún no asignadas (Adams *et al.*, 2004; Martelli *et al.*, 2007). Los virus que componen esta familia se encuentran ampliamente distribuidos en todos los continentes y su importancia radica en que atacan cultivos de interés agronómico como papa, tomate, pimiento y tabaco. Los *Potex*-, *Allexi*- y *Carlavirus* son patógenos de plantas herbáceas, mientras que los *Capillo*-, *Citri*-, *Fovea*-, *Mandari*-, *Tricho*- y *Vitivirus* atacan plantas leñosas. Los miembros de esta familia presentan una estructura de viriones filamentosos y flexibles, con una longitud variable entre los 500 y 800 nm y un diámetro de 13 nm. El genoma se compone de una única hebra de ARN de polaridad positiva, poliadenilado en el extremo 3' y de una extensión variable entre 5,8 y 8,8 kb.

El criterio para clasificar a estos virus como parte de una misma familia está basado en una fuerte relación filogenética entre las proteínas de replicación y las proteínas estructurales y en la similitud a nivel de la organización de sus genomas. En la **Figura 1** se detalla la organización genómica de los virus de la familia. Todos ellos codifican una replicasa viral que posee dominios de ARN polimerasa, ARN helicasa y metiltransferasa. Adicionalmente, algunas replicasas presentan dominios peptidasa, proteasa y demetilasa. Dentro de la familia existe variabilidad respecto de las proteínas de movimiento (MP) expresadas por los distintos virus, lo que implica la utilización de diferentes estrategias de movimiento célula a célula y a larga distancia. Los géneros *Capillo*-, *Citri*-, *Tricho*- y *Vitivirus* codifican en sus genomas una proteína de alrededor de 30 kDa, a la que se ha identificado como única responsable del movimiento viral. Estas proteínas conforman el grupo de "proteínas similares a 30 K", en referencia a la proteína de 30 kDa del *Tobacco mosaic virus* (TMV). Por otro lado los géneros *Allexi*-, *Carla*-, *Fovea*-, *Mandari*- y *Potexvirus*, presentan un conjunto de tres ORFs (por *Open Reading Frame*) parcialmente superpuestos denominado triple bloque de genes (TGB, por *Triple Gene Block*). Los productos de expresión identificados como TGBp1, TGBp2 y TGBp3 constituyen el conjunto de proteínas necesarias para el movimiento viral célula a célula. Existe otro grupo de virus no relacionados a la familia *Flexiviridae* compuesto por los géneros *Hordeivirus*, *Benyvirus*, *Pecluvirus* y *Pomovirus*, que presentan un arreglo de TGB para las

proteínas de movimiento y una estrategia de movimiento similar. Pese a esta similitud existen diferencias entre el grupo de los *Potexvirus* y de los *Hordeivirus* respecto de las características de las TGBps y el mecanismo a través del cual concretan la movilización que serán discutidas más adelante

En los virus de la familia *Flexiviridae*, el ORF que codifica la proteína de cápside viral (CP) se encuentra luego del extremo 3' del TGB. Además, en varios de los géneros comprendidos en esta familia la proteína CP es necesaria para el movimiento viral. El análisis filogenético de las CPs de los virus de esta familia reveló que existe una fuerte correlación entre la evolución de las CPs y el tipo de MPs presentes en el genoma. Se ha señalado que este patrón de co-evolución posiblemente resulte como consecuencia de la vinculación que existe entre las funciones de movimiento y encapsidación (Martelli *et al.*, 2007). Si bien en varios casos el ORF correspondiente a la CP es el más cercano al extremo 3' terminal del genoma, en los géneros *Allexi-*, *Carla-*, *Mandari-* y *Vitivirus* se puede encontrar un ORF 3' adicional que codifica una proteína de unión a ARN. Adicionalmente, los géneros *Allexivirus* y *Vitivirus* presentan otros ORFs cuya disposición no está relacionada, y que codifican proteínas únicas cuya función ha sido relacionada particularmente en cada caso con el ensamblado del virión y las funciones asociadas a la transmisión por áfidos.

Flexiviridae

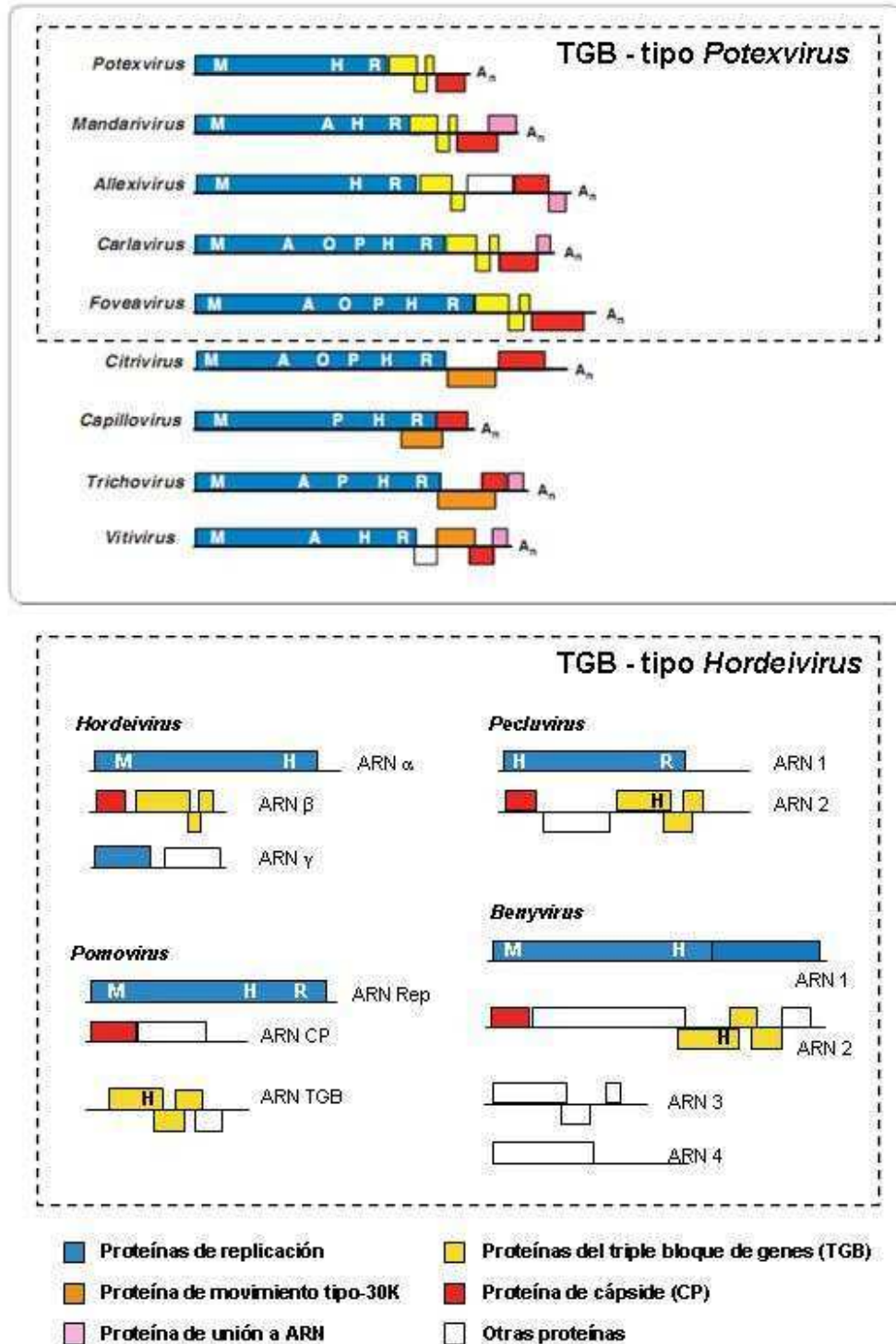


Figura 1. Organización del genoma en los géneros virales comprendidos en la familia *Flexiviridae* y en otros virus no relacionados que contienen triple bloque de genes (TGB). Las líneas de puntos agrupan a los géneros con TGB: *Potexvirus* y *Hordeivirus*. M, metiltransferasa; H, helicasa; R, polimerasa; P, proteasa; A, demetilasa; O, peptidasa; TGB: triple bloque de genes. Adaptado de: Martelli *et al.*, 2007.

2. Los *Potexvirus*: el *Potato virus X*.

2.1 Características generales

Los virus pertenecientes al género *Potexvirus* presentan genomas compuestos por una única hebra de ARN de cadena simple y polaridad positiva, con extensiones que fluctúan entre 5,9 y 7 kb. El ARN genómico (ARNg) se encuentra recubierto por proteínas de cápside viral dispuestas en arreglo helicoidal (**Figura 2A**; ICTVdB, 2006). El ARNg presenta una estructura del tipo *cap* (m7GpppG(m)pAp(Xp)3G) en el extremo 5', y un tracto poliadenilado en el extremo 3' [poli(A)]. Habitualmente, el ácido nucleico encapsidado es mayoritariamente de origen genómico (ARNg), aunque también se ha reportado la presencia de especies de ARN subgenómicos (ARNsg) (Batten *et al.*, 2003). Se conocen alrededor de 25 especies comprendidas en este género, las más estudiadas son *Potato virus X* (PVX), *White clover mosaic virus* (WCMV), *Foxtail mosaic virus* (FMV), *Cactus virus X* (CVX), *Clover yellow mosaic virus* (CYMV) y *Bamboo mosaic virus* (BaMV) (Adams *et al.*, 2005).

El virus PVX es el miembro tipo del género de los *Potexvirus* (Huisman *et al.*, 1988), y se lo ha utilizado comúnmente como modelo para el estudio de los mecanismos de replicación y movimiento viral, del fenómeno de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) y de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) (Batten *et al.*, 2003).

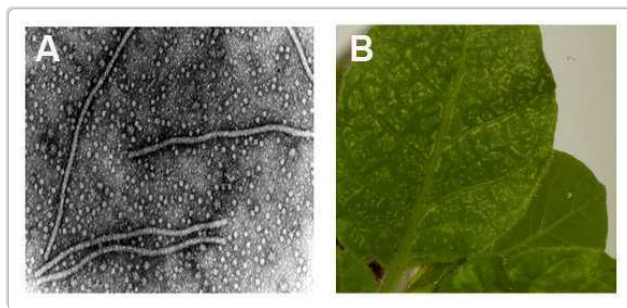


Figura 2. (A) Morfología de las partículas virales de PVX. Tomada de ICTVdB, 2006. **(B)** Síntomas observados en hojas sistémicas luego de 7 días post-infección, en hojas de *N. tabacum*. Fotografía tomada en el laboratorio.

El virus PVX infecta un amplio rango de solanáceas, en especial plantas de papa, tomate y tabaco. La sintomatología se caracteriza por la presencia de un moteado amarillento en forma de mosaico, anillos cloróticos, aclaramiento de las

nervaduras y en ocasiones necrosis (ver **Figura 2B**), que conducen al desarrollo de plantas enanas ocasionando importantes reducciones en el rendimiento. No existen insectos vectores; el virus se transmite por inoculación mecánica o por contacto entre plantas sanas e infectadas (Agrios, 2004).

El genoma de PVX tiene una extensión de 6.400 nt y presenta cinco ORFs (**Figura 3**). El ORF1 codifica la replicasa viral (Rep), una proteína de 165 kDa que exhibe actividad metiltransferasa, ARN helicasa, y ARN-polimerasa dependiente de ARN. Esta proteína de replicación interviene en la síntesis de ARNg y ARNsg (Batten *et al.*, 2003). Los ORFs 2, 3 y 4, que se encuentran parcialmente superpuestos y conforman el TGB, codifican a las proteínas de movimiento TGBp1 (24 kDa), TGBp2 (12 kDa) y TGBp3 (8 kDa), respectivamente. La principal función de estas proteínas es asistir la dispersión del virus en el movimiento de célula a célula y de larga distancia (Lough *et al.*, 1998; Gilmer *et al.*, 1992; Beck *et al.*, 1991). El ORF5, situado hacia el extremo 3' del genoma, codifica la CP viral, una proteína de 25 kDa que conforma la cápside del virus y que también es necesaria para el movimiento de célula a célula (Chapman *et al.* 1992; Santa-Cruz *et al.*, 1996; Fedorkin *et al.*, 2001).

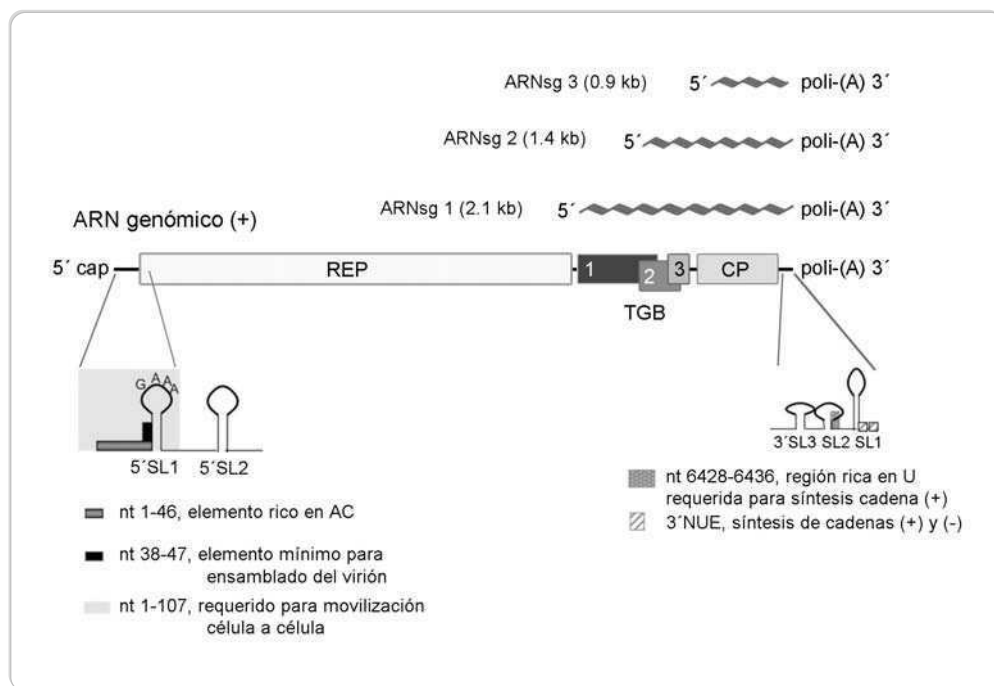


Figura 3. Esquema del genoma viral, transcritos subgenómicos y elementos reguladores 3' y 5' de PVX. Rep: replicasa; TGB: triple bloque de genes (1: TGBp1; 2: TGBp2; 3: TGBp3); CP: cápside viral. Adaptado de Verchot-Lubicz, 2008.

2.2 Multiplicación viral: replicación y traducción de proteínas virales

Se ha sugerido que el virus PVX no se multiplica en todas las células que infecta, y que puede movilizarse a través de varias antes de iniciar la replicación (Angell and Baulcombe, 1995). La replicación de PVX tiene lugar a partir de la síntesis de una hebra intermediaria de ARN de polaridad negativa, que se utiliza como molde para generar copias de ARNg y ARNsg. La proteína de replicación (Rep) es la encargada de sintetizar la hebra negativa para iniciar el proceso de replicación (Longstaff *et al.*, 1993). Habitualmente, en aquellos virus cuyo genoma se compone de una sola hebra de ARN, esta proteína se traduce a partir del ARNg (Mandahar, 2006). La replicasa de PVX se ha encontrado asociada a la fracción de membranas, particularmente se la ha localizado en estructuras que derivan del retículo endoplásmico (RE), mientras que no existen evidencias que sustenten su presencia en el aparato de Golgi (Bamunusinghe *et al.*, 2009; Doronin and Hemenway, 1996).

El mecanismo de transcripción del ARNsg de PVX es poco conocido (Miller and White, 2006). Se han descrito una serie de secuencias que participan de este proceso y se distribuyen en los extremos no traducibles del genoma y regiones adyacentes. Así, en el extremo 5' no traducible (5'UTR) existen dos estructuras tipo *stem-loop*, denominadas SL1 y SL2, esenciales para la replicación (ver **Figura 3**). Estas estructuras abarcan un total de 182 nt que comprenden, además de los 84 nt correspondientes al 5' UTR, cerca de 100 nucleótidos del inicio del ORF de la replicasa viral. La estructura 5' SL1 es un elemento multifuncional, debido a que además contribuye al movimiento de célula a célula y al ensamblaje del virión (Kwon and Kim, 2006; Lough *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2005). Además, para que ocurra la transcripción deben tener lugar ciertas interacciones con el extremo 3' UTR de la cadena negativa y con sitios de iniciación internos de los ARNm subgenómicos. De hecho, dado que este tipo de interacciones también se requiere para la síntesis del ARNg, se podría suponer que ambos procesos se encuentran acoplados (Kim and Hemenway, 1999).

Existen tres especies de ARNsg (ver **Figura 3**). Las especies de 0,9 kb y 2,1 kb son más abundantes y funcionan como mensajeros monocistrónicos para la producción de las proteínas CP y TGBp1, respectivamente (Dolja *et al.*, 1987; Verchot *et al.*, 1998). Se cree además que es posible que la proteína CP se traduzca a partir de un sitio de iniciación interno en el ARNg, a través de un mecanismo de traducción independiente de *cap* (Hefferon *et al.*, 1997). La tercera especie de ARNsg de 1,4 kb

es la menos abundante y funciona como mensajero bicistrónico, dando lugar a la producción de las proteínas TGBp2 y TGBp3 (Verchot *et al.*, 1998). Las proteínas del TGB se expresan simultáneamente desde estadios tempranos de la infección viral (Donald *et al.*, 1993). La regulación de los niveles de expresión de cada proteína tendría lugar a través de la transcripción diferencial de los ARNm (los ARNsg 1 y 3 son más abundantes que el ARNsg 2) y, en el caso de la proteína TGBp3, a través de un mecanismo *leaky* de escaneo de los ribosomas (Morozov *et al.*, 1991; Verchot *et al.*, 1998). Las proteínas del TGB son esenciales para el movimiento viral y no existen evidencias directas que las relacionen con la replicación (Verchot-Lubicz *et al.*, 2005). En el año 2006, Torrance *et al.*, reportaron que la proteína TGBp2 del hordeivirus *Barley stripe mosaic virus* era reclutada al sitio de replicación en presencia del ARN viral; sin embargo aún no se conoce cuál podría ser el rol de de la proteína TGBp2 en la replicación. Por el contrario, varios trabajos han señalado que la proteína TGBp1 no es requerida para la replicación del ARN viral (Angell *et al.*, 1996; Mushegian and Koonin, 1993; Gilmer *et al.*, 1992; Beck *et al.*, 1991; Petty *et al.*, 1990).

2.3 Estructura de las partículas virales

Los viriones de PVX presentan simetría helicoidal, miden alrededor de 470-580 nm de longitud por 13 nm de diámetro y contienen 8,9 subunidades de CP por vuelta de hélice (Atabekov *et al.*, 2007). El modelado de la estructura terciaria de la CP en el virión de PVX y de NMV (*Narcissus mosaic virus*; *Potexvirus*) indica que cada molécula de CP presenta una estructura compuesta por un único dominio en que el segmento N-terminal se proyecta hacia la superficie exterior del virión (Baratova *et al.*, 1992). Se ha reportado la presencia de O-glicosilaciones en los extremos de la proteína (Tozzini *et al.*, 1994). El estudio de otro *Potexvirus*, el *Papaya mosaic virus* (PapMV) indicó que el extremo N-terminal expuesto, al igual que el de PVX y el de NMV, presenta 6 residuos de serina que podrían resultar blanco de fosforilación por quinasas celulares (Lecours *et al.*, 2006). Las modificaciones en el estado de glicosilación y/o fosforilación de la proteína CP podría contribuir a desestabilizar la estructura y alterar la morfología del virión (Baratova *et al.*, 2004).

En el extremo 5' del genoma de PapMV se ha identificado una secuencia mínima requerida para iniciar el ensamblaje del virión (nt 38-47; **Figura 3**) (Sit *et al.*, 1994). Esta secuencia de 9 nt se superpone con un segmento de 107 nt requerido

para el movimiento de célula a célula (Lough *et al.*, 2006) y con la estructura SL1 requerida para la replicación (Kwon and Kim, 2006).

2.3.1 *Desensamblaje y activación de la traducción.*

Al evaluar la traducción *in vitro* de viriones de PVX purificados a partir de tejido de hojas infectadas, se observó que el ARN viral no resultaba traducible. Sin embargo el agregado a la reacción de proteína TGBp1 purificada, revierte esta situación; lo que llevó a proponer que la unión de TGBp1 remodela la partícula viral exponiendo el ARN para que pueda ser traducido (Atabekov *et al.*, 2000). En línea con esta idea, mediante estudios de microscopía electrónica, se demostró que TGBp1 se une a las moléculas de CP localizadas sobre el extremo 5' del ARN_v de la partícula viral. Esta unión induce una desestabilización de la estructura helicoidal que se transmite a lo largo de la partícula. Sin embargo, a pesar de que TGBp1 puede producir la desestabilización, su unión no es suficientemente para producir el desensamblaje de la partícula. Para ello, se requiere la activación de la traducibilidad del ARN_v la cual también es mediada por TGBp1. De esta forma, se produce un rápido y completo desensamblaje de las partículas virales en etapas muy tempranas de la traducción (Rodionova *et al.*, 2003). Este modelo de desensamblaje se diferencia del proceso demostrado para TMV el cual ocurre en forma co-traduccional e involucra una remoción gradual y continua de subunidades de CPs por el ribosoma durante la traducción del ARN_v. A su vez, el estudio con partículas ensambladas *in vitro* (STPs, por *Single Tailed Particles*) sugiere que el ensamblado de las STPs de PVX ocurre en dos etapas: en la primera, se forma un complejo no traducible de ARN-CP; en la segunda, la unión de las moléculas de TGBp1 al extremo 5' convierte a las STPs en formas traducibles (Karpova *et al.*, 2006b).

Por otra parte, se reportó que es posible lograr la conversión de los viriones PVX a una forma traducible a través de la fosforilación de las proteínas de la cápside viral (Atabekov *et al.*, 2001; 2007). Así, es posible que la fosforilación del extremo N-terminal de la CP por quinasas específicas de residuos de serina y de treonina genere cambios en la conformación de la proteína unida al virión. Si se elimina esta región de la proteína, el virión aún puede ser activado a su forma traducible pero sólo por el agregado de la proteína TGBp1 (Atabekov *et al.*, 2000; 2001; Karpova *et al.*, 2006a). Se ha sugerido que la traducción del ARN_v de los viriones cuyas subunidades de CP han sido fosforiladas podría ocurrir a través de un mecanismo convencional de

desensamblaje co-traducciona. Sin embargo, sólo la región del extremo 5' (ORF1) podría traducirse a través de este mecanismo (Atabekov *et al.*, 2007).

A partir de estos resultados, se ha propuesto un modelo en el que la fosforilación de moléculas de CP por quinasas del huésped induciría el desensamblaje inicial de la partícula viral, dando lugar a la traducción de la replicasa viral. Luego, a medida que el virus se moviliza a las células adyacentes, la proteína TGBp1 podría ser la responsable de que el complejo de movilización se mantenga en su forma traducible logrando la independencia de los factores del hospedante (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007).

3. El Triple Bloque de Genes (TGB)

3.1 Distribución y conservación del arreglo del TGB

El TGB es un módulo de genes que codifican tres proteínas no estructurales que actúan de manera coordinada para transportar los complejos de movilización viral hacia el plasmodesmo y, a través de él, a las células vecinas (Verchot-Luciz *et al.*, 2010). Los virus que portan TGB pertenecen a nueve géneros virales, y si bien el arreglo de los cistrones y su modo de expresión se encuentra conservado, la posición en el genoma varía notablemente (Verchot *et al.*, 2007, ver **Figura 1**). El análisis comparativo de las secuencias ha señalado que existen dos clases de módulos TGB: a) los módulos tipo *Potexvirus*, entre los cuales podemos incluir además los géneros *Allxi-*, *Fovea-*, *Mandari-* y *Carlavirus*, todos ellos miembros de la familia *Flexiviridae*; y b) los módulos de tipo *Hordeivirus* o similares, entre los que se incluyen los de *Beny-*, *Pomo-* y *Pecluvirus* (Morozov and Solovyev, 2003). A diferencia de los *Hordeivirus*, los virus de tipo *Potexvirus* requieren de la CP para concretar el transporte de célula a célula. Este rol diferencial de la CP en el movimiento viral, sustenta la clasificación en estrategias de tipo *Potex-* u *Hordeivirus* (Morozov and Solovyev, 2003).

Al igual que otras proteínas de movimiento viral, las proteínas del TGB se expresan desde las etapas tempranas del ciclo de infección (Donald *et al.*, 1993). Como se indicó anteriormente, las tres proteínas se expresan a partir de dos especies de ARNsg co-terminales con el extremo 3' del genoma viral (ver **Figura 3**). La

expresión de las tres proteínas es fundamental para el movimiento viral (Lawrence and Jackson, 2001; Verchot-Lubicz, 2005). El intercambio o la expresión en *trans* de proteínas individuales, entre arreglos TGBs de distintos virus, usualmente resultan en la reducción o incluso el bloqueo completo del movimiento de célula a célula (Verchot-Lubicz, 2010). Por ejemplo, Morozov *et al.* (1999) mostraron a través de ensayos de bombardeo de micropartículas que la expresión transitoria de la proteína TGBp1 de *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV, *Potexvirus*) es incapaz de complementar el movimiento de célula a célula de un virus PVX que carece de su propia proteína TGBp1. Por el contrario, algunos estudios demuestran que es posible complementar el movimiento de célula a célula de un virus PVX deficiente en TGB, a través de la expresión transitoria de una MP heteróloga como por ejemplo 30 K de TMV, confirmando que las funciones de las MPs de virus no relacionados pueden ser compatibles (Morozov *et al.*, 1997; Tamai *et al.*, 2003).

3.2 TGBp1: una proteína de movilización multifuncional

La proteína TGBp1 es una ARN helicasa, capaz de hidrolizar ATP y unir ARN, a la que se han asignado múltiples funciones que incluyen el aumento del límite de exclusión del plasmodesmo (SEL, por *size exclusion limit*), la promoción del transporte viral a través del plasmodesmo, la activación de la traducción del ARN viral y la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) (Morozov and Solovyev, 2003).

3.2.1 *Actividades de TGBp1 in vitro: ARN helicasa y unión de ARN*

Las helicasas son enzimas que convierten la energía química, producto de la hidrólisis de ATP (actividad ATPasa), en energía mecánica capaz de separar hebras de ácido nucleico (Caruthers and McKay, 2002). Además, impulsadas por esa misma energía, algunas helicasas son capaces de desplazar proteínas unidas al ácido nucleico provocando la remodelación de los complejos ribonucleoproteicos (Mackintosh and Raney, 2006). La comparación de secuencias de diversos dominios de ADN y ARN helicasas, permitió establecer una clasificación en 5 superfamilias (Gorbalenya and Koonin, 1993). Esta clasificación se basa en la presencia y el grado de conservación de una serie de motivos característicos. El dominio helicasa de la proteína TGBp1 pertenece a superfamilia 1 (SF1) (Gorbalenya and Koonin, 1993;

Kadaré and Haenni, 1997). Esta superfamilia de helicasas presenta siete motivos típicos (**Figura 4A**). El dominio helicasa se distribuye prácticamente en toda la extensión de la proteína TGBp1 de *Potexvirus* (Kalinina *et al.*, 2002). A diferencia de ello, el dominio helicasa de la proteína TGBp1 de *Hordeivirus* se ubica sobre el extremo C-terminal, mientras que en el extremo N-terminal se ha identificado una región capaz de unir ARN de manera fuerte y no cooperativa (Kalinina *et al.*, 2001).

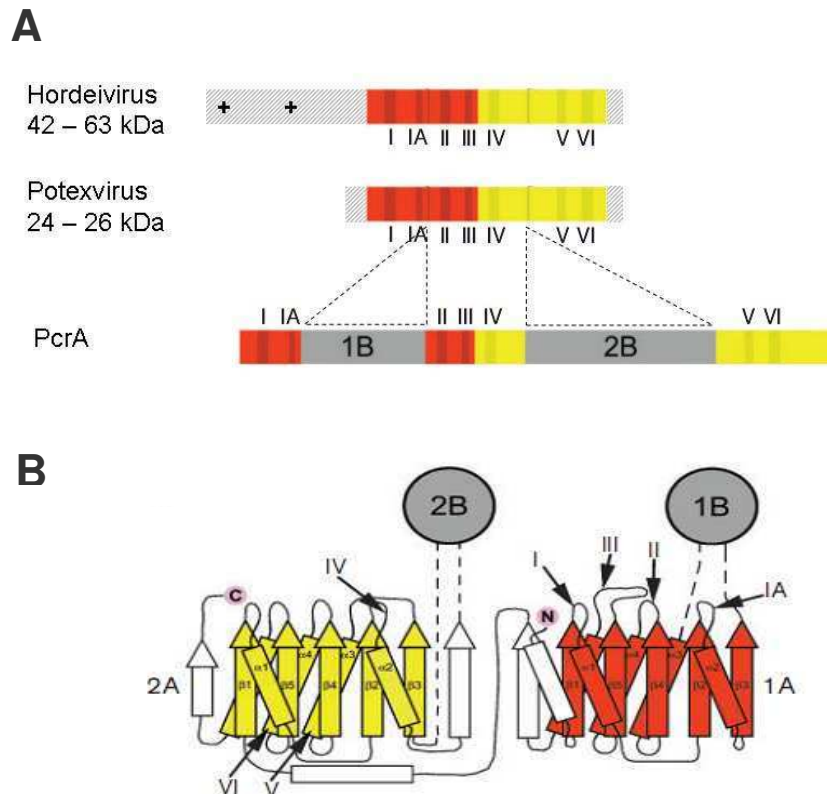


Figura 4. Estructura de las proteínas TGBp1 en *Potex*- y *Hordeivirus*. (A) El esquema muestra la distribución de los dominios funcionales y estructurales de las proteínas TGBp1 de *Potex*- y *Hordeivirus* y de la helicasa de PcrA de *B. stearothermophilus*. Se indican los motivos característicos de la SF1 (I-VI). Los dominios 1A y 2A se indican en rojo y amarillo, respectivamente. Los dominios 1B y 2B se muestran en color gris. (B) Predicción de la estructura secundaria del dominio helicasa de TGBp1, basada en un modelo modificado de la estructura secundaria de PcrA. Los elementos conservados, representados por los dominios 1A y 2A, se muestran en colores rojo y amarillo. Las flechas señalan la posición de los motivos I-VI. Los dominios 1B y 2B, ausentes en TGBp1, se muestran como círculos de color gris. Tomado de Morozov and Solovyev, 2003.

La comparación de secuencias de TGBp1 con la helicasa PcrA de *Bacillus stearothermophilus*, una ADN helicasa de la SF1, reveló que la proteína TGBp1 contiene sólo dos de los cuatro dominios estructurales reconocidos en PcrA (Kalinina *et al.*, 2002; Morozov and Solovyev, 2003). Se trata de los dominios paralelos α - β denominados 1A y 2A (**Figura 4B**, indicados en amarillo y rojo respectivamente), que componen la estructura canónica de las helicasas. Mientras que los dominios 1B y 2B, compuestos por estructuras de α hélices, se encuentran ausentes. Llamativamente, se ha descrito una estructura similar compuesta únicamente por los dominios 1A y 2A para la helicasa celular eIF4A (Caruthers and McKay, 2002), con quien TGBp1 comparte además la habilidad para discriminar entre sustratos de ADN y ARN; y de operar en ambas direcciones (Kalinina *et al.*, 2002).

En la **Figura 5** se presenta un esquema de la disposición e interacciones conocidas entre motivos, generado en base a estudios de cristalografía y mutagénesis de diversas ADN y ARN helicasas (Caruthers and McKay, 2002). Las flechas negras (llenas) indican aquellas interacciones que se han comprobado para las SF1 y SF2. Los motivos I y II, también conocidos, como Walker A y B, son los responsables de la interacción con el NTP, participan en la unión del Mg^{+2} y se definen clásicamente por los consensos GK(T/S) y DE(Y), respectivamente. Los motivos Ia y IV interactúan principalmente con el oligonucleótido, al igual que las secuencias TXGX y QXXR. Los motivos III, V y VI presentan mayor variabilidad entre las distintas superfamilias. Las flechas de puntos de la **Figura 5** indican aquellas interacciones que se han determinado para una SF en particular. Así, sobre el modelo de PcrA, se ha determinado que los motivos III y V participan en una compleja red de interacciones con el complejo MgATP/MgADP, el oligonucleótido y la conexión de los dominios estructurales 1A y 2A a través de la formación de puentes salinos. La arginina presente en el motivo VI interactúa con el fosfato γ del ATP (Velankar *et al.*, 1999; Caruthers and McKay, 2002).

A través de estudios de actividad *in vitro* de proteínas recombinantes, se ha demostrado que las proteínas TGBp1 poseen actividad helicasa *in vitro* dependiente de ATP y Mg^{2+} (Kalinina *et al.*, 2002). Particularmente, la proteína TGBp1 de *Hordeivirus* pueden operar en ambas direcciones sobre sustratos de ARN, pero no sobre ADN (Kalinina *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que la proteína TGBp1 de PVX es capaz de unir ARN de simple cadena de manera cooperativa y no específica; y que la estabilidad de esta unión es considerablemente menor a la de otras proteínas virales como la MP 30 K de TMV (Kalinina *et al.*, 1996; Morozov *et al.*, 1999; Kalinina *et al.*, 2001).

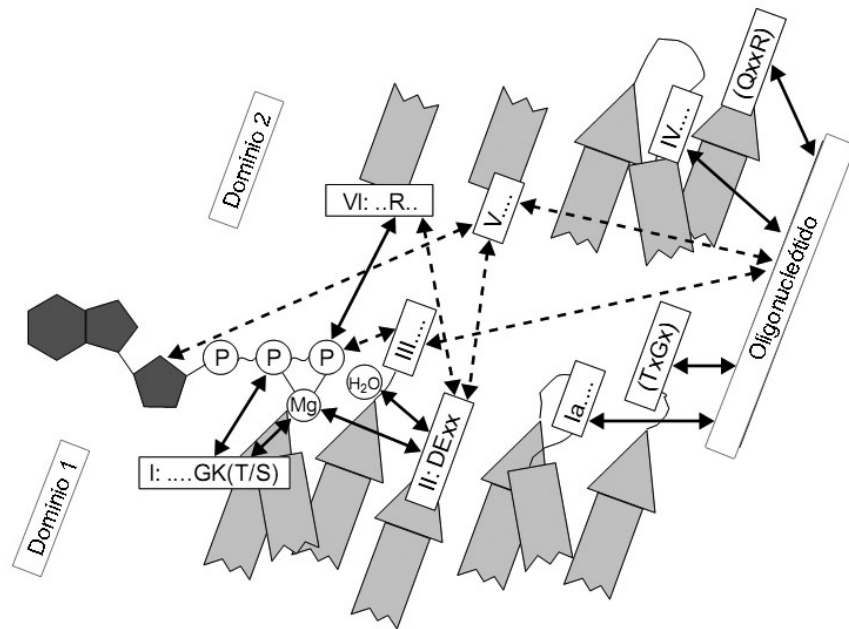


Figura 5. Interacciones de los motivos helicasa. El esquema muestra las relaciones de interacción entre los motivos de unión de ATP y oligonucleótidos. Las flechas negras enteras indican las interacciones observadas en las helicasas de las SF1 y SF2 a partir de estudios estructurales y/o de mutagénesis. Las flechas punteadas indican las interacciones específicas para una SF particular. Tomado de Caruthers and McKay, 2002.

Se ha demostrado que los motivos I, Ia y II de la proteína TGBp1 de PVX son esenciales para la actividad ATPasa, debido a que su delección conduce a la pérdida completa de esta actividad, aún en presencia de un estimulador de la misma como es el ARN simple cadena (Leschiner *et al.*, 2006). De hecho, se demostró en ensayos de unión a ARN, que la proteína delecionada en estos motivos es incapaz de unir ARN (Morozov *et al.*, 1999; Leschiner *et al.*, 2006). Este resultado es consistente con resultados que muestran que esta región de las helicasas es crucial para la hidrólisis y unión de NTPs (Gorbalenya and Koonin, 1993; Subramanya *et al.*, 1996; Korolev *et al.*, 1997). Por otra parte, la delección de los dominios V y VI de la proteína TGBp1 de PVX produce un aumento de la actividad ATPasa, la cual es estimulada por la presencia de ARN simple cadena. Remarcablemente, la delección de los dominios IV, V y VI produce una importante disminución de la actividad ATPasa, aún cuando dicha actividad continúa siendo fuertemente estimulada por la presencia de ARN simple cadena. En

concordancia con estos resultados, esta mutante es capaz de unir ARN con mucha mayor afinidad que la TGBp1 salvaje o que la mutante que no posee los dominios V y VI. De esta forma, se postuló que la remoción del extremo C-terminal de TGBp1 podría alterar la conformación de la proteína y permitiría establecer una unión más fuerte con el ARN simple cadena. Estos resultados sugieren que TGBp1 consiste en al menos dos dominios funcionales correspondientes a los dominios estructurales 1A y 2A. El dominio de unión a ARN y la actividad ATPasa estarían ubicados en la región N-terminal, mientras que el dominio regulatorio de estas actividades se ubicaría en el extremo C-terminal de TGBp1 (Morozov *et al.*, 1999; Leshchiner *et al.*, 2006).

Para poder accionar y desplazarse sin disociarse de las hebras, las helicasas requieren de varios sitios de unión al ácido nucleico. Por esta razón, algunas helicasas forman dímeros u oligómeros (Mackintosh and Raney, 2006; Jankowsky and Fairman, 2007). Se ha reportado que la proteína TGBp1 de PVX es capaz de formar dímeros aún en las condiciones propias de los geles desnaturizantes (Leshchiner *et al.*, 2006; 2008). Al someter a tratamiento con glutaraldehído una serie de versiones mutagenizadas de la proteína TGBp1 de PVX, se observó que la región de la proteína compuesta por los motivos helicasa I, la y II poseen sitios que estarían involucrados en la oligomerización de la proteína. Por otro lado, la región de la proteína TGBp1 que incluye los motivos III, IV, V y VI, presenta sitios que permitirían su dimerización, aportando estabilidad al oligómero producido por la región N-terminal (Leshchiner *et al.*, 2008).

3.2.2 Actividades de TGBp1 *in vivo*

Hasta el momento no resulta claro de que modo las actividades ATPasa, helicasa y de unión de ARN, participan en las diferentes funciones asignadas a la proteína TGBp1 (Morozov and Solovyev, 2003). La energía provista por la actividad ATPasa podría ser requerida para el transporte intracelular hacia la periferia de la célula, tanto como para la modificación de SEL del plasmodesmo y el pasaje de los complejos de movilización hacia las células vecinas. Experimentos de microinyección de proteínas conjuntamente con marcadores colorantes, y de expresión transitoria de la proteína TGBp1 fusionada al gen reportero GFP (por *green fluorescent protein*), mostraron que la proteína TGBp1 de *Potexvirus* es capaz de dilatar el plasmodesmo y movilizarse hacia las células vecinas (Lough *et al.*, 1998; 2000; Yang *et al.*, 2000). Se mostró en este caso que la mutación del motivo helicasa I (impidiendo las actividades

de ATPasa y helicasa), bloquea la habilidad de la proteína para modificar el SEL del plasmodesmo; mientras que la delección del motivo VI impide tanto la modificación del SEL como el transporte intracelular (Lough *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1999). Por el contrario, la proteína TGBp1 de *Hordeivirus* no es capaz de modificar el SEL del plasmodesmo ni se moviliza entre células, y requiere de la actividad ATPasa únicamente para transportar el complejo de movilización a través del plasmodesmo (Zamyatnin *et al.*, 2004).

En vista de que se ha reportado que la proteína TGBp1 de PVX interactúa con el extremo 5' de la partícula viral e induce *in vitro* cambios conformacionales (Atabekov *et al.*, 2000), se ha sugerido que las actividades ATPasa y helicasa podrían tener un rol importante en el desensamblaje de las partículas virales y el remodelado de los complejos de movilización (Morozov and Solovyev, 2003).

La acción de TGBp1 de *Potexvirus* como supresora del fenómeno del PTGS (Voinnet *et al.*, 2001; Baulcombe *et al.*, 2002), es otra de las diferencias fundamentales con las proteínas TGBp1 de *Hordeivirus*, en los cuales esta función es ejecutada por una proteína diferente (Yelina *et al.*, 2002). Como supresora de PTGS, la proteína TGBp1 de PVX actúa bloqueando la dispersión de la señal sistémica posiblemente al interferir con su producción o transmisión (Voinnet *et al.*, 2000). A nivel local, se ha observado que la efectividad de la acción supresora de TGBp1 depende del inductor que dispare el PTGS (Roth *et al.*, 2004; Bayne *et al.*, 2005). Incluso se ha reportado que las diferentes proteínas TGBp1 de virus del género *Potexvirus*, tienen distinto grado de eficiencia para suprimir la respuesta de PTGS (Senshu *et al.*, 2009). Para explicar porqué la actividad supresora de TGBp1 no afecta la producción de ARNs pequeños, Bayne *et al.* (2005) sugirieron que TGBp1 podría actuar en la vía de silenciamiento interfiriendo con la actividad de la nucleasa Argonauta (AGO). Recientemente, se reportó que la proteína TGBp1 de PVX interactúa con AGO1, y que la acumulación de AGO1 se encuentra reducida en células infectadas con PVX (Chiu *et al.*, 2010). De este modo la proteína TGBp1 podría suprimir la defensa de la planta que impide la acumulación viral (Chiu *et al.*, 2010). En referencia a la asociación de la supresión con la movilización viral se ha demostrado que la actividad supresora de TGBp1 de PVX es necesaria, pero no suficiente para la movilización del virus a través de los plasmodesmos (Bayne *et al.*, 2005). En el contexto del mismo trabajo se mostró que la actividad ATPasa es necesaria para la actividad supresora de PTGS pero no así su actividad helicasa.

Por último es interesante señalar que la proteína TGBp1 de PVX se desempeña como factor de avirulencia en la respuesta hipersensible, mediada por el gen *Nb* en plantas de *Solanum tuberosum* (Malcuit *et al.*, 1999). Se desconoce si este papel se encuentra relacionado de algún modo al rol de TGBp1 en la movilización viral. Tampoco se conoce si el producto del gen *Nb* previene la interacción de TGBp1 con otros componentes celulares que promuevan el movimiento o si es parte, al igual que otros genes R, de un sistema de detección de patógenos.

3.3 Características de las proteínas TGBp2 y TGBp3

Las proteínas TGBp2 y TGBp3 son proteínas integrales de membrana. En la **Figura 6**, se esquematiza la topología de ambas proteínas. La proteína TGBp2 presenta una organización conservada entre los virus portadores de un arreglo de TGB, y un tamaño que varía entre los 12 y 14 kDa. Esta proteína presenta dos regiones internas hidrofóbicas separadas por una región central hidrofílica. Los modelos de topología señalan que las proteínas TGBp2 se insertan en la membrana formando una U, donde la región central resulta expuesta al lumen del retículo endoplásmico (RE) (Morozov and Solovyev, 2003; Zamyatnin *et al.*, 2006; Martelli *et al.*, 2007). Si bien no se han identificado motivos que pueden relacionarse con actividades enzimáticas o dominios de estructura conocidos, en algunos casos se han establecido ciertas actividades de las proteínas TGBp2. Por ejemplo, la proteína TGBp2 de *Potato mop top virus* (PMTV, *Pomovirus*) es capaz de unir ARN (Cowan *et al.* 2002).

En cambio, la organización de la proteína TGBp3 difiere entre los distintos grupos virales. En los virus tipo *Potexvirus*, esta proteína presenta un tamaño que varía entre 6 y 13 kDa, y contienen un único segmento transmembrana hacia el extremo N-terminal, mientras que el extremo C-terminal permanecería expuesto hacia el citoplasma (Morozov and Solovyev, 2003; Martelli *et al.*, 2007). En los virus tipo *Hordeivirus*, la proteína TGBp3 presenta dos segmentos transmembrana (inserción tipo U) y una región N-terminal muy poco variable rica en residuos de histidina y cisteína. Su tamaño fluctúa entre 18 y 24 kDa (Morozov and Solovyev, 2003; Martelli *et al.*, 2007).

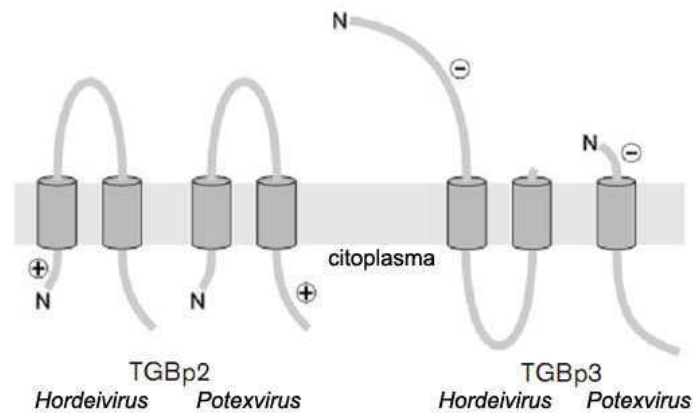


Figura 6. Organización de las proteínas TGBp2 y TGBp3. Topología propuesta para TGBp2 y TGBp3 en la membrana celular. Las hélices transmembrana se indican como cilindros, los signos (+) y (-) indican las cargas netas de las regiones hidrofílicas de las proteínas. Tomado de Morozov and Solovyev, 2003.

Mediante ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. tabacum* se mostró que las proteínas TGBp2 y TGBp3 de PVX fusionadas a la proteína reportera GFP, son incapaces de movilizarse hacia las células vecinas en ausencia de TGBp1. Sin embargo, las mismas proteínas, e incluso la proteína CP, fusionadas a GFP fueron capaces de movilizarse entre células en ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* (Krishnamurthy *et al.*, 2002; Howard *et al.*, 2004). A partir de estos datos contradictorios, se ha sugerido que las observaciones realizadas en *N. benthamiana* podrían reflejar propiedades únicas del hospedante, más que propiedades inherentes a las proteínas (Howard *et al.*, 2004).

3.4 Interacciones de las proteínas del TGB

Además de interactuar con determinadas proteínas del hospedante, algunas proteínas del TGB tienen la capacidad de interactuar entre sí. De esta forma, en el caso de los *Potexvirus* se ha confirmado la interacción homóloga de las proteínas TGBp1 (Leschiner *et al.*, 2008) y de las proteínas TGBp2 (Hsu *et al.*, 2008). Además se ha demostrado la interacción de TGBp1 con CP (Samuels *et al.*, 2007). En el caso de *Barley stripe mosaic virus* (BSMV, *Hordeivirus*) se observó que los pares

TGBp1/TGBp3 y TGBp2/TGBp3 son capaces de interactuar, pero no así TGBp1 con TGBp2 (Jackson *et al.*, 2009).

Para ejecutar sus múltiples funciones, las proteínas del TGB deben ser capaces de interactuar con diversas proteínas del huésped. Se ha identificado una serie de proteínas que interactúan con la proteína TGBp2 de PVX (TIPs, por *TGBp2 interacting proteins*), pero no con TGBp3 ni TGBp1 (Fridborg *et al.*, 2003). Una de estas proteínas posee una secuencia similar a la de la proteína HBP1 de *N. tabacum*, una proteína que presenta repeticiones del motivo *ankyrin*, asociado a interacciones proteína-proteína. Además, se encontró que todas las TIPs interactúan con la enzima β -1,3-glucanasa, una enzima que podría participar en la modulación de la apertura de los plasmodesmos mediante la degradación de calosa (Fridborg *et al.*, 2003; Iglesias and Meins, 2000). En las plantas, la deposición de calosa en las paredes y en los plasmodesmos es una respuesta defensiva que permite restringir la dispersión de distintos tipos de patógenos. Los autores sugirieron que a través de la interacción con la enzima β -1,3-glucanasa los virus estarían en condiciones de revertir este mecanismo de defensa del huésped permitiendo la dispersión viral (Epel, 2009; Fridborg *et al.*, 2003).

Más recientemente, se demostró que la proteína remorina, presente en los plasmodesmos de varias plantas solanáceas, interactúa con TGBp1 de PVX y que el grado de movilización del virus es inversamente proporcional a la acumulación de esta proteína (Raffaele *et al.*, 2009). Se propuso que la proteína remorina podría actuar secuestrando a la proteína TGBp1 con el fin de evitar la formación del complejo viral ARN-TGBp1-CP (Raffaele *et al.*, 2009).

3.5 Localización subcelular de las proteínas del TGB

En una publicación reciente, Verchot-Lubicz *et al.*, (2010) revisaron exhaustivamente la variedad de estudios y enfoques metodológicos utilizados en los últimos años para describir la localización de las proteínas del TGB. Inicialmente, los estudios de fraccionamiento subcelular y microscopía electrónica señalaron que la proteína TGBp1 de *Potexvirus* se localiza en el citoplasma, núcleo y en cuerpos de inclusión a través del citoplasma (Davies *et al.*, 1993). Mientras que, TGBp1 de *Hordeivirus* se asocia a membranas y paredes celulares (Cowan *et al.*, 2002).

El uso de proteínas reporteras fluorescentes permitió profundizar los estudios de la localización de estas proteínas. Los estudios realizados con proteínas TGBp1 de PVX fusionadas a GFP, ya sea por expresión ectópica o partir de construcciones virales, confirmaron su localización en el núcleo, el citoplasma y los cuerpos de inclusión (Samuels *et al.*, 2007). Dado que la CP se acumula en plasmodesmos pero no es capaz de dilatarlos (Oparka *et al.*, 1996), se postula que durante la infección viral, la interacción de la proteína TGBp1 con la CP podría ser la responsable de la relocalización de TGBp1 en los plasmodesmos (Samuels *et al.*, 2007). El caso de los *Hordeivirus* es bastante diferente, se observó por ejemplo, que a medida que transcurre la infección del virus *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) la proteína TGBp1 fusionada al reportero GFP se redirige desde membranas hacia la pared celular (Lawrence and Jackson, 2001). Posteriormente, se corroboró que en el *Hordeivirus* PMTV se requiere de la expresión de las proteínas TGBp2 y TGBp3 para transportar a la proteína TGBp1 hacia la periferia de la célula (Erhardt *et al.*, 2000). Particularmente, se observó que la delección de los motivos helicasa V y VI de la proteína TGBp1 de PMTV, impiden la localización de la proteína en la periferia de la célula, aún cuando ésta se exprese conjuntamente con las proteínas TGBp2 y TGBp3 (Zamyatnin *et al.*, 2004). Los autores de este trabajo señalan que esto podría deberse al bloqueo en la asociación de TGBp1 con TGBp2/TGBp3 u otras proteínas celulares.

En ausencia de las demás proteínas virales, la proteína de fusión GFP:TGBp2 de *Potexvirus* se localiza en el RE y es capaz de inducir la formación de vesículas granulares derivadas del mismo (Ju *et al.*, 2005). La proteína de fusión GFP:TGBp3 se localiza mayormente en la red del RE (Ju *et al.*, 2005; Krishnamurthy *et al.*, 2003). Sin embargo, al co-expresar la proteína de fusión con PVX, se observó que la localización de GFP:TGBp3 co-localiza con TGBp2 en las vesículas granulares (Shepetilnikov *et al.*, 2005; Samuels *et al.*, 2007). En experimentos de mutagénesis de las proteínas TGBp2 y TGBp3 se observó que las modificaciones que bloquean la inserción de las proteínas en la membrana, impiden también el movimiento de célula a célula. De modo que se postula que la asociación a membranas de las proteínas TGBp2 y TGBp3 es importante para el movimiento de célula a célula (Krishnamurthy *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2003).

Algunas evidencias recientes relacionan a las MPs con la replicación viral. En *Potexvirus*, se ha visto que el ARN genómico de PVX se asocia con membranas del RE que también contienen replicasa y proteína TGBp1 (Tilsner *et al.* 2009). Por otro lado, la proteína TGBp3 se ha encontrado asociada además con cuerpos membranosos que contienen proteína replicasa de PVX, viriones y proteína TGBp1

(Krishnamurthy *et al.* 2003; Ju *et al.* 2005; Samuels *et al.* 2007; Bamunusinghe *et al.* 2009). Si bien no se logró determinar la presencia del ARN molde de replicación en estos cuerpos membranosos, el hecho de haberlos observado en estadios tempranos de la infección condujo a los autores del trabajo a proponer que podría tratarse de sitios de traducción, síntesis y encapsidación (Verchot-Lubicz, 2010). Más allá de estas especulaciones, el estudio de diversos *Potex*- y *Hordeivirus* ha demostrado que las proteínas del TGB no son necesarias para la replicación del ARN viral (Angell *et al.*, 1996; Gilmer *et al.*, 1992; Beck *et al.*, 1991; Petty *et al.*, 1990). En este conjunto de trabajos se realizaron experimentos para analizar la capacidad de replicación de virus mutantes, a los que se eliminó uno, dos o los tres ORFs codificantes de las proteínas del TGB. Independientemente del virus analizado, los análisis de *Northern blot* señalaron que todos los virus mutantes producen la/s especie/s de ARNsg esperada/s, y por lo tanto conservan la capacidad de replicarse aún en ausencia de las proteínas del TGB (Angell *et al.*, 1996; Gilmer *et al.*, 1992; Beck *et al.*, 1991; Petty *et al.*, 1990).

4. Estrategias de movilización viral

Si bien las secuencias y estructuras de los genomas virales y los mecanismos adoptados para movilizarse pueden ser diversos, el esquema básico del proceso de infección es similar para todos los virus de plantas: se replican en una célula inicial y, a partir de allí, se dispersan hacia las células vecinas a través de los plasmodesmos. Los plasmodesmos son un tipo especial de organelas intercelulares que permiten establecer una continuidad topológica entre el citoplasma y las endomembranas de células vecinas. Esta característica permite el intercambio de pequeñas moléculas y de señales químicas, lo que contribuye a la coordinación de los procesos bioquímicos y fisiológicos. Además, tienen la capacidad de mediar el transporte selectivo de proteínas y complejos de ribonucleoproteínas (Zambryski and Crawford, 2000; Lucas and Lee, 2004). Inicialmente, el proceso de movimiento de célula a célula tiene lugar en el mesófilo. Luego, los virus ingresan al sistema vascular en donde el flujo floemático les permitirá dispersarse de manera sistémica hasta alcanzar tejidos distantes del sitio de infección inicial (Waigmann *et al.*, 2004). Aparentemente, la dispersión a través del tejido vascular constituye un proceso pasivo que ocurre siguiendo el flujo de los fotoasimilados. Por el contrario, el movimiento de célula a célula es un proceso activo que requiere la interacción específica de proteínas del

virus con proteínas del huésped (Lough and Lee, 2004). En esta sección se revisarán los modelos más aceptados para explicar el movimiento de los *Potexvirus*.

4.1 Movimiento de célula a célula

En función de la naturaleza del complejo de transporte, se han postulado dos modelos diferentes para explicar el movimiento de los *Potexvirus*. El primer modelo plantea que el complejo transportado de célula a célula a través de los plasmodesmos, es la partícula viral o el virión filamentosos. Este modelo se apoya en observaciones que indican la presencia de viriones de PVX en los plasmodesmos de las células infectadas y en el hecho de que la CP de PVX puede ser co-translocada junto con el material infeccioso (Chapman *et al.*, 1992; Oparka *et al.*, 1996; Santa Cruz *et al.*, 1998). En estudios posteriores se observó que la proteína TGBp1 puede asociarse a los viriones PVX, formando un complejo denominado PVX-TGBp1 (Kiselyova *et al.*, 2003). El segundo modelo, un tanto más desarrollado, propone que los complejos de transporte estarían compuestos por complejos ribonucleoproteicos (RNP). En el caso de los *Potexvirus* se constató que complejos ensamblados *in vitro* conteniendo ARNg, TGBp1 y CP son capaces de moverse entre células (Lough *et al.*, 1998; 2000). Por otro lado, esta idea fue reforzada por otras observaciones que demostraron que la delección del extremo C-terminal de la CP permite la formación de viriones pero impide el movimiento entre células, sugiriendo que la formación de viriones no es suficiente para la dispersión local (Lough *et al.*, 2000; Fedorkin *et al.*, 2001). Por el momento se desconoce la estructura exacta de estos complejos de movilización.

En la **Figura 7** se presenta un esquema del modelo de movimiento viral intracelular basado en complejos de transporte RNP, representados como una línea de color rojo (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). Como ya se ha mencionado, TGBp2 y TGBp3 son proteínas integrales de membrana que co-localizan en vesículas granulares derivadas del RE (Krishnamurthy *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2003) (**Fig. 7**, círculos de color celeste). La formación de estas vesículas, y la inserción de las proteínas TGBp2 y TGBp3 es esencial para el movimiento viral de célula a célula (Ju *et al.*, 2007). Dado que las vesículas granulares se asocian con los filamentos de actina (Ju *et al.*, 2005), se ha sugerido que podrían moverse unidas al citoesqueleto hasta alcanzar el plasmodesmo (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). Si bien existen muchas similitudes en las estrategias de *Potex-* y *Hordeivirus*, es posible distinguir características que las diferencian. A diferencia de lo que ocurre con *Potexvirus*, en *Hordeivirus* se requiere de la presencia de TGBp2 y TGBp3 para que TGBp1 se localice en la periferia de la

célula (Zamyatnin *et al.*, 2004); mientras que tanto TGBp2 como TGBp3 tienen la capacidad de modificar el SEL del plasmodesmo (Krishnamurthy *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2003). Se especula que cuando TGBp2/3 se encuentran en el plasmodesmo o la zona cercana, se produce la transferencia del complejo de proteínas TGBp2/3 desde el RE a la membrana plasmática, y luego se produciría el pasaje del complejo RNP (en este caso compuesto por TGBp1 y ARN) a través del plasmodesmo (Haupt *et al.*, 2005). Luego del pasaje las proteínas TGBp2 y TGBp3 serían recicladas a través de la vía de endocitosis (Haupt *et al.*, 2005).

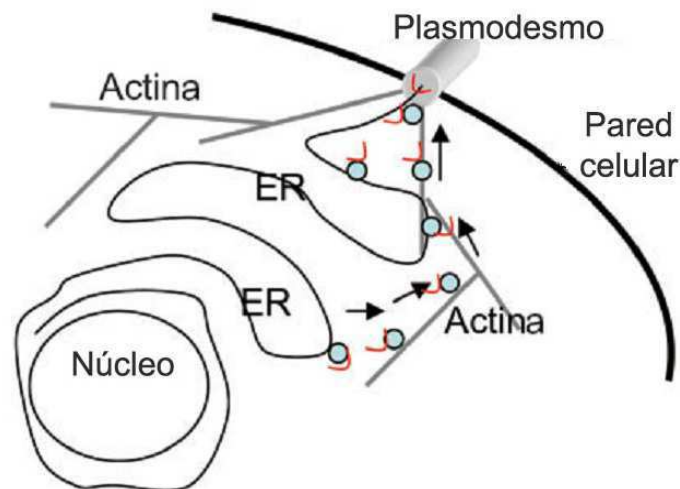


Figura 7. Modelo de movimiento viral intracelular para *Potexvirus*. En el diagrama se esquematizan las vesículas (círculos celestes) encargadas de transportar al complejo de transporte (línea roja) hacia el plasmodesmo, para luego ser transportado a la célula vecina. Tomado de Verchot-Lubicz *et al.*, 2007.

En la **Figura 8** se presenta un esquema detallado que permite explicar el transporte intercelular del complejo de movilización de *Potexvirus* a través del plasmodesmo. Este modelo fue desarrollado por Verchot-Lubicz (2005) y ha sido dividido en tres etapas. En una etapa inicial, la proteína TGBp1 se localiza en el interior del plasmodesmo y promueve el incremento de la permeabilidad del poro. Simultáneamente, una fracción de proteína TGBp1 podría interactuar en forma independiente con las proteínas TGBp2 y TGBp3, promoviendo su transporte a través del plasmodesmo. Durante esta etapa temprana del movimiento de célula a célula la proteína TGBp1 podría ejercer su función como supresora del PTGS. Luego, durante

la etapa intermedia, se produciría la movilización del complejo de transporte a través del plasmodesmo, ya sea en forma de virión asociado a TGBp1 (PVX-TGBp1), o bien como un complejo RNP (TGBp1-ARN-CP). Finalmente, en la etapa tardía los complejos de transporte quedarían anclados al RE de la célula vecina a través de los "complejos de anclaje", conformados por las proteínas TGBp1, TGBp2 y TGBp3. La presencia de un exceso de TGBp1, o tal vez de TGBp1 en forma de oligómeros, podría activar el complejo de transporte, virión o RNP, permitiendo que se inicie la traducción de las proteínas.

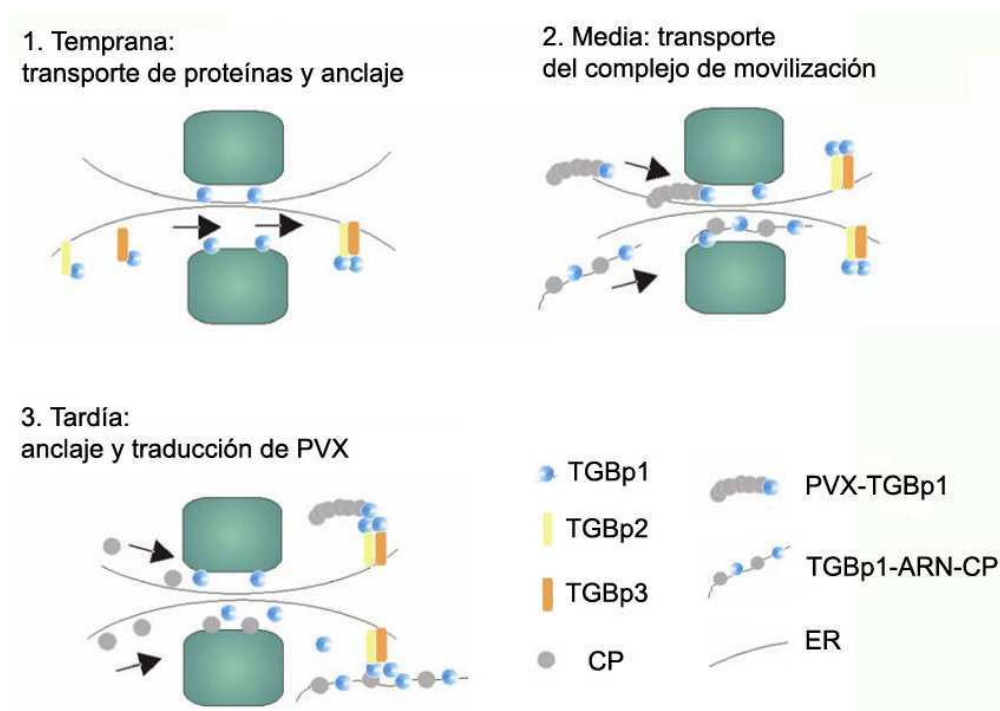


Figura 8. Modelo de movimiento viral intercelular para *Potexvirus*. El espacio entre las cajas verdes indica el plasmodesmo. Adaptado de Verchot-Lubicz *et al.*, 2005.

4.2 Movimiento sistémico

La fase siguiente del movimiento viral involucra la dispersión sistémica del virus desde el sitio de inicio de la infección hacia tejidos distantes de la planta. Para lograrlo, el virus debe acceder al tejido vascular, invadir distintos tipos de células altamente especializadas e interactuar con múltiples factores del huésped, alcanzando

finalmente el tejido meristemático. Debido a la complejidad de este proceso, el estudio de los mecanismos involucrados resulta mucho más complicado que el de aquellos implicados en el movimiento célula a célula. Por esta razón, la dispersión sistémica es también menos comprendida. En algunos grupos virales, como en el de los *Tobamovirus*, las proteínas que intervienen en el movimiento sistémico son distintas de las que actúan a nivel local. Así por ejemplo, la proteína CP usualmente es un factor determinante para el movimiento sistémico (Callaway *et al.*, 2001, Waigmann *et al.*, 2004). En base a ensayos de complementación en *trans* y la realización de injertos, se comprobó que las CP de PVX y WCIMV son capaces de acceder al floema, moverse sistémicamente y luego egresar del mismo (Santa Cruz *et al.*, 1998). En el caso de los *Potexvirus*, todo indica que las proteínas CP, TGBp1 y el ARN viral serían transportados a través del floema de plantas de *N. benthamiana*. Dado que no se ha logrado detectar viriones inmunoreactivos de PVX en el floema, se especula que al igual que en el caso del movimiento local, el transporte a larga distancia podría involucrar un complejo RNP (Santa Cruz *et al.*, 1998; Lough *et al.*, 2001). En contraste, los *Hordeivirus* no requieren de la CP para el movimiento sistémico, y se cree que podrían ser translocados en floema como un complejo RNP compuesto únicamente por proteína TGBp1 y ARNg (Jackson *et al.*, 2009). Remarcablemente, se observó que en los virus de este grupo la extensión N-terminal de la proteína TGBp1, caracterizada por su capacidad de unir ARN de manera fuerte y no cooperativa, es fundamental para el movimiento sistémico (Morozov and Solovyev, 2003).

5. Fosforilación de proteínas

5.1 Regulación de la función de proteínas por fosforilación

Las proteínas pueden presentarse en numerosas isoformas, exhibiendo modificaciones tales como fosforilación, acetilación, glicosilación o ubiquitinación, las que contribuyen a ampliar la diversidad del proteoma. La más estudiada de estas modificaciones es sin duda, la fosforilación de proteínas (Pawson and Scott, 2005). Esta modificación reversible y específica, puede provocar cambios estructurales que resultan en la modulación de la actividad enzimática, la modificación de la especificidad de los sustratos, o la modificación de la localización subcelular; también

pueden afectar la estabilidad de la proteína, o alterar las interacciones con otras proteínas o moléculas (Johnson, 1993; Fuente van Bentem and Hirt, 2007). Se han identificado más de 1.000 proteínas quinasas en plantas que intervienen en la regulación del metabolismo, del ciclo celular y del desarrollo y el crecimiento de la planta (Stone and Walker, 1995; Yang and Poovaiah, 2003). Además, las proteínas quinasas tienen un rol fundamental en la señalización de respuestas asociadas al reconocimiento y a la defensa frente a factores de estrés biótico (patógenos) y abióticos (Romeis, 2001; Zhang and Klessig, 2001).

La actividad de las proteínas virales, particularmente de aquellas involucradas en el movimiento, requiere de una regulación y coordinación estricta en respuesta a las demandas del ciclo viral y de la fisiología del huésped. Un mecanismo basado en eventos de fosforilación/defosforilación podría constituir una forma ideal para regular la serie de eventos en que están involucradas las MPs durante el curso de la infección viral (Waigmann *et al.*, 2004). Las evidencias señalan que este mecanismo de fosforilación/defosforilación podría estar involucrado en la regulación del tráfico de macromoléculas endógenas y de NCAPs (por *non-cell autonomous proteins*) a través del plasmodesmo (Lucas and Lee, 2004; Lee *et al.*, 2005). Así por ejemplo, en el caso de la proteína Cm-PP16-1 (una proteína de unión a NCAP), se observó que una serie de eventos de glicosilación, deglicosilación y fosforilación sobre un mismo residuo de serina, podrían constituir un modo de restringir la translocación de la proteína a través del plasmodesmo (Taoka *et al.*, 2007). Sin embargo, no se ha logrado establecer si estas modificaciones funcionan por sí mismas como señales de tráfico intercelular, o bien actúan modulando la actividad de otras señales aún no identificadas (Taoka *et al.*, 2007).

5.2 Fosforilación de proteínas de movimiento viral

En los últimos años se han reunido algunas evidencias sobre el estado de fosforilación de ciertas proteínas virales, particularmente de aquellas involucradas en el movimiento viral. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la identidad de las proteínas quinasas responsables de estas modificaciones, y sobre el rol de esta clase de modificaciones en el funcionamiento de las proteínas. La mayoría de los estudios se han centrado en describir y caracterizar la fosforilación de las MPs 30 K de los *Tobamovirus* TMV y ToMV. La fosforilación de las proteínas 30 K ha sido estudiada *in vivo* en plantas de *N. tabacum* transgénicas y en protoplastos BY2, e *in vitro* utilizando diferentes fuentes enzimáticas como fracciones enriquecidas en pared celular,

fracciones de RE y una fracción de proteínas solubles (Waigmann *et al.*, 2000; Haley *et al.*, 1995; Citovsky *et al.*, 1993; Karger *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2001). Experimentos de fosforilación *in vivo* realizados con protoplastos infectados demostraron la presencia de varios sitios de fosforilación, particularmente residuos de serina, distribuidos en toda la extensión de la proteína (Haley *et al.*, 1995). Además, se ha determinado que la proteína nativa 30 K se encuentra fosforilada durante el curso de la infección viral, y que la fosforilación y/o la presencia de un residuo de serina en posición 37, resulta esencial para la estabilidad de la proteína y su correcta localización subcelular (Kawakami *et al.*, 1999). Utilizando proteínas mutantes de delección y sustitución, se identificaron en la MP 30 K de TMV tres sitios de fosforilación situados en el extremo C-terminal que son blanco de fosforilación por una proteína quinasa asociada a la pared celular (Citovsky *et al.*, 1993; Waigmann *et al.*, 2000). La caracterización bioquímica de esta actividad indicó que se trata de una actividad quinasa con características de CK2 (Karpova *et al.*, 2002). También se identificó una actividad quinasa asociada al RE cuyo blanco de fosforilación es el residuo de treonina 104; donde se observó que el reemplazo de este residuo por un residuo de ácido aspártico inhibe el movimiento viral célula a célula (Karger *et al.*, 2003). Finalmente, se demostró que la proteína 30 K es blanco de fosforilación por una quinasa celular de tipo CK1 asociada a plasmodesmos (Lee *et al.*, 2005).

De manera similar, la proteína 30 K de ToMV también es fosforilada en el extremo C-terminal por actividades enzimáticas presentes en fracciones de proteínas solubles obtenidos a partir de protoplastos BY2 y de hojas de *N. tabacum* (Matsushita *et al.*, 2000; 2003). La actividad quinasa presente en la fracción citoplasmática de hojas de *N. tabacum* ha sido parcialmente caracterizada como una proteína quinasa tipo CK2 (Matsushita *et al.*, 2000). Por otra parte, la proteína 30 K de ToMV interactúa y es fosforilada por una proteína quinasa RIO (Yoshioka *et al.*, 2004). Llamativamente, en estudios realizados *in vitro*, la adición de proteína quinasa CK2 aumenta la fosforilación de la quinasa RIO aunque no se determina si esto ocurre porque CK2 fosforila a RIO, o bien porque aumenta la autofosforilación de la proteína quinasa RIO. Como consecuencia del aumento de la fosforilación, se observó una reducción en la interacción de la proteína quinasa RIO con la proteína 30 K (Yoshioka *et al.*, 2004).

Al igual que los *Potexvirus*, los Tobamovirus se movilizan entre células vecinas por medio de un complejo de transporte de tipo RNP conformado por ARNg y MP 30 K, una vez que los complejos RNP alcanzan el plasmodesmo, la proteína 30 K interacciona con las proteínas del huésped y activa la maquinaria celular que permite modificar el SEL del plasmodesmo (Rhee *et al.*, 2000). Para analizar la importancia

funcional de la fosforilación de los residuos identificados como blanco de fosforilación en el extremo C-terminal se analizaron dos tipos de proteínas MP mutantes: aquellas donde los residuos no pueden ser fosforilados (reemplazo por residuo de alanina) y aquellas donde los residuos imitan la carga negativa de la adición de un grupo fosfato (reemplazo por residuo de ácido aspártico). Dado que se sabía que el extremo C-terminal de la proteína 30 K no era necesario para el movimiento célula a célula, se podía suponer que la fosforilación en esta región no sería esencial para la movilización viral (Waigmann *et al.*, 2004). Los estudios iniciales con virus mutantes señalaron que la fosforilación de la MP 30 K de TMV inhibía el transporte del complejo RNP hacia células vecinas, a partir de lo cual se dedujo que la fosforilación impedía a la MP modificar el SEL del plasmodesmo (Waigmann *et al.*, 2000). En trabajos posteriores se observó que en realidad, la fosforilación de la MP en una primera etapa es necesaria para promover el movimiento viral entre células vecinas, mientras que las fosforilaciones posteriores conducen a la inactivación de las funciones de transporte de la proteína 30 K (Truntyeva *et al.*, 2005). Por otro lado, la fosforilación de la MP 30 K inhibe su capacidad de reprimir la traducción del ARNg. La ocurrencia de la fosforilación, tanto antes como después de la formación del complejo RNP, permite la conversión de la forma no traducible a la forma traducible (Karpova *et al.*, 1999).

Particularmente para los *Potexvirus*, se ha demostrado que la proteína CP de PVX es fosforilada *in vitro* por una proteína quinasa C (PKC), por la combinación las caseína quinasas 1 y 2 (CK1 y CK2), y por una proteína quinasa soluble de *N. tabacum* que presenta características similares a las CK2 (Atabekov *et al.*, 2001; Karpova *et al.*, 2002). Se mostró también que la fosforilación *in vitro* de la CP de PVX conduce a la traducción del ARNg viral contenido en los viriones, sugiriendo que la fosforilación de la proteína CP tiene un rol fundamental durante los estadios iniciales de la infección viral (Atabekov *et al.*, 2001). Durante el desarrollo de este trabajo se reportaron evidencias que indican que la fosforilación *in vitro* de TGBp1 ocasiona que la proteína pierda su habilidad para activar *in vitro* la traducción de los viriones de PVX (Zayakina *et al.*, 2007). Sin embargo se desconocía si la proteína TGBp1 era blanco de fosforilación por proteínas quinasas celulares, cuáles podrían ser las quinasas implicadas en la fosforilación, y de que modo la fosforilación de la proteína TGBp1 podía afectar las múltiples actividades de la MP.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el rol de la fosforilación de TGBp1 sobre su función y actividades en relación al proceso de movimiento viral. El estudio de los mecanismos regulatorios que afectan al movimiento viral permitirá dilucidar un aspecto importante de la interacción planta-hospedante y facilitará la implementación de estrategias de expresión basadas en vectores y amplicones virales.

Objetivos específicos:

- Establecer la fosforilación la proteína TGBp1 de PVX por quinasas celulares.
- Caracterizar la/s quinasa/s celular/es involucrada/s.
- Caracterizar los residuos fosforilados y/o posibles blancos de fosforilación.
- Examinar los efectos de la fosforilación sobre la infección viral.
- Estudiar el efecto de la fosforilación de la proteína TGBp1 sobre su actividad de hidrólisis de ATP.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi D8 y *Nicotiana benthamiana*. Las plantas se mantuvieron en cuartos acondicionados a 23-26 °C, con un régimen de 16 h luz / 8 h oscuridad y 45% de humedad relativa.

2. Aislamientos virales

Se utilizó la cepa CP2 de *Potato Virus X* (PVX-CP2), procedente del Centro Internacional de la Papa (Lima, Perú). El clonado y la secuenciación completa del genoma viral fueron reportados previamente por nuestro laboratorio (Orman *et al.*, 1990). La copia completa del genoma de PVX se obtuvo mediante ensamblado de los fragmentos de ADNc (Calamante, 1998). El clon resultante contiene los nucleótidos correspondientes a las posiciones 1 a 6.432 del genoma viral más una secuencia poli(A) de 24 residuos.

Además, se utilizó la cepa ordinaria de *Potato virus Y* (PVY^o) aislada en el Centro Internacional de la Papa (Lima-Perú) y caracterizada parcialmente en nuestro laboratorio (Bravo-Almonacid and Mentaberry, 1989).

3. Infección mecánica de plantas

Las infecciones mecánicas se llevaron a cabo utilizando carborundum como agente abrasivo. En cada planta se inocularon una o dos hojas expandidas (de 3 a 5 cm de largo). El inóculo se preparó con 0,5 g de tejido liofilizado de hojas infectadas, homogeneizado en 1 ml de *buffer* fosfato de sodio 20 mM, pH 7. Se aplicaron 50-100 µl del homogenato por hoja y, luego de 10 min de incubación, se enjuagaron con H₂O para eliminar los restos de carborundum.

4. Cepas bacterianas

4.1 *Escherichia coli*

4.1.1 *Condiciones de cultivo*

Se utilizaron las cepas DH10B, XL1Blue y BL21(DE3). Todos los cultivos fueron crecidos en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L). En el caso de medios sólidos, se adicionó ágar a una concentración final de 1,5%. Los suplementos utilizados fueron: ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml), según las resistencias aportadas por los plásmidos. El crecimiento de los cultivos se llevó a cabo en los dispositivos adecuados, conteniendo un volumen de medio líquido inferior al 20% de su capacidad; la temperatura de crecimiento fue de 37°C con agitación de 250 rpm.

4.1.2 *Preparación de células electrocompetentes*

Se inocularon 100 ml de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) con 1 ml de bacterias en fase estacionaria de crecimiento. El cultivo se incubó con agitación de 250 rpm a 37°C hasta alcanzar una OD600 = 0,5-1. Todo el procedimiento que se detalla a continuación se realizó en frío o utilizando soluciones previamente enfriadas. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4.000 x g, durante 15 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 100 ml de agua bidestilada. Luego se repitió dos veces el procedimiento de centrifugación y lavado del *pellet*, utilizando la mitad (50 ml), y un cuarto (25 ml) del volumen inicial de agua bidestilada. Finalmente, se realizó un lavado con 20 ml de glicerol 10% y se resuspendió el *pellet* en 2-3 ml de glicerol 10%. Las células se fraccionaron en alícuotas de 60 µl. Se conservaron a -70°C hasta 6 meses.

4.1.3 *Transformación de células electrocompetentes*

Para la electroporación se utilizó un equipo *Gene Pulser* (BioRad). Las células se descongelaron, y luego del agregado del ADN (100-250 ng) se incubaron en hielo por 10 min. La mezcla de ADN y bacterias se transfirió a una cubeta de electroporación (0,2 cm) y se aplicó un campo eléctrico de 2,5 kV por 5 milisegundos. Las células se recuperaron inmediatamente agregando 1 ml de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de

levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Finalmente, se sembraron en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes.

4.2 *Agrobacterium tumefaciens*

4.2.1 *Condiciones de cultivo*

Se utilizó la cepa GV3101 con resistencia nuclear a rifampicina (100 µg/ml), portadora del plásmido pMP90RK que aporta resistencia al antibiótico gentamicina (100 µg/ml). Los medios de cultivo utilizados y las condiciones son similares a las de *E. coli*, a excepción de la temperatura de incubación que se mantuvo en 26-28°C.

4.2.2 *Preparación de células electrocompetentes*

Para la preparación de células electrocompetentes se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección (4.1.2) para *E. coli*.

4.2.3 *Transformación de células electrocompetentes*

Se utilizó el mismo protocolo descrito anteriormente para la transformación de *E. coli* (Sección 4.1.3); con las siguientes adaptaciones: los parámetros del campo eléctrico aplicado fueron de 2,2 kV por 5 milisegundos y la temperatura de recuperación de las células fue de 26-28°C.

5. Métodos de ingeniería genética

Las técnicas de ADN recombinante se basaron en los protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1984). Las enzimas de restricción, enzimas modificadoras y otros reactivos se utilizaron según las recomendaciones de los fabricantes: Sigma-Aldrich (USA), GE Healthcare Life Science (Alemania, USA), New England Biolabs (USA), Promega (USA), Invitrogen (USA), Fermentas (Canadá), BioRad (USA).

5.1 Aislamiento de ADN plasmídico

5.1.1 *Mini preparación de ADN plasmídico*

Método de lisis alcalina: Se inoculó una colonia bacteriana en 5 ml de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) suplementado con los antibióticos adecuados, y se cultivó toda la noche con agitación a 37°C. El cultivo se cosechó por centrifugación y se resuspendió en 300 µl de Solución de Resuspensión (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, ribonucleasa A 100 µg/ml). Se agregaron 300 µl de solución de Lisis (NaOH 200 mM, SDS 1 %), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 3-5 minutos. Luego se agregaron 300 µl de Solución de Neutralización (acetato de potasio 3 M, pH 5,5), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Transcurrida la incubación, se centrifugaron las muestras a 15.700 x g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al que se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente 15.700 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70%, se secó y se resuspendió en 30 µl de H₂O bidestilada.

Purificación de ADN plasmídico utilizando matrices comerciales de fibra de vidrio: Las preparaciones de ADN plasmídico para secuenciación se obtuvieron utilizando los sistemas de purificación *Wizard plus SV minipreps DNA Purification System* (Promega) y *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences), según los protocolos suministrados por los fabricantes. Ambos sistemas consisten en una modificación del método de lisis alcalina, en la que el paso de precipitación del ADN con isopropanol se reemplaza por el pasaje a través de una columna que contiene una matriz de fibra de vidrio. El ADN plasmídico unido diferencialmente a la columna se eluyó con 50 a 100 µl de H₂O de acuerdo a la concentración final de ADN deseada.

5.2 Preparación de plásmido e insertos

5.2.1 *Amplificación de insertos por PCR*

La amplificación de fragmentos de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando las enzimas *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies) o *Pfu* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies), de acuerdo a las condiciones sugeridas y con los *buffers* suministrados por la empresa proveedora. Se utilizaron 10-50 ng de ADN molde y 0,5-1 µM (cf) de cada oligonucleótido iniciador por

reacción, en un volumen final de 25-30 μ l. La concentración estándar de $MgCl_2$ fue de 1,5 mM y 100 μ M de dNTPs.

5.2.2 Corte con enzimas de restricción

Los cortes de plásmidos e insertos de ADN para clonado, así como los mapeos de restricción, se realizaron con enzimas comerciales de acuerdo con las condiciones especificadas por cada empresa proveedora (*New England Biolabs, Promega, Amersham Biosciences, Gibco BRL*). Los cortes que implicaron el uso de más de una enzima de restricción cuyas condiciones de incubación eran incompatibles entre sí se hicieron en forma secuencial, purificando el ADN según el método indicado en 5.2.5. Todas las reacciones se incubaron entre 1 y 2 h a la temperatura correspondiente y utilizando 5 U de enzima por cada μ g de ADN.

5.2.3 Rellenado de extremos 5' protruyentes

Los extremos 5' protruyentes generados por restricción, se rellenaron por polimerización con T4 ADN polimerasa (Promega). Se ajustó la concentración del ADN a 50 ng/ μ l en alguno de los *buffers* sugeridos por el fabricante y se incubó con 100 μ M de cada dNTP y 1 U de la enzima modificadora por cada μ g de ADN, a 37°C durante 15 min. La reacción se detuvo incubando a 75°C por 10 min.

5.2.4 Desfosforilación de extremos compatibles

Los plásmidos con extremos romos y cohesivos compatibles se desfosforilaron previamente a la reacción de ligación. Se utilizó la enzima fosfatasa alcalina SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega*), en las condiciones indicadas por el fabricante. El ADN purificado se incubó a 37°C durante 15 min con 1 unidad de SAP por cada μ g de ADN, en el *buffer* suministrado con la enzima y en 50 μ l de reacción. La enzima se inactivó calentando la reacción a 65°C durante 15 min.

5.2.5 Purificación de plásmidos y fragmentos de ADN

Los plásmidos, fragmentos de ADN y productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa de 1% en TAE 1X. Las bandas de interés se

cortaron del gel y el ADN se purificó utilizando sistemas comerciales basados en la unión diferencial del ADN a una matriz de fibra de vidrio (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, Amersham Biosciences o *Wizard PCR Preps DNA Purification System*, Promega).

5.3 Reacciones de ligación

Para las reacciones de ligación de plásmidos e insertos, se utilizó la enzima ADN ligasa del fago T4 (*Gibco BRL; Invitrogen Life Technologies*). Alrededor de 25-50 ng de ADN del plásmido se combinaron con los insertos en relaciones molares de plásmido:inserto que variaron entre 1:1 y 1:10. En cada caso se utilizó el *buffer* suministrado con la enzima en un volumen final de 20 µl de reacción. La cantidad de T4 ADN ligasa utilizada varió de acuerdo con las características de los extremos a ligar. Se utilizaron 0,1 y 1 U de enzima por reacción para ligar extremos cohesivos o romos respectivamente y 0,5 unidades cuando ambos tipos de extremos estaban presentes. Las reacciones se incubaron a 16°C entre 4 y 16 h.

6. Electroforesis de ADN

Se utilizaron geles de 1% de agarosa, en solución TAE 1x (Tris-ácido acético 40 mM pH 8, EDTA disódico 2 mM); con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm y a temperatura ambiente. Las muestras para sembrar se prepararon adicionando a la solución de ADN, *buffer* de siembra de ADN 1x (glicerol 5 %, azul de bromofenol 0,1 %). Los geles fueron fotografiados utilizando luz UV de 365 nm en un *Image Master trans-illuminator* (Amersham Pharmacia, USA).

7. Plásmidos

7.1 Plásmidos comerciales

pZERO-2 (Invitrogen): vector de clonado para productos de amplificación por PCR que se generaron utilizando la enzima polimerasa *Pfu*.

pGEM-T easy (Promega): vector de clonado para productos de amplificación por PCR que se generaron utilizando la enzima polimerasa *Taq*.

pET28a(+) (Novagen): vector para expresión de proteínas recombinantes en bacterias; permite la fusión de la proteína de interés a una secuencia de 6 residuos de histidina.

7.2 Construcciones desarrolladas previamente

pZP-PVX: Este plásmido está constituido por el esqueleto del vector comercial pZP200bar y la secuencia de ADNc del genoma de PVX, insertada en el sitio *SmaI* (Zelada *et al.*, 2006). La construcción permite la expresión del genoma de PVX bajo la acción del promotor constitutivo 35S de CaMV (*Cauliflower mosaic virus*) y del terminador de nopalina sintetasa (NOS) de *A. tumefaciens*.

7.3 Construcciones desarrolladas en el presente trabajo

- **Plásmido pET-TGBp1:**

La secuencia codificante de TGBp1 se amplificó por PCR utilizando como molde una copia completa del genoma de PVX (Orman *et al.*, 1990) y los oligonucleótidos iniciadores complementarios a la secuencia que codifica los aminoácidos 1-8 y 220-226 de TGBp1, respectivamente:

24sNde: GGATCCCCATATGGGATATTCTCATCATTAGTTTG
(contiene el sitio de restricción *NdeI*)

24sSal: GTCGACCTATGCCCTGCGCGGACATAAGT
(contiene el sitio de restricción *SalI*)

Para la reacción de amplificación por PCR, se combinaron 50 ng de ADNc de PVX, 1 μ M de oligonucleótidos iniciadores; 1,5 mM MgCl₂; 100 μ M dNTPs, *buffer* de reacción 1x (provisto por el fabricante) y 5 U de enzima *Pfu HighFidelity* (Stratagene). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf). El programa del termociclador constó de 1 ciclo de 2 min a 95°C, 20 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 55°C y 1 min/kbp de longitud del fragmento a 68°C y 1 ciclo de 10 min a 68°C. El fragmento de 681 bp resultante de la amplificación se clonó en el vector pZERO-2 (Invitrogen). La verificación de la secuencia se efectuó por secuenciación automática. El fragmento resultante de la digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *SalI*, se subclonó en el vector de expresión bacteriana pET-28a(+) (Novagen)

previamente digerido con las mismas enzimas; dando lugar al vector pET-TGBp1. El clonado se confirmó mediante digestión con diferentes enzimas de restricción.

- **Plásmidos pET-TGBp1.dC1; pET-TGBp1.dC2:**

Para la reacción de amplificación por PCR, se combinaron 50 ng de pET-TGBp1, 1 μ M de oligonucleótidos iniciadores; 1,5 mM MgCl₂; 100 μ M dNTPs, *buffer* de reacción 1x (provisto por el fabricante) y 5 U de enzima *Pfu HighFidelity* (Stratagene).

Para generar la construcción pET-TGBp1.dC1 se combinó el oligonucleótido iniciador 24sNde descrito antes, con el oligonucleótido antisentido:

24antisen-dC1: gtcgacctagattgcggttagaacagagtg
(contiene el sitio de restricción *Sall*)

Para generar la construcción pET-TGBp1.dC2 se combinó el oligonucleótido iniciador 24sNde descrito antes, con el oligonucleótido antisentido:

24antisen-dC2 Gtcgactataccgggaattccagaccgcgactg
(contiene el sitio de restricción *Sall*)

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf). El programa del termociclador constó de 1 ciclo de 2 min a 95°C, 20 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 55°C y 1 min/kbp de longitud del fragmento a 68°C y 1 ciclo de 10 min a 68°C. Los fragmentos de 573 y 639 pb resultante de la amplificación se clonó en el vector pZERO-2 (Invitrogen). La verificación de la secuencia se efectuó por secuenciación automática. El fragmento resultante de la digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *Sall*, se subclonó en el vector de expresión bacteriana pET-28a(+) (Novagen) previamente digerido con las mismas enzimas; dando lugar al plásmidos pET-TGBp1.dC1 y pET-TGBp1.dC2. El clonado se confirmó mediante de digestión con diferentes enzimas de restricción.

- **Plásmidos pET-TGBp1.T193A, pET-TGBp1.T193D, pET-TGBp1.T214A, pET-TGBp1.T214D y pET-TGBp1.T193AT214D**

Los plásmidos mutantes se generaron utilizando el sistema comercial de mutagénesis *QuikChange site-directed mutagenesis* (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se basa en una amplificación por la técnica de PCR con una ADN polimerasa de alta fidelidad. Los oligonucleótidos se diseñaron respetando las instrucciones del sistema comercial. En ambos casos, estos oligonucleótidos se aparean sobre la zona a mutagenizar.

Para la mutagénesis del residuo de treonina se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos:

T193A-sentido: cggtagtc**gcc**atcgtgtccg
 T193A-antisentido: cggacacgat**ggc**gactaccgg
 T193D-sentido: cggtagtcgatatcgtgtccg
 T193D-antisentido: cggacacgatatcgactaccgg
 T214A-sentido: cgcaatc**gca**agggtcgaag
 T214A-antisentido: cttggacct**tg**cattgcg
 T214D-sentido: cgcaatcgatagggtcgaag
 T214D-antisentido: cttggacctatcgattgcg

En la reacción de PCR se combinaron 30 ng de ADN molde del plásmido pET-TGBp1, 2 μ M (cf) oligonucleótidos iniciador sentido y antisentido, la cantidad indicada de *buffer* de reacción y dNTPs provistos por el fabricante, en un volumen final de 50 μ l. Para generar el plásmido con la doble mutación se utilizó como molde ADN del plásmido pET-TGBp1.T193A y los oligonucleótidos T214A sentido y antisentido. A la mezcla de reacción se adicionó 1 μ l de enzima *PfuUltra High-Fidelity* ADN polimerasa (2,5 U/ μ l). El programa del termociclador Mastecycler (Eppendorf) se inició con un ciclo de 30 seg a 95°C, seguido por 16 ciclos en las siguientes condiciones: 30 seg a 95°C; 1 min a 55°C y 1 minuto/kbp de longitud del plásmido a 68°C. Finalizada la reacción, se dejó enfriar el tubo en hielo durante 2 min hasta alcanzar una temperatura de 37°C, momento en que se adicionó 1 μ l de enzima de restricción *DpnI* para digerir selectivamente el ADN molde. La mezcla se incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se añadieron 7 μ l de la resina *StrataClean* provista por el sistema comercial, agitando la mezcla durante 30 seg e incubando por 1 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 2.500 x g por 1 min, para remover la resina. El sobrenadante, que contiene el ADN amplificado mutante, se introdujo en *E. Coli* XL1-Blue competentes (células provistas por el fabricante) con el fin de recuperar y amplificar el ADN mutante amplificado. Posteriormente, se corroboró la identidad del plásmido y la presencia de la mutación introducida por secuenciación automática.

- **Plásmido pET-CK2:**

Se amplificó por RT-PCR la secuencia codificante de NtCK2 utilizando como molde ARN total extraído de tejido de hojas de *N. tabacum*. La síntesis de ADNc se realizó utilizando transcriptasa reversa MMLV e iniciadores oligo-dT según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). En la reacción de PCR se combinaron 10 ng of ADNc en 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 100 μ M dNTP,

5 U Taq polimerasa, y 2 μ M de cada iniciador. Para la amplificación de la secuencia, se utilizaron los oligonucleótidos:

CK2-sentido: AAACATATGTCGAAAGCTCGTGTTTACACC
(contiene el sitio de restricción *NdeI*)
CK2-antisentido: AAACCCGGGCTACTGCGTCCGCATCCTGCTATTC
(contiene el sitio de restricción *SmaI*).

El fragmento de amplificación de 1.002 bp se clonó en el vector pGEM-T *easy* (Promega) y la secuencia se confirmó por secuenciación automática. La secuencia clonada se ingresó en la base de datos GenBank bajo en código de acceso EU555192. El ADNc de NtCK2 se subclonó en el vector de expresión bacteriana pET-28a (+) (Novagen) entre los sitios de restricción *NdeI/SmaI* para obtener el plásmido pETCK2.

- **Amplicones PVX mutantes:**

Las construcciones se obtuvieron mediante de la técnica de mutagénesis dirigida basada en la amplificación por la técnica de PCR con mega-olnucleótidos. En la **Figura 9** se presenta un esquema del procedimiento que se describe a continuación. En la reacción de amplificación N° 1, se combinaron los oligonucleótidos iniciadores A (sentido, aparece en el extremo 5' de la secuencia nucleotídica de TGBp1), y B* (anti-sentido, portador de la mutación). En la reacción de amplificación N° 2, se combinaron los oligonucleótidos iniciadores C* (sentido, portador de la mutación), y D (anti-sentido, aparece en el extremo 5' de la secuencia nucleotídica de la proteína de la cápside). El oligonucleótido A incorpora un sitio de restricción para la enzima *StuI*, y el oligonucleótido D incorpora un sitio de restricción para la enzima *MluI*. En las reacciones de PCR se combinaron 30 ng de ADN molde del plásmido pZP-PVX, 2 μ M (cf) de oligonucleótidos iniciador sentido y antisentido, y la cantidad indicada de *buffer* de reacción, enzima polimerasa *Pfu* y dNTPs provistos por el fabricante (Invitrogen, LifeTechnologies), en un volumen final de 50 μ l. El programa del termociclador Mastecycler (Eppendorf) se inició con un ciclo de 30 seg a 95°C, seguido por 16 ciclos en las siguientes condiciones: 30 seg a 95°C; 1 min a 52°C y 1 minuto/kbp de longitud del producto a 68°C. Los productos de amplificación de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 se combinaron en una reacción de amplificación N° 3, donde se incluyeron únicamente los iniciadores A y D. La amplificación se realizó en en condiciones similares a las descritas antes. El producto final resultante consistió en un fragmento del genoma de PVX, de aproximadamente 1.600 pb. El fragmento

mutagenizado se subclonó en un vector pZERO. Las construcciones resultantes para cada mutación se analizaron por secuenciación automática.

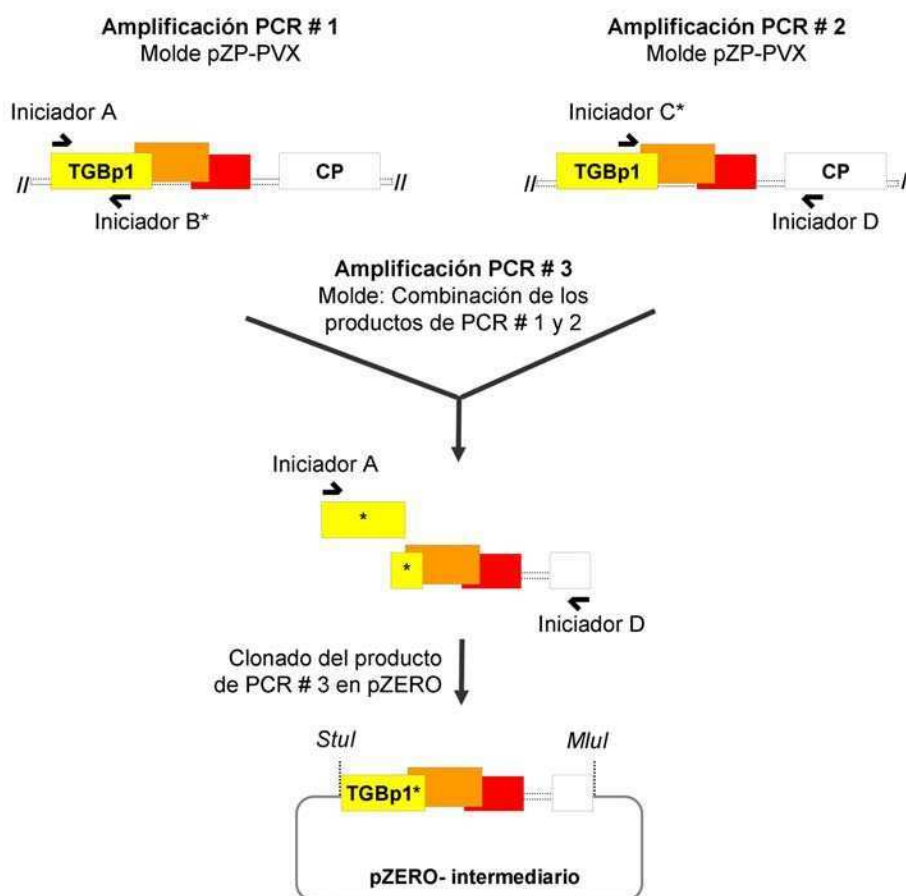


Figura 9. Amplificación y clonado de fragmentos, para la obtención de los amplicones PVX mutantes. El * indica la introducción de una mutación respecto de la secuencia salvaje.

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
Oligonucleótidos comunes a todas las amplificaciones por PCR			
A	ctgctaggccttagattc	D	gatacgcgctcggttatgtg
Oligonucleótidos combinados según la mutación introducida			
T193A-B*	cggacacgatgg C gactac	T193A-C*	gtagtc G ccatcgtgtccg
T214A-B*	cttcgacctg C gattgcg	T214A-C*	cgcaatc G caaggctcgaag
T193D-B*	cggacacgat ATC gactaccgg	T193D-C*	cggtagtc GAT atcgtgtccg
T214D-B*	cttcgacct ATC gattgcg	T214D-C*	cgcaatc GAT aggctcgaag

Sobre las secuencias de los oligonucleótidos se indican en mayúscula negra las bases modificadas respecto de la secuencia original.

Las construcciones intermedias pZERO se digirieron con las enzimas de restricción *Stul-MluI*, y el fragmento de 1.600 pb resultante de la digestión se subclonó en el vector pZP-PVX, previamente digerido con las mismas enzimas de

restricción. Las construcciones resultantes (PVX-T193A, PVX-193D, PVX-T214A y PVX-T214D) se analizaron por secuenciación automática.

8. Electroforesis y transferencia de proteínas

8.1 Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se prepararon geles desnaturizantes de poliacrilamida de 8 x 10 cm y 1-1,5 mm de espesor, utilizando el sistema Mini-Protean II™ (BioRad, USA) o SE 260 Mini Vertical Unit Hoeffer (Amersham-Pharmacia), de acuerdo con los protocolos previamente descritos (Sambrook *et al.*, 1989). Antes de sembrar las muestras, las mismas se calentaron a 100°C durante 3 min en *buffer* de siembra de proteínas (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 0,5%, glicerol 5%, β-mercaptoetanol 1% V/V, BPB 0,05 mg/ml). Las corridas se realizaron a 25 mA durante aproximadamente 1 h 30 min, en *buffer* de corrida SDS-PAGE 1x (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; glicina 190 mM y SDS 0,1%).

8.2 Tinción con Coomassie Brilliant Blue

Los geles se sumergieron en una solución de *Coomassie Brilliant Blue* (CBB R250 0,05%, metanol 40%, y ácido acético 10%) durante 2 a 16 h a temperatura ambiente con agitación moderada. Se lavaron con metanol 45%, ácido acético 10%, hasta eliminar la tinción no específica.

8.3 Transferencia de proteínas

Se utilizó el sistema Mini Trans-Blot™ (BioRad, USA). Los geles se sumergieron en *buffer* de electrotransferencia (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicina 196 mM, metanol 20%). La membrana de nitrocelulosa (Hybond C-Extra, GE Healthcare Life Science, USA) del tamaño del gel se hidrató 10 min en el mismo *buffer*. Se colocaron sucesivamente, evitando la formación de burbujas, una esponja tipo *Scotch Brite* (BioRad, USA), tres hojas de papel de filtro, el gel, la membrana de nitrocelulosa, otras tres hojas de papel de filtro y otra esponja tipo *Scotch Brite*. Ensamblado el cartucho de transferencia, se colocó dentro de la cuba y se completó la carga con *buffer* de electrotransferencia. La transferencia se llevó a cabo en frío a 75 V (voltaje constante) por 1 h. Las membranas se guardaron secas a temperatura ambiente.

Alternativamente, se utilizó el sistema de transferencia semi-seca TransBlot (BioRad, USA) según las instrucciones del fabricante. Se colocó sobre la base del equipo una pieza de papel de transferencia (BioRad, USA) del tamaño del gel, un trozo de membrana de nitrocelulosa, el gel y finalmente otra pieza de papel de transferencia, todos los elementos fueron previamente humedecidos en *buffer* de electrotransferencia. La transferencia se llevó a cabo durante 1 h a 2,5 mA por cm² de gel. Las membranas secas se conservaron a temperatura ambiente.

9. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

9.1 Expresión de proteínas recombinantes en pequeña escala

Los plásmidos de expresión fueron introducidos por electroporación en *E. coli* BL21(DE3) utilizando los procedimientos previamente descritos. Se inocularon 200 ml de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) con 2 ml de un cultivo saturado de bacterias transformadas crecidas en medio LB toda la noche a 37 °C. Se incubó el cultivo hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0,8. Luego se adicionó IPTG (Fermentas) a una concentración final 1 mM. El cultivo se incubó a 37°C con agitación durante 3 y 6 hs. Se tomaron muestras de 1 ml de cultivo bacteriano y las células se cosecharon a 4.500 rpm durante 5 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 200 µl de *buffer* de extracción rápida de proteínas (Tris-HCl pH 6,8 50 mM, EDTA-Na₂ 10 mM, PMSF 1 mM) y se sonicó empleando 2 ciclos de 15 seg cada uno. Los homogenatos se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min a 4°C. Se adicionó *Buffer* de siembra de proteínas 5x (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 0,5%, glicerol 5%, β-mercaptoetanol 1% v/v, azul de bromofenol 0,05 mg/ml) al sobrenadante (fracción soluble) y el *pellet* (fracción insoluble), para su posterior análisis en geles desnaturizantes de poliacrilamida.

9.2 Expresión a gran escala y purificación por cromatografía de afinidad

Purificación en condiciones desnaturizantes (proteína rTGBp1 y sus versiones mutantes): Las células bacterianas cosechadas a partir de un cultivo de 600 ml inducido durante 6 hs a 37°C, se resuspendieron en *buffer* TN (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 50 mM) frío suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, USA). Las células se sonicaron durante 45 seg en hielo, se congelaron en N₂

líquido y se descongelaron en un baño de agua a 20°C. El procedimiento de sonicado-congelado-descongelado se repitió 5 veces. El lisado de células se centrifugó a 10.000 x g por 20 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió por agitación en *buffer* TNU (*buffer* TN, urea 8M) en un baño de agua a 10°C durante 10 min. El material resuspendido se sonicó en 3 ciclos de 30 seg, sumergido en un baño de agua a 10°C. Se centrifugó a 10.000 xg por 20 min a 15°C. El sobrenadante (sbTNU-1) se conservó a 4°C. Se repitió la incubación del *pellet* en *buffer* TNU y el material resuspendido se sonicó y se centrifugó tal como se describió anteriormente. El sobrenadante (sbTNU-2) se conservó a 4°C y se descartó el *pellet*. Las fracciones sbTNU-1 y 2 se sembraron en una resina de Ni-agarosa (Sigma Aldrich, USA), previamente equilibrada durante 20 min a 18°C en *buffer* TNU. La mezcla se incubó por 1 h a 18°C con agitación moderada. Luego se centrifugó a 1.100 xg por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de resina se lavó con *buffer* TNU suplementado con 20 mM de imidazol por 10 min a 18°C. El lavado de la resina se repitió dos veces. La proteína rTGBp1 se eluyó en dos pasos utilizando una solución de *buffer* TNU suplementado con 500-750 mM de imidazol por 1-16 h a 18°C. Las fracciones del percolado y de los lavados se conservaron para su posterior análisis. Las muestras de proteína rTGBp1 purificada se dializaron en una membrana de retención de proteínas de tamaño superior a 12,4 kDa (Sigma-Aldrich, USA), en 1.000 volúmenes de *buffer* TN con agitación a 4°C por 16 h. Se repitió el procedimiento utilizando 500 volúmenes del mismo *buffer* por 4 h. Se adicionó glicerol hasta alcanzar una concentración final 20%, conservando la proteína purificada a -20°C.

Purificación en condiciones no desnaturalizantes (rNtCK2): Las células bacterianas cosechadas a partir de un cultivo de 600 ml inducido durante 3 hs a 37°C, se resuspendieron en *buffer* TN (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 50 mM) frío suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, USA). Las células se sonicaron durante 45 seg en hielo, se congelaron en N₂ líquido y se descongelaron en un baño de agua a 10°C. El procedimiento de sonicado-congelado-descongelado se repitió 5 veces. El lisado de células se centrifugó a 10.000 x g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se sembró en una resina de Ni-agarosa (Sigma Aldrich, USA), previamente equilibrada durante 20 min a 4°C en *buffer* TN. La mezcla se incubó por 1 h a 4°C con agitación moderada. Luego se centrifugó a 1.100 xg por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de resina se lavó con *buffer* TN suplementado con 20 mM de imidazol por 10 min a 4°C. El lavado de la resina se repitió dos veces. La proteína rNtCK2 se eluyó en dos pasos utilizando una solución de *buffer* TN suplementado con 500-750 mM de imidazol por 1-16 h a 4°C. Las fracciones de

proteína rNtCK2 purificada se dializaron en una membrana de retención de proteínas de tamaño superior a 12,4 kDa (Sigma-Aldrich, USA), en 1.000 volúmenes de *buffer* TN con agitación a 4°C por 16 h. Se repitió el procedimiento utilizando 500 volúmenes del mismo *buffer* por 4 h. Se adicionó glicerol hasta alcanzar una cf 20%, conservando la proteína purificada a -20°C.

10. Inmunodetección de proteínas (*Western blot*)

Las membranas se incubaron en Solución de Bloqueo preparada con 5% de leche descremada en polvo disuelta en *buffer* TTBS (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% v/v) por 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Luego, las membranas se incubaron con el primer anticuerpo, diluido en Solución de Bloqueo, por 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados de 5 min cada uno con *buffer* TTBS y se agregó el segundo anticuerpo diluido en Solución de Bloqueo, incubando por 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados de 5 min cada uno con *buffer* TTBS, y un lavado de 10 min en *buffer* TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM).

10.1 Anticuerpos utilizados

- a) IgG de conejo anti-cápside (anti-CP) de PVX. Dilución de uso: 1/1000.
- b) IgG de conejo anti-TGBp1 de PVX, desarrollado en el laboratorio. Dilución de uso: 1/500 para las inmunodetecciones en extractos proteicos de hojas y 1/5.000 para la inmunodetección de proteína recombinante.
- c) Anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (AP). Dilución de uso: 1/4.000 (NEN Life Science).
- d) Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). Dilución de uso: 1/4.000 (NEN Life Science).

10.2 Revelado con sustrato cromogénico

La presencia de los anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina se reveló utilizando los sustratos NBT (*Nitroblue tetrazolium*, Sigma-Aldrich) y BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato, Sigma-Aldrich). Las membranas se incubaron durante 10 min en *buffer* fosfatasa (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM). A continuación, cada membrana se incubó en 10 ml de *buffer* fosfatasa conteniendo 30

µl de BCIP (30 mg/ml en dimetilformamida 100%) y 30 µl de NBT (50 mg/ml, en dimetilformamida 70%) en oscuridad.

10.3 Revelado por quimioluminiscencia

Los anticuerpos conjugados a peroxidasa se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema comercial ECL *plus Western blotting Detection System* (Amersham Biosciences), de acuerdo con el protocolo suministrado por el proveedor. Las membranas tratadas se expusieron durante tiempos que variaron entre 1-15 min en películas radiográficas Kodak X-Omat (Kodak).

11. Extracción de ARN total y ensayo de *Northern blot*

Se extrajo ARN total a partir de hojas de plantas infectadas por PVX o por PVY, y de hojas no infectadas utilizando el reactivo TRIzol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, se molieron 5 discos de hojas de tabaco en un mortero previamente lavado con una solución de SDS 1%. Se agregaron 0,75 ml de TRIzol (Invitrogen Life Technologies) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se centrifugó a 13.000 x g durante 15 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. El ARN se precipitó agregando 0,3 ml de isopropanol e incubando a temperatura ambiente durante 10 min, seguidos por una centrifugación a 13.000 x g durante 20 min a 4°C. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75%, se dejó secar y se resuspendió en 35 µl de H₂O libre de nucleasas.

Las muestras (10 µg ARN) se prepararon incubando 15 µl de la extracción de ARN con 15 µl de mezcla de siembra libre de ribonucleasas (400 µl de formamida; 80 µl de MOPS 10X; 122 µl de formaldehído; azul de bromofenol 0,25%; 8 µl de bromuro de etidio) a 65°C durante 15 min. Para el armado del gel desnaturalizante, se fundieron 2,4 g de agarosa en 115 ml de H₂O, se dejó enfriar y, antes de que comenzara a gelificar, se agregaron 16 ml de MOPS 10X y 28 ml de formaldehído al 37%. La electroforesis se realizó a 50 V constantes en MOPS 1X (MOPS 10X: 0,2 M MOPS; 0,05 M acetato de sodio; 0,01 M EDTA disódico, pH 7). Finalizada la electroforesis, el ARN se transfirió por capilaridad a membranas de Nylon (Hybond N+,

GE Healthcare), utilizando como *buffer* de transferencia SSC 10X (1,5 M NaCl; 0,15 M citrato de sodio, pH 7), se secaron a 80°C y se fijaron con luz ultravioleta (UV).

Las membranas se hibridaron con sondas dirigidas contra la secuencia ADNc de NtCK2 o el ARN ribosomal 17s. Ambas sondas se generaron mediante amplificación por la técnica de PCR con iniciadores específicos. Los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa de 1% y se purificaron los fragmentos de interés. Ambas sondas fueron marcadas con α -³²P-CTP, utilizando el sistema de iniciación al azar *Prime-a-gene* (Promega). Se desnaturalizaron 25 ng de fragmento molde por incubación a 95°C durante 5 min y se mezclaron con 2 μ l de seroalbúmina bovina 400 μ g/ml, 5 unidades de ADN polimerasa I *Klenow*, 20 μ M de dATP, dGTP y dTTP, 50 μ Ci (333 nM) de α -³²P dCTP 3000 Ci/mmol y el *buffer* de marcación 5X, que contiene los oligonucleótidos iniciadores, en un volumen final de 50 μ l. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo incubando a 95°C por 2 min y agregando EDTA hasta obtener una concentración final 20 mM.

Las membranas se pre-hibridaron con *buffer* CHURCH (7% SDS, 1% BSA - fracción V-, 0,5 M NaHPO₄, pH 7,2, 1 mM EDTA, pH 8) en un horno de hibridación a 65°C. Luego de 2 h, se agregó la sonda marcada con radioisótopos y se incubó a 65°C durante toda la noche. La prehibridación, hibridación y lavados se llevaron a cabo con solución SSC 0,1x, conteniendo 0,2% SDS. Las bandas radioactivas se revelaron por exposición en placas radiográficas (Kodak) y en un *scanner* Storm 820 (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences). La cuantificación se realizó utilizando el software ImageQuant (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences).

12. Preparación de extractos de proteínas como fuente enzimática para reacciones de fosforilación.

Fracción de proteínas solubles (FPS): Se utilizaron 400 mg de tejido foliar de plantas infectadas con PVX, PVY o plantas no infectadas, homogeneizados en mortero con N₂ líquido. El tejido disgregado se resuspendió en 1 ml de *Buffer* H (fosfato de sodio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, PMSF 1 mM) frío suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, USA) según las indicaciones del fabricante. El homogenato se centrifugó a 1.000 x g durante 5 min a 4 °C, obteniéndose un *pellet* crudo de paredes celulares y un sobrenadante. El

sobrenadante se centrifugó nuevamente a 15.000 x g durante 30 min a 4°C, y se conservaron a -70°C hasta el momento de su utilización.

Fracción de proteínas asociadas a la pared celular (FPAPC): Para la purificación de la fracción de paredes celulares, el *pellet* de 1.000 x g se homogeneizó en 10 volúmenes de *Buffer H* suplementado con 2% Tritón X-100, y se centrifugó a 1.000 x g durante 5 min a 4 °C. Este procedimiento se repitió dos veces, seguido de cuatro lavados en *Buffer H* sin agregado de detergente. El *pellet* insoluble se resuspendió en *Buffer E* y se guardó a -70°C hasta el momento de su utilización.

13. Purificación parcial de actividad quinasa por cromatografía de afinidad en heparina-Sepharose.

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad a heparina. Se homogeneizó un total de 30 g de hojas de tabaco en mortero con N₂ líquido y se resuspendió el homogenato en *Buffer BM* (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaF 5 mM, EDTA 5 mM, PMSF 0,3 mM y glicerol 20 % [v/v]). Los extractos se centrifugaron por 30 min a 10.000 x g. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. El sobrenadante de centrifugación se adsorbió en 10 ml de Heparina-Sepharose (Sigma Aldrich, USA) por 1 h, a continuación se llevaron a cabo 5 lavados sucesivos con 40 ml de *Buffer CM* (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, 2-mercaptoetanol 5 mM y glicerol 5 % [v/v]). La elución se realizó con un gradiente lineal de 0 a 1.5 M NaCl en *Buffer CM*. Se colectaron fracciones de 2,5 ml que fueron conservadas a 4°C hasta el momento de su utilización.

14. Fosforilación de proteínas.

14.1 Ensayos de fosforilación *in vitro*

Para los ensayos de fosforilación *in vitro* se utilizaron las siguientes fuentes enzimáticas: subunidad alfa recombinante de CK2 de *N. tabacum* (rNtCK2, ver 9.2), 200 ng de proteína por reacción; CK2 de *N. tabacum* parcialmente purificada (ver sección 13), 300 ng por reacción, extractos frescos de proteínas preparados a partir de tejido de hojas (ver sección 12), 1 ug de proteína total por reacción. Las mezclas de reacción incluyeron Tris-HCl 20 mM, pH 8,2, MgCl₂ 5 mM ó MnCl₂ 5 mM y 1 µCi de ATP-γ-³²P (6.000 Ci/mmol; New England Nuclear) o GTP-γ-³²P (5.000 Ci/mmol;

Amersham Biosciences) en un volumen final de 30 μ l. Las reacciones se desarrollaron en presencia o ausencia de heparina, polilisina, ATP o GTP no radioactivos en las concentraciones indicadas. Se adicionaron según el caso los sustratos rTGBp1 0,5-1 μ g, caseína desfosforilada 1-2 μ g (C4032; Sigma-Aldrich, USA), o péptido sustrato específico de CK2 1 mM (C2460; Sigma-Aldrich, USA). Se utilizó además un inhibidor de fosfatasa de plantas en la concentración indicada por el fabricante (Sigma-Aldrich, USA). Las reacciones se incubaron durante 10 minutos a 28°C. Las reacciones fueron terminadas por adición de EDTA (50 nM concentración final) y/o 10 μ l de *buffer* de siembra de proteínas.

14.2 Ensayos de fosforilación *in situ*

Se prepararon extractos de proteínas a partir de hojas de plantas infectadas con PVX y no infectadas. El tejido disgregado en N2 líquido se resuspendió en 1 ml de *Buffer H* (fosfato de sodio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, PMSF 1 mM) frío suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, USA) según las indicaciones del fabricante. El homogenato se centrifugó a 1.000 x g durante 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se fraccionó el extracto obtenido para incubar aproximadamente 400 μ g de proteína total soluble durante 30 min a 28°C en presencia de 5 mM MgCl₂ y 100 μ Ci de ATP- γ -³²P (6.000 Ci/mmol; New England Nuclear) sin agregados adicionales, o en presencia de 100 μ M ATP frío, o 100 μ M GTP frío o 10 μ M polilisina en un volumen final de 100 μ l. Las reacciones se terminaron con la adición de EGTA (10 mM, concentración final). Para la inmunoprecipitación las reacciones se diluyeron adicionando 900 μ l del *buffer* de Inmunoprecipitación (50 mM TrisHCl, pH 7,4, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF y 10 μ l/ml inhibidores de proteasas) suplementado con 1% Tritón X-100. El primer anticuerpo, anti-TGBp1 o pre-inmune, se adicionó en una dilución de 1:100; y se incubó con agitación durante 2 h a 4°C. Paralelamente, se equilibró la proteína A (Sigma-Aldrich, USA) en *buffer* de inmunoprecipitación suplementado con 1% Tritón X-100 y se agregó a las reacciones. Se incubó por 2 h en las condiciones descritas. Las muestras se centrifugaron a 1.500 x g por 2 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con *buffer* de inmunoprecipitación suplementado con 1% Tritón X-100. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS de 15%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se revelaron por autorradiografía y por *Western blot* con anticuerpos específicos anti-TGBp1 y/o anti-CP de PVX.

15. Electroforesis de proteínas en geles bidimensionales

15.1 Preparación del extracto de proteínas a partir de tejido de hojas de plantas no infectadas

Se homogeneizó 1 g de tejido foliar en un mortero con N₂ líquido, y se resuspendió el homogenato en 10 ml de *Buffer* de Extracción TCA (ácido tricloroacético al 10% en acetona [v/v], β-mercaptoetanol 2% [v/v]). Se incubó durante 16 h a - 20°C. Se centrifugó a 5.000 x g por 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, y se lavó el *pellet* con 10 ml de acetona 100% (fría). Se centrifugó a 5.000 x g por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se secó el *pellet* a temperatura ambiente. Aproximadamente 100 - 200 µg de proteína total de tejido de hojas no infectadas se resuspendieron en *buffer* de isoelectroenfoque (IEF) (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, Tritón X-100 2%, anfolitos 0,5%; DTT 60 mM) y se incubaron por 1 h a 37°C. Transcurrido este período, se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min y se conservó el sobrenadante.

15.2 Tratamiento de desfosforilación de proteínas totales en extractos de hojas infectadas por PVX

El tejido foliar de plantas infectadas por PVX se homogeneizó en mortero con N₂ líquido en el *buffer* Desfosforilación (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, ditioneitol 2 mM, Brij 35 0,01%, MnCl₂ 1 mM), compatible con el *buffer* recomendado para la reacción de desfosforilación con fosfatasa Lambda (NEB). El homogenato se centrifugó a 1.000 x g durante 5 min a 4°C. La reacción de desfosforilación se llevó a cabo incubando 200 µg de proteína total con 200 U de fosfatasa Lambda (NEB) y 200 U de fosfatasa alcalina (Promega), en las condiciones recomendadas por el fabricante de la enzima fosfatasa Lambda (NEB), en un volumen final de 100 µl. La reacción se incubó durante 30 min a 30°C. Una cantidad equivalente de proteína total se incubó de manera similar, sin el agregado de enzimas fosfatasas. Finalizado el tiempo de incubación, se incremento 5 veces el volumen final de la reacción y se adicionó TCA (ácido tricloroacético) hasta alcanzar una concentración final de 10%. Luego de incubar durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm. El *pellet* se lavó por agregado de 1 volumen de acetona 100% y luego de centrifugar

durante 5 min a 13.000 rpm, se reiteró el lavado del *pellet* con acetona 80% en agua. El *pellet* se secó a temperatura ambiente. Aproximadamente 100-200 µg de proteína total se resuspendieron en *buffer* de isoelectroenfoque (IEF) (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, Tritón X-100 2%, anfolitos 0,5%; DTT 60 mM) y se incubaron por 1 h a 37°C. Transcurrido este período, se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min y se conservó el sobrenadante.

15.3 Separación de proteínas en geles bidimensionales

El equipamiento para la electroforesis en dos dimensiones y los reactivos descritos corresponden a la línea Ethan IPG-phor (*GE Healthcare*) y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las tiras comerciales polimerizadas con un gradiente de pH 3-10 no lineal (*Inmobiline DryStrip, GE Healthcare, USA*) se descongelaron durante 15 min a temperatura ambiente, y se cargaron con los sobrenadantes obtenidos en 15.1 y 15.2 siguiendo el procedimiento de rehidratación especificado por el fabricante. Las tiras cargadas se cubrieron con aceite mineral para evitar la desecación y se incubaron a 30°C durante toda la noche.

Luego, se efectuó la separación por isoelectroenfoque utilizando los parámetros sugeridos por el fabricante para las tiras de punto isoeléctrico (pI) 3-10 NL (no lineal) a una temperatura de corrida de 20°C. El programa constó con los siguientes pasos: Paso 1, 500 V por 30 min; Paso 2, 1.000 V por 30 min; y Paso 3, 5.000 V por 100 min, o hasta un total de 8.000 V. Finalizado el proceso, las tiras se guardaron a -70°C hasta el momento de su utilización.

Previamente a la resolución en la segunda dimensión, las tiras IPG se equilibraron con 4 ml de *buffer* Eq (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,01%) suplementado con 40 mg de DTT sólido, con agitación por 1 h a temperatura ambiente. Luego, se traspasó la tira de IPG a un tubo con 4 ml de *buffer* Eq suplementado con 225 mg de iodoacetamida sólida y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Las tiras de IPG se sembraron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de 15%. Se realizó la electroforesis de proteínas en las condiciones descritas anteriormente. Los geles de proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa según se describió.

16. Determinación de fosfoaminoácidos

Se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* de la proteína rTGBp1 incubandola con extractos de hojas de *N. tabacum* infectadas con PVX y no infectadas en presencia de ATP- γ - ^{32}P . Los productos de las reacciones se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de 15% y se transfirieron a membranas de polivinil dieno fluorado (PVDF Hybond-P, *GE Healthcare*). Las membranas se sometieron a autoradiografía durante 12 h. Las bandas radioactivas se cortaron de la membrana y se sometieron a un tratamiento de hidrólisis en HCl 6 N a 110°C por 60 min. Cada muestra fue liofilizada y resuspendida en *buffer* que contenía 0,5% (v/v) de piridina y ácido acético glacial 0.87 M, pH 3,5 y 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de estándares de fosfoaminoácidos no radioactivos. Finalmente, se las muestras se sembraron sobre una placa de TLC celulosa y se efectuó la electroforesis en capa delgada durante 90 min a 350 V y en el mismo *buffer*. Los estándares se visualizaron aplicando sobre la placa una solución de 0,25% [p/v] de nihidrina/acetona y calentando a la misma a 80°C. La detección de los fosfoaminoácidos radioactivos se realizó mediante autorradiografía.

17. Ensayos de agroinfiltración

Se inocularon 3 ml de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) suplementado con los antibióticos adecuados con las agrobacterias transformadas con los plásmidos de interés. Los cultivos se mantuvieron durante 16 h a 28°C con agitación y se utilizaron para inocular 10 ml de medio LB suplementado con los antibióticos adecuados, en una dilución 1:100. Los subcultivos se incubaron en las condiciones mencionadas hasta alcanzar una DO600 de entre 0,6-1,0 y se centrifugaron a 3.500 x g por 10 min. En el caso de la co-agroinfiltraciones se combinaron los cultivos de *A. tumefaciens* en partes iguales. Las células precipitadas se resuspendieron en agua deionizada a una DO600 final de 0,5. Para la agroinfiltración, se seleccionaron hojas expandidas y en buen estado, con una longitud no inferior a los 4 cm. Con la ayuda de una jeringa (sin aguja) se infiltraron dos hojas completas en cada una de las plantas. Las plantas se mantuvieron en las cámaras acondicionadas descriptas en la sección 1. Se tomaron muestras de tejido de hojas inoculadas y sistémicas utilizando como sacabocado la tapa de un tubo *Eppendorf* (~15 mg de tejido). Se descartaron las zonas de tejido con signos de necrosis y/o

daño. Se homogeneizaron aproximadamente 30 mg de tejido foliar en 100 μ l de *buffer* de extracción de proteínas (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, EDTA- Na_2 10 mM, PMSF 1 mM). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976) utilizando un *kit* comercial (Sigma-Aldrich, USA). Se empleó albúmina bovina fracción V (Sigma-Aldrich, USA) como proteína de referencia. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína total en geles desnaturizantes de poliacrilamida 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

18. Ensayos de actividad de hidrólisis de ATP

Las reacciones de hidrólisis de ATP se efectuaron incubando las proteínas recombinantes (100-500 ng) con 1 μ Ci ATP- γ - ^{32}P (6.000 Ci/mmol) en *buffer* RH (Tris-HCl 10 mM, pH 8, glicerol 10%, MgCl_2 5 mM, DTT 1 mM); en 10 μ l de volumen final. Las incubaciones se realizaron durante 1 h a 37°C y se finalizaron agregando de EDTA a una concentración final de 20 mM. El ATP no hidrolizado se precipitó agregando 200 μ l de 7,5% de carbón activado en HCl 50 mM/ H_3PO_4 5 mM. La mezcla se agitó en Vortex durante 10 seg y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 13.000 x g y se recogió el sobrenadante. Se tomaron 20 μ l del mismo y se depositaron sobre papel tipo Whatman. Los papeles se secaron a temperatura ambiente, se colocaron en un vial y se aplicó líquido de centelleo. Se estimó el ^{32}P liberado en un contador de centelleo líquido.

19. Análisis por espectrometría de masa.

Se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* de la proteína rTGBp1 con rNtCK2 en condiciones similares a las descritas en la sección 14.1, donde se reemplazó el ATP- γ - ^{32}P por ATP (no radioactivo) 50 μ M. La reacción se llevó a cabo en las condiciones descritas en la misma sección. Una vez finalizada se sembró en un gel desnaturizante de poliacrilamida 15% que luego fue tenido con Solución de *Coomassie Brilliant Blue*. La banda de proteína correspondiente a rTGBp1 se cortó del gel y se destiñó. El análisis de espectrometría de masa fue realizado por el *Scripps Center for Mass Spectrometry* (California, USA).

20. Herramientas de bioinformática y análisis estadístico de datos

Los alineamientos de secuencias nucleótídicas y aminoacídicas se efectuaron con el programa ClustalW2, utilizando el servidor EMBL-EBI [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sequence.html>]. La edición de los alineamientos se realizó con el programa JalView [<http://www.jalview.org/>] (Waterhouse *et al.*, 2009).

Para el análisis de las secuencias de TGBp1 presentado en las Figuras 30 y 33, puntos 9 y 10 de Resultados, se utilizaron las siguientes secuencias de secuencias:

Virus	Género	UniProtKB TrEMBL	NCBI	
			Genomic ID	Gene ID
Bamboo Mosaic Virus	Potexvirus	Q65007	D26017.1	1497255
Cactus Virus X	Potexvirus	Q91ND6	AF308158.2	2948592
Foxtail mosaic virus	Potexvirus	P22169	M62730.1	1494010
White clover mosaic virus	Potexvirus	P09499	X06728.1	944398
Cassava common mosaic virus	Potexvirus	Q65975	U23414.1	1403442
Cymbidium mosaic virus	Potexvirus	Q4LEP2	AF206274.1	6581101
Narcissus mosaic virus	Potexvirus	P15096	D13747.1	1494020
Papaya mosaic virus	Potexvirus	P20952	D13957.1	1494024
Plantago asiatica mosaic virus	Potexvirus	Q07517	Z21647.1	944433
Pepino mosaic virus	Potexvirus	Q8JSN3	AF484251.1	951225
Mint virus X	Potexvirus	Q5G7H2	AY789138.1	5076488
Opuntia virus X	Potexvirus	Q6UNI0	AY366209.1	2943442
Allium virus X	Potexvirus	C0L9E2	FJ670570.1	7559136
Tulip virus X	Potexvirus	Q8BF55	AB066288.1	955712
Garlic virus E	Allexivirus	Q8QXW4	AJ292230.1	949153
Shallot virus X	Allexivirus	Q04581	M97264.1	944365
Garlic virus C	Allexivirus	O55602	AB010302.1	932222
Garlic virus A	Allexivirus	O55598	AB010300.1	932227
Garlic virus X	Allexivirus	O09499	U89243.1	1461233
Poplar mosaic virus	Carlavirus	Q02109	X65102.2	CAH55774.1
Potato virus S	Carlavirus	Q4A3R0	AJ863509.1	3562576
Garlic latent virus	Carlavirus	Q8QXY7	AJ292226.1	940165
Potato virus M	Carlavirus	P17526	D14449.2	1493993
Chrysanthemum virus B	Carlavirus	P37988	S60150.1	AAB20077.1
Potato latent virus	Carlavirus	B6RTB1	EU433397.2	7012351
Red clover vein mosaic virus	Carlavirus	C0L9E9	FJ685618.1	7559129
Indian citrus ringspot virus	Mandarivirus	Q918W2	AF406744.1	922108
Apple stem pitting virus	Foveavirus	Q64963	D21829.1	935273
Rupestris stem pitting-associated virus	Foveavirus	O91902	AF057136.1	2615849

El análisis de las secuencias aminoacídicas de la subunidad catalítica alfa de CK2 de *N. tabacum*, incluyó las secuencias CK2A (AF374474); CK2A1 (AJ437635),

CK2A2 (AJ438264), CK2A3 (AJ438263), NtCK2a1 (AB077050); NtCK2a2 (AB077051.1) y NtCK2a3 (AB077051.2). La secuencia de subunidad catalítica alfa de CK2 de *N. tabacum* clonada en este trabajo fue anotada en la base de datos del GenBank bajo el código EU555192.

El análisis *in silico* de predicción de sitios de fosforilación se llevó a cabo utilizando los programas NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>; Blom *et al.*, 1999); DisPhos (<http://phospho.elm.eu.org/>; Diella *et al.*, 2004), Scansite (http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml; Obenauer *et al.*, 2003), GPS (<http://gps.biocuckoo.org/>; Xue *et al.*, 2008) y KinasePhos 2.0 (<http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw/>; Wong *et al.*, 2007).

Para la estimación de la variación del pI en función del número de grupos fosfato, se utilizó la aplicación ProMost (<http://proteomics.mcw.edu/promost>; Halligan *et al.*, 2004).

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Software (San Diego, California). Las comparaciones estadísticas se realizaron por análisis de varianza. Se utilizó el test de *Dunnnett* para comparar los datos de las proteínas mutantes con la referencia (rTGBp1), con un intervalo de confianza del 95%.

21. Medios de cultivo y soluciones

LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L)

Solución de Resuspensión (Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 10 mM, ribonucleasa A 100 µg/ml)

Solución de Lisis (NaOH 200 mM, SDS 1%)

Solución de Neutralización (acetato de potasio 3 M, pH 5,5)

TAE 10x (Tris-ácido acético 400 mM, EDTA disódico 10 mM)

TAE 1x (Tris-ácido acético 40 mM, pH 8, EDTA disódico 2 mM)

Buffer de siembra de ADN (glicerol 5 %, azul de bromofenol 0,1 %)

MOPS 1X (MOPS 10X: MOPS 0,2 M, acetato de sodio 0,05 M, EDTA disódico 0,01 M, pH 7)

SSC 10X (NaCl 1,5 M, citrato de sodio 0,15 M, pH 7)

Buffer CHURCH (SDS 7%, BSA fracción V 1%, NaHPO₄ 0,5 M, pH 7,2, EDTA 1 mM, pH 8)

Buffer de siembra de proteínas 5x (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 0,5%, glicerol 5%, β -mercaptoetanol 1% v/v, azul de bromofenol 0,05 mg/ml)

Buffer de corrida SDS-PAGE (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; glicina 190 mM y SDS 0,1%)

Solución de *Coomassie Brilliant Blue* (CBB R250 0,05%, metanol 40%, ácido acético 10%)

Buffer Desfosforilación (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, ditioneitol 2 mM, Brij 35 0,01%, $MnCl_2$ 1 mM).

Buffer de electrotransferencia (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicina 196 mM, metanol 20%)

Buffer TTBS (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% v/v)

Buffer TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM)

Buffer fosfatasa (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM)

Buffer de inmunoprecipitación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, inhibidores de proteasas 10 μ l/ml)

Buffer de extracción de proteínas (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, EDTA- Na_2 10 mM, PMSF 1 mM)

Buffer TN (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 50 mM)

Buffer TNU (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 50 mM, urea 8 M)

Buffer H (fosfato de sodio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, PMSF 1 mM)

Buffer BM (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaF 5 mM, EDTA 5 mM, PMSF 0,3 mM, glicerol 20% [v/v])

Buffer CM (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, 2-mercaptoetanol 5 mM, glicerol 5% [v/v])

Buffer RH (Tris-HCl 10 mM, pH 8, glicerol 10%, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 1 mM)

Buffer Eq (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,01%)

Buffer IEF (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, Tritón X-100 2%, anfolitos 0,5%, DTT 60 mM)

IV.RESULTADOS

1. Producción de proteína recombinante TGBp1

Como primer paso, se abordó la construcción de un vector para la expresión de la proteína TGBp1 en *E. coli*. En la Figura 10 se presente un diagrama de la estrategia utilizada. En primer lugar se amplificó por PCR la secuencia de la proteína TGBp1 a partir de un clon de ADNc infectivo de la cepa CP2 de PVX previamente aislado en nuestro laboratorio (Orman *et al.*, 1990, Calamante *et al.*, 1998). El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector intermediario pZERO y luego en el vector de expresión bacteriana pET28a(+). La construcción resultante (pET-TGBp1) permite la expresión de la proteína recombinante TGBp1 fusionada en el extremo amino-terminal a una secuencia de 6 residuos de histidina (en adelante se denominada rTGBp1).

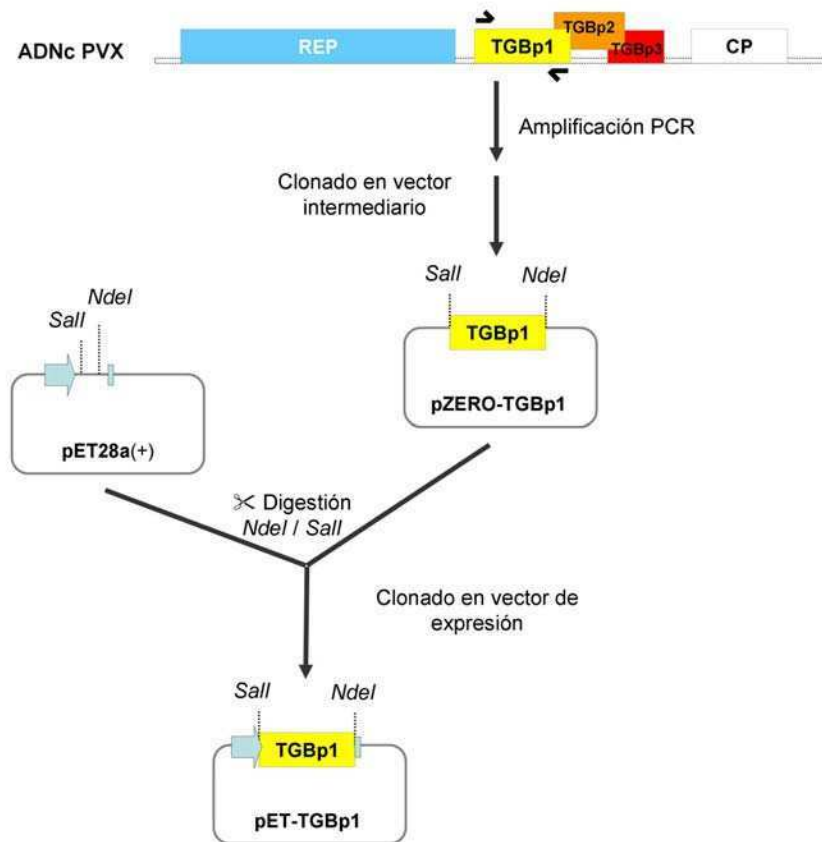


Figura 10. Diagrama de la estrategia de clonado del ORF2 de PVX en el vector de expresión bacteriana pET28a(+).

El plásmido pET-TGBp1 se transformó en la cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3). En primer lugar, se evaluó la expresión de la proteína recombinante rTGBp1 por agregado de IPTG. Se tomaron muestras del cultivo de bacterias transformadas, luego de 3 y 6 h post-inducción. A partir de las muestras se extrajeron proteínas totales que se fraccionaron por centrifugación en fracciones de sobrenadante y precipitado, correspondientes a las proteínas solubles e insolubles, respectivamente. Cantidades equivalentes de proteína de cada una de las fracciones se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15% y se revelaron por tinción con solución de *Coomassie Brilliant Blue* R250 (CBB). En la **Figura 11** se presenta el perfil de expresión de la proteína rTGBp1. El tratamiento con IPTG indujo la expresión de un polipéptido de aproximadamente 24 kDa, que presenta el tamaño esperado para la proteína rTGBp1. Como puede observarse la proteína se expresa en forma insoluble (**Fig. 11**, comparar calles 2 y 3 con calles 5 y 6) y los mayores niveles se alcanzan luego de un período de incubación de 6 h a 37 °C.

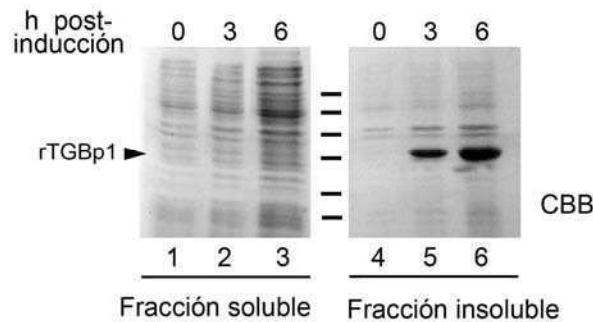


Figura 11. Perfil de expresión de la proteína recombinante rTGBp1. Se extrajeron proteínas totales a partir de alícuotas de un cultivo bacteriano portador del plásmido pET-TGBp1 inducido con IPTG. Los extractos proteicos se fraccionaron en proteínas solubles e insolubles; se sembraron cantidades equivalentes de proteínas totales en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15 % y se tiñeron con CBB. Los marcadores de peso molecular corresponden a 61, 47, 37, 24, 19 y 12 kDa

Con el fin de aumentar los niveles de rTGBp1 en la fracción de proteínas solubles, se llevaron a cabo diferentes modificaciones sobre el protocolo de expresión que incluyeron, entre otras la incubación del cultivo inducido con IPTG a 28 °C y la modificación de la cepa de expresión utilizada. Alternativamente, se

evaluó la utilización de sistemas de expresión de proteínas de fusión a GST (glutación-S-transferasa) y a thiorredoxina, ampliamente utilizadas para aumentar solubilidad de las proteínas recombinantes (Yu *et al.*, 2006; Yasukawa *et al.*, 1995). En todos los casos, la proteína recombinante TGBp1 se recuperó en la fracción insoluble (datos no mostrados). Diversas evidencias señalan que las proteínas TGBp1 forman cuerpos de inclusión en sistemas de expresión recombinante en *E. coli*, probablemente como resultado de la capacidad de las proteínas TGBp1 de interactuar consigo mismas formando oligómeros (Liou *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2008; Leschiner *et al.*, 2008). Teniendo estos antecedentes en cuenta se decidió utilizar el protocolo optimizado para la expresión de TGBp1 fusionado a la secuencia de 6 histidinas (**Figura 11**).

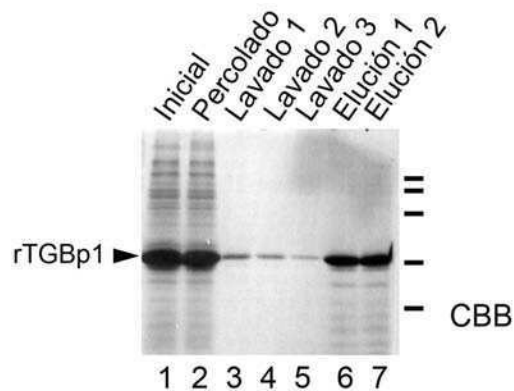


Figura 12. Perfil de purificación en condiciones desnaturizantes de la proteína recombinante rTGBp1. Alícuotas de las distintas fracciones evaluadas durante el proceso de purificación fueron resueltas en geles de desnaturizantes de poliacrilamida 15 %. Los geles se tiñeron con CBB. Los marcadores de peso molecular corresponden a 61, 47, 37, 24 y 19 kDa.

La purificación de la proteína rTGBp1 se llevó a cabo a partir de la fracción insoluble bajo condiciones desnaturizantes y la proteína purificada fue renaturalizada por diálisis. Este mismo protocolo de purificación fue utilizado con éxito por otros autores para estudiar la actividad helicasa y ATPasa de la proteína recombinante TGBp1 (Kalinina *et al.*, 1996; Bayne *et al.*, 2005). Brevemente, se extrajeron las proteínas presentes en la fracción insoluble, mediante un tratamiento con urea 8M. Las muestras desnaturizadas se purificaron por cromatografía de afinidad por níquel en presencia de urea 8M. En la **Figura 12** se

muestra una marcha de purificación típica. Los altos niveles de proteína rTGBp1 presentes en las fracciones de percolado (**Fig. 12**, calle 2) y de lavados (**Fig. 12**, calles 3-5), sugieren que la interacción entre la proteína desnaturalizada y la resina de níquel es débil. Debido a los altos niveles de expresión obtenidos, fue posible purificar rTGBp1 en cantidades considerables. Las fracciones se dializaron sucesivamente a fin de eliminar el contenido de urea, y permitir la renaturalización de las proteínas.

2. Fosforilación *in vitro* de rTGBp1 con la fracción de proteínas solubles de hojas de *N. tabacum* infectadas con PVX y de hojas no infectadas

Con el objetivo de determinar si la proteína TGBp1 del *Potato virus X* es blanco de fosforilación de quinasas celulares, se evaluó la fosforilación *in vitro* de la proteína rTGBp1 por actividades enzimática presentes en extractos de hojas de *N. tabacum* no infectadas e infectadas con PVX.

Trabajos previos sobre fosforilación de proteínas de movimiento viral por extractos vegetales habían reportado la presencia de proteínas quinasas, tanto en fracciones solubles como en fracciones enriquecidas en pared celular (Citovsky *et al.*, 1993; Waigmann *et al.*, 2000; Karpova *et al.*, 2002; Matushita *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). Por esta razón, se decidió investigar la presencia de actividades de fosforilación de rTGBp1 en ambas fracciones. Como fuentes de actividad enzimática, se utilizaron extractos proteicos de plantas de *N. tabacum* infectadas con PVX y de plantas no infectadas. La preparación de estos extractos se describe en detalle en Materiales y Métodos. En la **Figura 13** se esquematiza el procedimiento para la obtención de cada una de las fracciones mencionadas. Brevemente, el tejido foliar se homogeneizó con N₂ líquido, se resuspendió el homogenato resultante en *Buffer H* y se centrifugó a baja velocidad. El sobrenadante se sometió a una nueva centrifugación a máxima velocidad, dando lugar a la fracción de proteínas celulares solubles (FPS). El precipitado fue tratado siguiendo un protocolo utilizado para la obtención de extractos enriquecidos en pared celular dando lugar a la fracción de proteínas asociadas a pared celular (FPAPC) (Waigmann *et al.*, 2000).

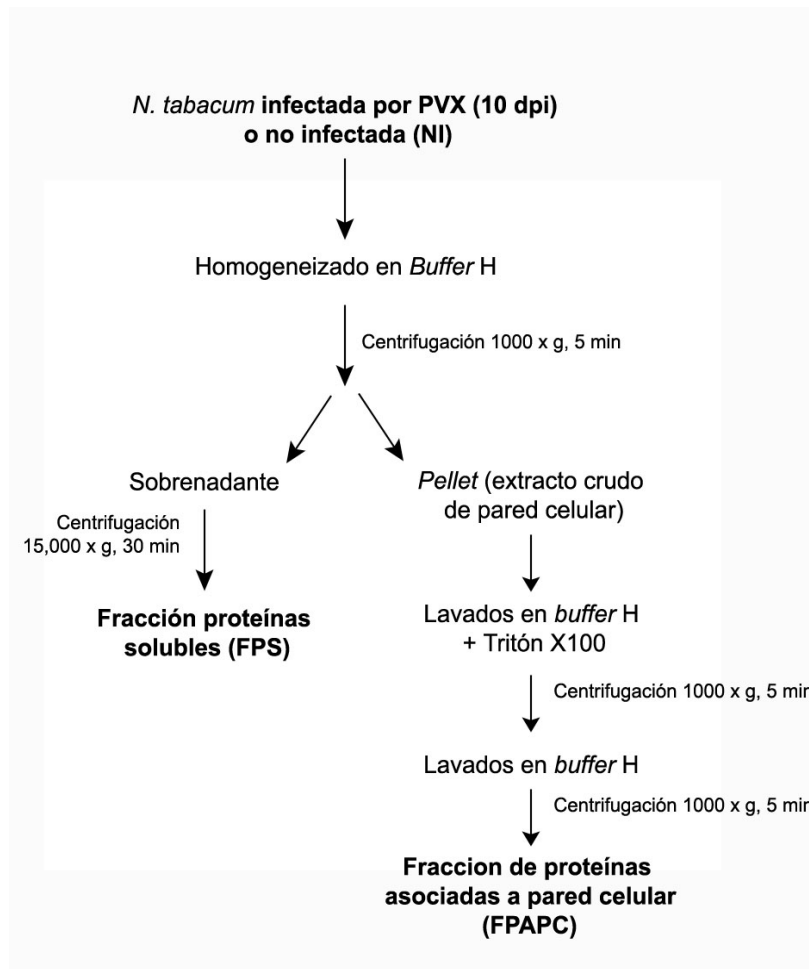


Figura 13. Esquema del procedimiento para la obtención de las fracciones de proteínas utilizadas como fuentes de actividad enzimática en ensayos de fosforilación. Los detalles del protocolo se indican en la sección de Materiales y Métodos.

Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo incubando rTGBp1 purificada en presencia de ATP- γ - ^{32}P y la FPS, obtenida a partir de hojas de *N. tabacum* no infectadas (NI) o infectadas con PVX (PVX). Luego de la incubación, los productos de reacción se resolvieron en geles desnaturantes de poliacrilamida 15 % y se tiñeron con CBB. A continuación, los geles fueron secados y sometidos a autorradiografía. Como se observa en la **Figura 14** (calles 2 y 4), la proteína rTGBp1 es fosforilada por una o más quinasas celulares presentes tanto en la FPS de plantas infectadas (PVX) como no infectadas (NI). El control negativo consistió en incubaciones de las fracciones proteicas sin el agregado de rTGBp1. En este caso, se confirmó la ausencia de otras proteínas fosforiladas en el peso molecular correspondiente a rTGBp1, sin embargo se observó la presencia de proteínas endógenas fosforiladas (**Fig. 14**; calles 3 y 4). El

nivel de fosforilación de rTGBp1 fue de 3 a 6 veces superior en la FPS de plantas infectadas con PVX respecto de la FPS de plantas no infectadas. Este resultado no puede atribuirse a la fosforilación de la TGBp1 producida durante la infección viral, dado que en el control de reacción de la FPS de plantas infectadas con PVX no se observan proteínas fosforiladas en la posición correspondiente a TGBp1 (**Fig. 14**, calle 3). Por último, no se detectaron bandas radioactivas cuando rTGBp1 se incubó con ATP- γ - 32 P sin la adición de extracto enzimático (**Fig. 14**; calle 1), descartando así la presencia de otras proteínas fosforilables en la fracción de rTGBp1 purificada.

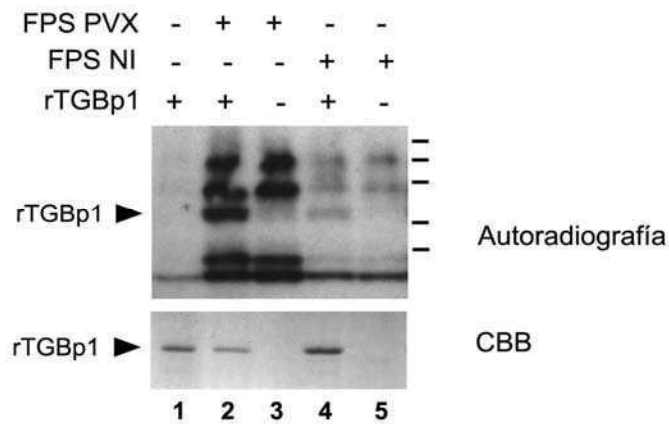


Figura 14. Fosforilación de rTGBp1 por quinasas celulares presentes en la FPS de plantas de *N. tabacum* infectadas con PVX y de hojas no infectadas. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de ATP- γ - 32 P y 5mM MgCl₂. Los productos se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15%, se tiñeron con CBB (panel inferior) y se detectaron mediante autorradiografía (panel superior). *Calle 1*: TGBp1 recombinante (rTGBp1), en ausencia de la FPS; calles 2 y 4: rTGBp1 incubada con FPS de plantas PVX y NI; calles 3 y 5: incubaciones de FPS de plantas PVX y NI sin el agregado de rTGBp1. Los marcadores de peso molecular señalados a la derecha del panel superior corresponden a 61, 47, 37, 24 y 19 kDa.

Por su parte, los ensayos de fosforilación realizados con la FPAPC no permitieron detectar fosforilación específica de rTGBp1 (datos no mostrados). Los resultados de los ensayos con FPS demuestran que rTGBp1 es fosforilada por una o más quinasas celulares solubles, cuya actividad se encuentra incrementada en plantas infectadas con PVX.

Para analizar si la fosforilación de la proteína rTGBp1 es una respuesta propia de la infección por el virus PVX, o está asociada a una respuesta general

de la planta a virus, se comparó la fosforilación *in vitro* de la proteína rTGBp1 por quinasas de proteínas presentes en FPS de hojas de *N. tabacum* infectadas con PVX, o FPS de hojas de *N. tabacum* infectadas con el virus *Potato Virus Y* (PVY).

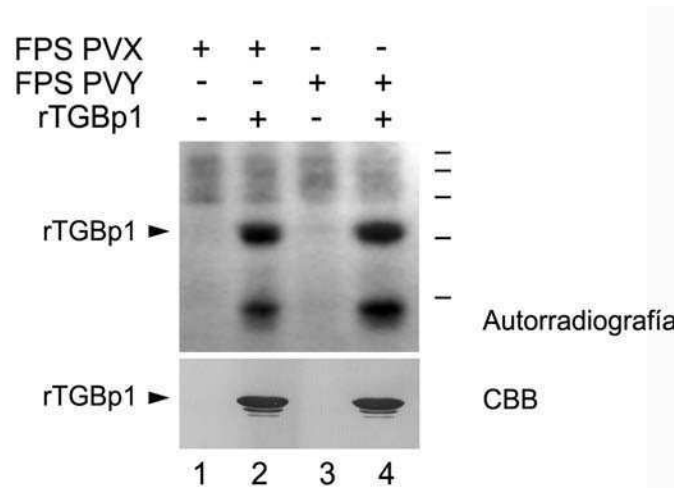


Figura 15. Fosforilación de rTGBp1 por quinasas celulares presentes en la FPS de hojas de tabaco infectadas con PVX y FPS de hojas infectadas con PVY. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de ATP- γ - 32 P y 5mM MgCl₂. Los productos se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15%, se tiñeron con CBB (panel inferior) y se detectaron mediante una autorradiografía (panel superior). Calles 1 y 3: incubaciones de extractos de plantas sin el agregado de rTGBp1; calles 2 y 4: rTGBp1 incubada con extractos de plantas infectadas. Los marcadores de peso molecular señalados a la derecha del panel superior corresponden a 61, 47, 37, 24 y 19 kDa.

Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo incubando rTGBp1 purificada en presencia de ATP- γ - 32 P y FPS, tal como se describió anteriormente. Como se observa en la **Figura 15** (calles 2 y 4), la proteína rTGBp1 es fosforilada por proteínas quinasas celulares presentes tanto en la FPS de hojas de plantas infectadas con PVX, como en aquellas hojas de plantas infectadas con PVY. Tal como en el ensayo anterior en las reacciones control de FPS incubadas en ausencia de rTGBp1, se observó la presencia de proteínas endógenas fosforiladas. El nivel de fosforilación de rTGBp1 resultó similar al utilizar como fuente de actividad enzimática la FPS de plantas infectadas con PVX, o plantas infectadas con PVY.

3. Caracterización de la actividad quinasa de rTGBp1 presente en la fracción de proteínas solubles de hojas de *N. tabacum* infectadas con PVX y de hojas no infectadas

Con el fin de caracterizar la/s quinasa/s solubles que fosforilan a rTGBp1, se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* con la FPS de plantas infectadas con PVX y de plantas no infectadas en presencia de distintos inhibidores o estimuladores específicos. Con la finalidad de determinar la participación de quinasas dependientes de Ca^{2+} , se llevaron a cabo ensayos de fosforilación en presencia de EGTA o Ca^{2+} .

Como se observa en la **Figura 16** no se registró estimulación de la actividad en presencia de Ca^{2+} cuando las FPS de plantas no infectadas e infectadas con PVX fueron utilizadas como fuente de enzima (comparar calles 1 y 4; y calles 12 y 15, respectivamente). Consistentemente con este resultado e indistintamente de la fuente de enzima utilizada, no se observó una disminución en el nivel de fosforilación al agregar EGTA en las reacciones (comparar calles 1 y 5; y calles 12 y 16). Estos resultados sugieren que en la fosforilación de rTGBp1 no se encuentran implicadas quinasas dependientes de Ca^{2+} .

Por otra parte, se llevaron a cabo ensayos de fosforilación en presencia de estaurosporina, un potente inhibidor de proteínas quinasas de baja selectividad (Ruegg and Burgess, 1989). Aún cuando este inhibidor suele ser efectivo en un rango de concentraciones a escala nanomolar, la fosforilación de rTGBp1 por la FPS de plantas infectadas con PVX y no infectadas no resultó inhibida en presencia de 0,25 y 1 mM de estaurosporina (**Fig. 16**, comparar calles 2 y 3 con 1; y calles 13 y 14 con 12). Esto podría indicar que la fosforilación de rTGBp1 puede ser mediada por quinasas parcialmente resistentes a este inhibidor, como son las quinasas CK1 y CK2 (Meggio *et al.*, 1995; Battistutta, 2009).

Dado que existían algunos antecedentes en la literatura sobre fosforilación de proteínas de movimiento virales por quinasas de tipo CK1 y CK2, decidimos focalizar el análisis en esta dirección. Para ello, se llevaron a cabo reacciones de fosforilación *in vitro* con rTGBp1 y la FPS de plantas infectadas con PVX y de plantas no infectadas suplementadas con heparina, un inhibidor específico de ambas familias de quinasas (Vaglio *et al.*, 1996; Guerra *et al.*, 1999). Como se

muestra en la **Figura 16**, la fosforilación de rTGBp1 por la FPS de hojas infectadas (calles 19 y 20) y no infectadas (calles 8 y 9), fue parcialmente inhibida por heparina.

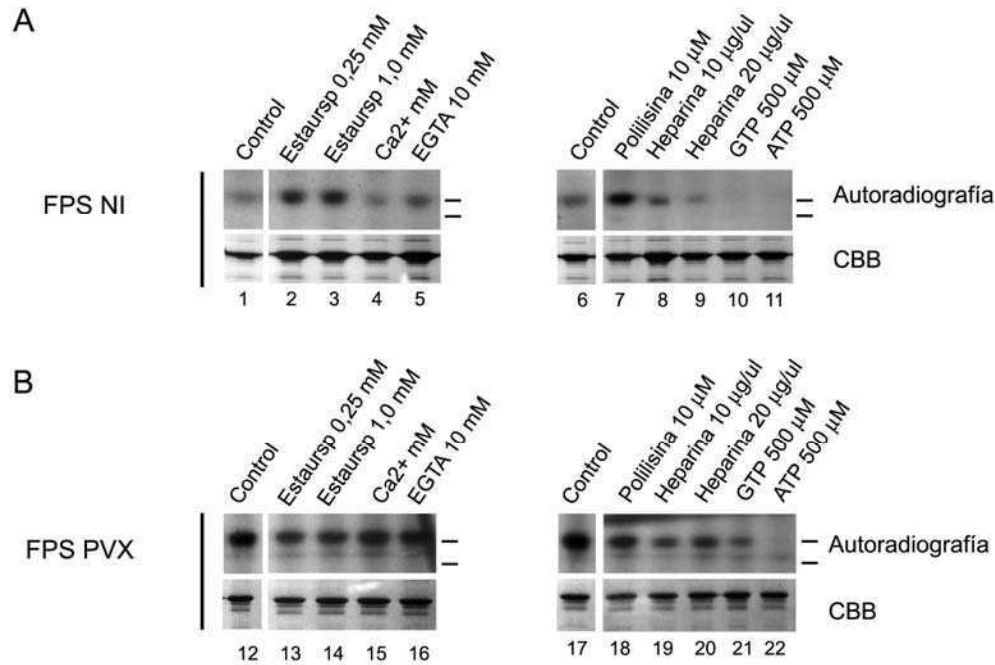


Figura 16. Fosforilación de la proteína recombinante rTGBp1 *in vitro* por una quinasa de tabaco de tipo CK2. La proteína recombinante purificada se incubó con (A) la FPS de plantas no infectadas o (B) de plantas infectadas con PVX, con ATP- γ - 32 P sin agregados (calles 1 y 12); o en presencia de 0,25 mM (calles 2 y 13) y 1 mM estaurosporina (calles 3 y 14), 2 mM Ca^{2+} (calles 4 y 15), 10 mM EGTA (calles 5 y 16), 10 μM polilisina (calles 7 y 18), 10 $\mu\text{g/ml}$ (calles 8 y 19) y 20 $\mu\text{g/ml}$ heparina (calles 9 y 20), 500 μM GTP (calles 10 y 21), 100 μM ATP (calles 11 y 22). Los productos de reacción fueron resueltos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15 %, teñidos con CBB (paneles inferiores) y detectados por autorradiografía (paneles superiores). A la derecha de los paneles se indica la posición de los marcadores de peso molecular correspondientes a 27 y 19 kDa.

Una de las características propias de las quinasas CK2 es la estimulación que experimentan en presencia de polilisina (Leroy *et al.*, 1995; Meggio and Pinna, 2003). Como se observa en la **Figura 16**, el agregado de polilisina 10 μM incrementa entre 3 y 4 veces el nivel fosforilación relativa de rTGBp1 cuando se emplea la FPS de plantas no infectadas (comparar calles 6 y 7). Por el contrario, no se observó un aumento de la fosforilación de TGBp1 al ensayar la FPS de plantas infectadas con PVX (**Fig. 16**, comparar calles 17 y 18). Este resultado podría deberse a los altos niveles de fosforilación observados en la reacciones

control de plantas infectadas con PVX, lo cual podría dificultar la detección de aumentos en la fosforilación

Una de las principales características que distinguen a las actividades de las quinasas CK1 y CK2, es la capacidad de CK2 de utilizar GTP como dador de grupo fosforilo (Wang *et al.*, 1992; Allende and Allende, 1995; Klimczak *et al.*, 1995b; Antonelli *et al.*, 1996; Niefind *et al.*, 1999; Knippschild *et al.*, 2005). Con el fin de estudiar si la quinasa celular que fosforila rTGBp1 es capaz de utilizar GTP, se efectuaron ensayos de fosforilación en presencia de ATP- γ - ^{32}P utilizando como competidor un exceso de GTP no radioactivo. Tal como se observa en la **Figura 16**, el agregado de GTP no radioactivo compite completamente la fosforilación de rTGBp1 por ATP- γ - ^{32}P al utilizar la FPS de plantas no infectadas (comparar calles 10 y 6). Sin embargo, se observó que en el caso de la FPS de plantas infectadas con PVX la competencia fue sólo parcial (**Fig. 16**, comparar calles 21 y 17). El ensayo control con agregado de ATP no radioactivo mostró que la fosforilación de TGBp1 fue eficientemente competida tanto en las FPS de plantas infectadas y no infectadas (**Fig. 16**, calles 11 y 22).

Con el objetivo de demostrar en forma directa que la quinasa celular que fosforila a rTGBp1 es capaz de utilizar GTP se realizaron ensayos de fosforilación en presencia de GTP- γ - ^{32}P . Como se observa en la **Figura 17** tanto la actividad enzimática presente en las FPS de plantas infectadas con PVX, como la de plantas no infectadas son capaces de fosforilar a rTGBp1 utilizando GTP radioactivo y Mn^{2+} como cofactor (calles 1 y 2). También se observó que, coincidiendo con las propiedades ya descritas para quinasas CK2, la fosforilación con GTP radioactivo resulta más eficiente al utilizar Mn^{2+} en lugar de Mg^{2+} como cofactor (datos nos mostrados) (Gatica *et al.*, 1993).

En resumen, los resultados obtenidos en esta etapa sugieren que rTGBp1 es fosforilada por una quinasa celular que presenta características típicas de CK2 y que está presente tanto en la FPS de plantas infectadas con PVX como en la de plantas no infectadas. En particular, en el caso de la FPS de plantas infectadas con PVX no es posible descartar la participación de otras quinasas celulares. Esta afirmación se sustenta en los resultados parciales obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad enzimática en presencia de heparina y en los ensayos de competencia con GTP no radioactivo (ver **Figura 16**).

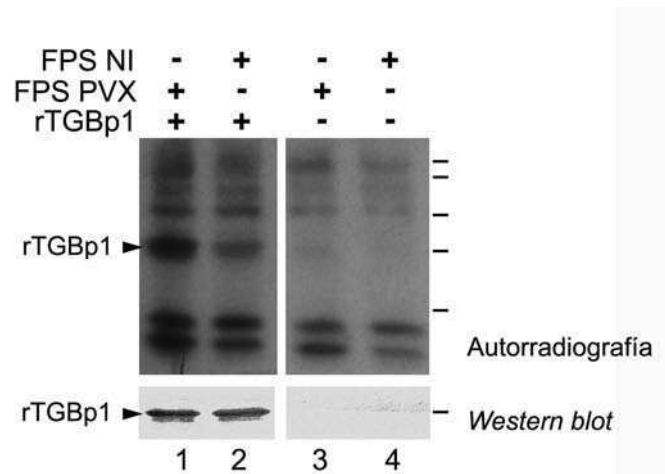


Figura 17. Fosforilación *in vitro* rTGBp1 por quinasas celulares que utilizan GTP como dador de grupo fosforilo. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de rTGBp1, GTP- γ - 32 P, 5mM MnCl $_2$ y la FPS de plantas infectadas con PVX (FPS PVX) o de plantas no infectadas (FPS NI). Los productos se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectaron por autorradiografía (panel superior). Las membranas se revelaron con anti-TGBp1 (panel inferior). La flecha indica la posición de rTGBp1. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64, 47, 34, 24, 19 kDa en el panel superior, y 24 kDa en el panel inferior.

4. Caracterización de los residuos fosforilados por una actividad quinasa presente en la FPS de hojas de *N. tabacum* infectadas con PVX y en hojas no infectadas.

Como una primera aproximación al estudio de los sitios blanco de fosforilación en la proteína rTGBp1, se efectuó un análisis de fosfoaminoácidos de la proteína rTGBp1 fosforilada *in vitro* con la FPS de hojas de *N. tabacum* infectadas con PVX y en hojas no infectadas en presencia de ATP- γ - 32 P. La proteína rTGBp1 fosforilada se separó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 15%. A partir de la autorradiografía del gel se identificó la región del gel correspondiente a la proteína rTGBp1, la misma fue aislada y sometida a hidrólisis parcial. Se combinó con estándares de fosfoaminoácidos no radioactivos, y se analizó por cromatografía en capa delgada (TLC) de una dimensión. La placa cromatográfica

se autorradiografió (**Figura 18A**) y se tiñó con una solución de ninhidrina/acetona para la visualización de los fosfoaminoácidos estándares (**Figura 18B**).

Los resultados revelaron la presencia de residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) fosforilados tanto en la proteína rTGBp1 incubada con la FPS de plantas infectadas con PVX o plantas no infectadas. En ninguna de las reacciones se detectó la presencia de residuos de tirosina fosforilados. Las señales intermedias que se observan en la figura corresponderían a la detección de fosfopéptidos, resultantes de la hidrólisis parcial de la proteína. Dado que no se trata de una técnica cuantitativa, no es posible estimar el número total de residuos modificados por fosforilación. Sin embargo se puede estimar que existen al menos dos sitios blancos (una serina y una treonina), tanto en el caso de la/s actividad/es quinasa/s presente/s en extractos de plantas infectadas con PVX como en los extractos de plantas no infectadas.

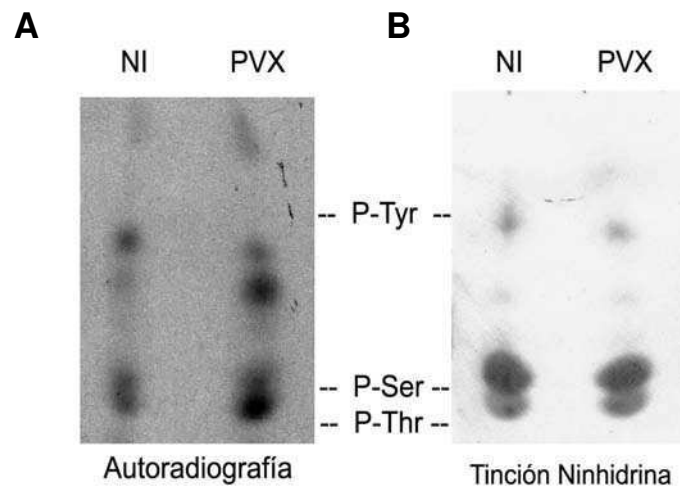


Figura 18. Análisis de fosfoaminoácidos de la proteína rTGBp1. Se fosforiló 1µg de proteína rTGBp1 con la FPS de hojas infectadas con PVX (PVX) y con la FPS de hojas no infectadas (NI) en presencia de ATP- γ - 32 P. La proteína fosforilada se hidrolizó en 6N HCl a 120 °C durante 1 h. El hidrolizado se analizó por TLC en una dimensión. La placa resultante se autorradiografió (A) y se tiñó con ninhidrina (B). P-Tyr, P-Ser, P-Thr: estándares comerciales de residuos de fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina.

5. Fosforilación *in situ* de la TGBp1 nativa por una actividad quinasa celular tipo CK2 presente en la FPS de hojas de *N. tabacum* infectadas con PVX.

La detección de la proteína TGBp1 nativa fosforilada en extractos de hojas infectadas con PVX resulta dificultosa debido a su baja abundancia y a la naturaleza reversible de la modificación estudiada. Para evaluar si la proteína TGBp1 sintetizada durante el curso de la infección viral es sustrato de quinasas celulares, se realizó un ensayo de fosforilación *in situ*. Para ello, se incubaron extractos de plantas infectadas con PVX con ATP- γ - ^{32}P , con o sin el agregado de los compuestos que se detallan en la **Figura 19**. Luego de la incubación, la proteína TGBp1 fue inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-TGBp1 (**Fig. 19**, panel A) o con suero pre-inmune como control negativo (**Fig. 19**, panel B). Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15 %, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se autorradiografiaron (**Fig. 19**, paneles superiores), y se revelaron con anti-TGBp1 (**Fig. 19**, paneles inferiores). En los extractos de plantas infectadas, se observó una banda proteica fosforilada de peso molecular similar al de TGBp1 (24 kDa), mientras que al utilizar suero pre-inmune no se observaron proteínas fosforiladas (**Fig. 19**, comparar las calles 3 y 7). Como se observa en el *Western blot*, esta banda fue específicamente reconocida por el anticuerpo anti-TGBp1 (**Fig. 19** paneles inferiores). Estos resultados indican que la proteína TGBp1 nativa producida durante la infección viral es fosforilada por una quinasa celular.

Además de la banda específica de 24 kDa, el anticuerpo anti-TGBp1 precipita una proteína adicional no fosforilada de aproximadamente 30 kDa (señalada con un asterisco en los paneles inferiores de la **Fig. 19**). Esta proteína fue también inmunoprecipitada por el anticuerpo anti-TGBp1 cuando se incubaron con ATP- γ - ^{32}P extractos proteicos de hojas no infectadas, indicando que se trata de una proteína endógena de la planta (**Fig. 19** panel C).

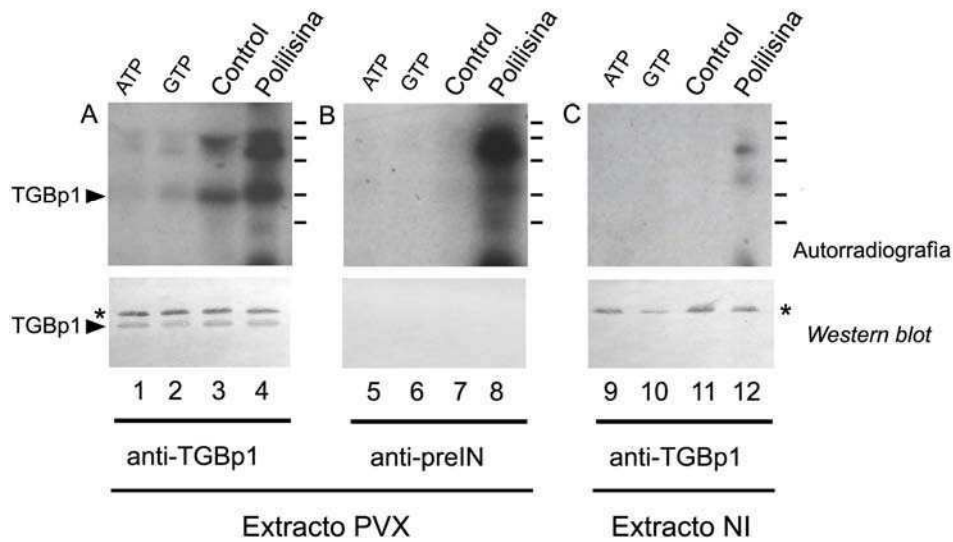


Figura 19. Fosforilación *in situ* de TGBp1 y caracterización de la quinasa celular tipo CK2. Los ensayos se realizaron con extractos de plantas infectadas con PVX y no infectadas. Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo en presencia de ATP- γ - ^{32}P , y los componentes indicados en las líneas superiores. En la reacción control no se agregaron componentes adicionales. Luego se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpo específico anti-TGBp1, o con anticuerpo pre-inmune (anti-preIN). La flecha indica la posición de TGBp1. El asterisco indica una proteína inespecífica detectada por el anticuerpo anti-TGBp1. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64, 47, 34, 24, 19 kDa.

Según la caracterización preliminar descrita en el apartado anterior, al menos una de las actividades quinasa de rTGBp1 presente en los extractos de plantas de *N. tabacum* infectadas exhibe características típicas de CK2. Por esta razón, se efectuaron ensayos de fosforilación *in situ* en presencia de polilisina, y de ATP y GTP no radioactivos. Como se observa en la **Figura 19A**, la fosforilación de TGBp1 resultó aumentada en presencia de polilisina (comparar calles 3 y 4) y fue eficientemente competida en presencia de ATP y GTP no radioactivos (calles 1 y 2).

Dado que existían antecedentes sobre la interacción *in vitro* entre la CP de PVX y TGBp1 (Karpova *et al.*, 2006); y que CP es sustrato de fosforilación de proteínas quinasas celulares de tabaco (Atabekov *et al.*, 2001; Karpova *et al.*, 2002), se realizaron controles con el fin de descartar la posibilidad de una co-inmunoprecipitación de CP y TGBp1. Para ello, los ensayos de inmunoprecipitación de extractos de plantas revelados con anticuerpo anti-TGBp1

fueron subsecuentemente revelados con un anticuerpo anti-CP. Como se observa en la **Figura 20**, no se detectó la presencia de CP en los extractos de plantas infectadas con PVX inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-TGBp1 (panel A, calles 1 a 4) o suero pre-inmune (panel B, calles 5 a 8). Como control se muestra la presencia de CP en los extractos no inmunoprecipitados de plantas infectadas (**Fig. 20**, calles indicadas con un asterisco). Se muestra además la ausencia de proteínas inespecíficas que reaccionen al anticuerpo anti-CP en los extractos de plantas no infectadas (**Fig. 20**, panel C, calles 11 – 14). Las bandas inespecíficas que se observan en la figura corresponden a las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas.

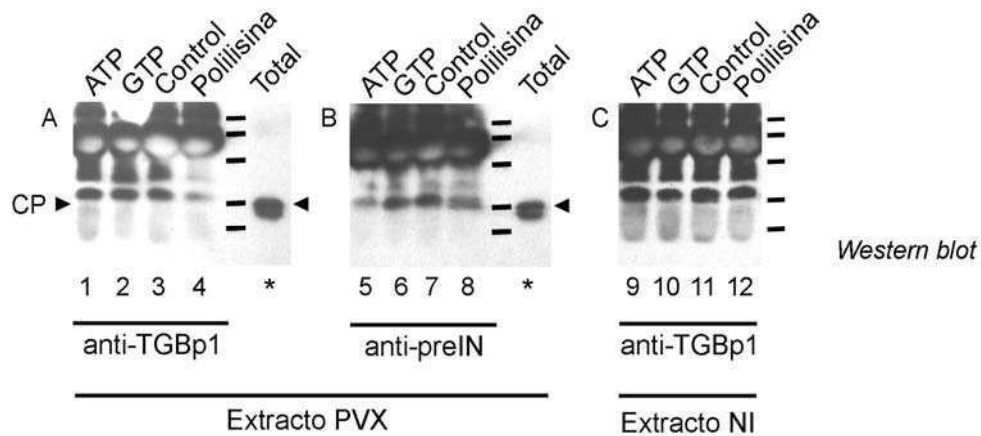


Figura 20. Evaluación de la co-precipitación CP con la proteína TGBp1.

Las reacciones de inmunoprecipitación con anti-TGBp1 se revelaron con anticuerpo específico anti-CP. Corresponde a la descripción de las reacciones lo indicado en la **Figura 19**. Anti-TGBp1: inmunoprecipitación con anticuerpo específico para TGBp1 Anti-preIN: inmunoprecipitación con anticuerpo pre-inmune. Extracto PVX: extracto de plantas infectadas con PVX. Extracto NI: extracto de plantas no infectadas. Las flechas negras indican la posición de CP. Las calles indicadas con un asterisco corresponden a los controles de extractos no inmunoprecipitados. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64, 47, 34, 24, 19 kDa.

En conjunto, estos resultados fueron consistentes con las observaciones de los ensayos efectuados *in vitro*, e indicaron que la forma nativa de la proteína TGBp1 producida durante el curso de la infección viral puede ser fosforilada por una quinasa celular de tabaco con las características típicas de una quinasa de tipo CK2.

6. Purificación parcial de una quinasa celular de tipo CK2.

Con el objetivo de obtener más información sobre la quinasa celular que interviene en la fosforilación de TGBp1, se procedió a realizar una purificación parcial a partir de extractos solubles de plantas de *N. tabacum* no infectadas. Para ello, se llevó a cabo una cromatografía de afinidad basada en la capacidad de las quinasas CK1 y CK2 de unir heparina (**Figura 21**). Las proteínas unidas a la resina de heparina-sepharose se eluyeron mediante un gradiente de NaCl. La actividad quinasa presente en las fracciones recolectadas fue evaluada mediante ensayo de fosforilación donde se utilizaron como sustratos rTGBp1, caseína desfosforilada (sustrato específico de CK2 y CK1) o un péptido sustrato específico de CK2 (Marin *et al.*, 1994), en presencia de ATP- γ - 32 P como dador de grupos fosforilos.

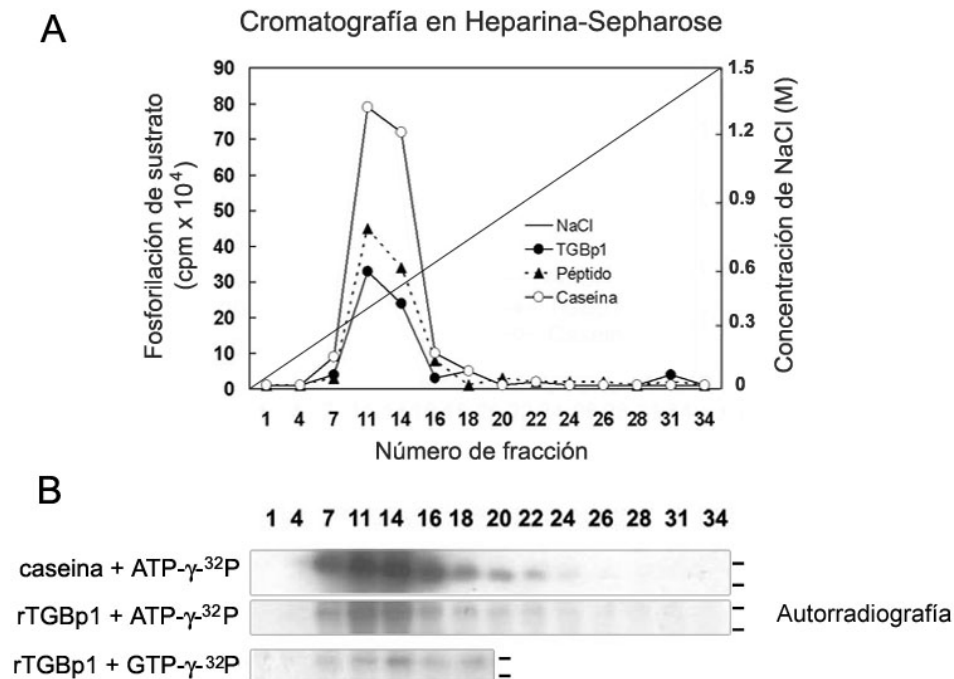


Figura 21. Fosforilación *in vitro* de rTGBp1 por una quinasa de *N. tabacum* tipo CK2 parcialmente purificada. (A) Perfil de elución en columna de heparina-sepharosa de la actividad quinasa de rTGBp1. La actividad se determinó *in vitro* utilizando como sustrato caseína (\circ), rTGBp1 (\bullet) o un péptido sustrato específico de CK2 (\blacktriangle). (B) Fosforilaciones *in vitro* de caseína y rTGBp1 en presencia de ATP- γ - 32 P o GTP- γ - 32 P utilizando como fuente enzimática las fracciones colectadas de la columna. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha y corresponden a 24 y 19 kDa.

Tal como se observa en la **Figura 21A**, la actividad quinasa de rTGBp1 eluye en un único pico principal entre 400 y 500 mM de NaCl (fracciones 7-16 en el eje inferior de la figura) y es capaz de utilizar tanto ATP como GTP como dadores de grupos fosforilo (**Figura 21B**). Por otra parte, esta actividad coeluye con una actividad quinasa capaz de fosforilar tanto caseína, como el péptido sustrato específico de CK2, sugiriendo que las fosforilaciones son producto de la acción de una misma quinasa celular (**Figura 21A**). Utilizando la fracción de mayor actividad (fracción 11), se confirmó que la actividad quinasa parcialmente purificada presenta las mismas características que la quinasa detectada en la FPS de plantas de *N. tabacum*, en cuanto a su capacidad de ser inhibida por heparina y ser fuertemente estimulada en presencia de polilisina (**Figura 22**).

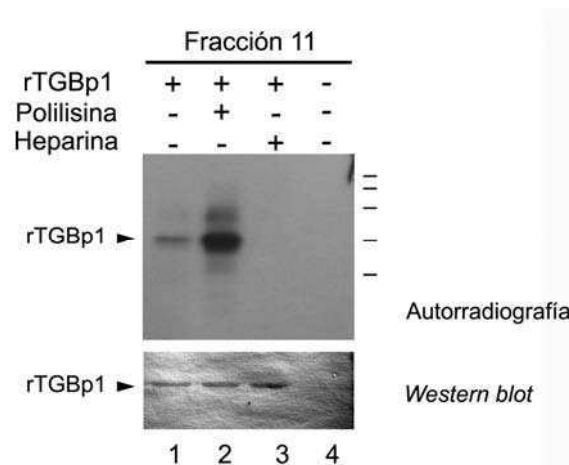


Figura 22. Caracterización de la actividad quinasa de tipo CK2 parcialmente purificada. Se evaluó la fosforilación *in vitro* de rTGBp1 en presencia de ATP- γ -³²P utilizando como fuente enzimática la fracción 11 de la columna de heparina-Sepharose. En las reacciones se incluyó heparina o polilisina según se indica en cada caso. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha y corresponden a 64, 47, 34, 24, 19 kDa.

El aumento observado en la fosforilación de rTGBp1 al utilizar como fuente enzimática la FPS de plantas infectadas (**Figura 15**), nos llevó a plantear una posible inducción de la expresión de CK2. Para evaluar esta hipótesis, se cuantificaron por *Northern blot* los niveles de ARNm de la subunidad alfa catalítica de CK2 en extractos preparados a partir de hojas de plantas no infectadas e infectadas con PVX o PVY. Para ello, el ARN total obtenido, se separó en geles de agarosa desnaturizantes y se transfirió a membranas de Nylon. La membrana

fue hibridada utilizando una sonda capaz de reconocer específicamente la subunidad alfa catalítica de CK2 de *N. tabacum*. La misma membrana fue hibridada con una sonda específica que reconoce el ARN 17S, para ser utilizado como control de carga. El resultado se presenta en la **Figura 23**. La intensidad de las bandas de hibridación se cuantificó utilizando el programa ImageJ. No se observaron diferencias al estimar la intensidad relativa de las bandas de hibridación (CK2/17S). La acumulación de los transcritos de ARNm CK2a2 resultó similar, tanto en las plantas infectadas como en las no infectadas, indicando que el incremento en la fosforilación de TGBp1 en extracto de plantas infectadas no se debe a un incremento en la transcripción de CK2.

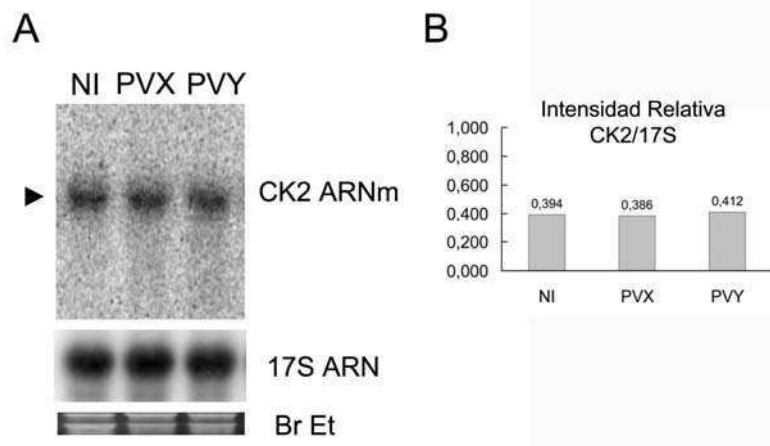


Figura 23. Northern blot de ARN total extraído de plantas infectadas con PVX, PVY y plantas no infectadas. (A) Se muestran las autorradiografías de las membranas hibridadas con sondas marcadas con ^{32}P , que reconocen específicamente el transcrito de CK2a2 (panel superior) y el ARN ribosomal 17S (panel intermedio). En el panel inferior se muestra la tinción del gel con bromuro de etidio. **(B)** La intensidad de las bandas se cuantificó mediante el programa ImageJ. Los valores de intensidad relativa (CK2/17S) se indican encima de las barras.

7. Fosforilación de rTGBp1 con la subunidad catalítica alfa recombinante de CK2 de *N. tabacum*

Hasta esta instancia, los resultados obtenidos indicaban que una quinasa de *N. tabacum* con características de CK2 fosforilaba a la proteína TGBp1. Con el fin de

confirmar que la quinasa CK2 de *N. tabacum* es capaz de llevar a cabo esta fosforilación, se procedió al clonado de la subunidad catalítica de CK2 de *N. tabacum*. En *A. thaliana* han sido identificados 4 genes que codifican las subunidades catalíticas de CK2: CK2A1 (At5g67380), CK2A2 (At3g50000), CK2A3 (At2g23080) y CKA2cp (At2g23070) (<http://www.arabidopsis.org>). Los genes CK2A1, CK2A2 y CK2A3 presentan un alto grado de identidad (aproximadamente 90%), mientras que el gen CKA2cp es el menos conservado (71-80% identidad), lo cual es debido a la presencia de una secuencia de localización en cloroplastos en su región N-terminal (Salinas *et al.*, 2006). Debido a que el genoma de *N. tabacum* no ha sido secuenciado, no es posible determinar el número de genes que codifican la subunidad catalítica de CK2 en esta especie.

Tomando como base las secuencias identificadas en el genoma de *A. thaliana*, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos del Genbank utilizando el programa de comparación múltiple de secuencias BLAST, y se identificaron seis secuencias, de marco de lectura completo, que codifican subunidades catalíticas de CK2 en *N. tabacum*: CK2A (AF374474); CK2A1 (AJ437635), CK2A2 (AJ438264), CK2A3 (AJ438263), NtCK2a1 (AB077050); y NtCK2a2 (AB077051.1). En la **Figura 24** se presenta el alineamiento de las secuencias mencionadas.

La comparación de las secuencias aminoacídicas de las subunidades catalíticas de *N. tabacum* reportadas, utilizando el programa CLUSTAW, permitió determinar que las subunidades alfa de CK2 de *N. tabacum* poseen un alto grado de identidad (98-99%) (**Figura 24**). Por otra parte, ninguna de las secuencias reportadas en *N. tabacum* presenta una secuencia de localización en cloroplastos, a diferencia de los observado en *A. thaliana*. En base a estas secuencias, se diseñaron oligonucleótidos iniciadores que permiten la amplificación del marco de lectura abierto de cualquiera de las secuencias reportadas. Utilizando estos oligonucleótidos, se llevó a cabo una amplificación por RT-PCR a partir de ARN total de tejido de hojas de tabaco de plantas de *N. tabacum*. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T Easy y la identidad de los clones recombinantes se corroboró por secuenciación automática. De esta forma se obtuvieron tres clones con secuencias idénticas. El análisis comparativo de la secuencia amplificada con las secuencias previamente reportadas permitió determinar un alto grado de homología entre las siete secuencias (**Figura 24**).

CK2A-AF374474	MSKARVYTDVNVLRPREYWDYEALTVQWGDQDDYEVVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSHEKC	60
CK2A1-AJ437635	MSKARVYTDINVLRPREYWDYESTVQWGDQDDYEVVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSNEKC	60
CK2A2-AJ438264	MSKARVYTDVNVLRPREYWDYEALTVQWGDQDDYEVVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSNEKC	60
CK2A3-AJ438263	MSKARVYTDVNVLRPREYWDYEALTVQWGDQDDYEVVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSHEKC	60
NtCK2a1-AB077050	MSKARVYTDINVLRPREYWDYESTVQWGDQDDYEVVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSNEKC	60
NtCK2a2-AB077051.1	MSKARVYTDINVLRPREYWDYESTVQWGDQDDYEVVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSNEKC	60
CK2a2-EU555192	MSKARVYTDVNVLRPREYWDYEALTVQWGDQDDYEVVVRKVGRGKYSEVFEGINVNSNEKC	60
	:*****:***	
Sitio de unión de ATP		
CK2A-AF374474	I IKILKPVKKKKI KREIKI LQNLCGGPTIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVLV	120
CK2A1-AJ437635	I IKILKPVKKKKI KREIKI LQNLCGGPNIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVLV	120
CK2A2-AJ438264	I IKILKPVKKKKI KREIKI LQNLCGGPNIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVLV	120
CK2A3-AJ438263	I IKILKPVKKKKI KREIKI LQNLCGGPNIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVLV	120
NtCK2a1-AB077050	I IKILKPVKKKKI KREIKI LQNLCGGPNIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVLV	120
NtCK2a2-AB077051.1	I IKILKPVKKKKI KREIKI LQNLCGGPNIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVLV	120
CK2a2-EU555192	I IKILKPVKKKKI KREIKI LQNLCGGPNIVKLLDIVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVLV	120
	*****:***	
Segmento básico (NLS)		
CK2A-AF374474	PTLTDYDIRYIYIELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMDHELRLRLIDWGLAEFYHPG	180
CK2A1-AJ437635	PTLTDYDIRYIYIELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMDHELRLRLIDWGLAEFYHPG	180
CK2A2-AJ438264	PTLTDYDIRYIYIELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMDHELRLRLIDWGLAEFYHPG	180
CK2A3-AJ438263	PTLTDYDIRYIYIELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMDHELRLRLIDWGLAEFYHPG	180
NtCK2a1-AB077050	PTLTDYDIRYIYIELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMDHELRLRLIDWGLAEFYHPG	180
NtCK2a2-AB077051.1	PTLTDYDIRYIYIELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMDHELRLRLIDWGLAEFYHPG	180
CK2a2-EU555192	PTLTDYDIRYIYIELLKALDYCHSQGIMHRDVKPHNVMDHELRLRLIDWGLAEFYHPG	180
	*****:***	
Loop catalítico Segmento de activación		
CK2A-AF374474	KEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYS LDMWS LGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDQLVKI	240
CK2A1-AJ437635	KEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYS LDMWS LGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDQLVKI	240
CK2A2-AJ438264	KEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYS LDMWS LGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDQLVKI	240
CK2A3-AJ438263	KEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYS LDMWS LGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDQLVKI	240
NtCK2a1-AB077050	KEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYS LDMWS LGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDQLVKI	240
NtCK2a2-AB077051.1	KEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYS LDMWS LGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDQLVKI	240
CK2a2-EU555192	KEYNVRVASRYFKGPELLVDLQDYDYS LDMWS LGCMFAGMIFRKEPFFYGHNDQDQLVKI	240
	*****:***	
Segmento de activación		
CK2A-AF374474	AKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAMVGRHSRKPWSKF INADNQHLSVPEAIDFLDKLL	300
CK2A1-AJ437635	AKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAMVGRHSRKPWSKF INADNQHLSVPEAIDFLDKLL	300
CK2A2-AJ438264	AKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAMVGRHSRKPWSKF INADNQHLSVPEAIDFLDKLL	300
CK2A3-AJ438263	AKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAMVGRHSRKPWSKF INADNQHLSVPEAIDFLDKLL	300
NtCK2a1-AB077050	AKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAMVGRHSRKPWSKF INADNQHLSVPEAIDFLDKLL	300
NtCK2a2-AB077051.1	AKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAMVGRHSRKPWSKF INADNQHLSVPEAIDFLDKLL	300
CK2a2-EU555192	AKVLGTDELNAYLHKYQLELDPQLEAIVGRHSRKPWSKF INADNQHLSVPEAIDFLDKLL	300
	*****:***	
CK2A-AF374474	RYDHQDRILTAREAMAHPYFLQVRAAENSRMRTQ	333
CK2A1-AJ437635	RYDHQSRILTAREAMAHPYFLQVRAAENSRMRTQ	333
CK2A2-AJ438264	RYDHQDRILTAREAMAHPYFLQVRAAENSRMRTQ	333
CK2A3-AJ438263	RYDHQDRILTAREAMAHPYFLQVRAAENSRMRTQ	333
NtCK2a1-AB077050	RYDHQSRILTAREAMAHTYFLQVRAAENSRMRTQ	333
NtCK2a2-AB077051.1	RYDHQSRILTAREAMAHTYFLQVRAAENSRMRTQ	333
CK2a2-EU555192	RYDHQGRILTAREAMAHPYFLQVRAAENSRMRTQ	333
	*****.***:*****.*****.*****	

Figura 24. Alineamiento de secuencias de la subunidad catalítica α de CK2. Se muestra el alineamiento de las subunidades catalíticas α descritas en *N. tabacum* CK2A (AF374474); CK2A1 (AJ437635), CK2A2 (AJ438264), CK2A3 (AJ438263), NtCK2a1(AB077050); NtCK2a2 (AB077051.1) y de la secuencia clonada en este trabajo CK2a2 (EU555192). El * indica residuos idénticos. Los residuos similares se indican con . o : (según el criterio del programa de alineamiento múltiple CLUSTAWL). En la figura se indican subrayados los dominios funcionales conservados de CK2: sitio de unión de ATP, segmento de residuos básicos (NLS), el *loop* catalítico y el segmento de activación.

De esta forma se determinó que la proteína CK2A2 es la más parecida a la amplificada con un grado de identidad del 99%, razón por la cual se la designó como CK2a2. Por otro lado las secuencias CK2A y CK2A3 poseen 98% de identidad; mientras que las secuencias CK2A1 y la NtCK2a1 un 97% y la NtCK2a2 un 96%. Como era de esperar, los dominios previamente descritos como relevantes para la subunidad catalítica, se encuentran altamente conservados en las secuencias clonadas, lo que refuerza la asignación de su función como subunidades catalíticas de CK2.

La secuencia codificante seleccionada se subclonó en el vector de expresión bacteriana pET28(+), dando lugar al vector pET-CK2, que permite la expresión en *E. coli* de la subunidad catalítica alfa de CK2 fusionada a una secuencia de 6 residuos de histidina (en adelante denominada rNtCK2). Se expresó la enzima rNtCK2 en *E. coli* y la proteína se purificó a homogeneidad por cromatografía de afinidad por níquel en condiciones no desnaturalizantes. A continuación se evaluó la capacidad de la rNtCK2 de fosforilar a rTGBp1 en ensayos de fosforilación *in vitro*. Como puede observarse en la **Figura 25**, rNtCK2 es capaz de fosforilar a rTGBp1 utilizando como dador de grupo fosforilo tanto ATP como GTP radioactivo, en forma similar a la quinasa endógena presente en las FPS de plantas de *N. tabacum*.

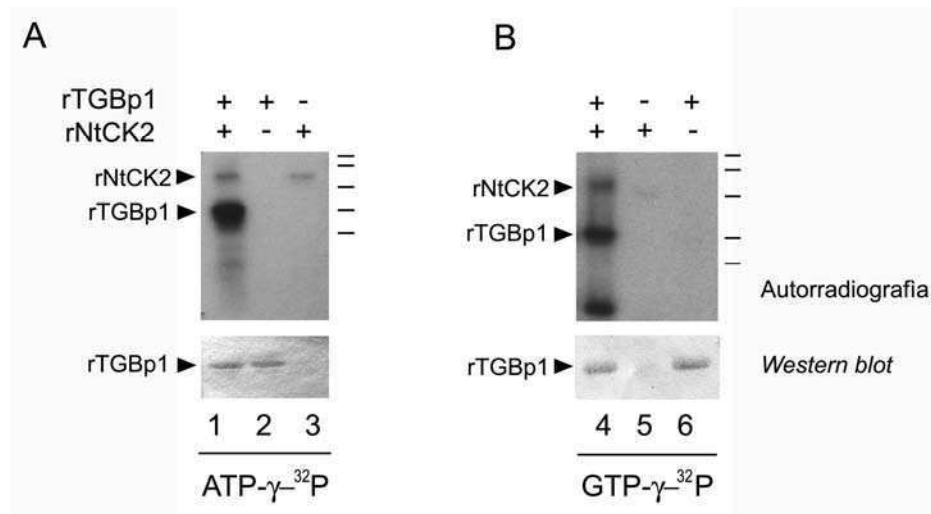


Figura 25. Fosforilación *in vitro* de rTGBp1 por rNtCK2 con ATP y GTP. (A) Fosforilación de rTGBp1 en presencia de ATP- γ -³²P y MgCl₂ (calle 1). Los controles corresponden rTGBp1 sin el agregado de rNtCK2 (calle 2) y a rNtCK2 sin el agregado de sustrato (calle 3). **(B)** Fosforilación de rTGBp1 en presencia de GTP- γ -³²P y MnCl₂ (calle 4). Los controles corresponden a rNtCK2 sin el agregado de sustrato (calle 5) y rTGBp1 sin el agregado de rNtCK2 (calle 6). En todos los casos los productos de reacción fueron resueltos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15%, transferidos a membranas de nitrocelulosa y autorradiografiados. Los paneles inferiores corresponden las membranas reveladas con suero anti-TGBp1. Los marcadores de peso molecular, corresponden a 61, 47, 34, 24 y 19 kDa.

Por otra parte, se analizó también el comportamiento de la rNtCK2 ante el agregado de heparina y polilisina. Como se esperaba, la fosforilación de rTGBp1 por la enzima rNtCK2, fue inhibida por heparina y estimulada por polilisina. En la **Figura 26** se observa que una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ resultó suficiente para inhibir la fosforilación de rTGBp1 en un 80%, lográndose una inhibición prácticamente completa con 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina (**Fig. 26A**; comparar calles 1, 2 y 3; y **Fig. 26B**). Resultados similares se obtuvieron en la caracterización de la subunidad catalítica α recombinante de *Zea mays* (Riera *et al.*; 2003), mostrándose que concentraciones similares de heparina a las utilizadas en este trabajo logran el mismo grado de inhibición de la actividad enzimática.

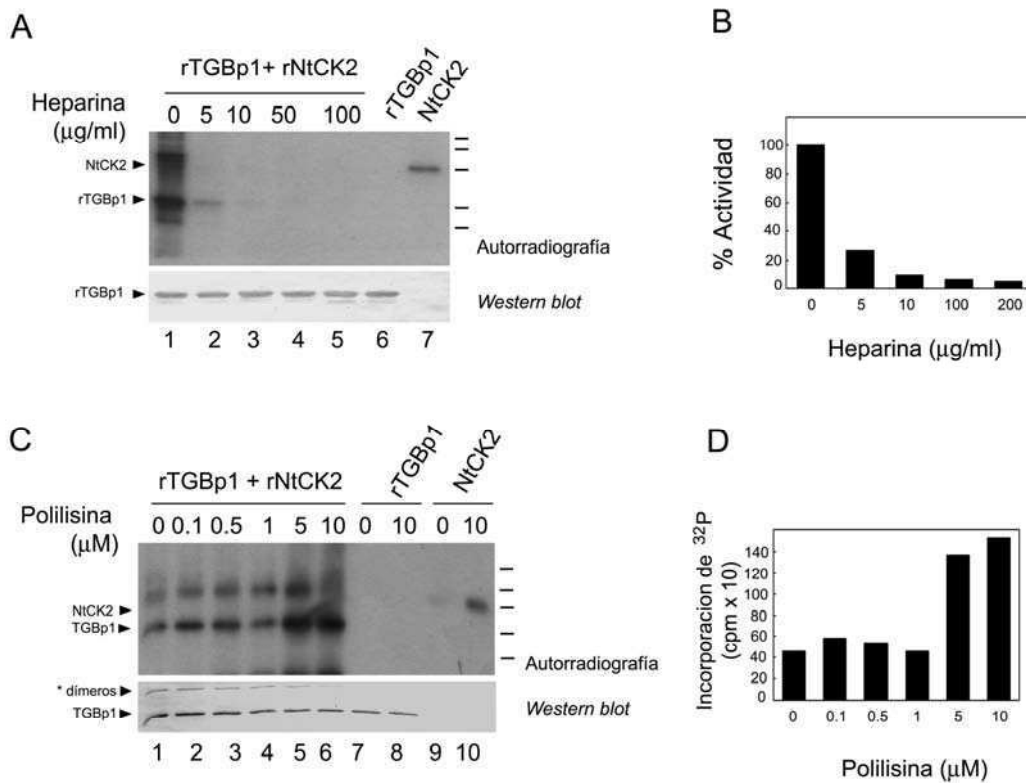


Figura 26. Caracterización de la fosforilación *in vitro* de rTGBp1 por subunidad alfa recombinante de CK2 de *N. tabacum*. (A) Fosforilación de rTGBp1 en presencia de ATP- γ - ^{32}P y cantidades crecientes de heparina (calles 1-5). Controles de reacción, incubados sin agregado de heparina: rTGBp1 sin el agregado de enzima (calle 6) y rNtCK2 sin el agregado de sustrato (calle 7). Panel superior: autorradiografía. Panel inferior: análisis de *Western blot* revelado con anti-TGBp1. (B) Porcentaje de fosforilación de rTGBp1 en presencia de heparina, relativo a un control de fosforilación de rTGBp1 sin agregado de heparina (100%). (C) Fosforilación de rTGBp1 en presencia de ATP- γ - ^{32}P y concentraciones crecientes de polilisina (calles 1-6). Controles de reacción: rTGBp1 sin el agregado de enzima (calles 7 y 8) y rNtCK2 sin el agregado de sustrato (calles 9 y 10), en presencia de 0 y 10 μM polilisina, respectivamente. Panel superior: autorradiografía. Panel inferior: *Western blot* revelado con anti-TGBp1. (D) Porcentaje de fosforilación de TGBp1 en presencia de concentraciones crecientes de polilisina, relativo a un control de fosforilación de rTGBp1 sin agregado de polilisina (100%). Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha y corresponden a 64, 47, 34, 24, 19 kDa.

El agregado de polilisina aumenta la fosforilación de rTGBp1, observándose un incremento de tres veces al utilizar una concentración de 5 μ M (**Fig. 26C**, comparar calles 1 y 5; y **Fig. 26D**). Por otra parte, es posible observar que la polilisina aumenta la autofosforilación de rNtCK2 (**Fig. 26C**, calles 9 y 10), comportamiento que también ha sido observado para la CK2 de animales (Meggio *et al.*, 1992).

El análisis de los productos de reacción mediante un ensayo de *Western blot* permitió observar la presencia de dos bandas reconocidas por el anticuerpo anti-TGBp1 (ver **Fig. 26C**). La banda de mayor tamaño resultó compatible con la formación de dímeros de rTGBp1, los cuales también fueron fosforilados por rNtCK2. En condiciones de electroforesis en geles desnaturizantes, la proteína recombinante producida en este y otros trabajos, ha sido detectada como una única banda (**Fig. 12**, Kalinina *et al.*, 1996; Leshchiner *et al.*, 2006). Sin embargo, mediante ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos, se demostró que es posible detectar pequeñas cantidades de dímeros y oligómeros en las preparaciones de proteína recombinante TGBp1 (Leshchiner *et al.*, 2006; 2008).

8. Caracterización de las isoformas de TGBp1 presentes durante la infección viral por electroforesis bidimensional.

Se evaluó la presencia de isoformas de TGBp1 en extractos de plantas de *N. tabacum* infectadas con PVX utilizando geles desnaturizantes bidimensionales (2D-PAGE). Para ello, se realizaron extracciones de proteínas totales a partir de hojas de *N. tabacum* infectadas y no infectadas. Los extractos de proteínas se resolvieron según su punto isoeléctrico (pI) en tiras polimerizadas con un gradiente de pH 3–10 no lineal. Luego de esta separación basada en la carga, las proteínas fueron resueltas de acuerdo con su peso molecular por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida 15%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y se sometieron a inmunodetección con anticuerpo anti-TGBp1 (**Figura 27**).

En el caso de las proteínas totales de plantas infectadas con PVX, el anticuerpo anti-TGBp1 permitió reconocer de manera específica 8 isoformas de diferente pI y

de un peso molecular aparente de 24 kDa, (**Figura 27**, panel A). La isoforma más ácida posee un pI aparente de 4,6 (*spot 1*), mientras que el resto de las isoformas (*spots 2 a 8*) se distribuyen dentro de un rango de pI aparente de 5,2 a 6,0 presentando un patrón tipo "collar de perlas". Las proteínas de mayor peso molecular detectadas por el anticuerpo corresponden a detecciones inespecíficas, dado que también son reveladas por el anticuerpo anti-TGBp1 en los extractos de proteínas de plantas no infectadas (ver **Figura 27**, panel C).

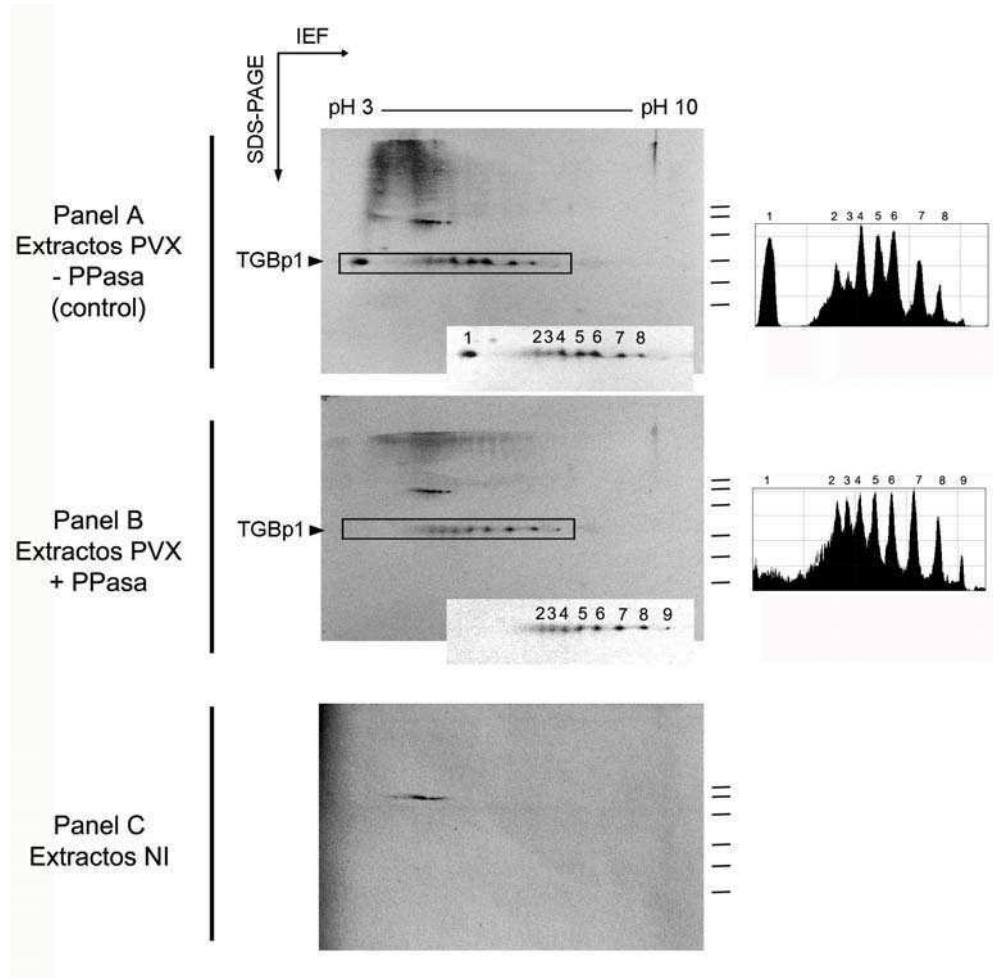


Figura 27. Isoformas de TGBp1 en extracto de plantas infectadas con PVX. Se extrajeron proteínas totales de hojas de plantas de tabaco infectadas con PVX. Una fracción de las proteínas se utilizó como control de reacción sin tratamiento (panel A), una fracción equivalente se sometió a un tratamiento de desfosforilación con una mezcla de fosfatasas (panel B). Además, se extrajeron proteínas totales de plantas de tabaco no infectadas (panel C). Las muestras de proteínas totales se resolvieron en 2D-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se inmunodetectaron con anti-TGBp1. Los marcadores de peso molecular, corresponden a 64, 47, 34, 25, 19 y 12 kDa. Los recuadros indican la zona ampliada de la figura. Los gráficos reflejan la estimación de la abundancia de las isoformas observadas.

En la **Figura 28** se indican las estimaciones del *pI* aparente para cada una de las isoformas de TGBp1 observadas en el extracto de plantas infectadas con PVX. Para ello se calculó la distancia desde el extremo correspondiente al *pH*3 hasta la posición de cada una de las isoformas, y dichas distancias se expresaron como un porcentaje del largo de las tiras. El *pI* correspondiente a cada isoforma se obtuvo a partir del gráfico (*pH* vs porcentaje del gel) provisto por el fabricante. La modificación de proteínas por fosforilación reemplaza las cargas neutras de los grupos hidroxilos en serinas, treoninas o tirosinas, con grupos fosfatos cargados negativamente (Haystead and Garrison, 1999). Estas modificaciones usualmente provocan una disminución en el *pI* y el corrimiento de las isoformas hacia el sector ácido. La presencia de múltiples fosforilaciones tiene un efecto acumulativo y resulta en una reducción del *pI* en varias unidades (Zhue *et al.*, 2005; Halligan *et al.*, 2004). Estos cambios de posición de las isoformas son más evidentes cuando la proteína no modificada presenta un *pI* > 6.4; tal como es caso de la proteína TGBp1 (Zhue, *et al.*, 2005).

Utilizando el programa ProMost (Halligan *et al.*, 2004) se calculó el *pI* teórico de las isoformas de fosforilación de la proteína TGBp1 (**Figura 29**). Las diferencias relativas observadas entre las isoformas de la proteína TGBp1, (**Figuras 28**), son compatibles con las diferencias relativas teóricas entre las isoformas fosforiladas (**Figura 29**). Esto sugiere que el patrón de isoformas de TGBp1 sería compatible con la acumulación de múltiples fosforilaciones.

Figura 28. Puntos isoeléctricos estimados para las isoformas de la proteína TGBp1, detectadas en un extracto de proteínas de hojas infectadas con PVX¹

Nº de isoforma (<i>spot</i>) ²	<i>pI</i> estimado
1	~ 4,6
2	~ 5,2
3	~ 5,3
4	~ 5,5
5	~ 5,6
6	~ 5,7
7	~ 5,8
8	~ 6,0

(1) La estimación de los *pI* se efectuó según las instrucciones del fabricante del equipamiento utilizado para la electroforesis 2D-PAGE.

(2) Ver referencia de las isoformas mencionadas en la Figura 27, panel A (sin tratamiento de desfosforilación).

Figura 29 Puntos isoelectricos teóricos calculados sobre la adición de n grupos fosfato a la secuencia de la proteína TGBp1³.

Número de grupos fosfatos	pI teórico
10	4,95
9	5,06
8	5,18
7	5,32
6	5,48
5	5,65
4	5,83
3	6,03
2	6,26
1	6,54
0	7,02

(3) La estimación se efectuó utilizando el software ProMost.

Con el fin de estudiar si las distintas isoformas de TGBp1 observadas durante la infección viral corresponden a isoformas de fosforilación, el extracto de proteínas totales de plantas infectadas con PVX fue previamente incubado con una mezcla de enzimas fosfatasas que incluyó fosfatasa alcalina y fosfatasa de fago lambda. Luego de la incubación las proteínas se separaron en geles 2D-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con el anticuerpo anti-TGBp1 (**Fig. 27**, panel B). Al comparar la distribución de isoformas resultantes de este ensayo con la observada en los extractos de plantas infectadas con PVX, se constató la desaparición de la isoforma más ácida (*spot 1*) y se detectó una nueva isoforma menos ácida (*spot 9*) con un pI de 6,3. De acuerdo a la estimación de pI realizada para diferentes isoformas de fosforilación de TGBp1 (**Fig. 29**), la aparición de la isoforma del *spot 9* sería compatible con la eliminación de un grupo fosfato respecto de la isoforma del *spot 8*. Por otra parte, se observa un aumento relativo en la intensidad de las isoformas menos ácidas 7, 8 y 9 con respecto a las isoformas más ácidas 4, 5 y 6. En términos generales, se podría concluir que los efectos observados responden a un aumento proporcional relativo de las isoformas más básicas con respecto a las isoformas más ácidas en los extractos proteicos tratados con fosfatasa respecto de los no tratados, lo que sugiere que las distintas isoformas de pI corresponden a isoformas de fosforilación. Sin embargo, los resultados obtenidos no nos permiten descartar el aporte de otras modificaciones post-traduccionales en la generación del patrón de isoformas observadas.

9. Comparación de las secuencias de las proteínas TGBp1 de virus pertenecientes a la familia *Flexiviridae*

Con el fin de identificar aquellas regiones de la proteína que presentan un alto grado de homología y/o conservación, se realizó un análisis comparativo de las secuencias de proteínas TGBp1 de virus pertenecientes a la familia *Flexiviridae*. Se incluyeron en el análisis las secuencias de TGBp1 de virus pertenecientes a los géneros *Potexvirus*, *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus* y *Mandarivirus*. Utilizando la herramienta de alineamiento múltiple ClustalW2, se compararon un total de 35 secuencias aminoacídicas (ver Materiales y Métodos).

En la **Figura 30** se presenta el resultado del alineamiento de secuencias de aminoácidos, se incluye debajo del alineamiento un gráfico de barras que cuantifica el grado de conservación de las secuencias analizadas. Esta característica se expresa mediante un índice numérico (0 – 9 y *, donde *=10), y refleja el grado de preservación de las propiedades físico-químicas para cada posición del alineamiento. El puntaje más alto se adjudica a la posición que presente residuos idénticos, mientras que los valores sucesivos se otorgan en función de la pertenencia a grupos con propiedades similares. Ante la presencia de cuatro o más espacios vacíos (*gaps*) en el alineamiento, se anula el cálculo de conservación para la posición y se otorga un signo (-). Además se representó el porcentaje de homología entre secuencias mediante de una escala de colores donde el color blanco (o ausencia de color) señala un porcentaje de identidad menor al 40%, y los sucesivos tonos de color azul cubren los rangos > 40%, > 60% y > 80% de homología. Se observó que sobre el promedio de 220 residuos totales, sólo 25 residuos son idénticos entre las secuencias de TGBp1 de distintos géneros virales. La mayor parte del alineamiento no alcanza el 40% de homología, a excepción de las zonas que corresponden a los motivos helicasa donde la mayoría de los residuos revelan una homología superior al 60 %. Tal como se esperaba las secuencias de los motivos helicasa, particularmente de los motivos I y II, son las que resultan más conservadas (Gorbanlenya *et al.*, 1989); mientras que la zona del extremo N-terminal y aquella comprendida entre los motivos IV y V son altamente variables. Se ha sugerido que la variabilidad de los segmentos, no relacionados a los motivos helicasa, podría estar vinculada con la determinación de la especificidad de sustrato de las enzimas helicasa (Owtrim, 2006).

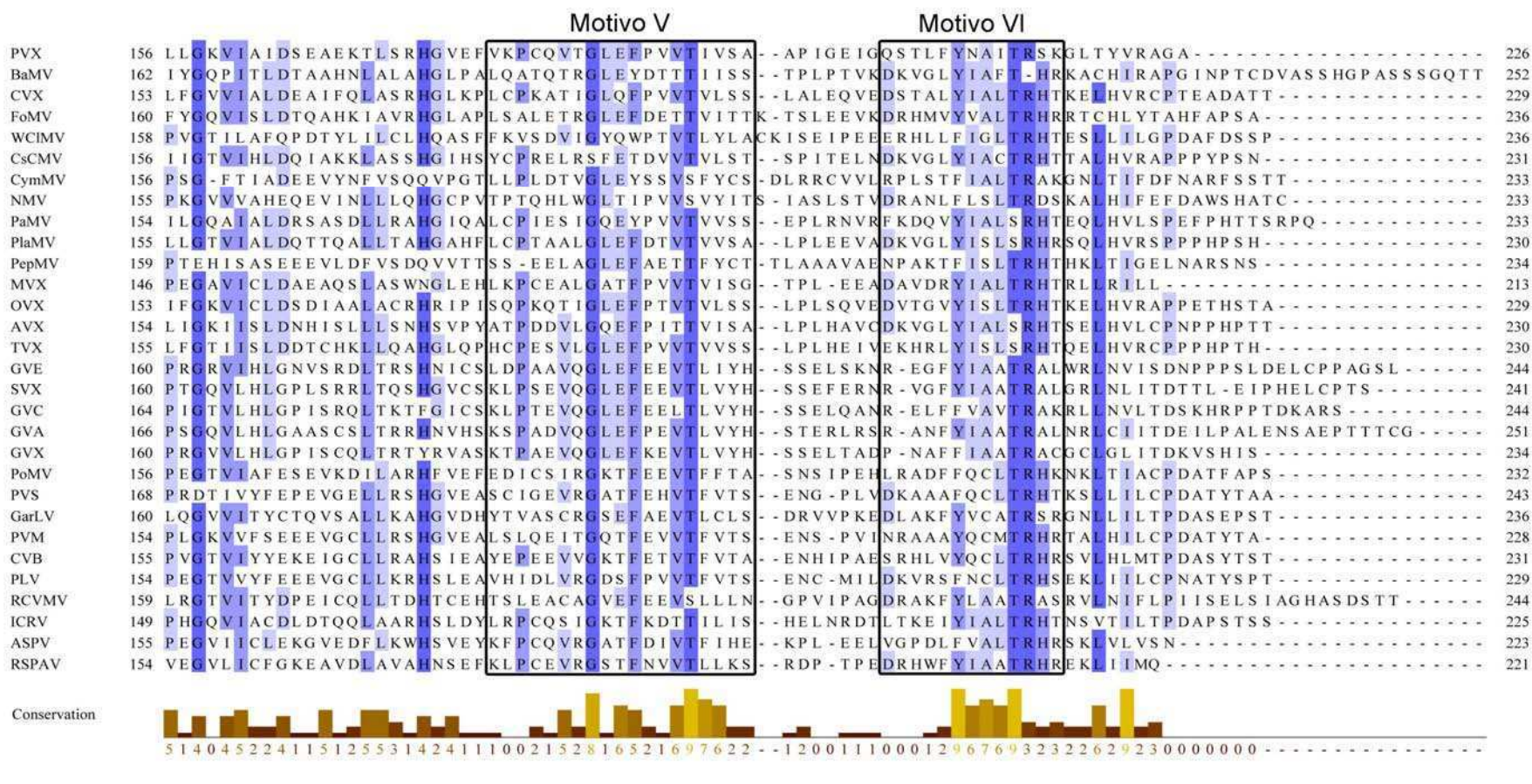


Figura 30. Alineación de secuencias de TGBp1 de virus pertenecientes a la familia *Flexiviridae*. Corresponden al género *Potexvirus* (PVX; BaMV; CVX; FoMV; WCMV; CsCMV; CymMV; NMV; PaMV; PlaMV; PepMV; MVX; OVX; AVX; TVX), *Allexvirus* (GVE; SVX; GVC; GVA; GVX), *Carlavirus* (PoMV; PVS; GarLV; PVM; CVB; PLV; RCVMV), *Mandarivirus* (ICRV) y *Foveavirus* (ASPV; RSPAV). Los códigos de acceso de las secuencias se indican en Materiales y Métodos. Los recuadros negros indican las regiones correspondientes a los motivos helicasa. El gráfico de barras indica el grado de Conservación expresado en escala numérica de 0 – 9. A la derecha de este cuadro se indica la escala de colores asignada según el porcentaje de homología con respecto del consenso.

10. Caracterización de posibles sitios de fosforilación en el extremo C-terminal de TGBp1

Existen distintas evidencias experimentales que le otorgan al extremo carboxi-terminal (C-terminal) de la proteína TGBp1 un posible rol regulatorio, el cual podría estar asociado a la modulación de su actividad ATPasa y helicasa (Atabekov *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1999; Kalinina *et al.*, 2002). El alineamiento de secuencias de TGBp1 y la helicasa tipo SF1 PcrA mostró la conservación de los motivos helicasa dentro de los dominios estructurales 1A y 2A y la ausencia de los dominios 1B y 2B, por lo cual se postula que TGBp1 representaría una helicasa simplificada con sólo dos dominios estructurales (**Figura 4**) (Morozov and Solovyev, 2003). De este modo, la fosforilación y/o la interacción del dominio C-terminal con otras proteínas, podrían resultar en la transducción de un efecto alostérico desde el dominio C-terminal al dominio enzimático N-terminal, permitiendo así regular la capacidad de la proteína de unir ARN y/o de hidrolizar ATP.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió evaluar la presencia de posibles blancos de fosforilación en el extremo C-terminal de la proteína TGBp1. Para ello, se generaron dos proteínas rTGBp1 mutagenizadas: la proteína rTGBp1-dC1 la cual carece del motivo helicasa VI por delección de los aminoácidos 213 a 226; y la proteína rTGBp1-dC2 la cual carece de los motivos helicasas V y VI por delección de los aminoácidos 191 a 226 (**Figura 31**). Ambas construcciones mutantes se generaron sobre el plásmido pET-TGBp1, de manera que es posible expresar las proteínas recombinantes mutagenizadas fusionadas a una secuencia de 6 residuos de histidina. Las proteínas mutagenizadas se expresaron en la cepa *E. coli* BL21(DE3), y se purificaron a homogeneidad en las condiciones ya descritas para la proteína rTGBp1. Las proteínas purificadas presentaron el tamaño molecular esperado, y no mostraron diferencias con respecto a la proteína recombinante rTGBp1 en cuanto a su estabilidad o su antigenicidad en la inmunodetección con anticuerpo específico anti-TGBp1

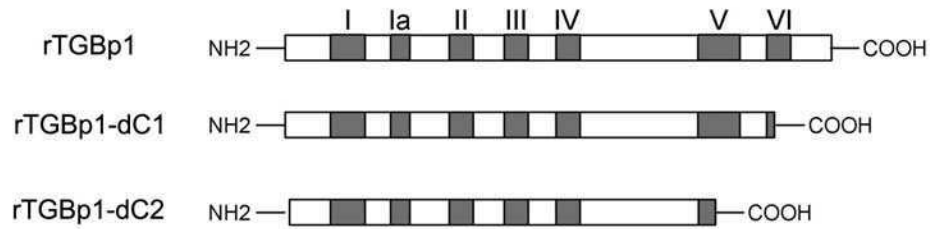


Figura 31. Esquema de las proteínas mutantes con deleciones del extremo C-terminal. Para la construcción de las versiones mutantes se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida, por medio de la amplificación por PCR con mega-oligonucleótidos mutantes. En la proteína denominada TGBp1-dC1 se delecionó el motivo VI. En la proteína denominada TGBp1-dC2 se deleccionaron los motivos V y VI.

Las proteínas rTGBp1-dC1, rTGBp1-dC2 y la proteína salvaje rTGBp1 se fosforilaron *in vitro* con rNtCK2, en presencia de Mg^{+2} y ATP- γ - ^{32}P . Los productos de la reacción de fosforilación, se resolvieron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se autoradiografió (**Figura 35**, panel superior) y se reveló por inmunodetección con anticuerpo anti-TGBp1 (**Fig. 35**, panel inferior). Como puede observarse, la proteína rTGBp1 fue eficientemente fosforilada, mientras que las proteínas rTGBp1-dC1 y rTGBp1-dC2 presentaron un menor nivel de fosforilación que la proteína salvaje (**Fig. 35**, comparar calles 11 y 13, con calle 2). No se observó autofosforilación ni bandas inespecíficas al incubar las proteínas en ausencia de rNtCK2 (**Fig. 35**, calles 1, 10 y 12). La intensidad de las señales se analizó con el software ImageJ, tomando la señal de fosforilación de rTGBp1 como referencia (100% fosforilación). A partir del resultado de cuatro experimentos independientes se estimó un porcentaje medio de fosforilación respecto de rTGBp1, que resultó de $45,3 \pm 4,7$ % para rTGBp1-dC1, y $71,5 \pm 14,2$ % para rTGBp1-dC2. Ambas diferencias resultaron estadísticamente significativas con un $p < 0,01$ para rTGBp1-dC1 y de $p < 0,05$ para rTGBp1-dC2 (ver tabla en el **Fig. 35**). Llamativamente se observó un mayor nivel de fosforilación en la mutante rTGBp1-dC2, que carece de dos motivos helicinas, con respecto a rTGBp1-dC1 que carece sólo del motivo VI. Esta diferencia podría asociarse a una modificación en la estructura de la proteína, que conlleve a la exposición de sitios de fosforilación por rNtCK2 en la proteína rTGBp1-dC1, que no serían accesibles para la quinasa en la proteína rTGBp1-dC2. Este comportamiento atípico también se ha observado con mutantes de delección del extremo C-terminal de TGBp1 cuando se mide su

actividad ATPasa y capacidad de unión de ARN, los cuales apoyan la hipótesis de cambios conformacionales diferenciales de acuerdo con los dominios C-terminales que se encuentren presentes en la proteína mutagenizada (Atabekov *et al.*, 1999; Kalinina *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos permiten suponer la presencia de posibles sitios de fosforilación por rNtCK2 dentro de las regiones que comprenden los motivos helicasa V y VI.

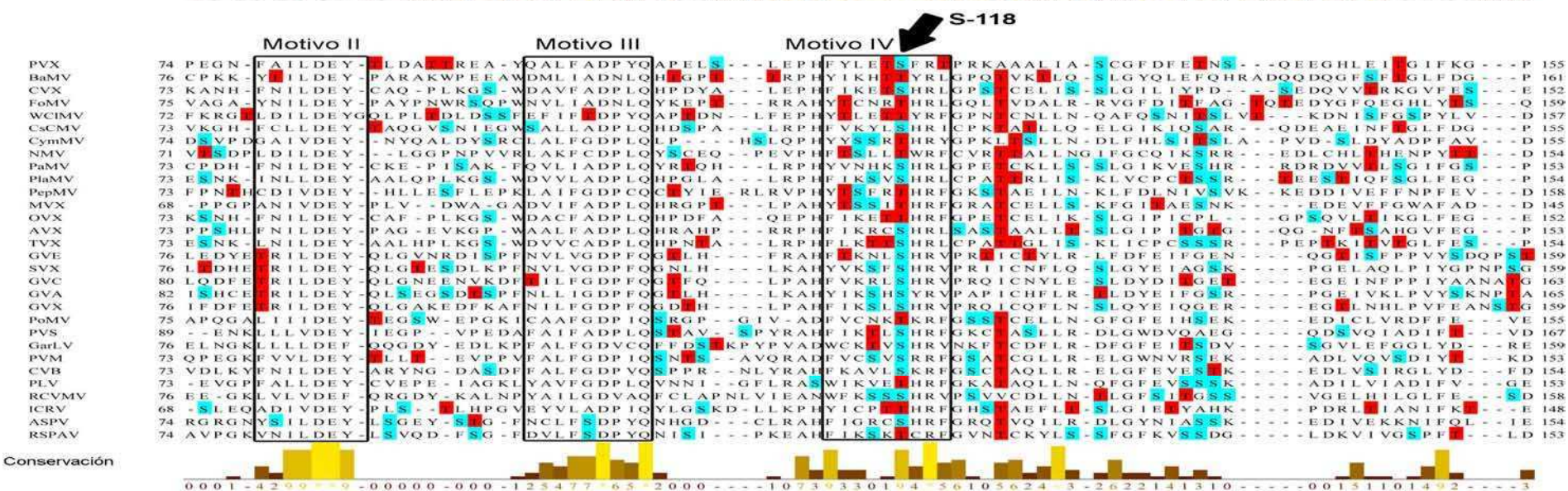
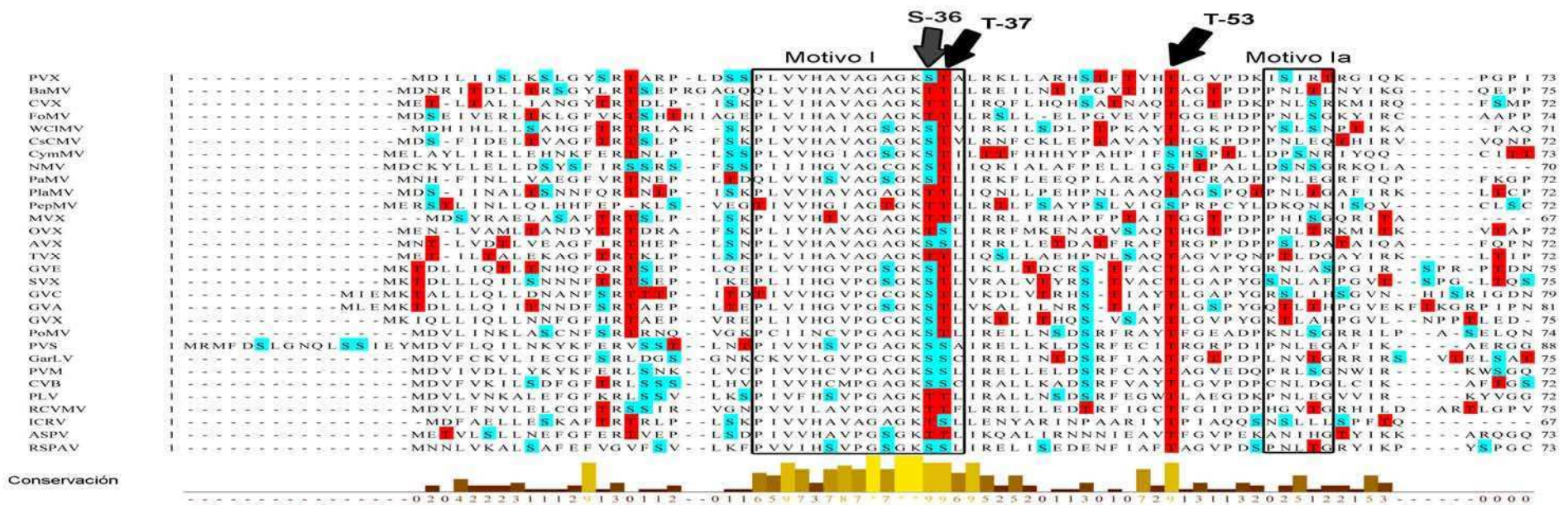
Con el fin de determinar posibles sitios consensos de fosforilación por CK2 en TGBp1, se llevó a cabo un análisis *in silico* de la secuencia utilizando los programas NetPhos 2.0 (Blom *et al.*, 1999); Disphos (Iakoucheva *et al.*, 2004; Diella *et al.*, 2004), Scansite (Obenauer *et al.*, 2003), GPS (Xue *et al.*, 2008) y KinasePhos 2.0 (Wong *et al.*, 2007). En conjunto los resultados obtenidos (ver **Figura 32**) mostraron que ninguno de los programas predictores fue capaz de identificar posibles sitios de fosforilación para CK2 en las regiones delecionadas. Existen algunos antecedentes que muestran que la proteína CK2 es capaz de fosforilar *in vitro* e *in vivo* proteínas que no poseen un sitio consenso estricto (Soufi *et al.*, 2009), y se postula que los entornos estructurales acídicos o bien la oligomerización de la proteína (proceso que ocurre en TGBp1) podrían favorecer la fosforilación por CK2 (Armstrong *et al.*, 1997; Dermody *et al.*, 2008).

Figura 32. Predicción de sitios posibles de fosforilación por CK2, sobre la secuencia de la proteína TGBp1. Se indican con una x, aquellos residuos reconocidos como posibles sitios de fosforilación según la calificación (*score*) de cada uno de los programas utilizados.

Posición	Aminoácido	NetPhos 2.0	DisPhos	Scansite	GPS 2.1	GPS 2.1	Kinase Phos 2.0	Kinase Phos 2.0
85	T(L)DA		x	x				
89	T(TR)E	x	x					
90	T(R)EA				x			
108	S(L)EP	x	x					
138	T(N)SQ			x	x			
140	S(QE)E	x	x		x	x		
165	S(EA)E		x	x			x	
185	T(GL)E		x					
Rigurosidad				Baja	Baja	Media	Baja	Media

Por esta razón, se decidió utilizar como criterio para la selección de posibles sitios de fosforilación, la conservación de aminoácidos fosforilables en las distintas TGBp1 virales. Teniendo en cuenta que el análisis de fosfoaminoácidos reveló que

la proteína rTGBp1 es fosforilada por la FPS de plantas de *N. tabacum* en residuos de serina y treonina, se analizó la distribución y ubicación de dichos residuos en el alineamiento de secuencias TGBp1. El resultado se presenta en la **Figura 33**, en la que los residuos de serina se indican en color celeste, y los de treonina en color rojo. Se identificaron un total de 8 residuos conservados en las secuencias proteicas analizadas, que corresponden a las posiciones: S-36, T-37, T-53, S-118, T-193 y T-214 (numeración relativa a la secuencia de la proteína TGBp1 de PVX), donde sólo los residuos T-193 y T-214 se encuentran ubicados dentro de las delecionadas. La secuencia consenso de fosforilación de CK2 está conformada por el motivo S/TXXE o S/TXXD. Sin embargo, se ha demostrado que el efecto de los residuos de ácido glutámico y de ácido aspártico puede ser reemplazado por residuos de treonina o serina que resulten fosforilados por la propia CK2 o por otra quinasa (Pinna, 1990; Meggio and Pinna; 2003). En el caso de la T-193 en la posición + 3 se ubica un residuo de serina (S-196), el cual es potencialmente fosforilable, creando así un entorno más favorable para la fosforilación por CK2. Llamativamente, este residuo de serina se encuentra parcialmente conservado, y en la mayoría de los casos es reemplazado por residuos fosforilables como treonina y tirosina. Por otra parte, la región aledaña a la S-196 es en general una región levemente rica en residuos ácidos que se encuentra presente en casi todas las TGBp1 analizadas, lo que la convierte en un posible sitio de fosforilación por CK2. Teniendo en cuenta estas consideraciones se decidió estudiar la fosforilación de los residuos T-193 y T-214.



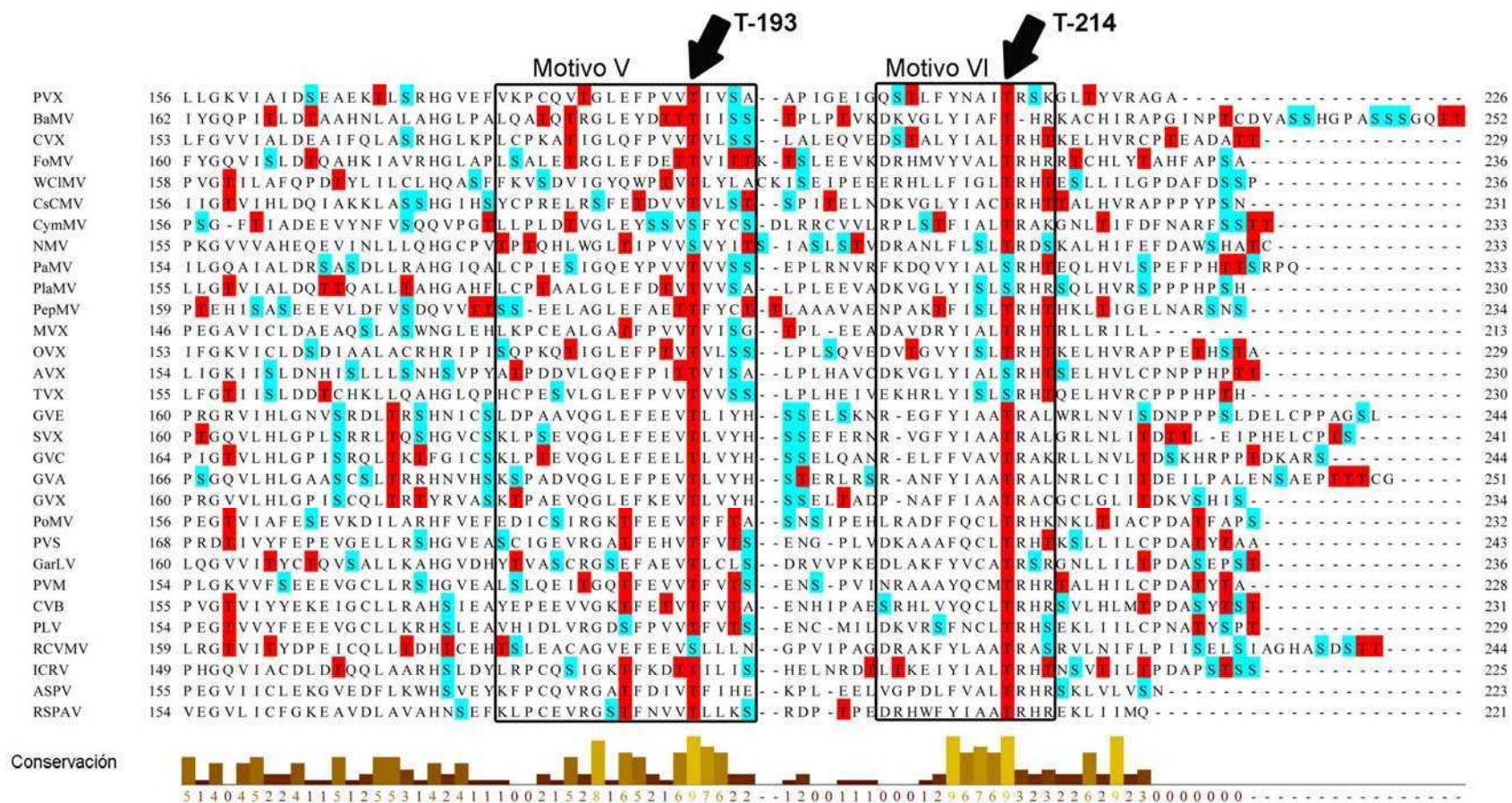


Figura 33. Identificación de residuos de serina y de treonina en el alineamiento de secuencias de TGBp1, familia *Flexiviridae*. Las secuencias alineadas corresponden a los géneros *Potexvirus* (PVX; BaMV; CVX; FoMV; WCIMV; CsCMV; CyMMV; NMV; PaMV; PlaMV; PepMV; MVX; OVX; AVX; TVX), *Allxivirus* (GVE; SVX; GVC; GVA; GVX), *Carlavirus* (PoMV; PVS; GarLV; PVM; CVB; PLV; RCVMV), *Mandarivirus* (ICRV) y *Foveavirus* (ASPV; RSPAV). Los códigos de acceso de las secuencias se indican en Materiales y Métodos. Las zonas recuadradas señalan los residuos comprendidos en cada motivo helicasa. El gráfico de barras indica el grado de conservación expresado en una escala numérica de 0 a 9. Los residuos de serina se indican en color azul y los de treonina en color rojo. Las flechas señalan los aminoácidos de interés (ver texto).

11. Caracterización de versiones de rTGBp1 mutadas en los residuos T-193 y T-214

Para determinar si los residuos T-193 y T-214 son blancos de fosforilación por rNtCK2, se construyeron por mutagénesis dirigida versiones modificadas de la proteína rTGBp1, donde se reemplazaron los residuos de treonina en estudio por residuos de alanina (un aminoácido no fosforilable). Las mutaciones se introdujeron sobre el plásmido pET-TGBp1, obteniéndose en total tres construcciones que permiten la expresión en *E. coli* de las proteínas mutagenizadas: rTGBp1-T193A; rTGBp1-T214A y rTGBp1-T193AT214A (**Figura 34**). Las proteínas recombinantes fueron expresadas y purificadas según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las proteínas presentaron el tamaño molecular esperado, y no evidenciaron diferencias de estabilidad ni antigenicidad respecto de la proteína salvaje en ensayos de *Western blot* realizados con anticuerpo anti-TGBp1.

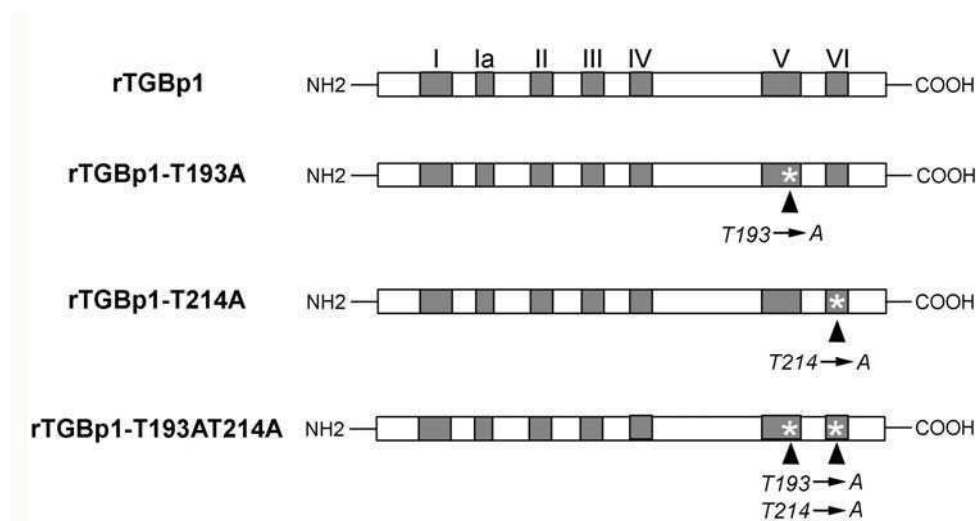


Figura 34. Descripción de proteínas recombinantes con mutaciones puntuales en T-193 y T-214. Para la construcción de las versiones mutantes se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida, por medio de la amplificación por PCR con mega-oligonucleótidos mutantes y un sistema de mutagénesis comercial basado en la técnica de PCR. T = treonina, A = alanina. El asterisco indica la posición del aminoácidos modificado.

La proteína recombinante rTGBp1 y las mutantes rTGBp1-T193A; rTGBp1-T214A y rTGBp1-T193AT214A se fosforilaron *in vitro* con rNtCK2 en presencia de Mg^{2+} y $ATP-\gamma\text{-}^{32}P$ (**Figura 35**). Las reacciones se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se autorradiografiaron (**Fig. 35**, paneles superiores) y se inmunodetectaron con anticuerpo anti-TGBp1 (**Fig. 35**, paneles inferiores). La proteína rTGBp1 salvaje fue eficientemente fosforilada (**Fig. 35**, calle 2), mientras que las tres proteínas mutagenizadas presentaron menores niveles de fosforilación que la proteína salvaje (**Fig. 35**, comparar calles 4, 6 y 8, con calle 2). No se observó autofosforilación ni bandas inespecíficas al incubar las proteínas en ausencia de rNtCK2 (**Fig. 35**, calles 1, 3, 5 y 7)

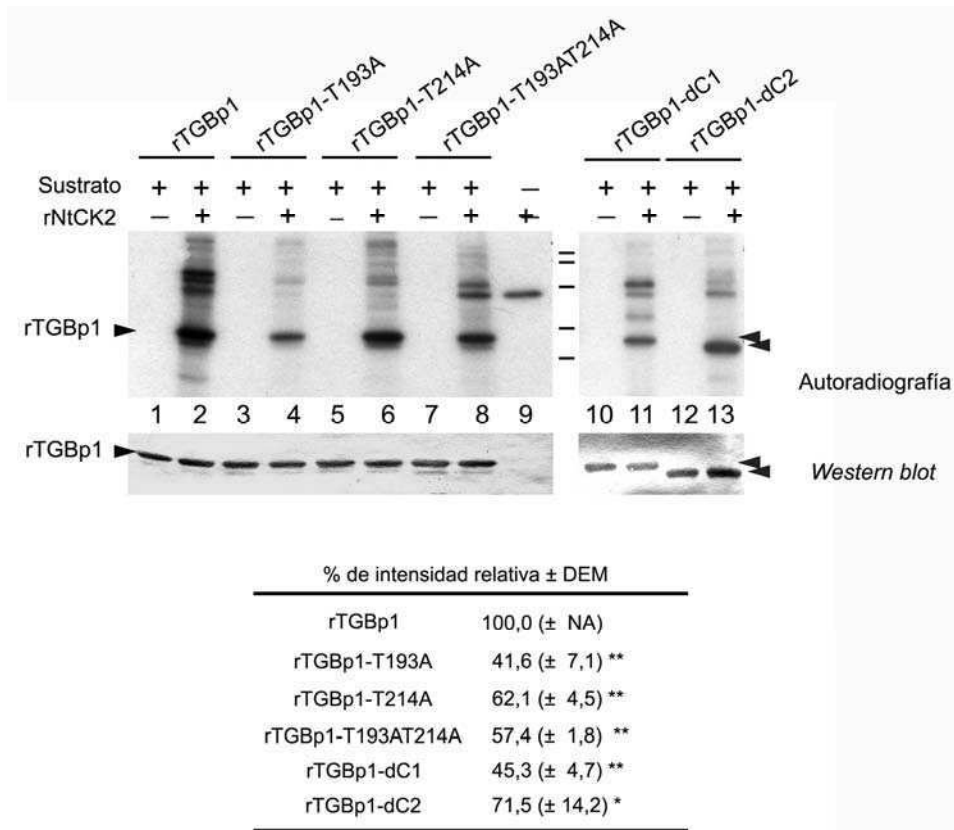


Figura 35. Fosforilación *in vitro* de proteínas rTGBp1 mutantes por rNtCK2. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de $ATP-\gamma\text{-}^{32}P$ y 5 mM $MgCl_2$. Se resolvieron en geles SDS-PAGE 15%, se transfirieron a nitrocelulosa y se autorradiografiaron (*paneles superiores*); las membranas se inmunodetectaron con anti-TGBp1 (*paneles inferiores*). Las flechas indica la posición de TGBp1. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64, 47, 34, 24 y 19 kDa. Estos resultados son representativos. En la tabla se indica el porcentaje promedio de intensidad de las bandas relativo a rTGBp1 (100 %), calculada en base a 4 experimentos independientes. Los valores se analizaron por ANOVA, seguido del test de Dunnet. **: $p < 0,01$ y *: $p < 0,05$ (con respecto a rTGBp1). NA: no aplica. DEM: desviación estándar de la media.

La intensidad de las señales se analizó con el software ImageJ, tomando la señal de fosforilación de rTGBp1 como referencia (100% fosforilación). A partir del resultado de cuatro experimentos independientes, se estimó un porcentaje medio de fosforilación de $41,6 \pm 7,1$ % para rTGBp1-T193A, $62,1 \pm 4,5$ % para rTGBp1-T214A y de $57,4 \pm 1,8$ % para la doble mutante rTGBp1-T193AT214A. En todos los casos las diferencias resultaron estadísticamente significativas con un $p < 0,01$. Estos resultados sugieren que tanto la T-193 como la T-214 son blancos de fosforilación de CK2. Por otra parte, la doble mutante continúa siendo fosforilada por CK2 lo que indica que existen en TGBp1, otro u otros residuos fosforilables por CK2. Llamativamente, los niveles de fosforilación obtenidos en la doble mutante no son menores a los de las mutantes individuales, lo que podría señalar la exposición de nuevos sitios de fosforilación cuando los sitios T-193 y T-214 no se encuentran fosforilados.

12. Efecto de la mutación de los residuos T-193 y T-214 de TGBp1 sobre la capacidad infectiva de PVX

Con el objetivo de determinar la importancia de los residuos identificados como blanco de fosforilación en la capacidad de infección viral, se construyeron diferentes amplicones de PVX mutagenizadas que portan modificaciones puntuales en los sitios en estudio. Como molde se utilizó un amplicón viral que expresa el ADNc infeccioso del virus PVX cepa CP2 a partir del promotor constitutivo 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (Orman *et al.*, 1990; Zelada *et al.*, 2006). Utilizando técnicas basadas en amplificación por PCR, se introdujeron mutaciones de reemplazo de los aminoácidos T-193 y T-214 por residuos de alanina y de ácido aspártico sobre un fragmento del genoma de PVX (los detalles del procedimiento se describen en Materiales y Métodos). Los fragmentos modificados se clonaron en un vector intermediario (pZERO), y luego se subclonaron en el amplicón PVX (pZP-PVX) dando lugar a los amplicones mutagenizados: PVX-T193A; PVX-T193D; PVX-T215A y PVX-T215D (**Figura 36**). El reemplazo de los residuos de treonina por alanina impide la fosforilación de la proteína en las posiciones modificadas, mientras que el reemplazo por residuos de ácido aspártico (un residuo de carga negativa) genera en el entorno una carga similar a la que provocaría la adición de un grupo fosfato por fosforilación (Dean and Koshland, 1990).

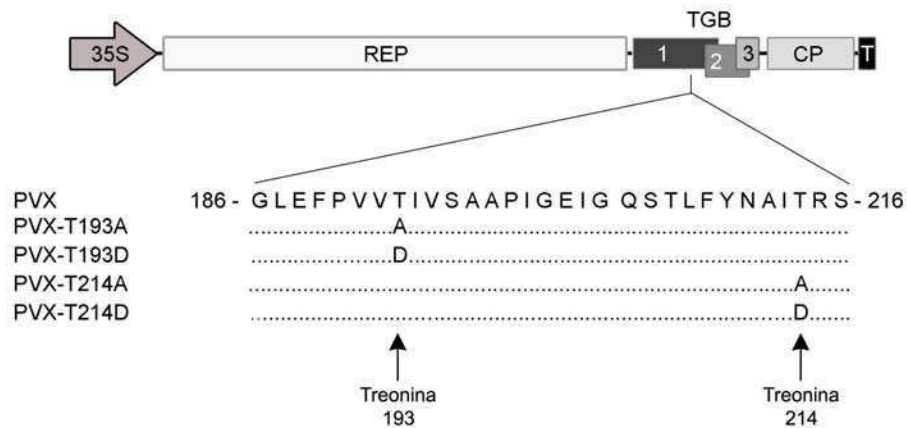


Figura 36. Amplicón viral de PVX y versiones mutantes. Se indica un fragmento de la secuencia aminoacídica de TGBp1 (residuos 186 – 216 de la secuencia proteica), y la posición de las mutaciones de reemplazo de residuo. 35S: promotor 35S de CaMV; REP: replicasa viral; TGB: triple bloque de genes; CP: cápside viral; T: terminador NOS (nopalina sintetasa); A: alanina; D: ácido aspártico.

Para evaluar la capacidad infectiva de los amplicones PVX mutagenizados, se realizaron ensayos de agroinfiltración de plantas *N. tabacum* con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las construcciones que codifican los distintos amplicones mutantes. Como control, se agroinfiltraron plantas con un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con un plásmido binario vacío. En la **Figura 37** se presenta un esquema del procedimiento utilizado. Las plantas agroinfiltradas se conservaron en cámaras de cultivo durante un período de 30 días y se observaron diariamente para registrar la aparición de síntomas de infección. Transcurridos 7 y 14 días post-infiltración (d.p.i) se recolectó tejido foliar de hojas inoculadas y sistémicas, a partir de las cuales se extrajeron proteínas totales para evaluar la presencia de CP y TGBp1 mediante análisis de *Western blot* con anticuerpos específicos.

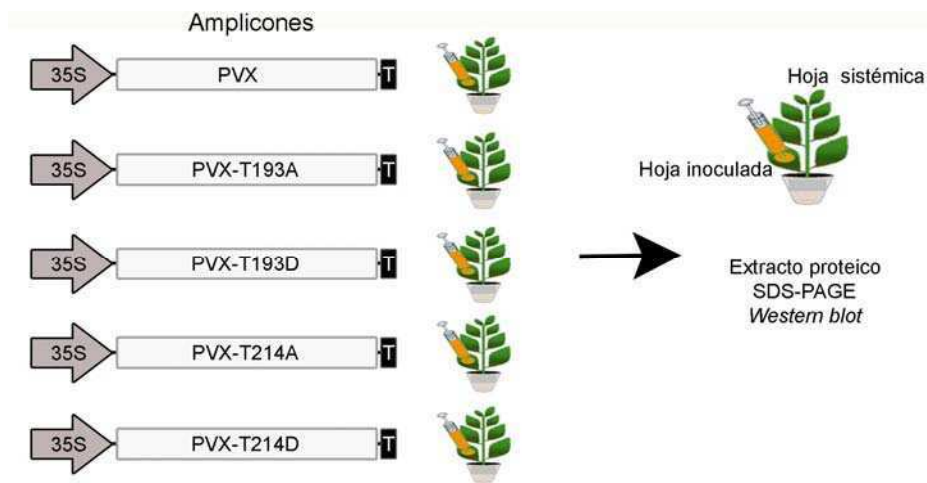


Figura 37. Esquema del procedimiento utilizado para la evaluación de la capacidad de movilización sistémica de los amplicones PVX mutantes. En cada esquema se indica el nombre de la construcción del amplicón PVX mutante. 35S: promotor 35S de CaMV; T: terminador NOS. Las plantas de *N. tabacum* se agroinfiltraron con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las construcciones descritas en la figura. Luego de 7 y 14 d.p.i se tomaron muestras de tejido foliar de hojas inoculadas y sistémicas. Se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se revelaron con anticuerpo anti-CP y con anti-TGBp1 (ver **Figuras 38 y 39**).

En las **Figuras 38 y 39** se presentan los resultados del análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de CP y TGBp1 en un ensayo tipo, respectivamente. Se efectuaron dos experimentos independientes con 3 réplicas de cada una de las construcciones evaluadas.

En todas las plantas agroinfiltradas con el amplicón PVX se detectó presencia de CP en hojas inoculadas y sistémicas a los 7 d.p.i. (**Fig. 38**, calles 2, 6, 18 y 22), y estos niveles se mantuvieron luego de 14 d.p.i. (**Fig. 38**, calles 10, 14, 26 y 30). La misma observación se reiteró para la presencia de TGBp1 en hojas inoculadas y sistémicas luego de 7 d.p.i (**Fig. 39**, calles 2, 6, 18 y 22) y 14 d.p.i. (**Fig. 39**, calles 10, 14, 26 y 30). La presencia de altos niveles de CP en hojas sistémicas se correlacionó con la aparición de síntomas de infección viral. En estas plantas los síntomas de infección se manifestaron a partir de los 5 d.p.i..

Ninguna de las plantas agroinfiltradas con el cultivo de *Agrobacterium* transformado con un plásmido vacío evidenciaron síntomas de infección o presencia

de proteína CP (**Fig. 38**, calles 1, 5, 9,13, 17, 21, 25 y 29) o TGBp1 (**Fig. 39**, calles 1, 5, 9,13, 17, 21, 25 y 29).

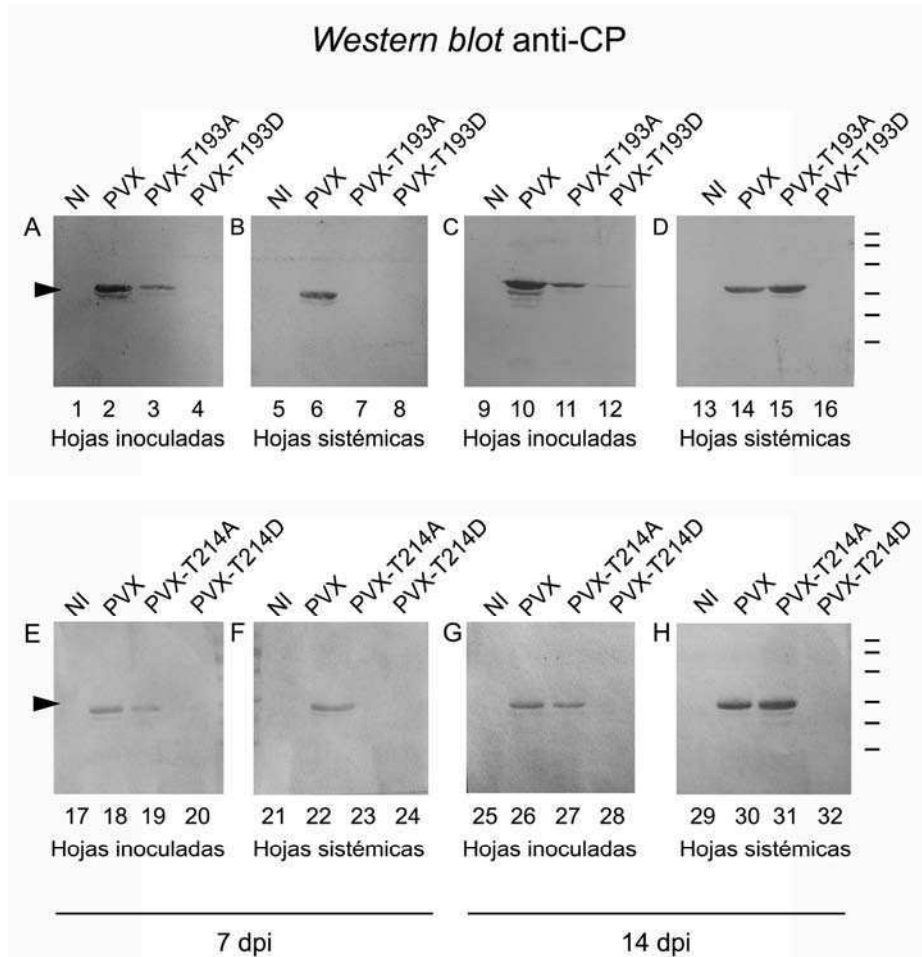


Figura 38. Evaluación de la movilización sistémica de amplicones mutantes PVX. Análisis de Western blot anti-CP A partir de las muestras tomadas a 7 y 14 d.p.i. de hojas inoculadas y sistémicas se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas mostradas en esta figura se revelaron con anticuerpo anti-CP. (A – D) Muestras de plantas agroinfiltradas con amplicones mutantes en el residuos de treonina 193. (E – H) Muestras de plantas agroinfiltradas con amplicones mutantes en el residuos de treonina 214. (A, B, E y F) Las muestras se tomaron a 7 d.p.i.; (C, D, G y H) muestras tomadas a 14 d.p.i.. La flecha indica la posición de CP. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64, 47, 34, 24 y 19 kDa.

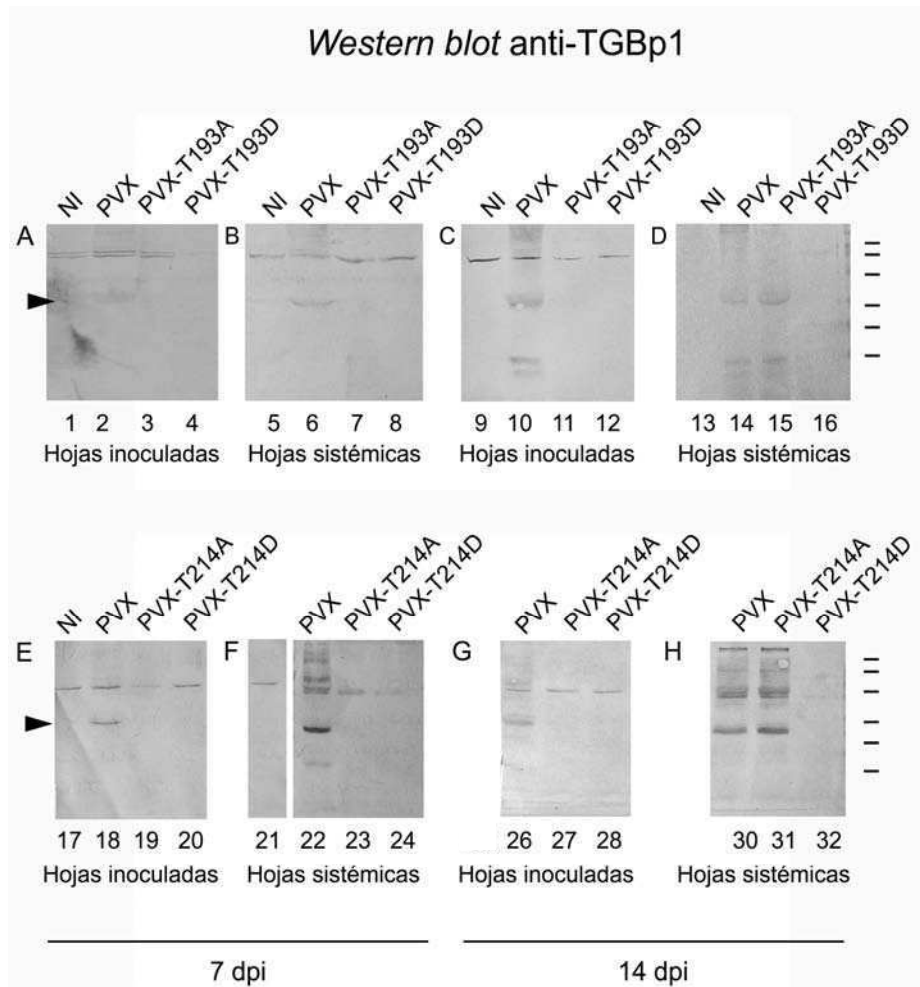


Figura 39. Evaluación de la movilización sistémica de amplicones mutantes PVX – Análisis de *Western blot* anti-TGBp1. A partir de las muestras tomadas a 7 y 14 d.p.i. de hojas inoculadas y sistémicas se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La membranas mostradas en esta figura se revelaron con anticuerpo anti-TGBp1. A – D) Muestras de plantas agroinfiltradas con amplicones mutantes en el residuo de treonina 193. (E – H) Muestras de plantas agroinfiltradas con amplicones mutantes en el residuo de treonina 214. (A, B, E y F) Las muestras se tomaron a 7 d.p.i.; (C, D, G y H) muestras tomadas a 14 d.p.i.. La flecha indica la posición de CP. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64, 47, 34, 24 y 19 kDa.

En cuanto a los amplicones mutantes PVX-T193A y PVX-T215A, ninguna de las plantas agroinfiltradas presentó niveles detectables de CP a nivel sistémico luego de 7 d.p.i. (**Fig. 38**, calles 7 y 23). Sin embargo fue posible detectar CP en hojas inoculadas, aunque en este caso los niveles detectados siempre fueron muchos menores que los observados en las plantas infiltradas con el amplicón PVX salvaje (**Fig. 38**, comparar calles 3 con calle 2, y calle 19 con 18). No fue posible detectar

niveles de expresión de TGBp1 en las hojas inoculadas, ni en hojas sistémicas (Fig. 39, calles 3, 7, 19 y 23). Llamativamente, luego de 14 d.p.i. los amplicones mutantes PVX-T193A y PVX-T215A fueron capaces de establecer una infección sistémica, a juzgar por la aparición de síntomas de infección y la detección en hojas sistémicas de la proteína CP (**Fig. 38**, calles 15 y 31) y de TGBp1 (**Fig. 39**, calles 15 y 31). Los niveles de CP y TGBp1 alcanzados en hojas sistémicas fueron similares a los obtenidos por los amplicones salvajes (**Fig. 38 y Fig. 39** comparar calle 15 con 14, y calle 31 con 30). Con el fin de determinar si la infección sistémica se establece por un evento de reversión de la mutación se analizó por RT-PCR la progenie viral presente en hojas sistémicas a los 14 d.p.i. Los resultados obtenidos mostraron que en todos clones analizados la secuencia de TGBp1 presentaba la reversión de alanina a treonina, sugiriendo que la infección sistémica es establecida por viriones salvajes.

En el caso de los amplicones mutantes PVX-T193D y PVX-T214D ninguna de las plantas agroinfiltradas desarrollaron síntomas de infección en el período de tiempo estudiado (30 d.p.i.). Esta observación correlaciona con la ausencia de detección de proteínas CP en la mayoría de las plantas infiltradas luego de 7 y 14 d.p.i., tanto para hojas inoculadas como sistémicas (**Fig. 38**, calles 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 32). La misma observación es válida para el análisis de la presencia de proteína TGBp1 (**Fig. 39**, calles 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 32). Sólo en algunas plantas fue posible detectar niveles muy bajos de CP en hojas inoculadas (**Fig. 38**, calle 12), sin embargo en estas plantas, y a diferencia de lo observado para PVX-T193A y PVX-T215A, los amplicones mutantes PVX-T193D y PVX-T214D no lograron establecer una infección sistémica.

En resumen, los resultados de estos experimentos señalan que la modificación de los residuos de treonina ubicados en las posiciones 193 y 214 resulta perjudicial para el ciclo de infección del virus. El reemplazo del residuo de treonina por alanina, en cualquiera de los sitios, podría producir una disminución en la capacidad de amplificación del virus en las hojas inoculadas, conduciendo a un retraso de al menos 7 d.p.i. en el establecimiento de la infección sistémica con respecto al virus salvaje. Por otra parte, la modificación de cualquiera de los residuos de treonina por un residuo de ácidos aspártico aparentemente impide la amplificación inicial del virus, y conduce a la imposibilidad de establecer una infección sistémica.

Para confirmar que las diferencias observadas entre los amplicones mutantes y el amplicón PVX en la acumulación de proteína CP en hojas inoculadas, se debe exclusivamente a las modificaciones incorporadas en la proteína se evaluó si la expresión transitoria de la proteína TGBp1 salvaje, era capaz de restaurar la acumulación de proteína CP. Para esto se co-agroinfiltraron hojas de *N. tabacum* con

cultivos de *A. tumefaciens* que portan los amplicones mutagenizados con un cultivo de *A. tumefaciens* que porta una construcción para la expresión de la proteína TGBp1 salvaje bajo la acción del promotor 35S de CaMV (35S:TGBp1). Como control se agroinfiltraron plantas de *N. tabacum* con el cultivo que porta las construcciones de amplicones mutagenizados. En la **Figura 40A** se esquematiza el procedimiento.

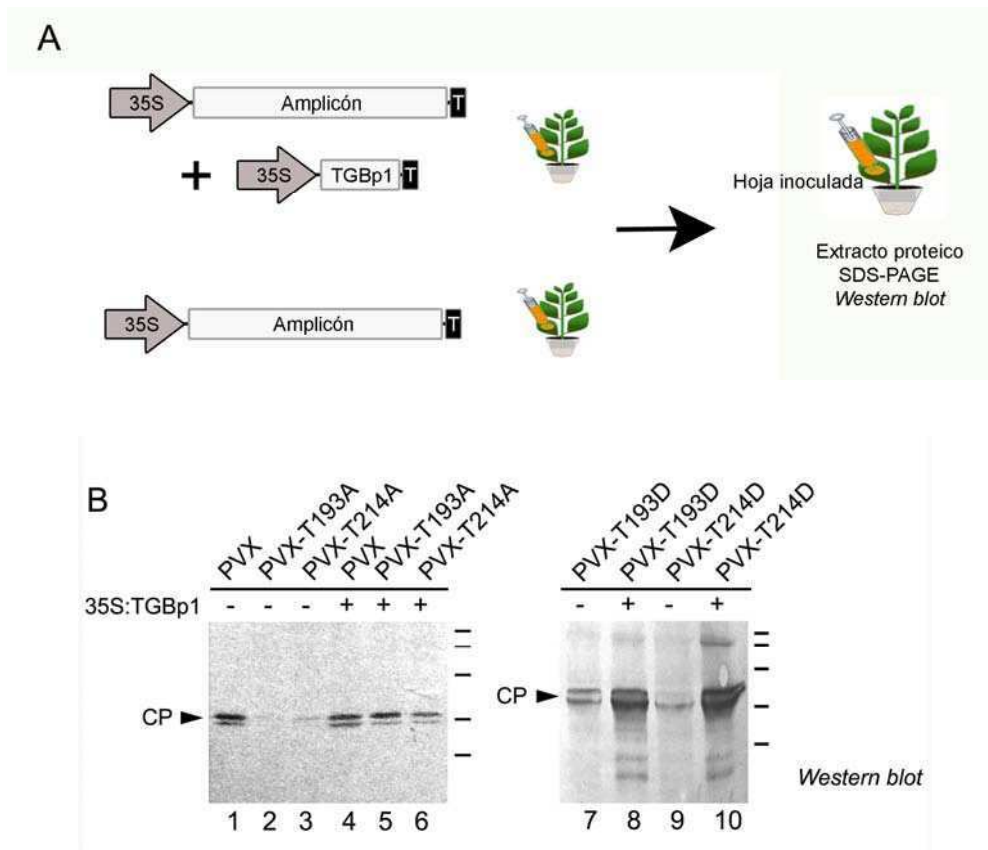


Figura 40. Evaluación de la acumulación de proteína CP en co-agroinfiltraciones de amplicones mutantes y 35S:TGBp1. (A) Se agroinfiltraron hojas de *N. tabacum* con una combinación de cultivos de *A. tumefaciens* portador del amplicón (PVX o versiones mutantes indicadas en la Fig. 37) y de una construcción que expresa la proteína TGBp1 bajo la acción del promotor 35S de CaMV y el terminador NOS. Como control se agroinfiltraron plantas con cultivos de *A. tumefaciens* con cada uno de los amplicones mutantes (B) Luego de 7 d.p.i. se evaluó la acumulación de la proteína CP por inmunodetección con anticuerpo anti-CP. Las flechas indican la posición de la proteína CP. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64, 47, 34, 24 y 19 kDa.

Luego de 7 d.p.i se evaluó la acumulación de proteína CP y se observó que la expresión en *trans* de la proteína TGBp1 salvaje, eleva la acumulación de proteína CP en las hojas co-infiltradas con los amplicones mutagenizados, con respecto a los controles agroinfiltrados únicamente con los amplicones mutagenizados (**Figura 40B**, comparar calle 2 y 5; 3 y 6; y **Fig. 40C** comparar 7 y 8; 9 y 10). Estos resultados

muestran que la reducción observada en la acumulación de proteína CP puede ser revertida en presencia de una proteína TGBp1 funcional. Este resultado nos permite suponer que la integridad de los viriones mutagenizados no se encuentra afectada, más allá del defecto que ocasionan las mutaciones en los residuos T-193 y T-214 sobre la funcionalidad de la proteína TGBp1.

13. Efecto de la mutación de los residuos T-193 y T-214 sobre la actividad ATPasa de TGBp1

Se ha postulado que las modificaciones en el extremo C-terminal modulan la capacidad de hidrólisis de ATP de los motivos catalíticos I, la y II (Morozov *et al.*, 1999; Leschiner *et al.*, 2006). Sobre esta base, decidimos evaluar si la actividad ATPasa de TGBp1 es afectada por reemplazo de los residuos T-193 y T-214 por residuos que generan un entorno electrostático similar al de la fosforilación. Para ello, se construyeron por mutagénesis dirigida versiones mutantes de la proteína rTGBp1, donde se reemplazaron los residuos de treonina en estudio por residuos de ácido aspártico. Las mutaciones se introdujeron sobre el plásmido pET-TGBp1, obteniéndose en total dos construcciones que permiten la expresión en *E. coli* de las proteínas recombinantes mutantes TGBp1-T193D y TGBp1-T215D (**Figura 41**). Las proteínas recombinantes fueron expresadas y purificadas según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Ambas proteínas presentaron el tamaño molecular esperado y no se evidenciaron diferencias en su antigenicidad respecto de rTGBp1, en ensayos de *Western blot* realizados con anticuerpo anti-TGBp1

Para medir la actividad de hidrólisis de ATP, las proteínas recombinantes mutantes y salvaje fueron incubadas en el buffer RH (ver Materiales y Métodos) suplementado con $MgCl_2$ y en presencia de ATP- γ - ^{32}P , durante 15 min a 37 °C Como control negativo, se utilizó un extracto de purificación obtenido a partir de *E.coli* BL21 (DE3) transformada con el vector de expresión vacío pET28a (+). Finalizada la reacción, se precipitó el ATP- γ - ^{32}P no hidrolizado por el método de carbón activado, y se midió la radioactividad del sobrenadante (^{32}Pi) en contador de centelleo líquido. En el gráfico y la tabla de la **Figura 42** se indican los valores medios de porcentaje de actividad relativa a rTGBp1 (100% de hidrólisis de ATP). Estos valores se calcularon

en base a tres experimentos independientes y el resultado se analizó por ANOVA de un factor seguido del test de *Dunnet*.

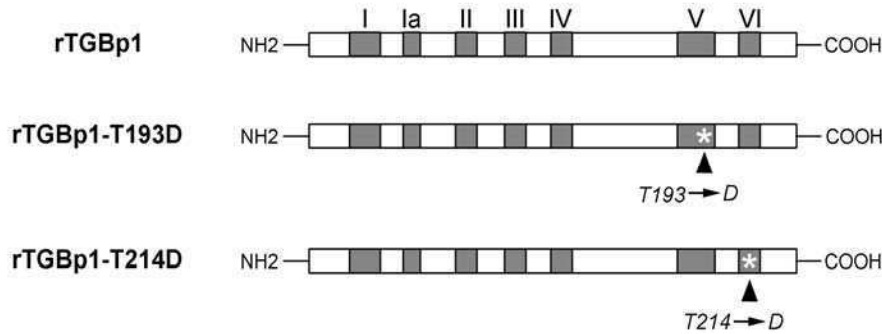


Figura 41. Descripción de proteínas recombinantes con mutaciones puntuales en T-193 y T-214. Para la construcción de las versiones mutantes se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida, por medio de la amplificación por PCR con megaoligonucleótidos mutantes y un sistema de mutagénesis comercial basado en la técnica de PCR. T = treonina, D = ácidos aspártico. El asterisco indica la posición del residuo modificado.

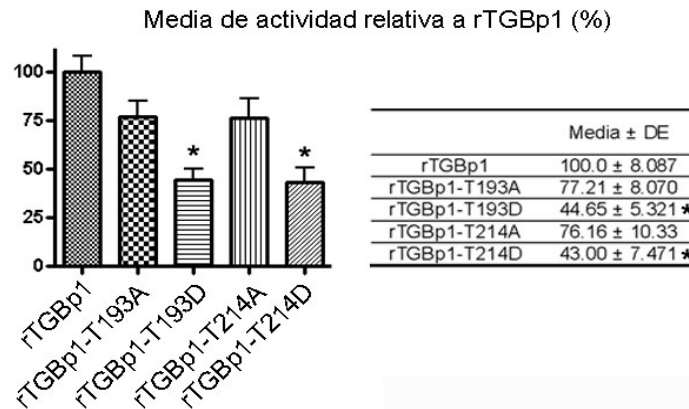


Figura 42. Evaluación de la actividad de hidrólisis de rTGBp1 mutantes. Se midió la actividad de 300 ng de proteína durante 15 min en presencia de 1 μ Ci de ATP- γ - 32 P y 5 mM MgCl₂. La reacción se interrumpió por agregado de EDTA. Se precipitó el ATP, y se midió la radioactividad del sobrenadante en contador líquido de centelleo. La lectura de cpm x 1000 (32 P libre) registrada para rTGBp1 en cada uno de los ensayos, se consideró como valor de 100 % de actividad. En el gráfico se indica el porcentaje de actividad de hidrólisis alcanzado por cada proteína mutante, en relación a rTGBp1. En la tabla se indican los valores de la media de 3 experimentos y su desviación estándar (DE), y la media de las diferencias observadas. Los datos se analizaron por ANOVA, seguido de test de *Dunnet*; * = $p < 0.01$.

Como puede observarse en la **Figura 42**, las proteínas mutagenizadas donde los residuos de treonina se reemplazaron por alanina y no pueden ser fosforilados, (rTGBp1-T193A y rTGBp1-T214A) presentan niveles de actividad inferiores a los de de

la proteína salvaje. El cálculo de la media de actividad relativa a rTGBp1 indica que en ambos casos las proteínas mutantes alcanzan valores de $77,21 \pm 8.070\%$ para rTGBp1-T193A; y $76,16 \pm 10.33\%$ de actividad de hidrólisis para rTGBp1-T214A en relación a rTGBp1. Sin embargo, el análisis estadístico de las medias de actividad relativa de la proteínas TGBp1 con respecto a cada una de las mutantes rTGBp1-T193A y rTGBp1-T214A no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0.01$) (**Fig. 42**). Por otra parte, las mutantes rTGBp1-T193D y rTGBp1-T214D mostraron una media de actividad relativa a rTGBp1 de $44.65 \pm 5.3213\%$ y $43.00 \pm 7.471\%$ respectivamente. El análisis estadístico indicó que las medias de actividad relativa de la proteína salvaje con respecto a cada una de las proteínas mutagenizadas rTGBp1-T193D y rTGBp1-T214D son significativamente diferentes ($p < 0.01$). Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de una regulación negativa de la actividad de hidrólisis de TGBp1 por fosforilación de los residuos T-193 y T-214.

14. Análisis de los sitios de fosforilación de rTGBp1 por espectrometría de masa

Con el fin de confirmar si los residuos T-193 y T-214 son fosforilados por CK2 e identificar los otros posibles residuos blanco sugeridos por los ensayos de fosforilación *in vitro*, se llevó a cabo un análisis de la presencia de modificaciones post-traduccionales (MPT) mediante la técnica espectrometría de masa en la proteína recombinante rTGBp1 fosforilada *in vitro* por rNtCK2.

Para ello, se llevó a cabo la fosforilación *in vitro* de rTGBp1 con rNtCK2, en presencia de $MgCl_2$ y ATP. El producto de reacción se resolvió en un gel desnaturizante de poliacrilamida 15%. El gel se tiñó con CBB y se recortó la banda de proteína de 24 kDa correspondiente a TGBp1. El análisis de espectrometría de masa se llevó a cabo en el *Scripps Center for Mass Spectrometry* (La Jolla, California). Allí, se digirió la proteína con tripsina y los fragmentos se sometieron a cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en *tandem* (nanoLC-MS/MS, *nano liquid chromatography coupled to ion trap mass spectrometer*). Esta técnica es particularmente ventajosa debido a que combina la elevada resolución y sensibilidad de la cromatografía líquida con la precisión y especificidad de los espectros de datos MS/MS (Kalume *et al.* 2003; MacCoss *et al.* 2002).

La lectura del espectro permitió identificar varios péptidos logrando una cobertura del 72% de la secuencia de TGBp1 (**Figura 43**, residuos de color rojo). En la misma figura, las zonas señaladas por líneas de puntos corresponden a péptidos trípticos pequeños, con rango de masa de aproximadamente 200 Da o menos; debido al principio de funcionamiento del espectrómetro de masa, estos fragmentos pequeños no suelen detectarse en los espectros (Mann *et al*, 2001).

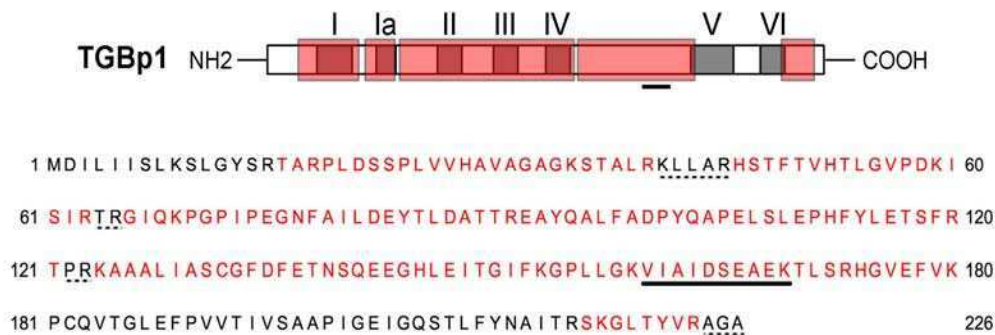
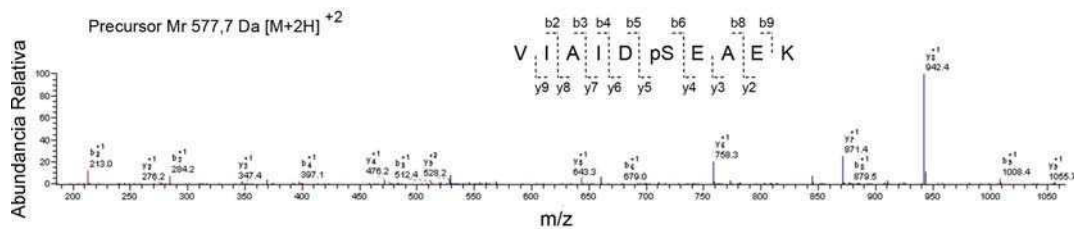


Figura 43. Cobertura del ensayo de espectrometría de masa. Sobre el esquema de la secuencia de TGBp1 se indica en color rosado/rojo las zonas cubiertas por la lectura del espectro generado. El péptido subrayado de 1074 Da, presentó una modificación atribuible a fosforilación (masa observada 1155Da). Las líneas de puntos señalan los fragmentos cuyos tamaños son inferiores a 200 Da.

Este análisis permitió identificar la presencia de un único péptido fosforilado. La masa observada de 1155 Da, resulta compatible con la masa teórica de 1074 Da del péptido tríptico 160-VIAIDSEAEK-169 más 80 Da adicionales atribuibles a la presencia de un grupo fosfato H_3PO_4 (D'Ambrosio *et al.*, 2007). El fosfopéptido de interés se sometió a fragmentación para corroborar la modificación del único residuo de serina presente. El espectro de la fragmentación resultante del precursor $577,7 [M+2H]^{+2}$ se presenta en la **Figura 44**. Al someter el péptido/ión precursor (1155 Da) a un proceso de fragmentación se generan iones "y" que corresponden a los iones derivados del extremo C-terminal; e iones "b" derivados del extremo N-terminal. En la tabla (**Fig. 44**) se presentan los valores teóricos y observados para ambas series de iones. En la columna correspondiente a los valores teóricos, se indica el valor que debería observarse si el único residuo de serina de este péptido se encontrara fosforilado (S*, ver Tabla en **Fig. 44**). En ambos casos, se observa que la coincidencia entre el valor

m/z teórico para la S* y el valor observado en el espectro (ver iones b6 e y5), indicando que el residuo de serina en la posición 165 es blanco de fosforilación *in vitro* por la subunidad alfa recombinante de CK2 de *N. tabacum* (rNtCK2).



Serie fragmentos b			Serie fragmentos y		
	[MH+] teórica	m/z observada	Residuo	[MH+] teórica	m/z observada
1	100.08	-	V	10	-
2	213.16	213.0	I	9	1055.48
3	284.20	284.2	A	8	942.40
4	397.28	397.1	I	7	871.36
5	512.31	512.4	D	6	758.27
6	679.32	679.0	S*	5	643.25
7	808.36	-	E	4	476.24
8	879.40	879.5	A	3	347.19
9	1008.41	1008.4	E	2	276.16
10	-	-	K	1	147.11

Figura 44. Espectro de fragmentación MS/MS. El espectro presenta la secuenciación *de novo* del polipéptido cuya secuencia se indica en el panel superior, donde se señalan los iones identificados luego de la fragmentación. La tabla inferior presenta la comparación de las masas teóricas y las masas observadas para la serie iónicas *b* e *y*. S*, la masa teórica de los iones *b6* e *y5*, contemplan la modificación por fosforilación de la serina.

No fue posible confirmar la presencia de sitios de fosforilación en la región C-terminal debido a que el fragmento peptídico que contiene los residuos T-193 y T-214 no pudo ser secuenciado. Probablemente, esto se haya debido a que la ausencia de sitios de corte para tripsina en el extremo C-terminal de TGBp1 genera un péptido muy largo. Si bien los péptidos largos se fragmentan de manera eficiente y proveen largas series iónicas, en realidad estas series presentan baja intensidad dificultando la detección por falta de sensibilidad (Mann *et al.*, 2001). Además, los péptidos fosforilados se ionizan de manera menos eficiente y habitualmente presentan una baja relación estequiométrica respecto de las formas no fosforiladas (Maccarrone *et al.*, 2006).

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1. La proteína TGBp1 es fosforilada por una quinasa celular con características de CK2

En el transcurso de este trabajo, se demostró que la proteína rTGBp1, es fosforilada por al menos una proteína quinasa celular presente en la FPS de hojas de *N. tabacum*. Esta actividad quinasa se encuentra presente tanto en la FPS obtenida de plantas de *N. tabacum* no infectadas, como en las obtenidas a partir de plantas infectadas con PVX o con PVY. Además, se observó que la fosforilación de rTGBp1 se encuentra incrementada en las plantas infectadas respecto de las plantas no infectadas.

Utilizando diferentes enfoques experimentales, se obtuvieron evidencias que señalan que la proteína quinasa involucrada en este proceso pertenece a la familia de CK2. En primer lugar, se observó que la fosforilación *in vitro* por la FPS de plantas no infectadas es estimulada por polilisina, inhibida por heparina y utiliza ATP y GTP como dadores de grupo fosforilo. Enfoques similares han sido utilizados para la caracterización de actividades CK2 en maíz y *Arabidopsis* (Stemmer *et al.*, 2002; Kang and Klessig, 2005). En particular, la capacidad de utilizar GTP es buen indicador de la actividad de CK2, principalmente porque permite discriminar entre actividades enzimáticas de CK2 y CK1 (Wang *et al.*, 1992; Allende and Allende, 1995; Antonelli *et al.*, 1996; Niefind *et al.*, 1999). Aunque las proteínas quinasas CK1 comparten características bioquímicas con las quinasas CK2, tanto en plantas como en animales se ha demostrado que la quinasa CK1 no es capaz de utilizar GTP como dador de grupos fosforilo (Klimczak and Cashmore, 1993; Klimczak *et al.*, 1995b; Knippschild *et al.*, 2005). Por otra parte, y en concordancia con los resultados de los ensayos de fosforilación de rTGBp1 *in vitro* por FPS de *N. tabacum*, los ensayos de fosforilación *in situ* demostraron que la proteína nativa TGBp1 es también fosforilada por una proteína quinasa celular de tipo CK2.

A partir de la FPS de plantas no infectadas de *N. tabacum*, se purificó parcialmente una actividad enzimática endógena capaz de fosforilar a rTGBp1. Dicha actividad co-eluyó con una actividad enzimática que fosforila también caseína (un sustrato de las proteínas quinasas CK1 y CK2) y un oligopéptido

que actúa como sustrato específico de fosforilación por CK2 (Marin *et al.*, 1994). Las características de la actividad endógena resultaron similares a las de proteínas quinasas CK2, incluyendo su capacidad de utilizar GTP como dador de grupos fosforilo. Finalmente, se llevó a cabo el clonado y expresión de la subunidad alfa de CK2 de *N. tabacum* (rNtCK2), y se demostró mediante ensayos de fosforilación *in vitro* su capacidad para fosforilar a rTGBp1. La enzima recombinante utilizada en estos ensayos presentó las características bioquímicas típicas asociadas a enzimas CK2 de plantas (Espunya and Martínez, 1997; Salinas *et al.*, 2001; Ogrzewalla *et al.*, 2002; Riera *et al.*, 2004).

Hasta el momento, las MPs más estudiadas y caracterizadas han sido las MPs 30K de los *Tobamovirus* TMV y ToMV. Entre las proteínas quinasas capaces de fosforilar a estas proteínas, se han descrito una proteína quinasa asociada a pared celular y una actividad quinasa citoplasmática; en ambos casos las actividades enzimáticas responden a las características de las proteínas quinasas de tipo CK2 (Citovsky *et al.*, 1993; Waigmann *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 2000; Karpova *et al.*, 2002). Sin embargo, dado que al utilizar algunos inhibidores de CK2 se obtuvieron efectos parciales, no se descarta la posibilidad de que otra(s) actividad(es) quinasa puedan intervenir en la fosforilación de las MPs 30K. De manera similar, en este trabajo se ha observado que la actividad enzimática con características de CK2 no sería la única capaz de fosforilar a rTGBp1 en la FPS de plantas de *N. tabacum* infectadas con PVX. Esta hipótesis se sustenta en el efecto de inhibición parcial observado al suplementar las reacciones de fosforilación con heparina, y en la competencia parcial de dicha fosforilación por GTP.

Por otra parte, en el caso de la MP 30K de TMV, se ha descrito otra actividad quinasa asociada a plasmodesmos (PAPK), presente en extractos de plantas de *N. tabacum*, que fue capaz de utilizar GTP como dador de grupos fosforilo (Lee *et al.*, 2005). Los autores identificaron a la PAPK como una quinasa de tipo CK1; la cual presentaría un comportamiento atípico respecto a la utilización de GTP. Sin embargo, los autores no demostraron que la proteína recombinante CK1 que fosforila a la MP 30K sea capaz de utilizar GTP como donante de grupos fosforilo. A diferencia de la proteína MP 30K, en este trabajo de Tesis no se observó la fosforilación específica de la proteína rTGBp1 utilizando fracciones de proteínas asociadas a la pared celular de *N. tabacum*.

En el caso particular de PVX, se ha demostrado que la proteína CP es fosforilada por una proteína quinasa soluble con características similares a CK2 y se ha observado que la eficiencia de la fosforilación de la CP se incrementa al incubar a esta proteína con una mezcla de proteínas quinasas CK1 y CK2 (Atabekov *et al.*, 2001; Karpova *et al.*, 2002). Es sabido que las quinasas CK1 y CK2 fosforilan residuos de serina y treonina en el contexto de regiones ricas en aminoácidos ácidos. Estos residuos ácidos pueden ser reemplazados por residuos de serina, treonina o tirosina fosforilables por las propias quinasas CK1 o CK2, u otras proteínas quinasas (Flotow *et al.*, 1990; Hardie, 1999). Los autores señalan que el incremento observado en la fosforilación de CP, pueda probablemente adjudicarse a que la fosforilación por CK1 genere contextos más ácidos que favorezcan la fosforilación por CK2 (Atabekov *et al.*, 2001).

La proteína quinasa CK2 se encuentra presente en todas las células eucariotas (Hardie, 1999; Lichtfield, 2003). En plantas, la actividad de CK2 ha sido relacionada con diferentes procesos que incluyen, entre otros, la regulación del ciclo celular, el control transcripcional, la degradación mediada por proteosomas, la traducción de ARN y la defensa mediada por ácido salicílico (Hidalgo *et al.*, 2001; Riera *et al.*, 2001; Kang and Klessig, 2005). Se la ha descrito como un heterotetrámero formado por dos subunidades catalíticas α y dos subunidades regulatorias β , aunque también se ha reportado la existencia de formas monoméricas de la subunidad catalítica (Dobrowolska *et al.*, 1992; Espunya and Martínez, 1997; Riera *et al.*, 2001). Las subunidades catalíticas se localizan fundamentalmente en el núcleo y, en menor medida en el citoplasma (Riera *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2006), aunque la localización de la subunidad catalítica podría ser regulada por su interacción con las subunidad regulatorias. Si bien las subunidades regulatorias se hallaron homogéneamente distribuidas en el núcleo y el citoplasma, la isoforma $\beta 3$ mostró una patrón de distribución puntuado que podría asociarse a la localización en plasmodesmos (Salinas *et al.* 2006). Este patrón de localización celular de CK2 es compatible con el observado para la proteína TGBp1 de PVX, la cual en el contexto de la infección viral se localiza en núcleo, citoplasma y plasmodesmos (Samuels *et al.*, 2007); por esta razón será interesante analizar en un futuro la posible co-localización de CK2 y TGBp1.

Hasta el momento, tanto los antecedentes mencionados como los resultados presentados en este trabajo permiten asumir que al menos una proteína quinasa CK2 estaría implicada en la fosforilación de las MPs de virus como *Potex- y Tobamovirus*. Aún cuando se trata de virus no relacionados, se ha demostrado que estas MPs pueden intercambiarse y que sus funciones son compatibles para concretar el movimiento de célula a célula de virus deficientes en sus MPs (Morozov *et al.*, 1997; Tamai *et al.*, 2003). Por otra parte, debido a que se ha demostrado que tanto la MP 30K de TMV como la proteína CP de PVX son fosforiladas por proteínas quinasas de la familia de CK1, sería interesante estudiar si también la proteína TGBp1 puede ser fosforilada por este tipo de quinasa.

2. Identificación de los residuos fosforilados en rTGBp1

El análisis en geles bidimensionales de las isoformas de TGBp1 presentes en extractos de plantas *N. tabacum* infectadas con PVX, mostró que la proteína producida *in vivo* durante la infección viral presenta múltiples isoformas. Se trata de una proteína compleja con al menos nueve isoformas de diferente pI, donde las diferencias entre isoformas según los pI estimados serían compatibles con la adición de múltiples fosforilaciones. El tratamiento del extracto de PVX con proteínas fosfatasa reveló la presencia de isoformas sensibles y no sensibles a esta enzima, por lo que no podría descartarse la presencia de otro tipo de modificaciones post-traduccionales.

Recientemente, se ha propuesto que la movilización de proteínas de la planta por vía del floema podría ser regulada mediante un balance entre la fosforilación y la O-glicosilación de dichas proteínas (Taoka *et al.*, 2007). El análisis de la secuencia de TGBp1 utilizando el programa YinOYang 1.2 (Gupta and Brunak, 2002) predice la presencia de 3 posibles sitios de O-glicosilación. Llamativamente uno de los sitios identificados es el residuo de treonina 193 (T-193), uno de los blancos de fosforilación de CK2 identificados en este trabajo. Esto hace particularmente interesante explorar si TGBp1 se encuentra

glicosilada durante la infección viral y, si así fuera, el posible rol de esta modificación en la movilización de PVX.

A través de la combinación de estudios de determinación de aminoácidos fosforilados, comparación de secuencias aminoacídicas de TGBp1 de distintos flexivirus y evaluación de la fosforilación *in vitro* de mutantes puntuales y de delección de TGBp1, se identificó a los residuos T-193 y T-214 como probables sitios de fosforilación por la quinasa CK2 de *N. tabacum*. Llamativamente, ninguno de los dos sitios forma parte de la secuencia consenso clásica para la fosforilación por CK2 (S/TXXE o S/TXXD). Sin embargo, en la literatura se encuentran algunos casos de fosforilación por CK2 en secuencias no consenso y se postula que los entornos estructurales acídicos o bien la oligomerización de la proteína blanco podría favorecer la fosforilación por CK2. El efecto de los residuos de ácidos aspártico o glutámico en posición n+3 de la secuencia consenso clásica de CK2 puede ser reemplazado por residuos de treonina o serina que resulten fosforilados (Pinna, 1990; Meggio and Pinna; 2003). En tal sentido, en la posición + 3 del residuo T-193 se ubica un residuo de serina (S-196) potencialmente fosforilable, creando así un entorno ácido más favorable para la fosforilación por CK2. Este residuo de serina se encuentra parcialmente conservado entre las distintas TGBp1 de los virus de la familia Flexiviridae, y cuando no se encuentra presente, en la mayoría de los casos es reemplazado, por residuos fosforilables como treonina y tirosina. Por otra parte en la mayoría de las TGBp1s analizadas, la región aledaña a la S-196 es en general una región levemente rica en residuos ácidos, lo que convierte al residuo S-196 en un posible sitio de fosforilación por CK2. A su vez, los resultados reportados por Bayne *et al.*, (2005) muestran que la mutación de cualquiera de dos residuos de ácido aspártico D-201 o D-202 de TGBp1 de PVX, ubicados en la región aledaña al residuo S-196, impide el movimiento célula a célula del virus mutante. Considerando los resultados presentados en este trabajo de Tesis se podría postular que el efecto de las mutaciones en esta región acídica sobre la movilización viral podría estar dado indirectamente por la inhibición de la fosforilación de TGBp1 por CK2.

El alto grado de conservación de los residuos T-193 y T-214 entre las distintas proteínas TGBp1 de flexivirus analizadas (91% y 88 % de identidad, respectivamente) sugiere la importancia de los mismos en la función de la

proteína. Por otra parte, se ha demostrado recientemente, mediante un análisis en gran escala de proteínas modificadas en forma post-traducciona, la existencia de una mayor presión de selección en los residuos serina y treonina fosforilados con respecto a los mismos residuos no modificados (Gray and Kumar, 2011; Chen *et al.*, 2010; Laundry *et al.* 2009). En este trabajo de Tesis, se observó que en todas las proteínas TGBp1 en que los residuos T-193 y T-214 no se encuentran conservados, los mismos son reemplazados por un residuo fosforilable de serina, sugiriendo que la fosforilación de las proteínas TGBp1 en estas posiciones podría ser importante para la función de la misma.

Los resultados de los ensayos de fosforilación *in vitro* con proteínas mutagenizadas señalan la existencia de otros sitios adicionales de fosforilación por CK2 en TGBp1. El análisis por espectrometría de masa permitió determinar que el residuo S-165 es fosforilado por CK2. Sin embargo, debido a que no se logró secuenciar el extremo C-terminal de TGBp1, no fue posible confirmar por esta técnica la fosforilación de los residuos T193 y T214. Por otro lado, el análisis por espectrometría de masa permitió inicialmente descartar la existencia de fosforilaciones en los residuos T-85, T-89, T-90, S-108, T-138 y S-140, los que forman parte de secuencias consenso para la fosforilación por CK2.

3. Posible rol regulatorio de la fosforilación de TGBp1.

Para analizar la importancia de los residuos identificados como blancos de fosforilación en la capacidad de infección viral, se examinó la capacidad infectiva de amplicones mutantes en ensayos de agroinfección. Los resultados señalaron que tanto la simulación de la fosforilación, como las modificaciones que impiden la fosforilación de los residuos T-193 y T-214 afectan negativamente al ciclo de infección del virus. El reemplazo de los residuos de treonina por residuos de alanina o ácido aspártico resulta deletéreo para el establecimiento de la infección sistémica y sugiere que el balance dinámico entre las formas de TGBp1 fosforiladas y no fosforiladas es crucial para mantener la capacidad infectiva del virus PVX. Este tipo de regulación se ha descrito, por ejemplo, para la proteína

CP de *Potato Virus A* (PVA), donde se observó que ambas clases de mutaciones, las que impiden la fosforilación de la proteína por CK2 y las que simulan la fosforilación sobre los residuos blanco de fosforilación, restringen el movimiento viral (Ivanov *et al.*, 2003). En forma similar a lo observado en este Trabajo de Tesis, en el caso de PVA se produjo un rescate parcial del movimiento viral cuando las variantes conteniendo sustituciones de alanina revirtieron a residuos de treonina.

Como se mencionó en la Introducción, se ha postulado que el extremo C-terminal de la proteína TGBp1 podría tener un rol regulatorio asociado a la modulación de la actividad ATPasa y helicasa (Atabekov *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1999; Kalinina *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo de Tesis señalan que las sustituciones que mimican la carga negativa de la fosforilación de los residuos T-193 y T-214 reducen la capacidad de ambas proteínas mutagenizadas para hidrolizar ATP. Estos resultados sugieren la existencia de una regulación negativa de la actividad ATPasa de TGBp1 provocada por la fosforilación de los residuos T-193 y T-214. De acuerdo con el modelo de interacciones postulado en la **Figura 5** (Caruthers and McKay, 2002), la fosforilación del/los residuos T-193 y/o T-214 podría interrumpir las interacciones que tienen lugar entre los residuos de los motivos helicasa V y VI y el ATP.

La evidencia obtenida permite asumir que los amplicones mutagenizados en los que se simuló la fosforilación de los residuos T-193 y T-214, son incapaces de desarrollar una infección sistémica debido a que se encontraría comprometida la actividad ATPasa de TGBp1. Se ha sugerido que esta actividad ATPasa es requerida para la supresión del PTGS; asimismo, se demostró que la supresión del PTGS es necesaria, pero no suficiente, para el movimiento de célula a célula de PVX (Bayne *et al.*, 2005). Tomando en consideración estos antecedentes, se podría hipotetizar que la(s) fosforilación(es) en el extremo C-terminal de la proteína TGBp1 regularían negativamente su actividad supresora. De esta forma los amplicones mutagenizados en que se simuló la fosforilación de la proteína TGBp1, serían incapaces de establecer una infección sistémica debido a que no podrían contrarrestar la respuesta de defensa mediada por PTGS. De hecho, otros resultados obtenidos en el laboratorio avalan esta hipótesis señalando que la simulación de la fosforilación de TGBp1 en los residuos T-193 o T-214 inhiben la actividad supresora (Binaghi *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha reportado que la proteína TGBp1 de PVX interacciona con AGO1, y que probablemente el rol supresor de TGBp1 podría tener lugar a través de la degradación mediada por proteasoma de AGO1 (Chiu *et al.*, 2010). AGO1 es una proteína clave en la respuesta de PTGS inducida por virus o VIGS, ya que se trata de un componente central del complejo efector de la degradación de ARN viral (conocido como complejo de silenciamiento inducido por ARN o RISC) (Morel *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Dados los resultados de este trabajo de Tesis y las observaciones de Binaghi *et al.*, podría postularse que la proteína TGBp1 fosforilada en el extremo C-terminal da lugar a una isoforma que es incapaz de interactuar con AGO1 y mediar su degradación. Por lo tanto, sería interesante estudiar si la fosforilación de los residuos T-193 y/o T-214 regula, directa o indirectamente, la interacción de la proteína TGBp1 con la proteína AGO1.

El modelo de movimiento viral de célula a célula aceptado para *Potexvirus* y esquematizado en la **Figura 8** propone tres etapas: temprana, media y tardía. Durante la etapa temprana, la proteína TGBp1 promovería el incremento del SEL del plasmodesmo y el transporte de las proteínas TGBp2 y TGBp3 y ejercería su función como supresora del PTGS. A partir de los resultados expuestos en este trabajo de Tesis y en la literatura se podría postular que durante el estadio inicial es necesaria la presencia de la isoforma de la proteína TGBp1 no fosforilada en el extremo C-terminal, la cual ejercería su rol como supresora del silenciamiento. En una etapa intermedia, se produciría la movilización del complejo de transporte a través del plasmodesmo. Tal como se señaló en la Introducción, distintos trabajos han mostrado que estos complejos no son traducibles *in vitro* y que su activación es mediada por TGBp1 (Atabekov *et al.*, 2007). En particular, se mostró que cuando la proteína TGBp1 es fosforilada por una mezcla de proteínas quinasas comerciales (PKC o CK1 y CK2), pierde la capacidad de activar la traducción *in vitro* de los viriones de PVX (Zayakina *et al.*, 2007). Sobre esta base, se podría postular que la isoforma de TGBp1 fosforilada en el extremo C-terminal podría desempeñar un rol importante en asegurar que los complejos de movilización se mantengan en un estado no traducible mientras ocurre el movimiento entre células. En este contexto resultaría interesante estudiar si la fosforilación de los residuos T-193 y/o T-214 afectan la interacción de TGBp1 con el ARN y/o la proteína CP. Finalmente, en la etapa tardía, se requeriría nuevamente de la isoforma no fosforilada de la proteína TGBp1, de modo de

asegurar la traducibilidad de los complejos transportados y la reiniciación del ciclo de multiplicación viral.

En este trabajo de Tesis se ha caracterizado parcialmente el impacto funcional de la fosforilación en los residuos T-193 y T-214. Se ha visto que la simulación de la fosforilación regula negativamente la dispersión viral. Esta deficiencia podría originarse en una capacidad reducida de la proteína TGBp1 mutagenizada para hidrolizar ATP. Además, se ha asociado la simulación de la fosforilación en el extremo C-terminal de TGBp1 con una regulación negativa de la actividad supresora del PTGS. En apoyo de esta hipótesis, se ha observado que los amplicones con mutaciones que simulan la fosforilación de los residuos T-193 y T-214 son incapaces de establecer una infección sistémica. Posiblemente, el rol de la proteína TGBp1 como proteína de movimiento resulte de la conjunción de las diferentes actividades que se le atribuyen y de la sucesión de interacciones con distintas proteínas virales y/o factores de la planta.

El conjunto de los resultados obtenidos apoyan la suposición de que la fosforilación de la proteína TGBp1 por CK2 podría constituir un mecanismo para regular el movimiento de PVX mediado por la activación/inactivación enzimática, la regulación de la interacción con proteínas o la modificación de la localización y el tráfico intracelular. Dentro de los próximos objetivos de esta línea de investigación, resultará fundamental contar con información acerca de un posible modelo para la estructura tridimensional de la proteína TGBp1. Los atributos funcionales de la proteína TGBp1 son complejos y será necesario profundizar los estudios, particularmente sobre la actividad supresora y la capacidad de la proteína para activar la traducibilidad de los complejos de transporte. Estudios de este tipo permitirían comprender mejor la regulación de sus múltiples funciones durante el desarrollo del ciclo infeccioso de PVX.

VI. REFERENCIAS

- **Adams M.J., Accotto G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Brunt A.A., Candresse T. Coutts R.H.A., Dolja V.V., otros autores. 2005.** Genus *Potexvirus*. En *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 1091-1095. Editado por Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. San Diego, CA: Elsevier Academia Press.
- **Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G., Zavriev S.K., Fauquet C.M. 2004.** The new plant virus family *Flexiviridae* and assesment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol*, 149: 1045-1060.
- **Agrios G.N. 2004.** Plant diseases caused by viruses. Dreibelbis D. (ed). In: *Plant Pathology*, Fifth Edition. Elsevier Academic Press, San Diego, California. pp. 762.
- **Allende J.E. and Allende C.C. 1995.** Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J*, 9: 313–323.
- **Angell S.H., Davies C., Baulcombe D.C. 1996.** Cell-to-cell movement of potato virus X is associated with a change in the size exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology*, 216: 197-201.
- **Angell SM and Baulcombe DC. 1995** Cell-to-cell movement of potato virus X revealed by microinjection of a viral vector tagged with the B-glucuronidase gene. *Plant J*, 7: 135-140
- **Antonelli M., Daniotti J.L., Rojo D., Allende C.C. 1996.** Cloning, expression and properties of the alfa subunit of casein kinase 2 from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur J Biochem*, 241: 272–279.
- **Ares X., Calamante G., Cabral S., Lodge J., Hemenway P., Beachy R.N., Mentaberry A. 1998.** Transgenic Plants Expressing Potato Virus X ORF2 Protein (p24) Are Resistant to Tobacco Mosaic Virus and Ob Tobamoviruses. *J Virol*, 72: 731–738.
- **Armstrong SA., Barry DA., Leggett RW., Mueller CR. 1997.** Casein Kinase II-mediated Phosphorylation of the C Terminus of Sp1 Decreases Its DNA Binding Activity. *J Biol Chem*, 272: 13489-95.
- **Atabekov J., Dobrov E., Karpova O. and Rodionova N. 2007.** Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution. *Mol Plant Pathol*, 8: 667-675.
- **Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Poljakov V.Y. 2000.** The movement protein-triggered in situ conversion of Potato Virus X virion RNA from a nontranslatable into a translatable form. *Virology*, 271: 259-263.
- **Atabekov JG., Rodionova NP., Karpova OV., Kozlovsky SV., Novikov VK., Arkhipenko MV. 2001.** Translational Activation of Encapsidated Potato Virus X RNA by Coat Protein Phosphorylation. *Virology*, 286: 466-474.
- **Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. M. Moore, J. A. Smith and K. Struhl. 1994.** *Current Protocols in Molecular Biology*, edited by F. M. Greene Publishing Associates, New York and Wiley-Interscience, New York and Chichester.
- **Bamunusinghe, D., Hemenway, C. L., Nelson, R. S., Sanderfoot, A. A., Ye, C. M., Silva, M. A., Payton, M., and Verchot-Lubicz, J. 2009.** Analysis of Potato virus X replicase and TGBp3 subcellular locations. *Virology*, 393:272-285.
- **Baratova L.A., Federova N.V., Dobrov E.N., Lukashina E.V., Kharlanov A.N., Nasonov V.V., Serebryakova M.V., Kozlovsky S.V., Zayakina O.V. and Rodionova N.R. 2004.** N-terminal segments of potato virus X coat protein subunits

is glycosylated and mediates the formation of a bound water shell on the virion surface. *Eur J Biochem* 271: 3136-3145.

- **Baratova L.A., Grebenshchikov N.I., Dobrov E.N., Gedrovich A.V., Kashirin I.A., Shishkov A.V., Efimov A.V., Järvekülg L., Radavsky Y.L., Saarma M. 1992.** The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. *Virology*, 188:175-80.
- **Batten J.S., Yoshinari S., Hemenway C. 2003.** *Potato Virus X*: a model system for virus replication, movement and gene expression. *Mol Plant Pathol*, 4: 125-131.
- **Battistutta R. 2009.** Protein kinase CK2 in health and disease: Structural bases of protein kinase CK2 inhibition. *Cell.Mol.Life Sci.* 66: 1868 – 1889.
- **Baulcombe D. 2002.** Viral suppression of systemic silencing. *Trends Microbiol*, 10: 306-308.
- **Bayne EH, Rakitina DV, Morozov SY, Baulcombe DC. 2005.** Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J*, 44: 471-482.
- **Beck DL., Guilford PJ., Voot DM., Anderson MT., Forster RLS. 1991.** Triple gene block proteins of *White clover mosaic potexvirus* are required for transport. *Virology* 183: 695-702.
- **Binaghi M., Módena N., Mentaberry A., and Zelada A. 2009.** Role of phosphorylation on the silencing suppressor activity of the movement protein TGBp1 of the Potato virus X and the relationship with its ATPase activity. XIV International Congress On MolecularPlant-Microbe Interactions, Quebec, Canada.
- **Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S. 1999.** Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294: 1351–1362
- **Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- **Bravo-Almonacid, F and Mentaberry, A. 1989.** Nucleotide cDNA sequence coding for the PVYo coat protein. *Nucleic Acids Research*, 17: 4401.
- **Calamante G. 1998.** Utilización del virus X de la papa como vector de expresión transitoria en plantas. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- **Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock ET., Sit TL., Lommel SA. 2001.** The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol*, 39:419-60.
- **Caruthers JM. and McKay DB. 2002.** Helicase structure and mechanism. *Curr Op Struct Biol*, 12: 123-133.
- **Chapman S., Hills G., Watts J., Baulcombe D. 1992.** Mutational analysis of the coat protein gene of Potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology*, 191: 223-230.
- **Chen S., Chen F., Li W. 2010.** Phosphorylated and non-phosphorylated serine and threonine residues evolve at different rates in mammals. *Mol Biol Evol*, 27: 2548-54.
- **Chiu M-H., Chen IH., Baulcombe DC. And Tsai C-H. 2010.** The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute 1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol Plant Pathol*, 11: 641-649.

- **Citovsky V., McLean BG., Zupan JR., Zambryski P. 1993.** Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Gen Dev*, 7: 904-910.
- **Cowan, G. H., Lioliopoulou, F., Ziegler, A., and Torrance, L. 2002.** Subcellular localisation, protein interactions, and RNA binding of Potato mop-top virus triple gene block proteins. *Virology* 298:106-115.
- **D'Ambrosio C., Salzano AM., Arena S., Renzone G., Scaloni A. 2007)** Analytical methodologies for the detection and structural characterization of phosphorylated proteins. *J Chromat B*, 849: 163-180.
- **Davies D., Hills G.J., Baulcombe D.C. 1993.** Sub-cellular localization of the 25-kDa protein encoded in the triple gene block of *Potato Virus X*. *Virology*, 197: 166-175.
- **Dean A.M. and Koshland D.E. 1990.** Electrostatic and steric contributions to regulation at the active site of isocitrate dehydrogenase. *Science*, 249: 1044 – 1046.
- **Dermody JL, Dreyfuss JM., Ville J., Ogundipe B., Gygi SP., Park PJ., , Ponticelli AS., Moore CL., Buratowski S., Bucheli ME. 2008.** Unphosphorylated SR-Like Protein Npl3 Stimulates RNA Polymerase II Elongation. *PLOS One*, 3: e3273.
- **Diella, F., Cameron, S., Gemund, C., Linding, R., Via, A., Kuster, B., Sicheritz-Ponten, T., Blom, N. and Gibson, T.J. 2004.** Phospho.ELM: a database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins. *BMC Bioinformatics*, 5: 79.
- **Dobrowolska G., Meggio F., Szczegielniak J., Muszynska G., Pinna L.A. 1992.** Purification and characterization of maize seedling casein kinase IIB, a monomeric enzyme immunologically related to the alpha subunit of animal casein kinase-2. *Eur J Biochem*, 204: 299-303.
- **Donald, R. G., Zhou H. and Jackson, A. O. 1993.** Serological analysis of barley stripe mosaic virus-encoded proteins in infected barley. *Virology* 195, 659–668.
- **Doronin S.V. and Hemenway C. 1996)** Synthesis of potato virus X RNAs by membrane-containing extracts. *J Virol*, 70: 4795-4799.
- **Epel BL. 2009.** Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host beta-1,3-glucanases. *Semin Cell Dev Biol*, ;20:1074-81.
- **Erhardt, M., Morant, M., Ritzenthaler, C., Sutssi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, D.E., Jonard, G., Bouzoubaa, S., and Gilmer, D. 2000.** P42 movement protein of *Beet necrotic Bellow vein virus* is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13: 520-528.
- **Espunya MC. and Martinez MC. 1997.** Identification of two different molecular forms of *Arabidopsis thaliana* casein kinase II. *Plant Sci*. 124:131–42
- **Fedorkin O., Solovyev A., Yelina N., Zamyatnin A., Zinovkin R., Makinen K., Schiemann J., Morozov SY. 2001.** Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein. *J Gen Virol*, 82: 449-458.

- **Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K., Angell, S.. 2003.** TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of *Potato virus X*. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 16: 132– 140.
- **Fuente van Bentem, S. Y Hirt H. 2007.** Using phosphoproteomics to reveal signalling dynamics in plants. *Trends Plant Sci.*, 12: 404-410.
- **Gatica, M., Hinrichs, M.V., Jedlicki, A., Allende, C.C., and Allende, J.E. 1993.** Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* 315, 173–177.
- **Gilmer D., Bouzoubaa S., Hehn A., Guilley H., Richards K., Jonard G. 1992.** Efficient cell-to-cell movement of *Beet necrotic yellow vein virus* requires 3'-proximal gene located on RNA2. *Virology*, 189: 40-47.
- **Gorbalenya AE. and Koonin EV. 1993.** Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr Op Struct Biol*, 3: 419-429.
- **Gorbalenya AE., Koonin EV., Donchenko AP., Blinov VM. 1989.** Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acid Res*, 17: 4713-4730.
- **Gray VE. And Kumar S. 2011.** Rampant purifying selection conserves positions with post-translational modifications in human proteins. *Mol Biol Evol*, [doi:10.1093/molbev/msr013].
- **Guerra B., Boldyreff B., Sarno S., Cesaro L., Issinger O.-G., Pinna L.A. 1999.** CK2: a protein kinase in need of control. *Pharmacol Ther*, 82: 303–313.
- **Gupta R. and Brunak S. 2002.** Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 7:310-322.
- **Haley A., Hunter T., Kiberstis P., Zimmern D. 1995.** Multiple serine phosphorylation sites on the 30 kDa TMV cell-to-cell movement protein synthesized in tobacco protoplasts. *Plant J*, 8: 715-724.
- **Halligan BD.; Ruotti V.; Jin W.; Laffoon S.; Twigger SN.and Dratz EA. 2004.** ProMoST (Protein Modification Screening Tool): a web-based tool for mapping protein modifications on two-dimensional gels. *Nucleic Acids Res.* 32: 638-644
- **Hardie DG. 1999.** Plant protein serine/threonine kinases: Classification and Functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 97–131.
- **Hardie, D.G. 1993.** Protein Phosphorylation: A Practical Approach, 62 pp. D. G. Hardie (Ed.). New York: IRL Press.
- **Haupt, S., Cowan, G. H., Ziegler, A., Roberts, A. G., Oparka, K. J. and Torrance, L. 2005.** Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell* 17, 164–181.
- **Haystead TAJ. and Garrison J.C. 1999.** Study of protein phosphorylation in intact cells. Pp: 1-33. In: Protein Phosphorylation: A practical approach. Second Edition. Hardie A.G. (ed). Oxford University Press Inc., New York.
- **Hefferon K.L., Khallilian H., Xu H., AbouHaidar M.G. 1997.** Expression of the coat protein of potato virus X from a dicistronic mRNA in transgenic potato plants. *J Gen Virol*, 78: 3051-3059.
- **Hidalgo P., Garreto V., Berríos CG., Ojeda H., Jordana X., and Holuigue L. 2001.** A Nuclear Casein Kinase 2 Activity Is Involved in Early Events of

Transcriptional Activation Induced by Salicylic Acid in Tobacco. *Plant Phys*, 125: 396-405.

- **Howard A.R., Heppler M.L., Ju H.J., Krishnamurthy K., Payton M.E., Verchot-Lubicz J. 2004.** *Potato virus X* TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Virology*, 328: 185-197.
- **Hsu HT., Hsu YH., Bi IP., Lin NS., Chang BY. 2008.** Biological functions of the cytoplasmic TGBp1 inclusions of *bamboo mosaic potexvirus*. *Arch. Virol*, 149:1027-1035.
- **Hsu, H. T., Hsu, Y. H., Bi, I. P., Lin, N. S., and Chang, B. Y. 2004.** Biological functions of the cytoplasmic TGBp1 inclusions of bamboo mosaic potexvirus. *Arch. Virol*. 149:1027-1035.
- **Huisman MJ., Linthorst HJ., Bol JF., Cornelissen JC. 1988)** The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *J Gen Virol*, 69: 1789-98.
- **Iakoucheva LM, Radivojac P, Brown CJ, O'Connor TR, Sikes JG, Obradovic Z, Dunker AK. 2004.** Intrinsic disorder and protein phosphorylation. *Nuc Acids Res*, 32: 1037-1049.
- **ICTVdB Management. 2006** 00.056.0.01. Potexvirus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. Ed), Columbia University, New York, USA [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>, 15/01/09]
- **Iglesias VA. and Meins F. 2000.** Movement of plant viruses es delayed in a β -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant J*. 21: 157-166.
- **Ivanov KI., Puustinen P., Gabrenaite R., Vihinen H., Ronnstrand L., Valmu L., Kalkkinen N. and Makinen K. 2003.** Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell*, 15: 2124–2139.
- **Ivanov KI., Puustinen P., Merits A., Saarma M. and Makinen K. 2001.** Phosphorylation down-regulates the RNA binding function of the coat protein of potato virus A.. *J Biol Chem*, 276: 13530–13540.
- **Jackson AO, Lim HS, Bragg J, Ganesan U, and Lee MY. 2009.** Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:385-422.
- **Jakubiec A. & Jupin I. 2007.** Regulation of positive-strand RNA virus replication: the emerging role of phosphorylation. *Virus Res*, 129: 73–79.
- **Jankowsky E. and Fairman ME. 2007.** RNA helicases – one fold for many functions. *Curr Op Struct Biol*, 17: 316-324.
- **Johnson LN. 1993.** The effects of phoshorylation on th estructures and function of proeins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 22: 199-232.
- **Ju, H. J., Brown, J. E., Ye, C. M. and Verchot-Lubicz, J. 2007.** Mutations in the central domain of potato virus X TGBp2 eliminate granular vesicles and virus cell-to-cell trafficking. *J Virol* 81, 1899–1911.
- **Ju, H. J., Samuels, T. D., Wang, Y. S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R. S. and Verchot-Lubicz, J. 2005.** The potato virus

- X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiol* 138, 1877–1895.
- **Kadaré G. and Haenni AL. 1997.** Virus-Encoded RNA Helicases. *J Virol*, 71: 2583-2590.
 - **Kalinina N. O., Rakitina D. A., Yelina N. E., Zamyatnin, Jr, A. A., Stroganova T. A., Klinov D. V., Prokhorov, V. V., S. V. Ustinova V. V., Chernov B. K., Schiemann J., Solovyev AG and Morozov SY. 2001.** RNA-binding properties of the 63 kDa protein encoded by the triple gene block of poa semilatifolius hordeivirus. *J Gen Vir*, 82: 2569-2578.
 - **Kalinina N.O., Rakitina D.A., Solovyev A.G., Schiemann J., Morozov S.Y. 2002.** RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology*, 296: 321-329.
 - **Kalinina NO., Fedorkin ON., Samuilova OV., Maiss E., Korpela T., Morozov SY., Atabekov JG. 1996.** Expression and biochemical analyses of the recombinant potato virus X 25K movement protein. *FEBS Lett*, 397: 75-78.
 - **Kalume DE., Molina H., Pandey A. 2003.** Tackling the phosphoproteome: Tools and strategies. *Curr Op Chem Biol*, 7: 64-69.
 - **Kang HG, Klessig DF. 2005.** Salicylic acid-inducible Arabidopsis CK2-like activity phosphorylates TGA2. *Plant Mol Biol*. 57:541-57.
 - **Karger EM., Frolova OY., Fedorova NV., Baratova LA., Ovchinnikova TV., Susi P., Makinen K., Ronnstrand L., Dorokhov YL., Atabekov JG. 2003.** Dysfunctionality of a tobacco mosaic virus movement protein mutant mimicking threonine 104 phosphorylation. *J Gen Virol*, 84:727-732.
 - **Karpova O.V., Arkhipenko M.V., Zayakina O.V., Nikitin N.A., Kiselyova O.I., Kozlovsky S.V., Rodionova N.P. and Atabekov J.G. 2006a.** Regulation of RNA translation in Potato virus X RNA-coat protein complexes: the key role of the N-terminal segment of the protein. *Mol. Biol. (Russia)*, 4, 628–634.
 - **Karpova OV., Kozlovsky SV., Arkhipenko MV., Zayakina OV., Reshetnikova VG., Rodionova NP., Atabekov IG. 2002.** Comparative Analysis of Protein Kinases That Phosphorylate Tobacco Mosaic Virus Movement Protein in vitro. *Doklady Biochem Biophys*, 386: 293–295.
 - **Karpova OV., Zayakina OV., Arkhipenko MV., Sheval EV., Kiselyova OI., Poljakov VY., Yaminsky IV., Rodionova NP., Atabekov JG. 2006b.** Potato virus X RNA-mediated assembly of single-tailed ternary “coat protein-RNA-movement protein” complexes. *J Gen Virol*, 87: 2731-2740.
 - **Karpova, O.V., Rodionova, N.P., Ivanov, K.I., Dorokhov, Y.L., Atabekov, J.G., 1999.** Phosphorylation of tobacco mosaic virus movement protein abolishes its translation repressing ability. *Virology* 261, 20–24.
 - **Kawakami S., Padgett H.S., Hosokawa D., Okada Y., Beachy R.N., Watanabe Y. 1999.** Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of Tomato mosaic tobamovirus is essential for intracellular localization and stability in vivo. *J Virol*, 73: 6831-40.
 - **Kim KH., and Hemenway C. 1999.** Long-distance RNA-RNA interactions and conserved sequence elements affect potato virus X plus-strand RNA accumulation. *RNA*, 5: 636-645.

- **Kiselyova, O.I., Yaminsky, I.A., Karpova, O.V., Rodionova, N.P., Kozlovsky, S.V., Arkhipenko, M.V. and Atabekov, J.G. 2003.** AFM study of potato virus X disassembly induced by movement protein. *J. Mol. Biol.* 332, 321–325.
- **Klimczak L.J. and Cashmore AR. 1993.** Purification and characterization of casein kinase I from broccoli. *Biochem J* 293: 283-288.
- **Klimczak L.J., Farini D., Lin C., Ponti D., Cahsmore AR., Giuliano G. 1995b.** Multiple Isoforms of Arabidopsis casin kinase I combine conserved catalytic domains with variable carboxyl-terminal extensions. *Plan Phys*, 109: 687-696.
- **Klimczak, L.J., Collinge, M.A., Farini, D., Giuliano, G., Walker, J.C., Cashmore, A.R., 1995a.** Reconstitution of Arabidopsis casein kinase II from recombinant subunits and phosphorylation of transcription factor GBF1. *Plant Cell* 7, 105–115.
- **Knippschild U., Gocht A., Wolff S., Huber N., Lfhler J., Stfter M. 2005.** The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cellular Signalling*, 17: 675–689
- **Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G. H., Lohman, T. M., and Waksman, G. 1997.** Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of E. coli Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell*, 90: 635-647.
- **Krishnamurthy K., Heppler M., Mitra R., Blancaflor E., Payton M.E., Nelson R.S., Verchot-Lubicz J. 2003.** The Potato Virus X TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement. *Virology*, 309: 135-151.
- **Krishnamurthy, K., Mitra, R., Payton, M.E., Verchot-Lubicz, J., 2002.** Cell-to-cell movement of the PVX 12K, 8K, or coat proteins may depend on the host, leaf developmental stage, and the PVX 25K protein. *Virology*, 300: 269– 281.
- **Kwon SJ. and Kim KH. 2006.** The SL1 stem-loop structure at the 5′-end of potato virus X RNA es required for efficient binding to host proteins and for viral infectivity. *Mol Cells*, 21: 63-75.
- **Kwon SJ., Park MR., Kim KW., Plante CA., Hemenway CL., Kim KH. 2005.** *cis*-Acting sequences requiered for coat protein binding and *in vitro* assembly of *Potato virus X*. *Virology*, 334: 83-97.
- **Laundry C., Levy E., Michnick S. 2009.** Weak functional constraints on phosphoproteomes. *Trends Genet*, 25: 193-197.
- **Lawrence DM. and Jackson AO. 2001.** Interactions of the TGB1 protein during cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus. *J Virol*, 75: 8712-8723.
- **Lecours K., Tremblay M.H., Gagne M.E. Gagne S.M. and Leclerc D. 2006.** Purification and biochemical characaterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein. *Protein Exp Purif*, 47: 273-280.
- **Lee JY., Taoka K., Yoo BC., Ben-Nissan G., Kim DJ., Lucas WJ. 2005.** Plasmodesmal-Associated protein kinase in tobacco and Arabidopsis recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell*, 17: 2817-2831.
- **Leroy D., Heriche J.K., Filhol O., Chambaz E.M., Cochet C. 1995.** Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J Biol Chem*, 272: 820–827.

- **Leshchiner AD., Minina EA., Rakitina DV., Vishnichenko VK., Solovyev AG., Morozov SY., Kalinina NO. 2008.** Oligomerization of the Potato Virus X 25-kDa movement protein. *Biochemistry (Moscow)*, 73, 50-55.
- **Leshchiner AD., Solovyev AG., Morozov SY., Kalinina NO. 2006.** A minimal region in the NTPase/helicase domain of the TGBp1 plant virus movement protein is responsible for ATPase activity and cooperative RNA binding. *J Gen Virol*, 87, 3087-3095.
- **Liou DY., Hsu YH., Wung CH., Wang WH., Lin NS., Chang BY. 2000.** Functional Analyses and Identification of Two Arginine Residues Essential to the ATP-Utilizing Activity of the Triple Gene Block Protein 1 of Bamboo Mosaic Potexvirus. *Virology*, 277: 336-344.
- **Litchfiel D.W. 2003.** Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J*, 369: 1-15.
- **Longstaff M., Brigneti G., Boccard F., Chapman S., Baulcombe D. 1993.** Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO J*, 12: 379-386.
- **Lough T.J., Netzler N.E., Emerson S.J., Sutherland P., Carr F., Beck D.L., Lucas W.J., Forster R.L. 2000.** Cell-to-cell movement of potexviruses: Evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol Plant Microbe Interact*, 13: 962-974.
- **Lough T.J., Shash K., Xoconostle-Cazares B., Hofstra K.R., Beck D.L., Balmori E., Forster R.L.S., Lucas W.J. 1998.** Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Mol Plant Microbe Interact*, 11: 801-814.
- **Lough TJ., Lee RH., Emerson SJ., Forster RLS., Lucas WJ. 2006.** Functional analysis of the 5' untranslated region of potexvirus RNA reveals a role in viral replication and cell-to-cell movement. *Virology*, 351: 455-465.
- **Lough, T.; Emerson S.J., Lucas W.J., Forster RLS. 2001.** Trans-Complementation of Long-Distance Movement of White clover mosaic virus Triple Gene Block (TGB) Mutants: Phloem-Associated Movement of TGBp1. *Virology*, 288: 18-28.
- **Lucas W.J. 2006.** Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, 344: 169-184.
- **Lucas, WJ., and Lee, JY. 2004.** Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, 5:712-726.
- **Maccarrone G., Kolb N., Teplytska L., Birg I., Zollinger Z., Holsboer F., Turck CW. 2006.** Phosphopeptide enrichment by IEF. *Electrophoresis*, 27, 4585–4595.
- **MacCoss MJ., McDonald H., Saraf A., Sadygov R., Clark JM., Tasto JJ., Gould KL., Wolters D., Washburn M., Weiss A., Clark JI., Yates III JR. 2002.** Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *PNAS*, 99: 7900-7905.
- **Mackintosh SG. and Raney KD. 2006.** DNA unwinding and protein displacement by superfamily 1 and superfamily 2 helicases. *Nuc Acid Res*, 34: 4145-4159.
- **Malcuit I, de Jong W, Baulcombe DC, Shields DC, Kavanagh TA. 2000.** Acquisition of multiple virulence/avirulence determinants by potato virus X (PVX)

has occurred through convergent evolution rather than through recombination. *Virus Genes*, 20:165-72

- **Malcuit, I., Marano, M. R., Kavanagh, T. A., De Jong, W., Forsyth, A., and Baulcombe, D. C. 1999.** The 25-kDa movement protein of PVX elicits Nb-mediated hypersensitive cell death in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:536-543.
- **Mandahar C.L. 2006.** Helicases. En Mandahar (ed.). Multiplication of RNA plant viruses. Springer-Verlag Publisher, New York. p 151-165.
- **Mann M., Hendrickson RC., Pandey A. 2001.** Analysis fo proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*, 70: 437-473.
- **Marin, O., Meggio, F., and Pinna, L.A. 1994.** Design and synthesis of two new peptide substrates for the specific and sensitive monitoring of casein kinases-1 and -2. *Biochem Biophys Res Commun*;198:898-905.
- **Martelli G.P., Adams M.J., Kreuze J.F., Dolja V.V. 2007.** Family *Flexiviridae*: A case study in virion an genome plasticity. *Annu Rev Phytopathol*, 45: 73-100.
- **Matsushita Y., Hanazawa K., Yoshioka K., Oguchi T., Kawakami S., Watanabe Y., Nishiguchi M. and Nyunoya H. 2000.** In vitro phosphorylation of the movement protein of tomato mosaic tobamovirus by a cellular kinase. *J Gen Virol*, 81: 2095–2102.
- **Matsushita Y., Ohshima M., Yoshioka K., Nishiguchi M., Nyunoya H. 2003.** The catalytic subunit of protein kinase CK2 phosphorylates in vitro the movement protein of Tomato mosaic virus. *J Gen Virol*, 84: 497-505.
- **Meggio F. & Pinna L.A. 2003.** One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J*, 17: 349–368.
- **Meggio F., Donella-Deana A., Ruzzene M., Brunati A.M., Cesaro L., Guerra B., Meyer T., Mett H., Fabbro D., Furet P., Dobrowolska G., Pinna L.A. 1995.** Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eu. J Biochem*, 234: 317–322.
- **Miller WA. and White KA. 2006.** Interactions in Plant Virus Gene Expression and Replication. *Annu Rev Phytopathol*, 44: 447-467.
- **Mitra R., Krishnamurthy K., Blancaflor E., Payton M., Nelson RS., Verchot-Lubicz J. 2003.** The Potato virus X TGBp2 protein association with the endoplasmic reticulum plays a role in but is not sufficient for viral cell-to-cell movement. *Virology*, 312:35–48.
- **Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., and Vaucheret, H. 2002.** Fertile hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14, 629-639.
- **Morozov S.Y., Fedorkin O.N., Juttner G., Schiemann J., Baulcombe D.C., Atabekov J.G. 1997.** Complementation of a Potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *J Gen Virol*, 78: 2077-2083.
- **Morozov SY, Dolja VV. and Atabekov AG. 1991.** Expression strategy of the potato virus X triple gene block. *J Gen Virol*, 72: 2039-2042.

- **Morozov SY. and Solovyev AG. 2003.** Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J Gen Virol*, 84: 1351-11366.
- **Morozov SY., Solovyev AG., Kalinina NO., Feodorkin ON., Samuilova OV., Schiemann J., Atabekov JG. 1999.** Evidence for two nonoverlapping functional domains in the Potato Virus X 25K movement protein. *Virology*, 260: 55-63.
- **Mushegian AR., and Koonin EV. 1993.** Cell-to-cell movement of plant viruses: Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analysis with cellular transport systems. *Arch Virol*, 133: 239-257.
- **Niefind K., Putter M., Guerra B., Issinger O.G., Schomburg D. 1999.** GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat Struct Biol*, 6: 1100–1103.
- **Obenauer, J.C., Cantley, L.C. and Yaffe, M.B. 2003.** Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 31: 3635–3641.
- **Ogrzewalla, K., Piotrowski M. Reinbothe S., and Link G. 2002.** The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.): a nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. *Eur. J. Biochem.*, 269: 3329-3337.
- **Oparka KJ., Roberts AG., Roberts IM., Prior DAM., Santa Cruz S. 1996.** Viral coat protein is targeted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of potato virus X. *Plant J.*, 10: 805–813.
- **Orman, B.E., R.M. Celnik, A.M. Mandel, H.N. Torres, and A.N. Mentaberry. 1990.** Complete cDNA sequence of a South American isolate of potato virus X. *Virus Res*, 16:293-306.
- **Owtrim GW. 2006** RNA helicases and abiotic stress. *Nuc Acid Res*, 34: 3220-3230.
- **Pawson T., y Scott, JD. 2005.** Protein phosphorylation in signaling 50 years and counting. *Trends Biochem Sci.*, 30: 286-290.
- **Petty ITD., French R., Jones RW., and Jackson AO. 1990.** Identification of *barley stripe mosaic virus* genes involved in viral RNA replication and systemic movement. *EMBO J*, 9: 3453-3457.
- **Pinna LA. 1990.** Casein kinase 2: an eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta*, 1054: 267–284.
- **Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekeur T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaître B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S. 2009.** Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell*; 21:1541-55.
- **Rhee Y., Tzfira T., Chen MH., Waigmann, E., Citovsky V. 2000.** Cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus: enigmas and explanations. *Mol Plant Pathol*, 1: 33-39.
- **Riera M., Peracchia G., Pages M. 2001.** Distinctive features of plant protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem*, 227: 119-127.

- **Riera, M., Figueras M., Lopez C., Goday A., y Pages M. 2004.** Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *PNAS*, 101: 9879-9884.
- **Riera, M., Pages M., Issinger O.G., Guerra B. 2003.** Purification and characterization of recombinant protein kinase CK2 from *Zea mays* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 29:24-32.
- **Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Atabekov J.G. 2003.** Linear remodeling of helical virus by movement protein binding. *J Mol Biol*, 333: 565-572.
- **Romeis T. 2001.** Protein kinases in the plant defence response. *Curr Op Plant Biol.* 4: 407-414.
- **Roth BM, Pruss GJ. and Vance VB. 2004.** Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res*, 102: 97-108.
- **Rouleau M., Smith R.J., Bancroft J.B. and Mackie G.A. 1994.** Purification, properties, and subcellular localization of foxtail mosaic potexviruses 26-kDa protein. *Virology*, 204: 254-265.
- **Ruegg U.T. and Burgess G.M. 1989.** Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but non specific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci*, 10: 218–220.
- **Salinas P., Bantignies B., Tapia J. Jordana X. y Holuigue L. 2001.** Cloning and characterization of the cDNA coding for the catalytic alpha subunit of CK2 from tobacco. *Mol Cell Biochem.*, 227: 120-135.
- **Salinas P., Fuentes D., Vidal E., Jordana X., Echeverria M., Holuigue L. 2006.** An extensive survey of CK2 α and β subunits in Arabidopsis: multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant Cell Physiol*, 47: 1295–1308.
- **Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1990.** Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- **Samuels T.D., HO-Jong J., Chang-Ming Y., Motes C.M., Blancaflor E.B., Verchot-Lubicz J. 2007.** Subcellular targeting and interactions among the Potato virus X TGB proteins. *Virology*, 367: 375-89.
- **Santa Cruz S., Chapman S., Roberts AG., Roberts IM., Prior DA., Oparka KJ. 1996.** Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *PNAS*, 93: 6286-6290.
- **Santa Cruz S., Roberts AG., Prior DAM., Chapman S., Oparka KJ. 1998.** Cell-to-Cell and Phloem-Mediated Transport of *Potato Virus X*:The Role of Virions. *Plant Cell*, 10: 495–510.
- **Schepetilnikov MV., Manske U., Solovyev AG., Zamyatnin AA., Jr., Schiemann, J., and Morozov SY. 2005.** The hydrophobic segment of *Potato virus X* TGBp3 is a major determinant of the protein intracellular trafficking. *J. Gen. Virol.* 86:2379-2391.
- **Scholthof HB. 2005.** Plant virus transport: motions of functional equivalente. *Trends Plant Science*, 10:376-382.
- **Senshu H., Ozeki J., Komatsu K., Hashimoto M., Hatada K., Aoyama M., Kagiwada S., Yamaji Y. And Namba S. 2009.** Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *J Gen Virol*, 90: 1014-1024.

- **Sit T.L., Leclerc D., and Abouhaidar M.G. 1994.** The minimal 5' sequence for in vitro initiation of papaya mosaic potexvirus assembly. *Virology*, 99: 238-242.
- **Solovyev AG., Savenkov EI., Grdzlishvili VZ., Kalinina NO., Morozov SY., Schiemann J., Atabekov JG. 1999.** Movement of hordeivirus hybrids with exchanges in the triple gene block. *Virology*, 253: 278-287.
- **Soufi A., Noy P., Buckle M., Sawasdichai A., Gaston K. and Jayaraman PS. 2009.** CK2 phosphorylation of the PRH/Hex homeodomain functions as a reversible switch for DNA binding. *Nucleic Acids Research*, 37: 3288–3300.
- **Stemmer C., Schwander A., Bauw G., Fojan P., and Grasser KD. 2002.** Protein Kinase CK2 Differentially Phosphorylates Maize Chromosomal High Mobility Group B (HMGB) Proteins Modulating Their Stability and DNA Interactions. *J Biol Chem*, 277: 1092–1098
- **Stone JM. y Walker JC. 1995.** Plant Protein Kinase Families and Signal Transduction. *Plant Phys*, 8: 451-457.
- **Subramanya, H. S., Bird, L. E., Brannigan, J. A., and Wigley, D. B. 1996.** Crystal structure of a Dexx box DNA helicase. *Nature*, 384: 379-383.
- **Tamai, A., and Meshi, T. 2001.** Cell-to-cell movement of Potato virus X: The role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1158-1167.
- **Tamai, A., Kubota, K., Nagano, H., Yoshii, M., Ishikawa, M., Mise, K., and Meshi, T. 2003.** Cucumovirus- and bromovirus-encoded movement functions potentiate cell-to-cell movement of tobamo- and potexviruses. *Virology* 315:56-67.
- **Taoka K., Ham BK, Xoconostle-Cazares B., Rojas MR., Lucas WJ. 2007.** Reciprocal Phosphorylation and Glycosylation Recognition Motifs Control NCAPP1 Interaction with Pumpkin Phloem Proteins and Their Cell-to-Cell Movement. *Plant Cell*, 19: 1866–1884.
- **Thorsness PE. and Koshland DE. 1987.** Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate. *J Biol Chem*, 262: 10422–10425.
- **Tilsner, J., Linnik, O., Christensen, N. M., Bell, K., Roberts, I. M., Lacomme, C., and Oparka, K. J. 2009.** Live-cell imaging of viral RNA genomes using a Pumilio-based reporter. *Plant J.* 57:758-770.
- **Torrance L., Cowan G.H., Gillespie T., Ziegler A., Lacomme C. 2006.** Barley stripe mosaic virus-encoded proteins triple-gene block 2 and gamma b localize to chloroplasts in virus-infected monocot and dicot plants, revealing hitherto-unknown roles in virus replication. *J Gen Virol*, 87: 2403-2411.
- **Tozzini A.C., Ek B., Palva E.T. and Hopp H.E. 1994.** Potato virus X coat protein: a glycoprotein. *Virology*, 202: 651-658.
- **Trutnyeva K., Bachmaier R., Waigmann E. 2005.** Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus movement protein. *Virology*, 332: 563-577.
- **Vaglio P., Sarno S., Marín O., Meggio F., Issinger OG., Pinna LA. 1996.** Mapping the residues of protein kinase CK2 alpha subunit responsible for responsiveness to polyanionic inhibitors. *FEBS Lett*, 380: 25-28.

- **Vashisht AA., Pradhan A., Tuteja R. and Tuteja N. 2005.** Cold- and salinity stress-induced bipolar pea DNA helicase 47 is involved in protein synthesis and stimulated by phosphorylation with protein kinase C. *Plant J.*, 44, 76–87.
- **Velankar SS, Soutanas P, Dillingham MS, Subramanya HS, Wigley DB. 1999.** Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* 1999, 97:75-84.
- **Verchot J., Angell SM. and Baulcombe DC. 1998.** *In vivo* translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic mRNAs. *J Virol*, 72: 8316-8320.
- **Verchot-Lubicz J. 2005.** A New Cell-to-Cell Transport Model for Potexviruses. *Mol Plant Microbe Interact*, 18: 283-290.
- **Verchot-Lubicz J., Torrance L., Solovyev AG., Morozov SY., Jackson AO. and Gilmer D. 2010.** Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. *Mol Plant Microbe Interact*, 23: 1231-1247.
- **Verchot-Lubicz J., Ye C-M., Bamunusinghe D. 2007.** Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol*, 88: 1643-1655.
- **Voinnet O. 2001.** RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17:449-59.
- **Voinnet O., Lederer C., Baulcombe D.C. 2000.** A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 103: 157-167.
- **Wagmann E. and Zambryski P. 1994.** Plasmodesmata. Gateways for rapid information transfer. *Curr Biol*, 4: 713-716.
- **Wagmann E., Chen M.H., Bachmaier R., Ghoshroy S., Citovsky V. 2000.** Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of Tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J*, 19: 4875-4884.
- **Wagmann E., Lucas WJ., Citovsky V., Zambryski P. 1994.** Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *PNAS*, 91: 1433-1437.
- **Wagmann E., Ueki S., Trutnyeva K., Citovsky V. 2004.** The Ins and Outs of Nondestructive Cell-to-cell and Systemic Movement of Plant Virus. *Crit Rev Plant Sci*, 23: 195-250.
- **Waterhouse AM., Procter JB., Martin DMA, Clamp M. and Barton GJ. 2009.** Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, [doi: 10.1093/bioinformatics/btp033].
- **Webster, C., Gaut, R.L., Browning, K.S., Ravel, J.M., Roberts, J.K.M. 1991.** Hypoxia enhances phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4A in maize root tips. *J. Biol. Chem.*, 266, 23341–23346.
- **Wong, Y.H., Lee, T.Y., Liang, H.K., Huang, C.M., Wang, T.Y., Yang, Y.H., Chu, C.H., Huang, H.D., Ko, M.T. and Hwang, J.K. 2007.** KinasePhos 2.0: a web server for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites based on sequences and coupling patterns. *Nucleic Acids Res.* 35(Web Server issue), W588–W594.

- **Xue Y, Ren J., Gao X, Jin C., Wen L., and Yao X. 2008.** GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy. *Mol Cell Proteomics*, 7: 1598-1608.
- **Yang T. y Poovaiah BW. 2003.** Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.*, 8: 505-512.
- **Yang Y., Ding B., Baulcombe D.C., Verchot J. 2000.** Cell-to-cell movement of the 25K protein of *Potato virus X* is regulated by three other viral proteins. *Mol Plant Microbe Interact*, 13: 599-605.
- **Yasukawa T., Kanei-ishii C., Maekawa T, Fujimoto J., Yamamoto T., Ishii S. 1995.** Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry* 270(43): 25328-25331.
- **Yelina NE., Savenkov EI., Solovyev AG., Morozov SY., and Valkonen JP. 2002.** Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: Complementary functions between virus families. *J. Virol.* 76:12981-12991.
- **Yoshioka K., Matsushita Y., Kasahara M., Konagaya K., Nyunova H. 2004.** Interaction of Tomato Mosaic Virus movement protein with tobacco RIO kinase. *Mol Cell*, 17: 223-229.
- **Yu S., Xia D., Luo Q., Cheng Y., Takano T., Liu S. 2006.** Purification and characterization of carbonic anhydrase of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *Escherichia coli*. *Prot, Exp and Purif* 52: 379-383.
- **Zambryski P. and Crawford K. 2000.** Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 393–421.
- **Zamyatnin A.A., Solovyev A.G., Savenkov E.I., Germundsson A., Sandgren, M., Valkonen J.P.T. and Morozov S.Y. 2004.** Transient coexpression of individual genes encoded by the triple gene block of *Potato mop-top virus* reveals requirements for TGBp1 trafficking. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8: 921-930.
- **Zamyatnin AA, Solovyev AG., Bozhkov PV., Valkonen JP, Morozov,SY., and Savenkov EI. 2006.** Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *Plant J.*, 46: 145-154.
- **Zayakina O., Arkhipenko M., Kozlovsky S., Nikitin N., Smirnov A., Susi P., Rodionova N., Karpova O., Atabekov J. 2007.** Mutagenic analysis of Potato virus X movement protein (TGBp1) and coat protein (CP): in vitro TGBp1-CP binding and viral RNA translation activation. *Mol Plant Pathol*, 8: 37-44.
- **Zelada AM., Calamante G., de la Paz Santangelo M., Bigi F., Verna F., Mentaberry A., Cataldi A. 2006.** Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector. *Tuberculosis* (Edinb) 86: 263-267.
- **Zhang ,X., Yuan,Y.R., Pei,Y., Lin,S.S., Tuschl,T., Patel,D.J., and Chua,N.H. 2006.** Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20, 3255-3268.
- **Zhang SL. y Klessig DF. 2001.** MAPK cascades in plant defense signalling. *Trends Plant Sci.* 6: 520-527.