

Tesis Doctoral

Rol de la fosforilación en la regulación funcional de la proteína de movimiento TGBp1 del potato virus X

Binaghi, María

2012-08-21

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:

Binaghi, María. (2012-08-21). Rol de la fosforilación en la regulación funcional de la proteína de movimiento TGBp1 del potato virus X. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Binaghi, María. "Rol de la fosforilación en la regulación funcional de la proteína de movimiento TGBp1 del potato virus X". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-08-21.

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

Rol de la fosforilación en la regulación funcional 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. María Binaghi

Directora: Dra. Alicia M. Zelada

Consejero de Estudios: Dr. Alejandro N. Mentaberry

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2012

Rol de la fosforilación en la regulación funcional de la proteína de movimiento TGBp1 del *Potato virus X*

RESUMEN

El *Potato virus X* (PVX) es un virus de plantas perteneciente al 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 célula a célula en la planta hospedera. Se ha demostrado que esta MP es fosforilada en los residuos T193 y T214 por una quinasa tipo CK2. Diferentes líneas de investigación sugieren que la fosforilación de las proteínas virales puede regular la replicación y el movimiento viral. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de la fosforilación en la regulación funcional de la proteína de movimiento TGBp1 de PVX y en su interacción con la proteína de plantas remorina (REM). Para ello se construyeron por mutagénesis dirigida versiones de TGBp1 no fosforilables (T193A y T214A) y otras que simulan la fosforilación (T193D y T214D). En ensayos de transcomplementación de la movilización célula a célula de un virus defectivo para dicha función, se demostró que las modificaciones en ambas treoninas resultan perjudiciales en la complementación del movimiento viral. Se determinó que la fosforilación de TGBp1 en la T193 regula la estabilidad de esta proteína viral por medio de un mecanismo que involucra la presencia de una secuencia de degradación tipo PEST en el extremo C-terminal de dicha proteína. A través de la combinación de estudios que involucran el análisis comparativo *in silico* de varias TGBp1s de virus de los géneros *Alpha* y *Betaflexiviridae* y de estudios por mutagénesis dirigida, se determinó que la T193 y la secuencia PEST C-terminal se encuentran conservadas en todas las TGBp1s analizadas, sugiriendo que la fosforilación en la T193 de estas MPs sería un mecanismo regulatorio de la estabilidad de dichas proteínas. Por otra parte, el análisis funcional de las fosfomutantes T193 y T214 de TGBp1 determinó que la fosforilación en dichos residuos afecta negativamente la actividad supresora del PTGS de TGBp1. Los ensayos de interacción entre TGBp1 de PVX y la proteína REM

determinaron que tanto el dominio N- como el C-terminal de TGBp1 son necesarios para la interacción y que la misma no es regulada por fosforilación en los residuos T193 y T214 de TGBp1. Por otro lado, este trabajo presenta las primeras evidencias que la interacción entre distintas proteínas TGBp1s y REM se encontraría conservada entre los virus que utilizan estrategias de movilización del tipo Triple Bloque de Genes (TGB). Los análisis realizados para determinar el efecto biológico de REM sobre la TGBp1 de PVX demostraron que la proteína REM no interfiere en la actividad del PTGS de esta proteína viral. Finalmente estudios de localización subcelular determinaron que la localización subcelular de TGBp1 es influenciada por la presencia de las otras proteínas virales y que a su vez varía según si la proteína se encuentra fusionada en su extremo N- o C- terminal a GFP.

Palabras claves: TGBp1 – *Potato virus X* – fosforilación – movimiento viral – silenciamiento mediado por ARN - REM

Role of phosphorylation in regulating the functional activity of the movement protein TGBp1 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. Previously it has been demonstrated that TGBp1 is phosphorylated by a CK2-like kinase in T193A and T214 residues. Recent works on other plant viruses have indicated that viral protein phosphorylation by host kinases can regulate processes such as viral replication and mobilization. The aim of this work is to evaluate the role of phosphorylation in regulating the functional activities of the movement protein TGBp1 of PVX and its interaction with the protein Remorin (REM). For this aim different TGBp1 mutants have been developed by direct mutagenesis where the identified threonines have been replaced by alanine (T193A and T214A) or aspartate (T193D and T214D) residues. The virus movement function of the phosphomutants was assessed by complementation of PVX cell-to-cell movement in trans. It was shown that all mutants were non-functional for virus movement, and that phosphorylation of T193 is essential for stability of the MP by a degradation mechanism that involves a PEST sequence at the C-terminus of TGBp1. Several experimental approaches involving sequence comparison among TGBp1 homologues from viruses belonging to the *Alpha* and *Betaflexiviridae* genera and direct mutagenesis show that the T193 residue and the PEST sequence are conserved among all TGBp1 analyzed, suggesting that phosphorylation of T193 in these MPs could be a mechanism by which protein stability is regulated in several viruses. The results obtained in this work also have shown that phosphorylation of T193 and T214 of TGBp1 negatively affects the PTGS suppression activity of this MP. Two-hybrid assays and pull down experiments demonstrated that the N- and C-term domain of TGBp1 are involved in the interaction between PVX

TGBp1 and REM and that this interaction is not regulated by TGBp1 phosphorylation. In addition, this work presents the first evidence that the interaction between REM and other TGBp1s could be a conserved mechanism used by different TGB-containing viruses. The studies conducted to determine the biological effect of REM on TGBp1 from PVX showed that REM protein does not interfere with PTGS- suppressing activity of TGBp1. Finally, sub-cellular localization studies demonstrated that TGBp1 localization is influenced by the presence of other viral proteins and by the use of N- or C-terminal GFP fusion proteins.

Keywords: TGBp1 – *Potato virus X* – phosphorylation – viral movement – RNA silencing
- REM

AGRADECIMIENTOS

A la primer persona que quiero agradecer es a la Dra. Alicia Zelada. La Dra. Zelada ha sido una excelente directora a lo largo de todos estos años y una gran referente de mi carrera científica. Estoy enormemente agradecida por la formación y los valores que me ha transmitido a lo largo de este camino. Siempre me ha apoyado y me ha alentado en todo lo relacionado a mi trabajo. Le quiero dar las gracias por sus valiosas discusiones y sugerencias, por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo y confianza. Gracias por todo el camino recorrido y compartido juntas, gracias de verdad!

Al Dr. Alejandro Mentaberry por haberme dado la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral en su laboratorio y por sus valiosos consejos como tutor.

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

Al Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por permitirme llevar la gran mayoría de mi trabajo en el laboratorio de Agrobiotecnología.

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

A la Dra. Natalia Módena, la Dra. Paula Bey, la Lic. Florencia Conte, al Lic. Franco Puccio y a la Lic. Artemis Perraki por sus valiosas colaboraciones, ayudas y aportes a la realización de este trabajo.

Al Dr. Sebastian Mongrand por recibirme y permitirme realizar parte de mi trabajo en el Laboratoire de Biogenese Membrane de la Universidad de Bordeaux, Francia.

A la Dra. Jeanmarie Verchot-Lubciz por recibirme en su laboratorio en la Universidad Estatal de Oklahoma, Estados Unidos.

A todas las personas que han transitado por el laboratorio de Agrobiotecnología (ex -papa) y por el Laboratorio de Biología Molecular de *Trypanosomas*. A Silvia, Patri, Sergio, Mercedes, Sonia, Ken, Naty B., Blanqui, Mauro,

Exe, Fran, Pablo, Marie, Maru, Silvio, Leo, Adri, Greta, Clari, Hernán, Adri, Nico y Luli. Especialmente le quiero agradecer a Naty M., Naty F., Flor, Pau, Euge, Gasti y Nico F. por las horas compartidas dentro y fuera del laboratorio. Gracias por ser mis amigos!

A todos los chicos del INGEBI que me ayudaron cada vez que he ido a hacer uso de los equipos.

A todos los biologuitos por compartir todos nuestros éxitos y frustraciones, Cece, Sabri, Ana, Lechi, Rodri, Vero M, Teban, Guille, Pablo, Lucas, la Colo, Diego, las Paulas y Vero D.

A Sebas del IByME y a Lucas por la ayuda estadística.

A todos los Wikis.

Le quiero agradecer especialmente a la Dra. Geraldine Gueron por haberme ayudado de forma incondicional en esta etapa de mi vida. Gracias Guebe por ser mi amiga y por el apoyo que me has dado durante todos estos años y los momentos compartidos!

A mis amigos de la vida Vicky, Ceci, Pili, Tomi, Maxi y Ale. Gracias por bancarme a pesar de no entender nada!

Especialmente a mi familia por el apoyo incondicional que me han dado.

¡Gracias a todos!

Dedicado a mi familia. A mí papá y mi mamá, Eduardo y Marta, y a mis hermanos Lu, Ana y Juan. Y a mis amigos. ¡Gracias a todos por su apoyo!

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas y Acrónimos | 1 |
| Introducción | 4 |
| 1. Virus en plantas | 5 |
| 2. Las familias <i>Alphaflexiviridae</i> , <i>Betaflexiviridae</i> y <i>Gammaflexiviridae</i> | 6 |
| 3. Los <i>Potexvirus</i> : <i>El Potato virus X</i> | 9 |
| 4. Triple Bloque de Genes (TGB)..... | 14 |
| 5. Regulación de la degradación de proteínas virales..... | 30 |
| 6. Mecanismos de defensa y contra defensa virales en plantas..... | 33 |
| 7. Rol de la fosforilación de proteínas virales en procesos celulares..... | 43 |
| Objetivos | 46 |
| Objetivo General y Específicos | 47 |
| Materiales y Métodos | 48 |
| 1. Material vegetal y condiciones de crecimiento | 49 |
| 2. Aislamiento viral | 49 |
| 2.1 Potato Virus X | 49 |
| 3. Cepas bacterianas utilizadas..... | 49 |
| 3.1 <i>Escherichia coli</i> | 49 |
| 3.1.1 Cepas y Condiciones de cultivo | 50 |
| 3.1.2 Preparación de células bacterianas electrocompetentes..... | 50 |
| 3.1.3 Transformación de células electrocompetentes | 50 |
| 3.1.4 Preparación de células bacterianas quimio-competentes | 50 |
| 3.1.5 Transformación de células bacterianas quimio-competentes..... | 51 |
| 3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 51 |
| 3.2.1 Cepas y Condiciones de cultivo | 51 |
| 3.2.2. Preparación de células de <i>A. tumefaciens</i> electrocompetentes | 52 |
| 3.2.3. Transformación de células de <i>A. tumefaciens</i> electrocompetentes | 52 |
| 4. Cepas de levaduras utilizadas..... | 52 |
| 4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - cepa JD53..... | 52 |
| 4.1.1 Preparación de células de levaduras competentes..... | 52 |

| | |
|---|----|
| 4.1.2 Transformación de levaduras | 53 |
| 5. Conservación de clones | 53 |
| 6. Técnicas y métodos de ingeniería genética..... | 53 |
| 6.1. Aislamiento de ADN plasmídico..... | 53 |
| 6.1.1. Método de lisis alcalina | 53 |
| 6.1.2 Purificación mediante matrices comerciales | 54 |
| 6.2 Preparación de plásmidos e insertos de ADN..... | 54 |
| 6.2.1 Amplificación de insertos por reacción en cadena de la polimerasa..... | 54 |
| 6.2.2 Purificación de plásmidos y fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa..... | 55 |
| 6.2.3 Digestión con enzimas de restricción | 55 |
| 6.2.4 Reacciones de ligación | 56 |
| 6.2.5 PCR “colony” | 56 |
| 6.3 Clonado por sistema Gateway | 56 |
| 6.3.1 Primera reacción de recombinación: reacción BP | 56 |
| 6.3.2 Segunda reacción de recombinación: reacción LR..... | 57 |
| 7. Cebadores utilizados..... | 57 |
| 8. Electroforesis de ADN | 59 |
| 9. Plásmidos..... | 59 |
| 9.1 Plásmidos comerciales | 59 |
| 9.2 Plásmidos cedidos por otros laboratorios | 60 |
| 9.3 Plásmidos construidos previamente en nuestro laboratorio | 61 |
| 9.4 Plásmidos construidos en este trabajo | 62 |
| 10. Ensayos de agroinfiltración..... | 66 |
| 11. Ensayos de bombardeo por biobalística | 67 |
| 12. Tinción de GUS en plantas..... | 68 |
| 13. Visualización de GFP | 68 |
| 14. Microscopía de Epifluorescencia y Confocal | 69 |
| 15. Ensayos con inhibidores del proteasoma..... | 69 |
| 16. Ensayos de doble híbrido por el sistema “Split-Ubiquitin” | 69 |
| 16.1 Selección de interacciones positivas por doble híbrido en levaduras | 70 |
| 16.2 Ensayo en placa con 5´FOA: “screening” de interacción | 70 |

| | |
|---|-----------|
| 17. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias | 70 |
| 18. Ensayos de “Pull down” | 71 |
| 18.1 Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST..... | 71 |
| 18.2 Preparación de los extractos de proteínas | 71 |
| 18.3 Ensayos de interacción..... | 72 |
| 19. Análisis de ARN | 72 |
| 19.1 Extracción de ARN total de plantas..... | 72 |
| 19.2 Ensayos de <i>Northern Blot</i> | 73 |
| 19.2.1 Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes | 73 |
| 19.2.2 Preparación de los moldes para sondas de ADN | 73 |
| 19.2.3 Marcación de sondas por iniciación al azar de la polimerización..... | 74 |
| 19.2.4 Hibridación | 74 |
| 19.3 Detección de ARN pequeños..... | 75 |
| 19.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes..... | 75 |
| 19.3.2 Ensayos de Northern blot de ARN pequeños | 75 |
| 19.3.3 Preparación de los moldes para sondas de ARN | 75 |
| 19.3.4 Marcación de sonda para detección de siARN | 76 |
| 19.3.5 Marcación de sonda para detección de microARN | 75 |
| 19.3.6 Hibridación | 76 |
| 20. Análisis de Proteínas..... | 77 |
| 20.1 Extracción de proteínas totales de plantas..... | 77 |
| 20.2 Electroforesis y transferencia de proteínas | 77 |
| 20.2.1 Geles de poliacrilamida-SDS PAGE..... | 77 |
| 20.2.2 Tinción con Coomasie Brilliant Blue..... | 78 |
| 20.2.3 Transferencia de proteínas | 78 |
| 20.3 Tinción con Ponceau | 79 |
| 21. Ensayos de <i>Western Blot</i> | 79 |
| 21.1 Anticuerpos utilizados..... | 79 |
| 21.2 Revelado con sustrato cromogénico: NBT/BCIP | 80 |
| 21.3 Revelado por quimioluminiscencia | 80 |
| 22. Medios de cultivo y soluciones..... | 80 |
| Resultados y Discusión | 83 |

| | |
|---|------------|
| Capítulo I | 84 |
| 1. Estudio del efecto de las fosfomutantes T193 y T214 de TGBp1 sobre la movilización célula a célula de PVX. | 85 |
| 1.1 Clonado de TGBp1 y las fosfomutantes T193 y T214 en el vector binario pK7WG2D para su expresión transitoria en plantas de <i>N. benthamiana</i> | 86 |
| 1.2 Evaluación de la capacidad de las fosfomutantes T193 y T214 de TGBp1 de complementar el movimiento célula a célula de un PVX defectivo en esta función..... | 87 |
| 2. Estudio de los niveles de acumulación de las fosfomutantes T193 y T214 en experimentos de expresión transitoria en plantas de <i>N. benthamiana</i> | 91 |
| 3. Estudio del rol de la fosforilación de la T193 en la regulación de la degradación de TGBp1 de PVX. | 97 |
| 3.1 Estudio del rol del sistema UPS – 26S en la degradación de la fosfomutante T193A de TGBp1. | 98 |
| 3.2 Efecto de la fusión de las fosfomutantes T193 de TGBp1 sobre la estabilidad de la proteína GFP..... | 100 |
| 3.3 Estudio de la presencia de una secuencia PEST como posible regulador de la estabilidad de la proteína TGBp1 de PVX..... | 105 |
| 3.4 Estudio del rol de la T193 en la estabilidad de las proteínas TGBp1s pertenecientes a virus que utilizan la estrategia de movilización del TGB.. | 112 |
| 4. Rol de la fosforilación de TGBp1 de PVX sobre la actividad supresora del silenciamiento génico mediado por ARN. | 117 |
| 5. Rol de la fosforilación de TGBp1 en la acumulación del microARN-168, regulador de los niveles de expresión de la proteína AGO1..... | 125 |
| 6. Estudio de la fosforilación de TGBp1 de PVX sobre su capacidad de promover la apertura de plasmodesmos..... | 128 |
| Conclusiones y Discusión..... | 132 |
| Capítulo II | 144 |
| 1. Estudio del rol de la fosforilación de TGBp1 en la regulación de la interacción con REM | 145 |
| 2. Estudio de los dominios funcionales de TGBp1 involucrados en la interacción con REM..... | 153 |

| | |
|--|------------|
| 3. Estudio del rol de REM en la interacción con TGBp1s pertenecientes a otros géneros virales..... | 156 |
| 4. Estudio del efecto de REM sobre la actividad supresora del PTGS de TGBp1 de PVX... .. | 158 |
| Conclusiones y Discusión..... | 162 |
| Capítulo III | 166 |
| 1. Estudio de la localización celular de la TGBp1 fusionada a GFP en su extremo N-terminal | 169 |
| 2. Estudio de la localización celular de TGBp1 fusionada a GFP en su extremo C-terminal..... | 176 |
| Conclusiones y Discusión..... | 183 |
| Discusión General..... | 189 |
| Referencias | 196 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|--------|--|
| μL | Microlitro |
| ADN | Acido desoxiribonucleico |
| ADNc | Acido desoxiribonucleico copia |
| ARN | Acido ribonucleico |
| ARNdc | ARN doble cadena |
| ARNg | ARN genómico |
| ARNm | ARN mensajero |
| ARNsg | ARN subgenómico |
| ARNv | ARN viral |
| 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> |
| CMV | <i>Cucumber mosaic virus</i> |
| CP | Cápside viral |
| CMV | <i>Cucumber mosaic virus</i> |
| CYMV | <i>Clover yellow mosaic virus</i> |
| CymRSV | <i>Cymbidium ringspot virus</i> |
| DMSO | Dimetil sulfoxido |
| D.O. | Densidad óptica |
| d.p.b | Días post bombardeo |
| d.p.i | Días post infiltración |
| ERAD | Degradación de proteínas asociada al retículo endoplasmático |
| GUS | Enzima β-glucuronidasa |
| GarVC | <i>Garlic virus C</i> |
| h | Horas |
| kb | Kilo pares de bases |
| kDa | Kilo Dalton |

| | |
|-------|--|
| L | Litro |
| LRSV | <i>Lichnys ringspot virus beta</i> |
| MBB | Cuerpos asociados a membranas (del inglés " <i>Membrane-Bound Bodies</i> ") |
| mg | Miligramo |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MP(s) | Proteína/s de movimiento |
| ng | Nanogramo |
| nm | Nanometros |
| NOS | Nopalina sintetasa |
| nt | Nucleótido |
| ORF | Marco abierto de lectura (del inglés " <i>Open Reading Frame</i> ") |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés " <i>Polymerase Chain Reaction</i> ") |
| Pi | Fósforo inorgánico |
| PLRV | <i>Potato leaf roll virus</i> |
| PMB | Cuerpos periféricos membranosos (del inglés " <i>Peripheral Membrane Bodies</i> ") |
| PTGS | Silenciamiento génico postranscripcional (del inglés " <i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i> ") |
| PTMV | <i>Potato mop top virus</i> |
| PVM | <i>Potato virus M</i> |
| PVX | <i>Potato virus X</i> |
| PVY | <i>Potato virus Y</i> |
| RE | Retículo endoplasmático |
| REM | Proteína remorina |
| RFP | Proteína roja fluorescente (del inglés " <i>Red Fluorescent Protein</i> ") |
| RISC | Complejo de silenciamiento mediado por ARN (del inglés " <i>RNA-induced Silencing Complex</i> ") |
| RNP | Complejo de ribonucleoproteico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| seg | Segundos |
| SEL | Límite de exclusión del plasmodesmo (del inglés " <i>Size Exclusion Limit</i> ") |

| | |
|---------|--|
| siARN | ARN pequeños de interferencia (del inglés " <i>Small Interference RNA</i> ") |
| TBSV | <i>Tomato bushy stunt virus</i> |
| TCV | <i>Turnip crinckle virus</i> |
| TGBp(s) | Proteínas del Triple Bloque de Genes (del inglés " <i>Triple Gene Block Proteins</i> ") |
| TMV | <i>Tobacco mosaic virus</i> |
| ToMV | <i>Tomato mosaic virus</i> |
| TuMV | <i>Turnip mosaic virus</i> |
| TYMV | <i>Turnip yellow mosaic virus</i> |
| U | Unidades |
| UA | Unidades arbitrarias |
| UPS-26S | Sistema Ubiquitina Proteasoma - 26S |
| WCMV | <i>White clover mosaic virus</i> |

Introducción

1. Virus de plantas.

Existen diversos tipos de patógenos que pueden infectar y enfermar a las plantas, entre ellos se encuentran los hongos, las bacterias, los insectos y los virus. Estos últimos son de gran importancia agronómica ya que se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo y producen importantes pérdidas en la producción de la mayoría de los cultivos.

La idea de la existencia de virus vegetales comenzó a tener fuerza hacia fines del siglo XIX. Sin embargo, no fue hasta 1916 cuando se logró identificar y aislar el primer virus de plantas, el *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) (Allard, 1916). Desde aquel año hasta el día de hoy, se han identificado más de 900 virus de plantas que pueden ser clasificados en diversas familias de acuerdo a la estructura de sus cápsides, la naturaleza de sus genomas, sus formas de transmisión y sus mecanismos de replicación e infección.

Recientemente, la revista *Plant Molecular Pathology* realizó una encuesta con más de 250 votos sobre los 10 virus de plantas más importantes agronómicamente y científicamente (Scholthof *et al.*, 2011). Entre ellos se encontraron: TMV, el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), el *Cucumber mosaic virus* (CMV), el *Potato virus Y* (PVY), el *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), el *African cassava mosaic virus* (ACMV), el *Plum pox virus* (PPV), el *Brome mosaic virus* (BMV) y el *Potato virus X* (PVX). Este último, perteneciente al género de los *Potexvirus*, es uno de los virus más ampliamente estudiados que infecta principalmente a plantas solanáceas. A campo, los cultivos más severamente afectados por este tipo de virus son los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), de tomate (*Solanum lycopersicum*), de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y de pimiento (*Capsicum annuum* y *Capsicum frutescens*). En muchos cultivares de papa, PVX se encuentra en una forma latente y no produce daños visibles (Rashid *et al.*, 1989). Sin embargo, varios estudios han demostrado que según el tipo de cultivar y la cepa de PVX, este virus puede reducir los rendimientos entre un 10-25% (Rashid *et al.*, 1989). Esta reducción en la producción de los cultivos se da por la presencia de diversos síntomas que produce dicho virus. 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 (**Figura 1**).

Estos síntomas son los que conducen al desarrollo de plantas enanas y los que ocasionan importantes reducciones en el rendimiento. Cuando se produce la infección conjunta de PVX con PVY los efectos son considerablemente más severos y las pérdidas producto de la enfermedad aumentan significativamente.

PVX se transmite por inoculación mecánica o por contacto entre plantas sanas e infectadas y hasta el momento no se han identificado insectos vectores (Agrios, 2004). En la actualidad es posible controlar la enfermedad a través de la utilización de técnicas de manejo del cultivo basadas en la certificación de semillas libres de virus y en programas de mejoramiento clásico. Si bien hoy en día el impacto en los rendimientos por infección de PVX ha disminuido (Scholthof *et al.*, 2011), se continúa con el estudio de la estructura, forma de replicación y movilización de este virus para avanzar en el conocimiento y el entendimiento de la expresión de genes virales, interacciones planta-patógeno, silenciamiento génico y en el desarrollo de vectores virales basados en PVX para aplicaciones agrícolas y médicas.



Figura 1. Síntomas observados en hojas sistémicas luego de 7 días postinfección con el virus PVX en hojas de *Nicotiana tabacum*. Se puede observar el moteado amarillento en forma de mosaico característico de la infección. Fotografía tomada en el laboratorio.

2. Las familias Alphaflexiviridae, Betaflexiviridae y Gammaflexiviridae.

Como se comentó anteriormente, PVX pertenece al género *Potexvirus*, el cual formaba parte hasta hace unos años de la familia *Flexiviridae*. Esta familia agrupaba a los géneros: *Allexivirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus* y *Vitivirus*, al género putativo *Citrivirus*, y a algunas especies aún no

asignadas (Martelli *et al.*, 2007). Sin embargo, en el año 2009 el “International Committee on Taxonomy of Viruses” recategorizó a la familia *Flexiviridae* junto con la familia *Tymoviridae* bajo un nuevo orden denominado *Tymovirales*. Asimismo, en base a análisis moleculares filogenéticos de las proteínas virales (replicasa y cápside), se dividió la familia *Flexiviridae* en tres nuevas familias: *Alphaflexiviridae* (géneros: *Potexvirus*, *Allexivirus*, *Botrexvirus*, *Lolavirus*, *Mandarivirus* y *Sclerodarnavirus*), *Betaflexiviridae* (géneros: *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citriovirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* y 6 especies no asignadas a un género) y *Gammaflexiviridae* (género: *Mycoflexivirus*) (ICTVdB, 2011).

Los *Potex*-, *Allexi*- y *Carlavirus* son patógenos de plantas herbáceas, mientras que los *Capillo*-, *Citri*-, *Fovea*-, *Mandari*-, *Tricho*- y *Vitivirus* atacan plantas leñosas dicotiledóneas. Son pocas las especies de plantas monocotiledóneas que son afectadas por virus pertenecientes a estos géneros. La diseminación de estos virus puede ser por transmisión física o mecánica (*Potexvirus* y algunos *Carlavirus*) o por medio de vectores específicos (*Carla*-, *Allexi*-, *Tricho*- y *Vitivirus*). El establecimiento del agrupamiento de estos géneros virales en estas familias se basó en las similitudes en la morfología de los viriones, en la organización y tipo de genoma y en las relaciones filogenéticas de las proteínas replicasas y proteínas estructurales.

Los miembros de estas familias presentan una estructura de viriones de morfología filamentosas y flexibles, con una longitud que varía entre los 500 y 1000 nm y un diámetro de 12-14 nm. Las partículas virales están formadas por una única subunidad proteica que puede tener un tamaño entre 21 y 41 kDa. Como la gran mayoría de los virus de plantas, el genoma se compone de una única hebra de ARN de polaridad positiva, poliadenilado en el extremo 3' y de una extensión variable de entre 5,8 y 8,8 kb. La organización típica del genoma de algunos virus pertenecientes a las familias *Alpha*- y *Betaflexiviridae* se muestra en la **Figura 2**. Si bien el número de ORFs (marcos abiertos de lectura, del inglés “*Open Reading Frame*”) varían entre los distintos géneros, e inclusive entre distintas especies, el primer ORF corresponde al gen que codifica la replicasa. Este gen se traduce directamente del ARN genómico y codifica una replicasa viral que posee tres dominios bien definidos: un dominio metiltransferasa (Met), uno ARN helicasa (Hel) y uno ARN polimerasa (RDR). También

algunos virus presentan replicasas con otros dominios adicionales (peptidasa, proteasa y dimetilasa).

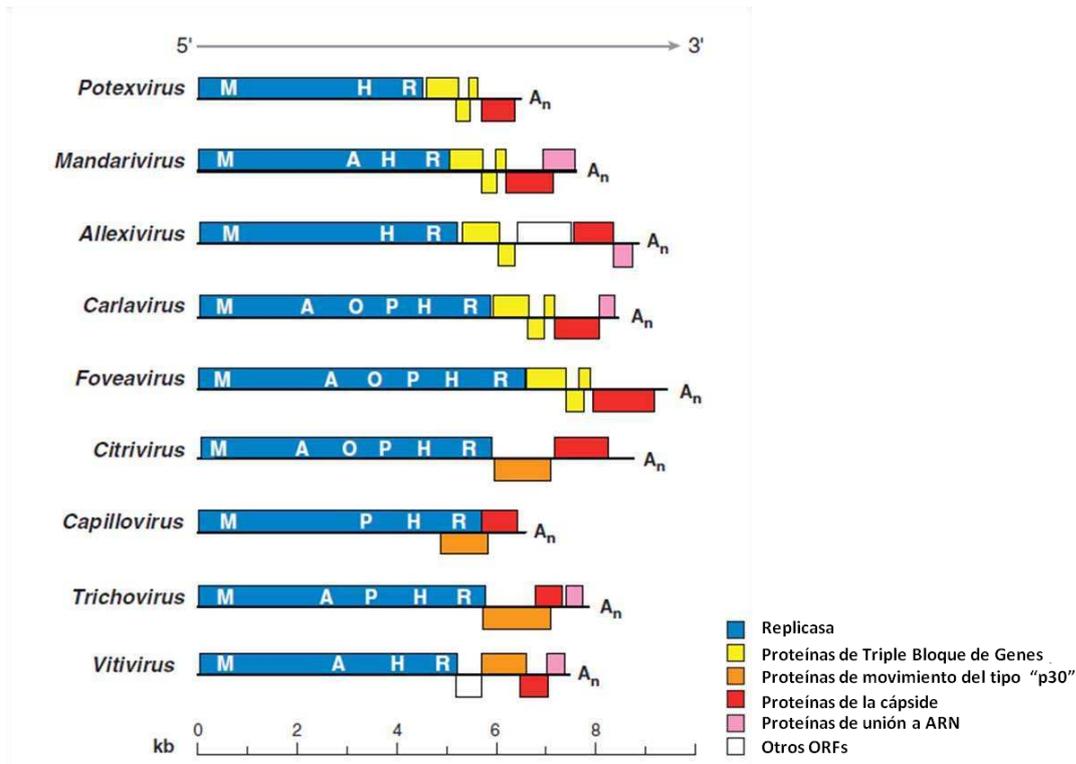


Figura 2. Organización del genoma en algunos géneros virales pertenecientes a las familias *Alphaflexiviridae* y *Betaflexiviridae*. M, dominio metiltransferasa; H, dominio helicasa; R, dominio polimerasa; P, dominio proteasa; A, dominio dimetilasa; O, dominio peptidasa; TGB: Triple Bloque de Genes. Adaptado de: Martelli *et al.*, 2007. No se incluyen los géneros *Lola-*, *Botrex* y *Sclerodarnavirus* debido a que presentan una organización genómica de las proteínas de movimiento que difieren del esquema general de proteínas de movimiento del TGB o del tipo p30.

Río abajo del ORF de la replicasa, el genoma de estas familias codifica una o más proteínas de movimiento (MPs) que se encuentran involucradas en la movilización célula a célula y en la dispersión sistémica dentro de la planta, a excepción de los *Mycoflexivirus* que no poseen MPs (Howitt *et al.*, 2001). En base a la organización y a la presencia de distintas MPs, se distinguen dos tipos de estrategia de movilización en los virus pertenecientes a estas familias. Por un lado están los géneros *Capillo-*, *Citri-*, *Tricho-* y *Vitivirus* que codifican una única proteína de movimiento de

aproximadamente 30 kDa. Estas proteínas conforman el grupo de proteínas “del tipo 30K” o “p30”, en referencia a la proteína de 30 kDa de TMV (**Figura 2**). Por otro lado, se encuentran los géneros *Allexi-*, *Carla-*, *Fovea-*, *Mandari-* y *Potexvirus* que presentan un conjunto de tres ORFs parcialmente superpuestos denominado triple bloque de genes (TGB del inglés “*Triple Gene Block*”) (**Figura 2**). Estos tres ORFs codifican respectivamente las proteínas de movimiento TGBp1, TGBp2 y TGBp3. Conjuntamente las tres proteínas son las responsables de la movilización célula a célula de este tipo de virus. El módulo del tipo TGB existe en otros virus no relacionados a dichas familias que pertenecen a los géneros *Benyvirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus* y *Pomovirus* (estos tres últimos pertenecientes a la familia *Virgaviridae*). Estos presentan una estrategia de movilización basado en el modelo del triple bloque de genes, con la diferencia que sus proteínas TGBp1 y TGBp3 son significativamente más grandes. Más adelante se explicará en mayor detalle el modelo de movilización basado en el TGB para los virus pertenecientes a la familia *Alpha-* y *Betaflexiviridae* (tipo Potex).

En los virus de las familias *Alpha-* y *Betaflexiviridae* el ORF que codifica la cápside viral (CP) se encuentra río abajo del TGB. En esta familia la CP se expresa abundantemente a partir de un único ARN subgenómico y monocistrónico. 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 con el ensamblado del virión y las funciones asociadas a la transmisión por vectores, respectivamente.

3. Los *Potexvirus*: El *Potato virus X*.

El *Potato virus X* pertenece al género viral *Potexvirus*. Los *Potexvirus* tienen un genoma de ARN simple cadena monopartito. Hasta el día de hoy, este género incluye 35 especies (ICTVdB, 2011), dentro de los cuales los más estudiados son el PVX, el *White clover mosaic virus* (WCMV), el *Foxtail mosaic virus* (FMV), el *Cactus virus X*

(CVX), el *Clover yellow mosaic virus* (CYMV) y el *Bamboo mosaic virus* (BaMV) (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007).

El *Potato virus X* fue por primera vez descrito en 1931 como el “X virus of potato” (Smith, 1931) y fue uno de los primeros virus en ser purificados. PVX ha sido extremadamente útil como sistema modelo para el estudio de varios aspectos de los mecanismos de infección viral y para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. Si bien se caracteriza por ser un virus con una estructura filamentosa helicoidal de unos 515 nm, se han reportado tamaños variables de las partículas virales (Price, 1993). El genoma viral consiste de un ARN simple cadena de orientación positiva de un tamaño de 6.4 kb. El ARN genómico en su extremo 5´ posee una estructura del tipo “CAP” ($m^7GpppG^{(m)}pAp(Xp)_3G$) (Sonenberg *et al.*, 1978) y su extremo 3´ se encuentra poliadenilado (estructura de “poly-A”) (Price, 1993) (**Figura 3**).

El genoma de PVX contiene cinco ORFs (**Figura 3**). El ORF que se encuentra próximo al 5´ codifica la replicasa viral (165 kDa), la cual se encuentra involucrada en la síntesis de los ARN genómicos (de orientación positiva y negativa) y de los ARN subgenómicos (Batten *et al.*, 2003). Los ORFs 2, 3 y 4, se encuentran parcialmente superpuestos y se los conoce como el TGB. Dichos tres marcos abiertos de lectura codifican las proteínas de movimiento TGBp1 (25 kDa), TGBp2 (12 kDa) y TGBp3 (8 kDa), respectivamente. La principal función de estas proteínas es asistir en la movilización viral célula a célula y de larga distancia (Lough *et al.*, 1998; Gilmer *et al.*, 1992; Beck *et al.*, 1991). Estas proteínas son expresadas a partir de dos ARN subgenómicos, el primer ARN subgenómico de 2,1 kb codifica la proteína TGBp1, mientras que el segundo ARN subgenómico de 1,4 kb codifica las proteínas TGBp2 y TGBp3 (Verchot *et al.*, 1998). Por último se encuentra una cuarta proteína necesaria para la movilización y encapsidación del virus: la cápside viral (CP) (Chapman *et al.*, 1992; Santa-Cruz *et al.*, 1996; Fedorkin *et al.*, 2001). Dicha proteína corresponde al quinto ORF (próximo al 3´) y es expresada a partir de un tercer ARN subgenómico de 0,9 kb (Verchot *et al.*, 1998).

3.1 Ciclo replicativo de PVX.

3.1.1 Replicación y traducción de proteínas virales.

La replicación del genoma viral de PVX involucra la síntesis de cadenas de ARNs de orientación positiva y negativa que dan origen a los nuevos ARNs genómicos (ARNg) y subgenómicos de polaridad positiva. Hasta el momento la única proteína identificada que es necesaria para la replicación del virus es la replicasa de 165 kDa (Longstaff *et al.*, 1993). Como las replicasas pertenecientes a los virus de la familia *Alphaflexiviridae*, posee tres dominios: un dominio metiltransferasa, un dominio helicasa y un dominio polimerasa ARN dependiente. Se ha demostrado que esta proteína se asocia a membranas celulares (Doronin y Hemenway, 1996), pero aún se desconoce el mecanismo por el cual ocurre dicha asociación. Como característica propia de la replicación de PVX, el genoma presenta elementos y secuencias que actúan en “cis” regulando la replicación del virus. Algunas de estas estructuras son las presentes en el extremo 5´ no traducible (5´NTR) denominadas 5´SL1 y 5´SL2. Estas estructuras son del tipo “stem loop” y son esenciales para la síntesis de los ARNs genómicos de orientación positiva (Kim y Hemenway, 1996) (**Figura 3**). En especial, la 5´SL1 es un elemento multifuncional que además de encontrarse involucrado en la replicación viral, juega un rol importante en la movilización célula a célula del virus y en el ensamblado de los viriones (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). El extremo 3´NTR de PVX es una secuencia de 74 nt que contiene elementos en “cis” que controlan la acumulación de los ARNs de orientación positiva y negativa. Mediante análisis computacionales se han identificado tres estructuras del tipo “stem-loop” en la región 3´NTR (3´SL1, 3´SL2 y 3´SL3) (**Figura 3**). Además, para que ocurra la transcripción y la síntesis del ARNg deben ocurrir ciertas interacciones entre elementos presentes en el extremo 5´ y entre sitios internos del ARN genómico o secuencias presentes en el extremo 3´NTR (Kim y Hemenway, 1996).

Como se explicó anteriormente existen tres especies de ARNsg (**Figura 3**). Las especies de 2,1 kb y 0,9 kb son más abundantes y funcionan como mensajeros monocistrónicos para la producción de las proteínas TGBp1 y CP, respectivamente (Verchot *et al.*, 1998). 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). La regulación de los niveles de expresión de cada proteína tendría lugar a través de la transcripción diferencial de los ARN

mensajeros (ARNm). En el caso de la proteína TGBp3 la producción de la misma ocurre a través de un mecanismo “leaky” de escaneo de los ribosomas (Verchot *et al.*, 1998).

Las proteínas del TGB de diversos *Potexvirus* son esenciales para el movimiento viral y no existen evidencias directas que las relacionen con la replicación del virus (Beck *et al.*, 1991; Verchot-Lubicz *et al.*, 1998; Batten *et al.*, 2003; Morozov y Solovyev 2003; Tilsner *et al.*, 2012). Diferentes trabajos han presentado 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 dichas proteínas.

3.1.2 Ensamblado y desensamblado de las partículas virales.

Los viriones de PVX tienen una estructura filamentosa, flexible con una longitud que varía entre los 470 – 580 nm. Alrededor de 1300 subunidades idénticas de CP forman la estructura de forma helicoidal que contiene al ARN viral (ARNv) (Zayakina *et al.*, 2008). Estudios de expresión de CP en *Escherichia coli*, han mostrado que las mismas se asocian formando discos y partículas virales vacías (Tremblay *et al.*, 2006). Estos estudios han permitido demostrar que las subunidades individuales de CP se autoensamblan primero en discos con forma helicoidal que luego se unen a lo largo del ARNg viral produciendo el ensamblado final de las partículas virales (Tremblay *et al.*, 2006). Se cree que el ensamblado de los viriones es gatillado cuando en las células se producen suficientes discos y ARN viral.

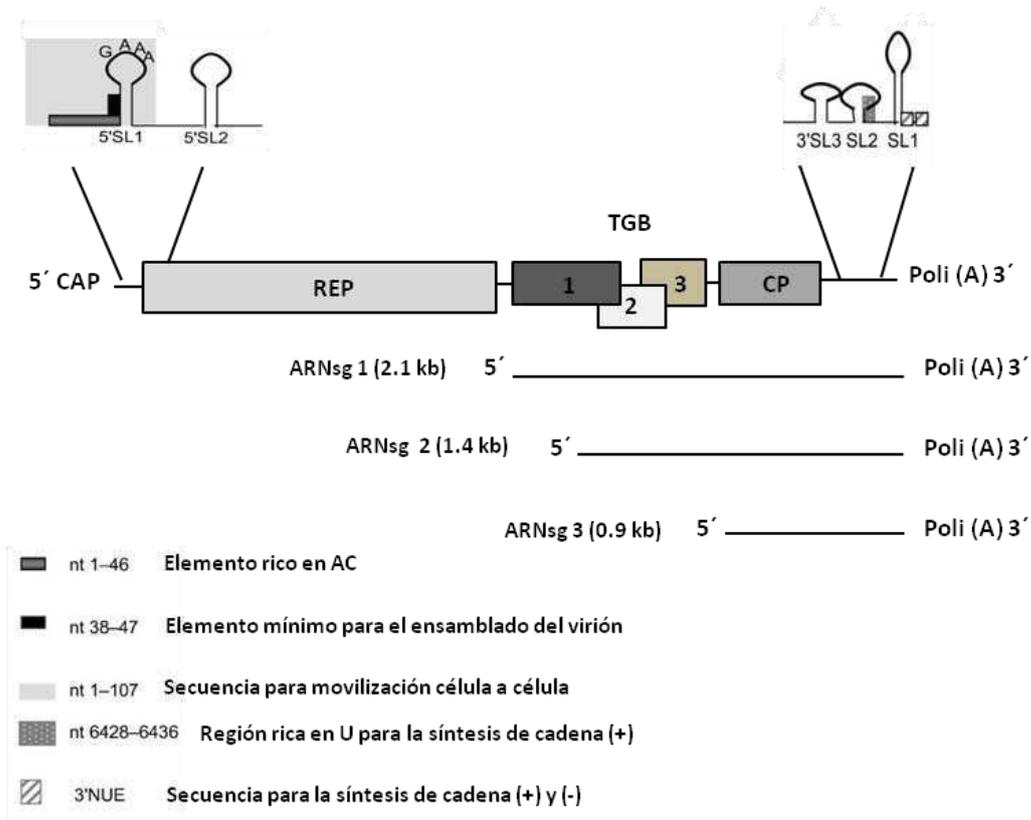


Figura 3. Esquema del genoma viral, transcritos subgenómicos y elementos reguladores 5' y 3' de PVX. REP: replicasa; TGB: triple bloque de genes (1: TGBp1; 2: TGBp2; 3: TGBp3); CP: cápside viral; SL: estructura "stem loop". Adaptado de Verchot-Lubicz *et al.*, 2007.

Una vez que el virus entra dentro de una primera célula, el mismo debe desensamblarse para que su ARN pueda traducirse y de este modo iniciar el ciclo de infección. Mediante estudios de traducibilidad del genoma viral *in vitro* se demostró que el genoma de PVX puede ser traducido mediante dos mecanismos diferentes (Atabekov *et al.*, 2007). El primer mecanismo involucra la fosforilación de la CP por quinasas celulares en residuos ubicados en el extremo N-terminal de dicha proteína (Atabekov *et al.*, 2001). Dicha fosforilación induciría cambios conformacionales de la CP que permitirían el desensamblado de la estructura del virión. El segundo mecanismo involucra la interacción de TGBp1 con el virión, transformando las partículas virales en sus formas traducibles (Atabekov *et al.*, 2000). Mediante experimentos de traducción en sistemas libres de células y fosforilación *in vitro* se demostró que la fosforilación de TGBp1 inhibe la activación de la traducción (Zayakina

et al., 2008). La TGBp1 se une selectivamente a un extremo del virión, presumiblemente a ciertos dominios de la CP que se encuentran expuestos en el extremo 5' de la hélice del virión. De esta manera, induce rápidamente el desensamblaje total de la estructura viral removiendo las subunidades de CP y exponiendo al ARN para su posterior traducción (Rodionova *et al.*, 2003). Este modelo de desensamblaje se diferencia del proceso demostrado para TMV, el cual ocurre en forma cotraduccional e involucra una remoción gradual y continua de subunidades de CPs por el ribosoma durante la traducción del ARN (Wilson, 1984).

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, mediante su fosforilación y desfosforilación, de que el complejo se movilice y se convierta en su forma traducible logrando la independencia de los factores del hospedante (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007).

4. Triple Bloque de Genes (TGB).

El TGB es un módulo de genes que codifican tres proteínas no estructurales, las cuales actúan de manera coordinada para transportar los complejos de movilización viral hacia células vecinas y hacia el resto de la planta (**Figura 2**). Varios virus pertenecientes a las familias *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae* y *Virgaviridae* tienen organizadas sus proteínas de movimiento (MP) bajo la estructura de triple bloque de genes. Basándose en el análisis filogenético y en las distintas estrategias de movilización viral, las proteínas del módulo TGB han sido clasificadas en módulos de tipo Potex o de tipo Hordei, haciendo referencia a los géneros *Potexvirus* y *Hordeivirus*, respectivamente (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). Aunque ambos grupos presentan similitudes en las actividades de las diferentes proteínas TGBs, se ha demostrado diferencias significativas entre las mismas (Schoelz *et al.*, 2011).

Si bien la posición del bloque TGB en el genoma viral varía notablemente entre los dos grupos virales, el arreglo de los cistrones dentro del bloque TGB y su modo de expresión se encuentra conservado (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007, ver **Figuras 2 y 3**). Las

proteínas del módulo TGB se expresan a partir de dos ARNsg. La TGBp1 es la proteína más abundante de las tres y se expresa a partir del ARN genómico (*Pomovirus*) o del primer ARN subgenómico. Por otro lado, la TGBp2 y la TGBp3 se expresan en menor abundancia a partir del segundo ARN subgenómico. La relación de acumulación entre las tres proteínas es de 100: 10: 1 respectivamente (Jackson *et al.*, 2009). La expresión de las tres proteínas es fundamental para el movimiento viral (Verchot-Lubicz, 2005).

Una de las principales diferencias entre la estrategia de movilización utilizada por los virus de ambos grupos es el requerimiento de la cápside para la movilización célula a célula (Callaway *et al.*, 2001). La proteína CP no es necesaria para el movimiento intercelular mediado por las proteínas del TGB tipo *Hordei* (McGeachy y Baker, 2000). Por el contrario, la CP de los *Potexvirus*, y presumiblemente de otros virus que poseen TGB tipo *Potex*, es necesaria para el transporte intercelular del genoma viral (Chapman *et al.*, 1992; Forster *et al.*, 1992).

4.1 La proteína TGBp1.

La proteína TGBp1 es una proteína multifuncional. Se trata de 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, del inglés "*Size Exclusion Limit*"), la promoción del transporte viral a través del plasmodesmo (PD), la activación de la traducción del ARN viral, la supresión del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) y la organización de los complejos de replicación viral (Kalinina *et al.*, 2002; Angell *et al.* 1996; Howard *et al.* 2004; Atabekov *et al.*, 2000; Voinnet *et al.*, 2000; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010; Tilsner *et al.*, 2012).

4.1.1 Actividades de TGBp1 in vitro: helicasa, ATPasa y unión de ARN.

Las TGBp1 de tipo *Potex* y tipo *Hordei* pertenecen a la superfamilia de helicasas tipo I de ADN/ARN (SF1) (Gorbalenya y Koonin, 1993; Kadaré y Haenni, 1997). Dicha superfamilia posee un dominio estructural conservado (HELD) conformado por 7 motivos típicos (I, Ia, II, III, IV, V y VI), el cual a su vez puede subdividirse en dominios estructurales H1 (I, Ia, II, III) y H2 (IV, V y VI) (**Figura 4**). Las TGBp1s de tipo *Potex* y tipo

Hordei difieren en su peso molecular y en su estructura de dominios (Morozov y Solovyev, 2003). Las TGBp1 de tipo Hordei poseen un tamaño de entre 42 y 63 kDa y consisten en tres dominios estructurales y funcionales: una extensión N-terminal (NTD), un dominio interno (ID) y un dominio de tipo helicasa (HELD) en su extremo C-terminal (Makarov *et al.*, 2009). Las proteínas TGBp1s de tipo Potex son más pequeñas, con un tamaño de aproximadamente 25 kDa y no presentan la extensión NTD ni el dominio ID; sin embargo, presentan un dominio HELD que se extiende a lo largo de toda la proteína (Kalinina *et al.*, 2002).

Las TGBp1s de tipo Hordei son capaces de ejercer su función helicasa sobre un dúplex de ARN tanto en dirección 5'-3', como en dirección 3'-5', pero son incapaces de utilizar un dúplex de ADN como sustrato (Kalinina *et al.*, 2002). Por el contrario, las TGBp1s de tipo Potex realizan esta actividad sólo en sentido 3'-5' y de manera inespecífica (Kalinina *et al.*, 2002). En las TGBp1s de tipo Potex, el sitio de unión a ARN se encuentra en la región N-terminal de la proteína (Morozov *et al.*, 1999; Wung *et al.*, 1999) mientras que en las TGBp1s de tipo Hordei, existen al menos tres sitios de unión a ARN ubicados en las regiones amino, interna y carboxi-terminal de la proteína. Los dominios C-terminal e interno muestran unión cooperativa del ARN, similar a las TGBp1 de tipo Potex, mientras que el extremo N-terminal muestra una fuerte unión no-cooperativa, tal que la proteína exhibe los dos tipos de unión (Makarov *et al.*, 2009).

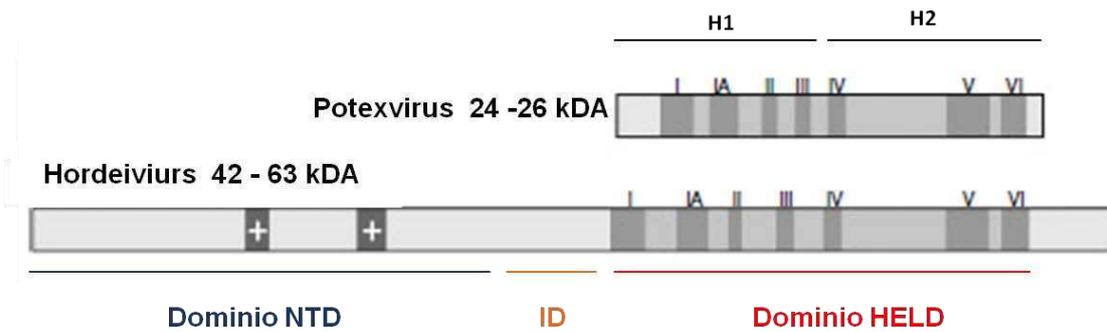


Figura 4. Estructura de las proteínas TGBp1 en *Potex-* y *Hordeivirus*. El esquema muestra la distribución de los dominios funcionales y estructurales de las proteínas TGBp1s de tipo Potex y de tipo Hordei. Se indican los motivos característicos de la SF1 (I-VI). NTD: dominio N-terminal, ID: dominio interno, HELD: dominio helicasa, H1: dominio helicasa 1, H2: dominio helicasa 2. Los + indican regiones ricas en aminoácidos con carga positiva. Adaptado de Morozov y Solovyev, 2003.

A lo largo de la secuencia de TGBp1 de PVX se encuentran siete dominios NTPasa/helicasa. 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 (Morozov *et al.*, 1999; Leshchiner *et al.*, 2006). A su vez, se demostró que la proteína delecionada en los mismos motivos es incapaz de unir ARN (Morozov *et al.*, 1999; Leshchiner *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 y Koonin, 1993; Subramanya *et al.*, 1996; Korolev *et al.*, 1997; Fairman-Williams *et al.*, 2010). 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. 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 con los dominios estructurales H1 y H2. 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 nucléico. Por esta razón, algunas helicasas forman dímeros u oligómeros (Mackintosh y Raney, 2006; Jankowsky y Fairman, 2007). Se ha reportado que la proteína TGBp1 de PVX es capaz de formar dímeros aún en las condiciones propias de 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, IA 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).

4.1.2. Actividades de TGBp1 *in vivo*.

Hasta el momento no resulta claro de qué modo las actividades helicasa, ATPasa, y de unión de ARN, participan en las diferentes funciones asignadas a la proteína TGBp1.

La TGBp1 de *Potexvirus* es capaz de promover la apertura del plasmodesmo (actividad de “gating”), aumentando el límite de exclusión de los mismos para permitir la transferencia de los complejos virales y de sí misma a las células adyacentes (Yang *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2004; Angell *et al.*, 1996). Se mostró que es necesaria la actividad ATPasa para la actividad de “gating” ya que mutaciones en el dominio NTPasa/helicasa I (mutación en la secuencia GKS que impide las actividades de ATPasa/helicasa), así como la delección de los dominios I, IA y II (involucrados en la actividad ATPasa), bloquearon la habilidad de la proteína para modificar el SEL y el transporte del ARN viral a través de las células (Lough *et al.*, 1998; Leshchiner *et al.*, 2006). La proteína TGBp1 de *Hordevirus* no es capaz de modificar el SEL del plasmodesmo ni se moviliza entre las células, y requiere de la actividad ATPasa únicamente para transportar el complejo de movilización a través del PD (Zamyatnin *et al.*, 2004).

Otra actividad adicional de las TGBp1s de tipo Potex es que, como se comentó anteriormente, promueven el desensamblaje de los viriones y la traducción del ARN

viral cuando la misma no se encuentra fosforilada (Atabekov *et al.*, 2000; Rodionova *et al.*, 2003; Zayakina *et al.*, 2008). Se ha reportado que la proteína TGBp1 de PVX interactúa con el extremo 5' de la partícula viral de forma ATP independiente mediante la interacción de su dominio IV con la CP (Atabekov *et al.*, 2000; Zayakina *et al.*, 2008).

Una de las funciones *in vivo* distintivas de las TGBp1s de los *Potexvirus* es su actividad supresora del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) mediado por ARN (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). Esta es una de las principales diferencias con las TGBp1s de los *Hordeivirus*, ya que no se ha identificado que estas últimas posean actividad supresora del silenciamiento génico (Jackson *et al.*, 2009). Particularmente, se ha demostrado que la actividad supresora de TGBp1 de PVX es necesaria para la movilización viral célula a célula (Bayne *et al.*, 2005) y que actúa, a nivel local interactuando y degradando la proteína AGO1 (proteína clave en la vía del PTGS) (Chiu *et al.*, 2010). Se ha demostrado que también impide el silenciamiento a nivel sistémico, probablemente, interfiriendo con la producción o transmisión de las señales del PTGS que se generan en esta vía (Voinnet *et al.*, 2000). Estos mecanismos se explicarán en mayor detalle en el punto 6.

Recientemente, una nueva función ha sido descrita para la TGBp1 de PVX. Se ha demostrado que esta MP organiza los cuerpos X mediante la reorganización de los filamentos de actina y del sistema de endomembranas de la célula (Tilsner *et al.*, 2012). Estos cuerpos X son “fábricas” virales altamente organizadas donde se produce la replicación del ARN genómico. Los cuerpos X sirven como andamios que protegen la replicación del virus y se encuentran involucrados en el ensamblaje de las partículas virales (Laliberté y Sanfaçon, 2010). Tilsner *et al.*, 2012, demostraron que TGBp1 de PVX es la encargada de “remodelar” los filamentos de actina y el RE de tal manera de compartimentalizar las diferentes proteínas virales y el ARN viral. Dentro de estos cuerpos X, TGBp1 forma agregados en forma de hélice, los cuales están rodeados por el sistema de endomembranas de la célula hospedante. Además en estas estructuras se localizan el ARN genómico y vesículas que contienen a la TGBp2 y la TGBp3 y que se encuentran asociadas a la replicasa y a ribosomas.

4.2 Proteínas TGBp2 y TGBp3.

Las proteínas TGBp2 y TGBp3 son proteínas integrales de membrana. La proteína TGBp2 presenta una organización conservada entre los virus portadores de un arreglo de TGB, y posee 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 TGBp2s se insertan en la membrana formando una U, donde la región central resulta expuesta al lumen del retículo endoplasmático (Morozov y Solovyev, 2003; Martelli *et al.*, 2007). Si bien no se han identificado motivos que puedan relacionarse con actividades enzimáticas o dominios estructurales conocidos, en algunos casos se han establecido ciertas actividades. Por ejemplo, la proteína TGBp2 del *Potato mop top virus* (PMTV, *Pomovirus*) es capaz de unir ARN (Cowan *et al.*, 2002) y, al igual que la TGBp2 de PVX, es capaz de aumentar el SEL de los plasmodesmos (Tamai y Meshi, 2001).

Por otro lado, la secuencia de la proteína TGBp3 es la menos conservada en los diferentes géneros 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 permanece expuesto hacia el citoplasma (Morozov y Solovyev, 2003; Martelli *et al.*, 2007). Mutaciones en el dominio citosólico de la TGBp3 de PVX impiden el movimiento célula a célula del virus, probablemente debido a un aumento en la degradación de dicha proteína (Ju *et al.*, 2008). Debido a esto, el análisis por mutagénesis dirigida no ha sido un método efectivo en la identificación de la función biológica de esta proteína, ya que lleva a una alta inestabilidad de la proteína lo cual sería deletéreo *per se* para el movimiento del virus (Ju *et al.*, 2008). 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 varía entre 18 y 24 kDa (Morozov y Solovyev, 2003; Martelli *et al.*, 2007). La TGBp3 del PMTV, al igual que su TGBp2, es capaz de aumentar el tamaño del poro de los PDs (Haupt *et al.*, 2005).

4.3 Localización subcelular de las proteínas TGB.

A lo largo de los años diferentes técnicas de microscopía han permitido el estudio de la localización celular de diferentes proteínas virales. En particular, la

localización de las proteínas del tipo TGB ha sido fuente de estudio de varios grupos de investigación. Recientemente, Verchot-Lubicz *et al.*, 2010 han recopilado la información proveniente de diferentes trabajos y enfoques metodológicos utilizados en los últimos años para describir la localización de las proteínas del TGB.

La localización de la proteína TGBp1 de PVX ha sido la más ampliamente estudiada en comparación a las otras TGBs (Davies *et al.*, 1993; Morozov *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2004; Samuels *et al.*, 2007, Tilsner *et al.*, 2012). Sin embargo, han existido diferentes controversias respecto a su localización y no hay en la literatura un trabajo que haya demostrado detalladamente la ubicación subcelular de esta MP de PVX.

En 1993, estudios de fraccionamiento subcelular y microscopía electrónica señalaron que la proteína TGBp1 de PVX se localiza en el citoplasma, núcleo y en cuerpos de inclusión (Davies *et al.*, 1993). Por otra parte, la utilización de proteínas reporteras fluorescentes del tipo GFP (del inglés "*Green Fluorescent Protein*"), permitió profundizar los estudios de la localización de esta proteína. Diferentes grupos analizaron la localización de la proteína TGBp1 de PVX fusionada en su extremo N- y C-terminal a GFP en presencia o ausencia de PVX. Sin embargo, los resultados obtenidos por los distintos grupos fueron contradictorios. Las evidencias presentadas por Morozov *et al.*, 1999 mostraban que la TGBp1-GFP, en presencia o ausencia de PVX, se localizaba como un punteado adyacente a la pared celular y así como también dentro de la misma. Contrariamente, los resultados obtenidos por Yang *et al.*, 2000 demostraban que la TGBp1-GFP en ausencia del virus, se acumulaba principalmente en agregados citoplasmáticos globulares. Por otra parte, en los trabajos de Yang *et al.*, 2000 y Samuels *et al.*, 2007 se muestra que la fusión N-terminal de TGBp1 (GFP-TGBp1) se encuentra localizada en el núcleo, en el citoplasma y como agregados en forma de bastón, pero nunca asociada a la pared celular. Sin embargo, la GFP-TGBp1 modificaba su patrón de localización en el contexto de una infección viral localizándose en el núcleo, en agregados citoplasmáticos con forma de bastones y como un punteado en la pared celular reminiscente a la localización en plasmodesmos (Samuels *et al.*, 2007).

La localización de la TGBp1 de tipo Hordei es algo diferente respecto a las TGBp1s de tipo Potex. Se demostró que la TGBp1 de los *Pomovirus* se asocia a

estructuras membranosas, a pared celular y a microtúbulos (Cowan *et al.*, 2002). Por otra parte, se observó su localización en PDs tanto en *Pomovirus* como en *Benyvirus* y *Pecluvirus* (Erhardt *et al.*, 1999; Erhardt *et al.*, 2000; Erhardt *et al.*, 2005). Se observó que durante la infección viral la proteína TGBp1 fusionada al reportero GFP se redirige desde membranas hacia la pared celular (Lawrence y Jackson, 2001) y que el transporte intracelular de TGBp1 a los plasmodesmos depende de la acción coordinada de las proteínas TGBp2 y TGBp3, las cuales también pueden ser localizadas en los plasmodesmos (Shemyakina *et al.*, 2011). Además de asociarse a membranas, pared celular y plasmodesmos, recientemente se ha demostrado su localización en el núcleo/nucléolo (Semashko *et al.*, 2012). La localización en nucléolo estaría dada por su interacción con la proteína nucleolar fibrilarina (Semashko *et al.*, 2012), siendo la región NTD de TGBp1 el principal determinante estructural para la localización en nucléolo y para la interacción con dicha proteína.

Se ha establecido claramente que las proteínas TGBp2 y TGBp3 de *Potex*, *Beny*, *Pomo* y *Hordeivirus* se asocian al retículo endoplasmático y a vesículas granulares móviles (Haupt *et al.*, 2005; Ju *et al.*, 2005; Martelli *et al.*, 2007; Mitra *et al.*, 2003; Samuels *et al.*, 2007). Para el caso de la TGBp2 de PVX, tanto en presencia como en ausencia de las demás proteínas virales, la proteína de fusión GFP-TGBp2 se localiza en el RE y es capaz de inducir la formación de vesículas granulares derivadas del mismo. Estas vesículas utilizan los filamentos de actina asociados al RE para la movilización intracelular de dicha proteína (Ju *et al.*, 2005). Mutaciones en el dominio que se localiza hacia el lumen del RE de la TGBp2 de PVX provocan la eliminación de la formación de las vesículas móviles pero no su asociación al RE (Ju *et al.*, 2007). Estas mismas mutaciones inhiben el movimiento célula a célula de PVX indicando que la formación de dichas vesículas móviles son necesarias para la movilización del virus (Ju *et al.*, 2007).

La proteína de fusión GFP-TGBp3 de PVX se localiza mayormente en la red del RE (Ju *et al.*, 2005; Krishnamurthy *et al.*, 2003). Sin embargo, al coexpresar la proteína de fusión GFP-TGBp3 con PVX, se observó la colocalización con TGBp2 en las vesículas granulares móviles (Schepetilnikov *et al.*, 2005; Samuels *et al.*, 2007). También, se ha descubierto que la TGBp3 se encuentra en cuerpos asociados a membranas (MBB, del inglés "*Membrane-Bound Bodies*"), donde a su vez se localiza la replicasa, el ARN viral y

la TGBp1 (Bamunusinghe *et al.*, 2009). Se propone que estos MBB podrían ser los cuerpos X descritos por Tilsner *et al.*, 2012. Por otro lado, experimentos de coexpresión de la TGBp3 nativa junto con PVX-GFP-TGBp3 demostraron que la GFP-TGBp3 se relocizaba en cuerpos periféricos membranosos (PMB, del inglés "*Peripheral Membrane Bodies*") que contienen marcadores específicos de RE (Schepetilnikov *et al.*, 2005). La interpretación para estos resultados ambiguos es que probablemente la proteína de fusión a GFP afecte la localización subcelular de TGBp3 y que la coexpresión con la proteína nativa dirige a la GFP-TGBp3 a los PMB, los cuales son los sitios auténticos de la localización de TGBp3 de PVX. Al igual que para TGBp2, en experimentos donde se modifica el dominio transmembrana de dichas proteínas, se observa una inhibición en el movimiento viral 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 de PVX (Krishnamurthy *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2003; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010).

Si bien existen numerosos trabajos que señalan que las proteínas TGB no se encuentran involucradas en la replicación viral (Angell *et al.*, 1996; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007, Tilsner *et al.*, 2012), en *Potexvirus* se ha visto que el ARN genómico de PVX se asocia con membranas del RE que también contienen la replicasa y la proteína TGBp1 (Tilsner *et al.* 2009). También se ha encontrado que la proteína TGBp3 se asocia a los MBB que contienen la proteína replicasa de PVX, viriones y la 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 estadíos tempranos de la infección sugiere que podría tratarse de sitios de traducción, síntesis y encapsidación del virus (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). De hecho, como se comentó anteriormente, estas estructuras podrían ser los cuerpos X descritos por Tilsner *et al.*, 2012.

4.5. Interacción de proteínas virales.

4.5.1 Interacción con proteínas del hospedante.

Para ejecutar sus múltiples funciones, las proteínas del TGB deben ser capaces de interactuar con diversas proteínas del huésped. A diferencia del virus TMV, poco se conoce sobre la interacción de las proteínas virales de tipo *Potex- u Hordeivirus* con las proteínas de las plantas hospedantes.

Para el caso de las proteínas TGB pertenecientes al tipo *Potexvirus* se conocen algunos factores de la planta que interactúan con dichas proteínas virales. En primer lugar se ha demostrado que la TGBp1 de PVX es capaz de ser fosforilada por una quinasa del tipo CK2 al igual que la proteína de movimiento p30 del *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Módena *et al.*, 2008; Matsushita *et al.*, 2002). También se ha descubierto, como se comentó anteriormente, que la TGBp1 de PVX es capaz de interactuar con la proteína AGO1 (Chiu *et al.*, 2010).

Recientemente, se ha identificado que la TGBp1 de PVX es capaz de interactuar con la proteína remorina (REM) de *Solanum tuberosum* (Raffaele *et al.*, 2009). La proteína REM es una proteína hidrofílica, específica de plantas vasculares, que se encuentra presente en microdominios lipídicos de la membrana plasmática denominados "lipid rafts" y en los plasmodesmos (Raffaele *et al.*, 2009). Los "lipid rafts" son estructuras membranosas ordenadas, enriquecidas en esteroides y esfingolípidos, que poseen proteínas específicas asociadas (Brown, 2006). Poco se sabe de la función de estos microdominios en plantas; sin embargo, se postula que, al igual que lo observado en células animales, jugarían un rol clave en los procesos de señalización celular (Mañes *et al.*, 2000; Ono y Freed 2005; Samuel *et al.*, 2001; Laliberte *et al.*, 2006). Varios miembros de las familias de las remorinas son expresados diferencialmente durante las interacciones planta-patógeno, sugiriendo un posible rol en los procesos de defensa de la planta (Campo *et al.*, 2008; Coaker *et al.*, 2004; Rocco *et al.*, 2008; Widjaja *et al.*, 2009, Jarsch y Ott, 2011).

El primer trabajo donde se demostró un posible rol de la remorina en la regulación de la interacción planta-patógeno fue el de Raffaele *et al.*, 2009. En dicho trabajo se comprobó que la sobreexpresión de REM en plantas de *Solanum lycopersicum* y *Nicotiana benthamiana* (comunicación personal) restringe la movilización célula a célula de PVX. Por otra parte, se determinó la colocalización de REM y TGBp1 en la membrana plasmática, y la interacción de dichas proteínas mediante estudios de interacción por doble híbrido y "pull down" (Raffaele *et al.*,

2009). Más recientemente se ha demostrado que REM es capaz de regular la interacción simbiótica entre *Medicago truncatula* y *Sinorhizobium meliloti*, mediante la organización e interacción con receptores de la planta ubicados en la membrana plasmática (Lefebvre *et al.*, 2010).

En cuanto a la proteína TGBp2, se ha demostrado por ensayos de doble híbrido que esta MP de PVX interactúa con unas proteínas de plantas denominadas TIP1, TIP2 y TIP3, que interactúan con la β 1-3 glucanasa. Esta glucanasa es la responsable de regular la degradación de la calosa permitiendo el aumento del SEL de los plasmodesmos (Fridborg *et al.*, 2003). A partir de estos resultados se ha propuesto que dichas interacciones proveen un mecanismo plausible para el movimiento de PVX a través de los PDs (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010), parecido al propuesto para la movilización de TMV (Epel, 2009; Ueki *et al.*, 2010).

4.5.2 Interacción entre las proteínas virales.

Además de interactuar con proteínas del hospedante, algunas proteínas del TGB tienen la capacidad de interactuar entre sí. De esta forma se ha confirmado la interacción homóloga entre las proteínas TGBp1s de PVX (Leshchiner *et al.*, 2008). Como se ha comentado anteriormente dicha interacción homóloga permite la formación de dímeros y oligómeros que facilitarían la función de helicasa de TGBp1 (Leshchiner *et al.*, 2006; 2008). Por otro lado, se ha demostrado que las proteínas TGBp2 del *Bamboo mosaic virus* (BaMV, *Potexvirus*) son capaces de interactuar también entre sí (Hsu *et al.*, 2008). Se ha demostrado que el dominio IV de TGBp1 de PVX es capaz de interactuar con el extremo C-terminal de la CP permitiendo la activación de la traducción del virión (Atabekov *et al.*, 2001; Zayakina *et al.*, 2008)

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 la TGBp1 con TGBp2 (Jackson *et al.*, 2009).

4.6. Estrategia de movilización viral de los Potexvirus.

A lo largo de los años, diferentes trabajos han demostrado las complejas interacciones que se desarrollan entre los virus y sus plantas hospedantes. Diversos estudios funcionales entre las proteínas del TGB de PVX y el estudio de sus interacciones con la CP, el ARN viral, el sistema de endomembranas de la célula hospedante, el citoesqueleto de actina y los plasmodesmos, indican las complejas interacciones planta-patógeno que se encuentran involucradas durante la movilización viral (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). El mecanismo básico del proceso de infección es similar para todos los virus de plantas: se replican en una célula inicial del mesófilo y, a partir de allí, se dispersan hacia las células vecinas a través de los plasmodesmos. Posteriormente, los virus ingresan al sistema vascular de la planta donde por medio del floema se dispersan de manera sistémica hasta alcanzar tejidos distantes del sitio de infección inicial (Waigmann *et al.*, 2004). En esta sección se describirá la estrategia de movilización viral postulada para los virus pertenecientes al género *Potexvirus*, basada principalmente en resultados obtenidos mediante el estudio del proceso de infección viral de los virus PVX y BaMV.

4.6.1 Movilización célula a célula.

Hasta el momento se han descrito dos posibles modelos de movilización para los virus de tipo Potex. Ambos modelos se diferencian principalmente de acuerdo a la localización subcelular de la proteína TGBp3 (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta el reciente trabajo de Tilsner *et al.*, 2012, se propone el siguiente modelo de movilización para los virus de tipo Potex donde se engloban varios aspectos de ambos modelos (**Figura 5 a y b**).

Para la movilización viral célula a célula de los virus tipo Potex son necesarias las tres proteínas del TGB y la CP. Además, se ha demostrado específicamente que para el movimiento de PVX es necesario que el citoesqueleto de actina se encuentre de forma intacta (Harries *et al.*, 2009). Como se comentó anteriormente, la proteína TGBp1 de PVX es la responsable de la remodelación de los filamentos de actina y del sistema de endomembranas para la organización y formación de los cuerpos X dentro de las células infectadas (Tilsner *et al.*, 2012). En estas estructuras se produciría la replicación y la encapsidación del virus (**Figura 5 a**). Unos de los hechos que confirman

esta hipótesis es la acumulación de la progenie viral en la periferia de estos cuerpos (ARNv encapsidado) (Tilsner *et al.*, 2012).

Una vez que el virus replica su material genético se debe formar el complejo de transporte que lo movilizará hacia las células vecinas. Si bien hasta el momento no se conoce con exactitud la naturaleza de este complejo, se han planteado dos posibles modelos de transporte (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). El primer modelo propone que el complejo transportado es la partícula viral o el virión filamentosos asociados a TGBp1 (PVX-TGBp1) (Kiselyova *et al.*, 2003). Este modelo se apoya en observaciones por microscopía electrónica que indican la presencia de estructuras fibrilares parecidas a viriones de PVX en los plasmodesmos de las células infectadas y en el hecho de que la CP de PVX puede ser cotranslocada junto con el material infeccioso (Chapman *et al.*, 1992; Oparka *et al.*, 1996; Santa Cruz *et al.*, 1998). El segundo modelo, el más aceptado y descrito, propone que los complejos de transporte estarían compuestos por complejos o partículas ribonucleoproteicos (RNP). Mediante estudios de complementación, microinyección y cambio de movilidad electroforética, se demostró que en los *Potexvirus* dichos complejos están compuestos por la TGBp1, el ARNv y la CP (TGBp1-ARNv-CP) (Lough *et al.*, 1998; 2000). Este último modelo se encuentra ampliamente establecido para la movilización de TMV (*Tomovirus*) y de CaMV (*Caulimovirus*) en donde se ha descrito que las MPs respectivas a cada virus se unen al ARN viral simple cadena de manera no específica para formar los complejos de movilización RNPs (Citovsky *et al.*, 1990; 1991). Hasta el momento se desconoce la estructura exacta de estos complejos de movilización en los *Potexvirus*.

En el modelo de movilización de PVX propuesto, el complejo de transporte corresponde a partículas ribonucleoproteicas (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). Si bien no hay evidencia experimental directa que demuestre que los complejos TGBp1-ARNg-CP son dirigidos hacia los plasmodesmos mediante la acción conjunta de TGBp2 y TGBp3, se cree que las partículas RNP serían transportadas hacia dicho compartimiento celular mediante las vesículas granulares derivadas del RE que contienen ambas MPs. Esta hipótesis se basa en las observaciones que demuestran que estas vesículas, que se alinean con los filamentos de actina y que se encuentran en los cuerpos X, son esenciales para el movimiento viral a través de las células (Krishnamurthy *et al.*, 2003; Ju *et al.*, 2007). Además esta hipótesis contempla el hecho de que mutaciones en la

TGBp2 de PVX impiden la formación de dichas vesículas móviles pero no su asociación al RE e impiden la movilización viral (Ju *et al.*, 2007). En base a las evidencias que demuestran la colocalización de TGBp2 y TGBp3 en dichas vesículas granulares y a la presencia de TGBp3 en cuerpos membranosos en la periferia de la célula derivados del RE (PMB) (Samuels *et al.*, 2007; Schepetilnikov *et al.*, 2005), se ha propuesto que ambas proteínas se reclutan en estructuras membranosas capaces de moverse hacia los bordes de la célula, donde forman los PMB (Lee *et al.*, 2010). La observación de que estas estructuras membranosas en la periferia de la célula se encuentran asociadas a los PDs apoya la idea de que la TGBp3 de *Potexvirus* dirige a la TGBp2 y al complejo TGBp1-ARNg-CP hacia los plasmodesmos (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010).

El modelo de transporte del complejo RNP a través de los plasmodesmos fue postulado por Verchot-Lubicz en 2005 y ha sido dividido en tres etapas. Primeramente, la proteína TGBp1 se localiza en el interior del PD y promueve el incremento del tamaño del poro. Así mismo, el aumento del SEL podría estar regulado también por la proteína TGBp2 mediante un mecanismo indirecto que involucra la interacción con proteínas TIPs, las cuales interactúan con la enzima encargada de hidrolizar la calosa depositada en los PDs, la β 1-3 glucanasa (Tamai y Meshi, 2001; Fridborg *et al.*, 2003). Simultáneamente, una subpoblación de proteínas TGBp1s podría interactuar de forma independiente con las proteínas TGBp2 y TGBp3, promoviendo su transporte a través del plasmodesmo. Durante esta etapa temprana del movimiento célula a célula, sería esencial que la proteína TGBp1 pueda ejercer su función como supresora del PTGS tanto en la célula inicial de infección como en la célula vecina, facilitando de esta manera la dispersión del virus (Bayne *et al.*, 2005). Durante una etapa intermedia, se produce la movilización del complejo de transporte a través del PD, ya sea como un virión asociado a TGBp1 (PVX-TGBp1), o bien en forma de un complejo RNP (TGBp1-ARNg-CP). En ambos casos la TGBp1 se encontraría en su forma fosforilada inhibiendo la activación de la traducción del virión o de la RNP (Zayakina *et al.*, 2008). Por último, 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. En la célula vecina la TGBp1 sería desfosforilada para activar los complejos de transporte virales gracias a su capacidad de inducir la traducción del

virión o de las partículas RNPs, permitiendo que se inicie la traducción de las proteínas virales y que comience un nuevo ciclo infeccioso del virus.

Asimismo, en las etapas tardías de infección se produciría la degradación de las proteínas de movimiento TGBp2 y TGBp3 vía el mecanismo de degradación de proteínas asociada al retículo endoplasmático (ERAD) restaurando el sistema de endomembranas de la célula hospedante (Ju *et al.*, 2005; 2008).

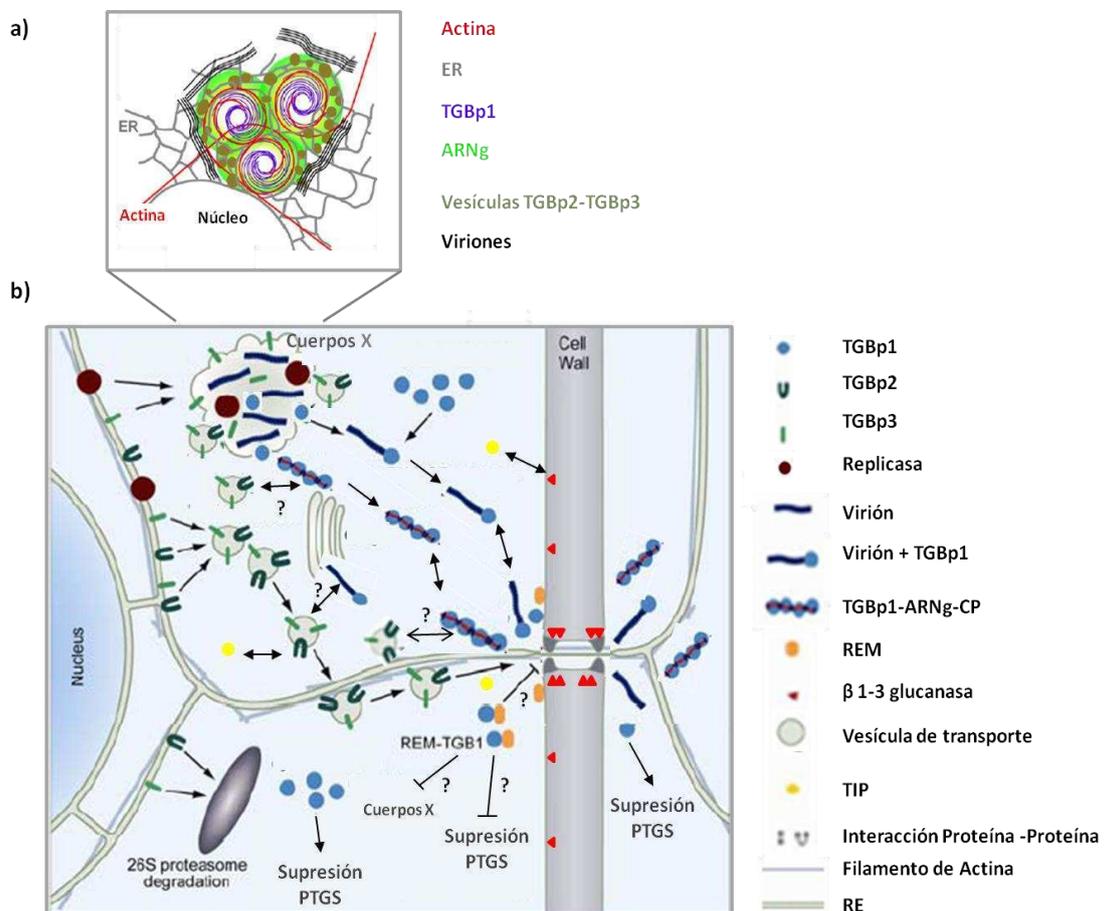


Figura 5. Modelo de movimiento viral intracelular para *Potexvirus*. a) Esquema de los cuerpos X que se forman durante la infección con PVX. Adaptado de Tilsner *et al.*, 2012. b) Esquema de movilización célula a célula de *Potexvirus*, adaptado de Verchot-Lubicz *et al.*, 2010.

4.6.2 Movilización sistémica.

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. En el caso de los *Potexvirus* las proteínas CP, TGBp1 y el ARN viral serían transportados a través del floema de las plantas. 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 del tipo 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 el floema como un complejo RNP compuesto únicamente por la proteína TGBp1 y ARNv (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 y Solovyev, 2003).

5. Regulación de la degradación de proteínas virales.

La degradación de proteínas juega un rol importante en varios procesos celulares. Existen varios mecanismos por los cuales se puede regular la degradación de proteínas. El mecanismo más usado y conservado dentro de las células eucariotas corresponde al sistema ubiquitina proteosoma - 26S (UPS-26S). Esta vía involucra sucesivos pasos hasta llegar a la degradación total de la proteína en cuestión (Gao y Luo, 2006). El primer paso consiste en la unión covalente de una molécula de ubiquitina (proteína globular de 76 aa) a lisinas de la proteína "target", seguida por la subsecuente adición de más ubiquitinas formando una larga cadena de dichas moléculas. Las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas por el sistema UPS-26S y posteriormente degradadas por este complejo (Glickman y Ciechanover, 2002). La poliubiquitinación de la proteína blanco requiere de la enzima E1, la cual está encargada de la activación de la ubiquitina mediante la hidrólisis de ATP y de la

transferencia de la misma a la enzima E2. La E2 puede unir el monómero de ubiquitina a la proteína directamente o transferirlo a la enzima E3 para que ésta sea la encargada de unirlo a la proteína blanco.

Las actividades biológicas de muchas proteínas usualmente están reguladas a nivel celular mediante un fino balance entre la síntesis y la degradación de las mismas. En 1986 Rogers y Reichsteiner describieron la existencia de pequeños motivos dentro de las proteínas blancos que estaban involucrados en la inducción y señalización de la degradación de las mismas. Tales regiones, denominadas motivos PEST, se caracterizan por ser ricas en los aminoácidos serina (S), prolina (P), ácido glutámico (E) y treonina (T). Se sabe que muchas proteínas que contienen dominios PESTs pueden ser reconocidas por las enzimas U2/U3 y ser degradadas por el sistema ubiquitina proteosoma - 26S (Reichsteiner, 1991; Reichsteiner y Rogers, 1996). Aunque las secuencias PESTs se encuentran presentes todo el tiempo en las proteínas, éstas no son reconocidas por el UPS-26S hasta que no son “marcadas” para su posterior degradación. Diferentes mecanismos moleculares, tales como la unión de ligandos, la exposición a la luz o la fosforilación-desfosforilación de residuos de la proteína “target” (Martínez *et al.*, 2003; Fleming y Wang *et al.*, 2000; Tornavaca *et al.*, 2011) han sido descritos como procesos claves para la señalización de las secuencias PESTs. Se hipotetiza que dichos mecanismos producen cambios estructurales en la proteína que la harían menos estable y la llevarían a su degradación (García-Alai *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha demostrado que estos elementos regulatorios de degradación son transferibles, y suficientes para ejercer su efecto en proteínas modelo (Fleming y Wang *et al.*, 2000; Camborde *et al.*, 2010). Hasta el día de hoy no se sabe como estas señales de degradación son presentadas al sistema UPS-26S, ni tampoco como son reconocidas por el mismo.

El sistema ubiquitina proteosoma - 26S juega un rol muy importante en las plantas ya que tiene como blancos numerosos reguladores intracelulares involucrados en la señalización hormonal, en la epigenética, en el desarrollo y en las respuestas de defensa frente al ataque de patógenos (Sullivan *et al.*, 2003; Vierstra, 2009).

Se ha demostrado que muchas proteínas virales son blanco del sistema UPS-26S dentro de la célula huésped. De hecho, la degradación de MPs virales por el proteosoma parecería ser un evento común durante la interacción planta-patógeno

(Dielen *et al.*, 2010). Este es el caso de la proteína de movimiento de TMV, la MP30 (Reichel y Beachy, 2000). Se ha sugerido que la degradación de esta MP vía el sistema UPS – 26S sería una forma de regular el movimiento y la dispersión del virus dentro de la planta y una manera de controlar el daño producido en las células huésped. La hipótesis se basa en los estudios realizados por Gillespie *et al.*, 2002. En ese trabajo se demostró que la MP30, al ser mutagenizada de manera tal de poder evadir el sistema UPS – 26S, mejoraba sus funciones de transporte de la RNP a través de los plasmodesmos. Dado que esta MP es una proteína de membrana que se localiza en el RE, se ha sugerido que la degradación de ésta permitiría mantener la integridad del sistema de membranas del RE y restaurar la homeostasis de las células hospedantes (Reichel y Beachy, 2000). Otro caso corresponde a la MP del *Tomato mosaic virus* (ToMV). Esta proteína es degradada *in vivo* y dicha degradación está regulada por la fosforilación de la serina en la posición 37 (Kawakami *et al.*, 1999). La proteína de movimiento 69K del *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) es la encargada de la movilización del virus y es una proteína altamente inestable que no se acumula *in vivo* durante el transcurso de la infección viral (Bozarth *et al.*, 1992). Drugeon y Jupin, 2002, demostraron que dicha MP presenta una vida media de alrededor de 25 minutos y que es degradada *in vitro* por el complejo UPS -26S. Dichos autores sugieren que la corta vida media y la alta inestabilidad de la 69K podrían ser explicadas por la rápida y selectiva degradación de la misma vía proteosoma. Otro claro ejemplo corresponde a la MP 17kDa del *Potato leaf roll virus* (PLRV), en la cual se ha demostrado que su acumulación en las células infectadas es regulada por degradación vía el sistema ubiquitina proteosoma - 26S (Vogel *et al.*, 2007). El último ejemplo corresponde a la proteína precursora de la cápside del *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (Karsies *et al.*, 2001). En este trabajo los autores sugieren que la inestabilidad del precursor de la CP podría jugar un rol importante en la regulación de la sobreproducción de la cápside evitando un posible daño en la célula huésped producto de su capacidad inespecífica de unión a ácidos nucleicos (Chapdelaine y Hohn, 1998).

En el caso de PVX, poco se conoce sobre el rol del sistema ubiquitina proteosoma - 26S en el ciclo viral. Se ha demostrado en ensayos de infección con PVX que la degradación de la proteína GFP-TGBp2 se encuentra significativamente aumentada respecto a la GFP-TGBp2 expresada en ausencia del virus (Ju *et al.*, 2005).

Por otro lado en las etapas tardías de la infección, TGBp2 se localiza en el citoplasma indicando que dicha proteína podría ser exportada desde el retículo endoplasmático hacia el citosol para su posterior degradación (Ju *et al.*, 2005). La retrotranslocación de proteínas desde el RE hacia el citoplasma es un componente clave de la vía ERAD. Se cree que la degradación de TGBp2 vía ERAD sería una forma de mantener el sistema de membranas del RE. Sin embargo, hasta el día de hoy, no se ha encontrado evidencia directa de la interacción de TGBp2 con el sistema UPS-26S o con algún componente de la maquinaria del ERAD. Similares resultados se obtuvieron con la TGBp3 de PVX. Se demostró que la TGBp3, al igual que muchas proteínas aberrantes que se producen en el RE, era translocada al citosol para su degradación por medio del sistema ERAD – UPS-26S (Ju *et al.*, 2008).

6. Mecanismos de defensa y contra defensa virales en plantas.

Las plantas han desarrollado varios mecanismos para defenderse del ataque de diversos organismos. Uno de los más importantes y ampliamente estudiados corresponde al silenciamiento génico mediado por ARN.

En los últimos años, se ha resaltado la importancia de este mecanismo, ya que además de estar relacionado a los sistemas de defensa de las plantas, también se encuentra involucrado en la regulación del desarrollo y en el mantenimiento de la integridad de los genomas.

En las plantas, así bien como en otros organismos, el silenciamiento es gatillado por la presencia de ARN doble cadena (ARNdc) y mediado por ARN pequeños de interferencia (Shimura y Pantaleo, 2011). El ARN doble cadena puede generarse por la introducción exógena de ARN doble cadena, la presencia de transgenes (tanto en orientación sentido como antisentido), la expresión de genes endógenos, o bien por la infección de virus (Baulcombe, 1996) (**Figura 6**).

En plantas existen diferentes vías de silenciamiento mediado por ARN que se clasifican según el tipo de ARN pequeño involucrado. Las vías pueden estar mediadas por microARNs, ARN pequeños de interferencia endógenos (siARNs) o ARN pequeños derivados de virus (viARNs) (Shimura y Pantaleo, 2011). También, el silenciamiento se

clasifica según a qué nivel se efectúa la respuesta, puede ser tanto a nivel transcripcional (silenciamiento génico transcripcional, TGS), a nivel postranscripcional (silenciamiento génico postranscripcional, PTGS) o a nivel traduccional (silenciamiento génico traduccional).

6.1 Silenciamiento génico mediado por ARN.

6.1.1 Mecanismo general de acción.

Como se dijo anteriormente el silenciamiento mediado por ARN es un proceso inducido por la presencia de ARNdc (**Figura 6**). Los pasos claves en el mecanismo molecular del silenciamiento génico mediado por ARN fueron obtenidos por estudios *in vitro* con extractos embrionarios de *Drosophila melanogaster*, en donde se observó que el ARNdc era procesado a fragmentos de aproximadamente 21-24 nt (Llave, 2010). En plantas transgénicas que presentaban PTGS se detectaron fragmentos en orientación sentido y antisentido de 25 nt (Hamilton *et al.*, 1999). Sin embargo, se demostró más tarde que los ARN de 25 nt inicialmente reportados representaban dos poblaciones de ARN de 21-22 nt y 24 nt respectivamente (Elbashir *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2002, Llave *et al.*, 2002). A estos ARNs se los denominó ARN pequeños de interferencia (siARN); son ARN cortos de doble cadena (dúplex) que funcionan como determinantes específicos en el silenciamiento génico mediado por ARN (Elbashir *et al.*, 2001). Usando extractos de *Drosophila melanogaster* se demostró que el ARN doble cadena largo era procesado a los dúplex de ARN por medio de una ribonucleasa perteneciente a la familia de las ARNasas tipo III denominada DICER (DCL). Esta enzima posee un dominio helicasa, dos motivos ARNasa del tipo III (Bernstein *et al.*, 2001) y un dominio PAZ y actúa en conjunto con otras proteínas denominadas DRBs (del inglés “*dsRNA Binding Protein*”). *Arabidopsis thaliana* posee cuatro genes que codifican para cuatro tipos de DICER; DCL-1, DCL-2, DCL-3 y DCL-4 (Schauer *et al.*, 2003). La DCL-4 y la DCL-2 son las que se encuentran involucradas en la generación de los siARNs de 21-22 nt que median el silenciamiento génico postranscripcional (Dunoyer *et al.*, 2005, Voinnet, 2008), mientras que la DCL-3 produce los siARNs de 24 nt que participan en la heterocromatización de la cromatina

durante el silenciamiento génico transcripcional (Xie *et al.*, 2004). Los siARNs tanto de 21 nt como los de 24 nt intervendrían en el silenciamiento génico a nivel sistémico (Melnik *et al.*, 2011 (a); 2011 (b)). Por último, la DCL-1 se encuentra involucrada en la vía de silenciamiento mediado por microARNs.

El segundo paso en el mecanismo de silenciamiento génico mediado por ARN es la formación del complejo RISC (del inglés “*RNA-induced Silencing Complex*”). RISC es un complejo ribonucleoproteico con actividad endonucleasa dependiente de homología de secuencia que se encarga de la degradación del ARN “target”. El complejo separa las cadenas de los duplexs de los siARNs a ARNs simple cadena. La enzima que llevaría a cabo esta función es una ARN helicasa, SDE3, la cual es requerida para el PTGS en *Arabidopsis thaliana* (Dalmay *et al.*, 2001). El siARNs simple cadena que queda formando parte del complejo RISC activado se utiliza como guía para la degradación del ARNm blanco, mientras que el otro es degradado (Schwarz *et al.*, 2003). Proteínas pertenecientes a la familia de proteínas argonauta forman el “core” principal de RISC y son necesarias en los mecanismos de ARN de interferencia en diversos organismos. Las proteínas pertenecientes a esta familia (AGOs) se caracterizan por poseer dos regiones altamente conservadas, el dominio PAZ y el dominio PIWI. En base a trabajos con la proteína AGO2 de *Drosophila melanogaster* se descubrió que el primer dominio interactúa con los nucleótidos libres en los extremos 3’ de los siARNs (Song *et al.*, 2003), mientras que el segundo participa en el corte del ARNm “target” gracias a su actividad de ARNasa-H (Liu *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004). *Arabidopsis thaliana* posee 10 genes que codifican a proteínas AGO. Hasta el momento la actividad de 7 AGOs han sido documentadas. La proteína más estudiada es la AGO1 y se encuentra fuertemente implicada en el silenciamiento mediado por transgenes (Fagard *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 2002), por virus (Zhang *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2010) y por microARNs (Brodersen *et al.*, 2008; Czech y Hannon, 2011). Tanto la AGO1, 4 y 7 gatillan la degradación de los ARNs “targets”, mientras que la AGO1 y la AGO10 puede también inhibir la traducción de los ARNms (Brodersen *et al.*, 2008; Varallyay *et al.*, 2010; Vazquez *et al.*, 2010). Por otro lado, las AGO4, 6 y 9 presentan funciones redundantes relacionadas a la metilación de cisteínas en el ADN “target” durante el TGS (Havecker *et al.*, 2010).

6.1.2 Amplificación y movilización de la señal.

Para mejorar la eficiencia en el mecanismo de silenciamiento mediado por ARN es necesario amplificar la cantidad de moléculas que intervienen en este proceso, o sea la cantidad de ARNs pequeños. Este mecanismo se lo conoce como transividad y significa que nuevos duplex de ARNs pequeños que comparten homología con otras partes del ARN “target” son sintetizados. La amplificación del silenciamiento evoca un tercer mecanismo de formación de ARNdc y en el cual participan varias ARN polimerasas ARN dependientes (RDRs) de la plantas (Llave, 2010) (**Figura 6**). En *Arabidopsis thaliana* se han identifica 6 RDRs (RDR1, 2, 3, 4, 5 y 6) (Wassenegger y Krczal, 2006) que estarían involucradas en la generación de estos ARN pequeños secundarios.

La amplificación de la señal se da tanto en la célula donde se gatilló el silenciamiento como en células vecinas. En la célula silenciada los siARNs primarios son usados como “primers” por alguna de estas polimerasas ARN dependientes para sintetizar nuevos ARNdc largos y generar de esta manera siARNs secundarios (Makeyev y Bamford, 2001). A su vez los siARNs primarios pueden difundir una distancia de entre diez y quince células a través de los plasmodesmos, y amplificar la señal mediante alguna de estas RDRs (Himber *et al.*, 2003; Buchon *et al.*, 2006).

El silenciamiento gatillado localmente puede expandirse hacia otros lugares distantes de la planta a través del floema (Molnar *et al.*, 2011; Melnyk *et al.*, 2011 (b)); a este mecanismo se lo denomina silenciamiento sistémico mediado por ARN (Palauqui *et al.*, 1997; Voinnet y Baulcombe, 1997; Molnar *et al.*, 2011). Este tipo de silenciamiento puede transcurrir a lo largo de varios días y generalmente ocurre desde lugares donde se produce la fotosíntesis (hojas) hacia raíces y partes en crecimiento de la planta (Melnyk *et al.*, 2011 (b)). Este mecanismo opera de manera secuencia específica, siendo la señal del silenciamiento sistémico un siARNs de 21- 24 nt (Melnyk *et al.*, 2011 (a); 2011 (b)). Si bien no se sabe con exactitud el tipo de ARN pequeño involucrado en el silenciamiento sistémico, se presume que serían dúplex de ARN doble cadena (Melnyk *et al.*, 2011 (b)).

Las actividades de las RDR también se encuentran ligadas a la percepción de ARNs simple cadena aberrantes que no poseen estructuras del tipo CAP en el extremo 5' o la cola de poli-A en el extremo 3'.

6.2 Silenciamiento mediado por microARNs.

Los microARNs juegan un rol importante en un amplio rango de procesos celulares que van desde la diferenciación celular, el desarrollo, la proliferación y la apoptosis. Estas secuencias pequeñas de ARN tienen un tamaño aproximado de 21-22 nucleótidos y son generados a partir de la transcripción de secuencias endógenas del genoma. Mediante análisis computacional se ha predicho que cada microARN sería capaz de regular una gran variedad de ARNs, sugiriendo que una gran parte del transcriptoma vegetal se encontraría sujeto a la regulación mediado por microARNs (Eulalio *et al.*, 2008).

Los fragmentos de ARNdc que disparan el mecanismo de silenciamiento mediado por microARNs provienen, en plantas, de unidades transcripcionales independientes con promotores propios, no asociadas a regiones codificantes. La transcripción de estos loci es llevada a cabo por la ARN polimerasa II generando un transcripto primario denominado pri-miARN (**Figura 6**). Estos pri-miARNs sufren la incorporación del "CAP" en el extremo 5', la remoción intrónica y la poliadenilación en el extremo 3', dando lugar a una estructura en forma de horquilla con complementariedad imperfecta entre las hebras apareadas (Xie *et al.*, 2005). Los pri-miARN son procesados en precursores con forma de "stem loops" que se llaman pre-miARNs, los cuales posteriormente son procesados en los "nuclear dicing bodies" por la DCL1 con ayuda de las proteínas HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) y SERRATE (SE) y con ayuda del complejo CBC (del inglés, "Cap Binding Complex") para dar origen a los microARNs finales (Voinnet, 2009) (**Figura 6**). Luego, la enzima HEN1 produce una 2'-O-metilación de los microARNs en los extremos 3' libres. Esta metilación evita que los microARNs sean 3' uridilados y posteriormente degradados (Li *et al.*, 2005). De esta manera los microARNs maduros son importados desde el núcleo hacia el citoplasma a través del transportador HASTY (HST) (Bollman *et al.*, 2003). La hebra del ARN pequeño que se encuentra apareada en forma menos estable en su extremo 5' es incorporada al

complejo RISC efector del silenciamiento, mientras que la hebra restante es rápidamente degradada. El complejo RISC que participa en la vía del silenciamiento mediado por microARNs contiene a la proteína AGO1, la cual se encarga de degradar directamente el transcripto “target” o inhibir la traducción del ARNm blanco (Brodersen *et al.*, 2008).

6.3 Silenciamiento mediado por ARN inducido por virus (VIGS) y proteínas supresoras.

La primera función biológica asignada al silenciamiento mediada por ARN fue un mecanismo de defensa antiviral en plantas. Una de las primeras evidencias que demostraron que los virus actuaban tanto como inductores y como “targets” del VIGS fue el trabajo con plantas transgénicas que expresaban el genoma de un potyvirus (Lindbo *et al.*, 1993). Los autores del trabajo mostraron que dichas plantas al ser infectadas con el mismo potyvirus presentaban síntomas inicialmente, pero luego de algunas semanas se recuperaban y se volvían resistentes a infecciones posteriores. Además, veían que este estado de recuperación se correlacionaba con la degradación del ARNm del transgén a nivel postranscripcional. Otro trabajo que apoyaba el modelo de VIGS, fue en el que utilizaron plantas de tabaco transformadas con una copia infectiva de ADN del virus PVX (amplicón viral) (Angell y Baulcombe, 1997). Las plantas fueron transformadas con el genoma intacto de PVX o con la secuencia de PVX fusionada a GUS (gen que codifica para la beta-glucuronidasa). Las plantas transformadas con estas construcciones poseían diferentes fenotipos atribuidos al PTGS, los cuales incluían ausencia de síntomas, baja acumulación del ARNm del transgén, resistencia a infecciones con PVX y baja expresión de GUS. Estas observaciones junto con otros diversos trabajos, llevaron a la conclusión de que esta vía de silenciamiento había evolucionado como un mecanismo de defensa frente a infecciones virales.

En virus, existen diversos tipos de ARNdc que pueden gatillar el silenciamiento mediado por ARN. En aquellos virus que tienen genomas ARN de orientación (+), el silenciamiento se induce mediante la generación de ARNdc que se producen como intermediarios durante la replicación de sus genomas. Por otro lado, se cree que la

inducción del VIGS por parte de virus ARNs se produce principalmente por la presencia de estructuras secundarias doble cadena presentes en sus genomas virales (estructuras del tipo “stem loop”) (Shimura y Pantaleo, 2011) (**Figura 6**). En el caso de los virus ADN, las estructuras ARNdc se generan a partir de plegamientos y apareamientos que se producen dentro de los ARNs que son transcritos durante el ciclo de infección viral (Vanitharani *et al.*, 2005). Asimismo, como se comentó anteriormente, las RDRs de plantas pueden reconocer ARNs aberrantes que se producen como consecuencia de una replicación o transcripción incompleta y sintetizar sus cadenas complementarias para dar origen a ARNdc secundarios. Se ha demostrado que la RDR1, RDR6 y RDR2 están involucradas en la producción de viARNs. La RDR1 es indispensable en la producción y amplificación de viARNs de varios virus, tales como el *Cucumber mosaic virus* (CMV), el *Turnip mosaic virus* (TuMV) y el *Tobacco rattle virus* (Yu *et al.*, 2003; García-Ruiz *et al.*, 2010; Donaire *et al.*, 2008). Se ha visto que la acumulación y amplificación de viARNs secundarios se encuentra significativamente reducida en plantas de *Arabidopsis thaliana rdr1* o *rdr6* infectadas con TMV o con CMV (Qi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha visto que la RDR6 cumple un rol fundamental en la defensa antiviral previniendo el ingreso de PVX y de otros virus a tejidos meristemáticos en plantas de *N. benthamiana* (Schwach *et al.*, 2005; Vaistij y Jones, 2009).

Los ARNdc virales, o las estructuras ARNdc presentes en los genomas de los virus, son procesados a ARN pequeños doble cadena por DCLs específicas. En particular se ha demostrado que la generación de viARNs de virus ARN (+) se produce principalmente por la acción de la DCL2 y de la DCL4 (Shimura y Pantaleo, 2011). Los virus ARN (+) acumulan mayoritariamente viARNs de 21 nt, producto de la acción de la DCL4, y en menor medida viARNs de 22 nt producto de la DCL2 (Bouche *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2008). En plantas doble mutantes *dcl-2 -/dcl-4*, la DCL3 produce viARNs de 24 nt de longitud (Bouche *et al.*, 2006; Diaz-Penton *et al.*, 2007; Shimura y Pantaleo, 2011). En los virus con genomas de ADN todas las DCLs participan activamente en la biogénesis de viARNs, siendo la DCL3 la que posee un rol preponderante en la respuesta antiviral (Blevins *et al.*, 2006). Los viARNs, al igual que los siARNs, son 2'-O-metilados en su extremos 3' por la acción de la metil transferasa HEN1, la cual los protege de ser degradados (Blevins *et al.*, 2006). Finalmente, una vez que se generan

los dúplex de viARNs, una de las hebras es estabilizada e incorporada al complejo RISC. Este complejo enzimático, que incluye una de las proteínas AGO y al viARN simple cadena, puede producir el corte en el centro de ARN viral “target” llevándolo a su posterior degradación. Existen evidencias que la AGO1 y AGO10 pueden actuar a nivel de represión traduccional (Brodersen *et al.*, 2008; Varallyay *et al.*, 2010). Como se ha comentado anteriormente, en *A. thaliana* existen diez proteínas AGOs y existen varias evidencias que implican a las mismas en el silenciamiento mediado por virus: 1) la AGO1, AGO2 y AGO5 son capaces de unir específicamente viARNs de diferentes virus (Zhang *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2008); 2) la expresión de AGO1 aumenta en infecciones con CMV (Zhang *et al.*, 2006); 3) mutantes *ago-1* de *Arabidopsis thaliana* son hipersensibles a infección por CMV y 4) plantas mutantes *ago-2* o *ago-7* acumulan mayor niveles de ARNg en infecciones con el *Turnip crinckle virus* (TCV) respecto a las plantas salvajes (Qu *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2011). Se ha confirmado y caracterizado la actividad antiviral de AGO1, AGO2, AGO7 en *A. thaliana* en infecciones con CMV y TCV (Morel *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha comprobado la actividad de AGO2 en mecanismos de defensa contra PVX y contra el *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* respectivamente (Jaubert *et al.*, 2011; Scholthof *et al.*, 2011).

Si el silenciamiento génico mediado por ARN inducido por virus sirve como un mecanismo general frente al ataque de virus, no sería sorprendente que algunos virus de plantas hayan coevolucionado de manera tal de desarrollar estrategias que les permitan sobrepasar el sistema de defensa de la planta. De hecho, el descubrimiento de proteínas virales con actividad supresora del silenciamiento génico postranscripcional, confirma dicha hipótesis. Casi todos los virus que se han estudiado, desde que se descubrió el primer supresor en 1998, codifican proteínas supresoras del PTGS. La mayoría de los supresores descubiertos hasta el momento no comparten homología a nivel de la secuencia primaria de aminoácidos; por lo que se cree que estos estarían actuando a diferentes niveles en la vía del silenciamiento inducido por virus.

Los supresores más extensamente estudiados son (**Figura 6**):

- HC-Pro: este supresor es codificado por el *Tobacco etch virus* y fue el primer supresor descubierto (Pruss *et al.*, 1997; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington,

1998). HC-Pro afecta el metabolismo de los ARNs pequeños mediante la disminución en la acumulación de los mismos (Mallory *et al.*, 2002). Se comprobó que este supresor inhibe la vía de silenciamiento mediante la unión a los siARNs, impidiendo que estos se incorporen a RISC (Lakatos *et al.*, 2006). Los viARNs no podrían incorporarse al complejo RISC debido a que se demostró que HC-Pro suprime la metilación en los extremos 3' de los duplexs llevándolos a la degradación. Se sugiere que Hc-Pro, posiblemente, compita con la enzima metil transferasa HEN1 por los viARNs impidiendo que los mismos sean metilados (Lózsza *et al.*, 2008).

- p19: este supresor es codificado por el *Tomato bushy stunt virus* (TBSV). Inicialmente fue descubierto en ensayos de reversión del silenciamiento (Voinnet *et al.*, 1999), donde funcionaba como un débil supresor, revertiendo parcialmente el silenciamiento previamente establecido. Sin embargo, en ensayos de expresión transitoria, p19 funcionaba como un potente supresor, inhibiendo tanto el silenciamiento local como el sistémico (Silhavy *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002; Qu y Morris, 2002; Lakatos *et al.*, 2004). El supresor p19 se encuentra en forma de homodímeros y actúa "secuestrando" a los viARNs impidiendo la incorporación de los mismos al complejo RISC. Se sabe que este supresor se une específicamente a los duplexs de siARNs de 21 nt que presenten nucleótidos libres en sus extremos 3' (Silhavy *et al.*, 2002; Lakatos *et al.*, 2006). Recientemente se demostró que también es capaz de secuestrar los siARNs doble cadena de 21 nt que actúan como señal en silenciamiento sistémico (Dunoyer *et al.*, 2010).

- 2b: esta proteína perteneciente al *Cucumber mosaic virus* (CMV) fue también uno de los primeros supresores en estudiarse. La proteína 2b tiene una localización nuclear y es capaz de unir siARNs inhibiendo el silenciamiento a nivel local y sistémico (Lucy *et al.*, 2000; Goto *et al.*, 2007). El supresor 2b interfiere con el complejo AGO1/viARN inhibiendo la actividad "slicer" de RISC e impidiendo el proceso de clivaje del ARN "target" gracias a la directa interacción con los dominios PAZ y PIWI de AGO1 (Zhang *et al.*, 2006). Recientemente, se ha demostrado que 2b también se encuentra involucrada en la supresión del TGS mediante la inhibición de las actividades de AGO4 y el secuestro preferencial de los siARNs de 24 nt (Hamera *et al.*, 2012).

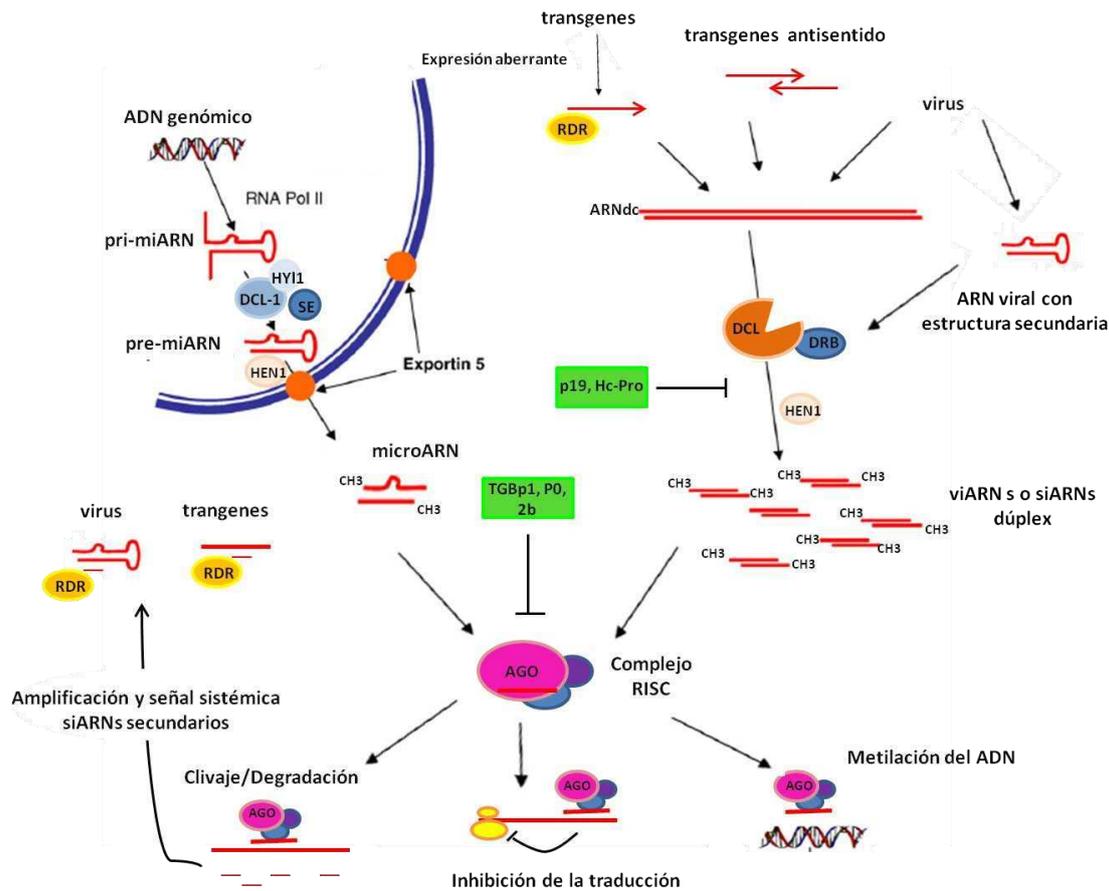


Figura 6: Silenciamiento mediado por ARN y defensa antiviral. Esquema general del silenciamiento en la regulación de la expresión de genes endógenos, transgenes y en la defensa antiviral. RDR: ARN polimerasa dependiente de ARN. DCL: Dicer-Like. DRB: proteína de unión a ARNdc. HEN1: metil transferasa. AGO: Argonauta. RISC: del inglés “RNA Induced Silencing Complex”. HYL1: proteína HYPONASTIC LEAVES 1. SE: proteína SERRATE.

-P0: proteína perteneciente al *Beet western yellow virus* (género *Poleovirus*) que contiene un dominio “F-box-like”. Este supresor es necesario para el establecimiento de la infección viral y tiene la capacidad de degradar a AGO1 (Bortolamiol *et al.*, 2007; Baumberger *et al.*, 2007). P0 desestabiliza la proteína AGO1 previniendo la formación del complejo RISC (Csorba *et al.*, 2010). Si bien P0 posee un dominio “F-box-like” que interactúan con componentes del proteosoma, la degradación de AGO1 es independiente de esta vía (Baumberger *et al.*, 2007).

TGBp1: la TGBp1 de PVX es un supresor débil respecto a otras TGBp1s de *Potexvirus* (Senshu *et al.*, 2009). Recientemente, se ha demostrado que la actividad supresora de TGBp1 de PVX estaría dada por su interacción con AGO1 mediante la degradación de

dicha proteína vía proteosoma (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).

7. Rol de la fosforilación de proteínas virales en procesos celulares.

Las proteínas pueden presentar diversas modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la acetilación, la glicosilación o la ubiquitinación, que permiten la regulación de sus diferentes funciones biológicas. Dentro de estas modificaciones, una de las más importantes corresponde a la fosforilación (Pawson y Scott, 2005). Se ha demostrado que la fosforilación de proteínas es una modificación reversible y específica que puede provocar cambios estructurales que resultan en la modulación de la actividad enzimática, la especificidad de sustratos y la modificación de la localización subcelular. También puede afectar la estabilidad de la proteína o alterar las interacciones con otras proteínas o moléculas (Johnson, 1993; Fuente van Bentem y Hirt, 2007).

La fosforilación de proteínas virales por quinasas de la planta podría ser un mecanismo de regulación del proceso de replicación y del transporte del ARN genómico dentro y entre las células vegetales así como también de las estrategias que utiliza el virus para escapar de la respuesta defensiva de la planta (Akamatsu *et al.*, 2007).

La MP30 de TMV fue la primera proteína viral que se demostró ser fosforilada por quinasas celulares de la planta (Citovsky *et al.*, 1993; Haley *et al.*, 1995). Trabajos posteriores mostraron también la fosforilación *in vitro* e *in vivo* de varias proteínas virales perteneciente a un amplio número de diferentes virus. Cabe mencionar la MP 69-kDa del *Turnip yellow mosaic virus* (Seron *et al.*, 1996), la MP 17-kDa del *Potato leafroll virus* (Sokolova *et al.*, 1997), la MP 30-kDa del *Tomato mosaic virus* (Kawakami *et al.*, 1999), la proteína 3a del *Cucumber mosaic virus* (Matsushita *et al.*, 2002), la cápside del *Potato virus A* (Ivanov *et al.*, 2003), la MP B3a del *Brome mosaic virus* (Akamatsu *et al.*, 2007), la MP del *Abutilon mosaic virus* (Kleinow *et al.*, 2009), la CP del *Alternanthera*

mosaic virus (Mukhamedzhanova *et al.*, 2011) y la P20 del *Bamboo mosaic virus* (Vijayapalan *et al.*, 2012).

A pesar de que la fosforilación de proteínas virales está relativamente establecida poco se ha avanzado en el estudio de su rol en la infección viral en plantas así como tampoco en la identificación de las quinasas celulares involucradas en este tipo de modificaciones. Uno de los casos más estudiado es el de TMV, para el cual se ha demostrado que la MP es fosforilada en su extremo C-terminal por una quinasa asociada a la pared celular con características de caseína quinasa 1 (Lee *et al.*, 2005). Dicha fosforilación inhibe el transporte del virión a las células vecinas, ya que esta modificación inhabilita a la MP a modificar el tamaño de abertura de los plasmodesmos (Waigmann *et al.*, 2000). También se observó que el efecto regulatorio de la fosforilación de la MP sobre la permeabilidad de los plasmodesmos era dependiente de la especie de planta que el virus infectaba (Truntyeva *et al.*, 2005). Además, en otro trabajo se demostró que la fosforilación de esta proteína inhibía su actividad de reprimir la traducción del ARN viral (Karpova *et al.*, 1999). De esta manera, cuando se fosforilaba dicha proteína, tanto antes como después de la formación del complejo RNP, inducía a los complejos MP-ARN (*in vitro*) a pasar de la forma no traducible a la forma traducible. En el caso del ToMV, se ha mostrado que la fosforilación de la MP es esencial para su localización intracelular y su estabilidad *in vivo* (Kawakami *et al.*, 1999). Otro caso descrito donde la fosforilación de proteínas virales afecta y regula diferentes procesos corresponde a la MP del *Abutilon mosaic virus* (*Geminivirus*). En este caso, la fosforilación de tres residuos ubicados en el extremo C-terminal de la proteína regula el desarrollo de los síntomas y la acumulación del ADN viral (Kleinow *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha demostrado el rol regulatorio de la fosforilación de la MP-17kDa del *Potato leaf roll virus* en la movilización de dicha proteína hacia los PDs. Se ha comprobado que dicha MP es fosforilada en su extremo C-terminal y que dicha fosforilación es necesaria pero no suficiente para el direccionamiento y localización de esta proteína en los plasmodesmos (Link *et al.*, 2011). Finalmente, se mostró que la fosforilación de la proteína P20 del *Bamboo mosaic virus* por quinasas celulares se encuentra implicada en la promoción de la traducción del ARNv que se encuentra formando parte de los complejos de movilización (Vijayapalan *et al.*, 2012).

En cuanto a PVX se sabe que las MPs y la CP son esenciales para la movilización del virus (Chapman *et al.*, 1992; Morozov y Solovyev, 2003). Desde ya hace un tiempo se conoce que la CP de PVX puede ser fosforilada por una protein quinasa C, por una mezcla de caseína quinasas 1 y 2 (CK1 y CK2) y por una quinasa soluble de *Nicotiana tabacum* (Atabekov *et al.*, 2001). Se mostró *in vitro* que la fosforilación de la cápside de PVX lleva a la traducción del ARN viral que se encuentra encapsidado, sugiriendo que la fosforilación de CP juega un rol regulatorio en la traducción de los viriones durante las infecciones primarias (Atabekov *et al.*, 2001). Por otro lado, se reportaron evidencias que indican que la fosforilación *in vitro* de TGBp1 inhibe la capacidad de activar *in vitro* la traducción de los viriones de PVX (Zayakina *et al.*, 2008).

En nuestro laboratorio se ha determinado que la TGBp1 de PVX es fosforilada *in vitro* por una caseína quinasa 2 de *Nicotiana tabacum*. Además, se demostró que la TGBp1 nativa es fosforilada por una quinasa celular tipo CK2 (Módena *et al.*, 2008). En línea con este trabajo, se han caracterizado dos posibles sitios de fosforilación, la treonina en posición 193 y la treonina en posición 214. Se observó que la simulación de la fosforilación en los residuos T193 y T214 regulaba negativamente la dispersión viral y la capacidad de la proteína TGBp1 de hidrolizar ATP (Módena, 2011). Estos resultados representan el primer paso para establecer el potencial rol de la fosforilación de TGBp1 durante la infección viral con PVX.

Objetivos

Objetivo general:

El objetivo general de la siguiente Tesis Doctoral fue estudiar el rol de la fosforilación en la regulación funcional de la proteína de movimiento TGBp1 del *Potato virus X* (PVX) y en su interacción con la proteína vegetal remorina (REM).

Objetivos específicos:

1. Estudiar el rol regulatorio de la fosforilación de TGBp1 sobre la movilización célula a célula de PVX.
2. Estudiar el rol regulatorio de la fosforilación de TGBp1 en la regulación de la degradación de las proteínas de movimiento TGBp1 de tipo Potex.
3. Estudiar el rol regulatorio de la fosforilación de TGBp1 sobre su capacidad de promover la apertura de los plasmodesmos y su capacidad supresora del silenciamiento génico mediado por ARN.
4. Estudiar el rol regulatorio de la fosforilación de TGBp1 en la interacción con la proteína REM.
5. Caracterizar la presencia de dominios de TGBp1 implicados en la interacción con la proteína REM.
6. Caracterizar la interacción de REM con otras proteínas de movimiento TGBp1 pertenecientes a virus con estrategias de movilización de tipo TGB.
7. Evaluar la localización subcelular de las fusiones N- y C- terminal a GFP de TGBp1 de PVX.

Materiales y Métodos

1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Se utilizaron plantas *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi D8, *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana benthamiana* 16c. Esta última línea expresa la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés “*Green Fluorescent Protein*”) en forma constitutiva y fue cedida por el Dr. D. Baulcombe (Ruiz *et al.*, 1998).

Las plantas se mantuvieron en cuartos especializados con condiciones óptimas para su crecimiento. La temperatura de los cuartos fue entre 23-26°C con un régimen de 16 h luz / 8 h oscuridad y 45% de humedad relativa.

2. Aislamiento viral.

2.1 Potato Virus X.

La cepa viral utilizada en este trabajo corresponde a la cepa CP2 del *Potato virus X* (PVX-CP2) procedente del Centro Internacional de la Papa (Perú). El clonado y la secuenciación completa del genoma viral fueron realizados y reportados previamente en nuestro laboratorio (Orman *et al.*, 1990). La copia completa del genoma de PVX se obtuvo mediante ensamblado de los fragmentos de ADNc (Calamante, 1998).

3. Cepas bacterianas utilizadas.

3.1 Escherichia coli.

3.1.1 Cepas y Condiciones de cultivo.

Se utilizaron las cepas DH10B, DH5 α , TOP10 y BL21 (DE3). Todos los cultivos líquidos fueron crecidos a 37°C en medio LB (NaCl 10 g/L, peptona de carne 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L) con agitación a 250 rpm. El crecimiento en medios sólidos se efectuó a la misma temperatura en medio LB suplementado con agar a una concentración final de 15 g/L. De acuerdo con la resistencia conferida por cada

plásmido, el medio se suplementó con ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y espectinomycin (100 µg/mL), gentamicina (100 µg/mL) o rifampicina (50 µg/mL).

3.1.2 Preparación de células bacterianas electrocompetentes.

Se inocularon 600 mL de medio LB con un cultivo crecido durante toda la noche (dilución 1/100) a partir de una colonia de células de *Escherichia coli*. El cultivo se incubó con agitación a 250 rpm a 37°C hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,5-1. Posteriormente, se colocaron las células en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron las mismas a 4000 g por un periodo de 15 min a 4°C. Luego, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 600 mL de agua Miliq pre-enfriada y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se repitió dos veces el procedimiento de centrifugación y lavado del *pellet*, utilizando la mitad (300 mL), y un cuarto (150 mL) del volumen inicial de agua Miliq. 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 50 µL, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C.

3.1.3 Transformación de células electrocompetentes.

Las células electrocompetentes previamente preparadas se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas se les agregó el ADN (100-250 ng) correspondiente y se las incubaron en hielo por 10 min. La mezcla de ADN y bacterias se transfirió a una cubeta de electroporación (0,2 cm BioRad) y se aplicó un campo eléctrico de 2,5 kV por 5 milisegundos utilizando un equipo *Gene Pulser* (BioRad). Las células se recuperaron inmediatamente mediante el agregado de 800 µL de LB y se incubaron durante 1 h a 37°C. Finalmente, se plaquearon 200 µL en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes.

3.1.4 Preparación de células bacterianas quimio-competentes.

Las bacterias quimio-competentes se prepararon por el método Hanahan (Hanahan, 1983). Se picó una colonia de *E. coli* y se inoculó en 10 mL de medio LB. Se incubó el cultivo durante toda la noche a 37° C con agitación a 250 rpm. Al día siguiente, se preparó un nuevo cultivo con 250 mL de LB al cual se le agregaron 2,5 mL del cultivo crecido durante la noche (dilución 1/100). Se dejó crecer hasta una D.O._{600nm} de 0,5. Se colocó el cultivo en hielo por 30 min y luego se cosecharon las células centrifugando a 4000 g por 10 min a 4° C. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 40 mL de *buffer* de transformación TFBI estéril pH 5,8 (30 mM KAc, 100 mM KCl, 10mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂ y 15% glicerol). Se dejó incubando una hora en hielo y se centrifugó nuevamente a 4000 g por 10 min a 4° C. Finalmente, se resuspendieron las células en 4 mL de *buffer* TFBII estéril pH 6,5 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl y 15% glicerol) y se incubaron en hielo 10 min. Las bacterias competentes se alícuotaron, se congelaron en nitrógeno líquido y finalmente se almacenaron a -70°C.

3.1.5 Transformación de células bacterianas quimio-competentes.

Se incubaron en hielo una alícuota (50 µL) de bacterias competentes con el ADN (100-250 ng) durante aproximadamente 30 min. A continuación, se sometieron las bacterias a un shock térmico durante 1 min a 42°C y luego se colocaron en hielo para su recuperación durante 5 min. Finalmente se agregó medio líquido LB (1 mL) y se incubó por 45 min a 37° C. Por último, las bacterias se plaquearon en medio LB sólido suplementado con el correspondiente antibiótico.

3.2 *Agrobacterium tumefaciens.*

3.2.1 Cepas y condiciones de cultivo.

Se utilizó la cepa GV3101, que posee resistencia genómica a rifampicina (100 µg/mL) y resistencia plasmídica (pTiC58) a gentamicina (100 µg/mL). Los cultivos de *A. tumefaciens* se realizaron en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes a cada plásmido. El cultivo se incubó con agitación a 200 rpm a 28°C.

3.2.2. Preparación de células de *A. tumefaciens* electrocompetentes.

Para la preparación de células de *Agrobacterium* competentes se partió de una colonia aislada y se largó con ésta un cultivo de 5 mL de medio LB suplementado con rifampicina y gentamicina. El cultivo se incubó con agitación a 200 rpm durante toda la noche a 28°C. Este cultivo se utilizó para inocular 200 mL de medio fresco, el cual se incubó en las mismas condiciones anteriores hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,5. Para la preparación de células competentes, se utilizó el mismo protocolo que en el caso de *E. coli* (ver punto 3.1.2). Posteriormente, las bacterias se alicuotaron en 50 µL y se conservaron a -70°C.

3.2.3. Transformación de células de *A. tumefaciens* electrocompetentes.

Se agregaron entre 100-250 ng del ADN de interés a 50 µL de células competentes previamente descongeladas. Una vez que se les agregó el ADN, se las mantuvo en hielo por 10 min. Se transformaron las células por electroporación (campo eléctrico aplicado 2,2 kV por 4-5 milisegundos) y luego se recuperaron en 800 µL de medio LB líquido. Posteriormente se las incubó a 28°C durante 2 hs. Para seleccionar las transformantes, se sembraron 150 µL de la suspensión bacteriana en medio sólido suplementado con los antibióticos correspondientes.

4. Cepas de levaduras utilizadas.

4.1 *Saccharomyces cerevisiae* - cepa JD53.

Para los ensayos de doble híbrido con el sistema “Split Ubiquitin” se utilizó la cepa de levaduras JD53 (*MATalpha his3-Delta 200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-Delta 63 ura3-52*) (Dohmen *et al.*, 1995).

4.1.1 Preparación de células de levaduras competentes.

Se partió de una colonia de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa JD53), estriada en

medio YPD-agar (10 g/L extracto de levaduras, 20 g/L bacto-peptona, 2 g/L glucosa y 15 g/L agar) y se creció en 2 mL de medio YPD líquido a 30°C con agitación durante toda una noche. Al día siguiente, se llevó el cultivo a un volumen final de 5 mL y se dejó crecer durante otras 5 hs. A continuación, se centrifugó 4 min a 2000 rpm y se hizo un lavado con 5 mL con H₂O Miliq estéril. Luego, se volvió a centrifugar y se resuspendió las células en 1 mL de AcLi/TE 1X. Finalmente, se volvió a incubar a 30°C con agitación durante 20 min.

4.1.2 Transformación de levaduras.

Se alicuotó 100 µL de las levaduras competentes en tubos de 1,5 mL y se hizo una breve centrifugación para bajar las levaduras y descartar el sobrenadante. Las células se resuspendieron en una solución de transfección (por cada tubo: 180 µL de PEG 40%, 36 µL de AcLi/TE 10X, 2 µL de carrier (ADN de esperma de salmón 100 ng/µL), 8 µL de H₂O y 2 µL del ADN plasmídico) usando vortex. Luego se llevó a baño de agua a 42°C durante 40 min. Pasado ese tiempo, se centrifugó brevemente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de levaduras en 100 µL H₂O para plaquear en placas con medio de selección. Se dejó secar las placas y finalmente se incubaron en estufa a 30°C durante 48 a 72 hs hasta observar la aparición de colonias.

5. Conservación de clones.

Para el caso de clones bacterianos, se mezcló en un tubo *ependorf* un volumen de cultivo crecido durante toda una noche con una solución de glicerol estéril, de modo que su concentración final esté entre un 10% y un 20%. Finalmente se guardaron los “stocks” a -70°C.

6. Técnicas y métodos de ingeniería genética.

6.1. Aislamiento de ADN plasmídico.

6.1.1. Método de lisis alcalina.

Para la extracción de ADN plasmídico en pequeña escala se creció una colonia aislada o un pre inóculo conservado a -70°C en 5 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaron 10 min a 3000 rpm. El precipitado se resuspendió en 300 μL de solución de resuspensión (25mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ARNsa A) y se agregó 300 μL de solución de lisis (0,2N NaOH, 1% SDS) y se incubó en hielo 5 min. Luego, se agregó 300 μL de solución de neutralización (3 M KAc pH 5,5), se incubó en hielo 10 min y se centrifugó 10 min a 13.000 rpm a 4°C . El sobrenadante se trasvasó a otro tubo y el ADN plasmídico se precipitó con 0,7 volúmenes de isopropanol. Luego, se centrifugó 15 min a 13.000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 μL EtOH 70% y se centrifugó nuevamente 10 min a 13.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, para luego resuspenderlo en 30 ó 40 μL de agua destilada estéril.

Para preparaciones en las que se requirió mayor masa de ADN la purificación se hizo utilizando un kit de purificación (Plasmid Purification Kit, QIAGEN).

6.1.2 Purificación mediante matrices comerciales.

Las preparaciones de ADN plasmídico utilizadas para secuenciación se obtuvieron utilizando el sistema de purificación *Wizard plus SV minipreps DNA Purification System* (Promega), siguiendo el protocolo suministrado con el mismo. El sistema consiste en una modificación del método de lisis alcalina, en la que el paso de precipitación del ADN con isopropanol es reemplazado por el pasaje a través de una columna conteniendo una matriz de fibra de vidrio. El ADN unido diferencialmente a la columna se eluyó con 50-100 μL de H_2O , según a la concentración final de ADN deseada.

6.2 Preparación de plásmidos e insertos de ADN.

6.2.1 Amplificación de insertos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Mastercycler* de gradiente Eppendorf en un volumen final de 50 μ L conteniendo *buffer* de reacción 1X (Invitrogen o Stratagene, de acuerdo a la enzima utilizada), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 500 ng de oligonucleótidos específicos (Invitrogen) y 2,5 U (unidades) de enzima. Las enzimas utilizadas fueron *Pfu* recombinante (Stratagene) o *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen). Las muestras se amplificaron usando 30 ciclos de: 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C y 2 min a 72°C. Se incluyó un paso inicial de 3 min a 94°C y un paso final de 10 min a 72°C. De acuerdo a la secuencia nucleotídica que se quería amplificar se utilizaron diferentes cebadores.

6.2.2 Purificación de plásmidos y fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Los plásmidos, fragmentos de ADN y productos de PCR se separaron e identificaron por electroforesis en geles de agarosa de 1% 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). Los productos se eluyeron de la matriz con volúmenes de H_2O , tales que permitían obtener una concentración del producto en el orden de los 50-100 ng/ μ L.

6.2.3 Digestión con enzimas de restricción.

Las digestiones de plásmidos para el clonado o chequeo por restricción se realizaron con enzimas comerciales (New England Biolabs, Promega, Gibco BRL). Los cortes se realizaron según las condiciones especificadas por cada empresa proveedora. En cada corte se mezclaron las cantidades necesarias de *buffer* 10X (específico de cada enzima), 100 ng de ADN, 5 U de enzima de restricción y agua hasta completar el volumen. Los cortes que implicaron el uso de más de una enzima de restricción, y cuyas condiciones de incubación eran incompatibles entre sí, se hicieron en forma secuencial, purificando el ADN por precipitación con acetato de amonio y etanol luego de cada reacción. Todas las reacciones se incubaron 2 hs a la temperatura

correspondiente de cada enzima. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa (ver punto 8).

6.2.4 Reacciones de ligación.

Para las reacciones de ligación entre plásmidos e insertos, se utilizó la enzima ADN T4 ligasa (Promega). Entre 100 y 150 ng de ADN plasmídico se combinó con los insertos en relaciones molares de plásmido:inserto 1:1, 1:5 y 1:10. El volumen de la reacción de ligación fue siempre de 20 μ L. A cada tubo de ligación se agregó 2 μ L de *buffer* de ligación 10X, vector, inserto, 0.1-1 U de ligasa de ADN T4 por cada 10 ng de vector y agua. Las reacciones se incubaron a 16°C durante toda la noche.

6.2.5 PCR “colony”.

Esta técnica permite analizar directamente si colonia bacteriana posee el plásmido de interés sin necesidad de realizar mini preparaciones de ADN plasmídico. Para esto se picó con una punta estéril una colonia posiblemente transformada y se la mojó en el volumen de H₂O correspondiente a la reacción de PCR. Con el mismo tip se inoculó un cultivo de LB con la correspondiente selección, para recuperar la bacteria en caso de que la reacción de PCR dé el producto esperado. Finalmente se procedió a agregar el resto de los reactivos de la PCR tal como se indica anteriormente (ver punto 6.2.1).

6.3 Clonado por sistema Gateway.

6.3.1 Primera reacción de recombinación: reacción BP.

La reacción de recombinación BP facilita la transferencia de un gen de interés o de un producto de amplificación (ambos con sitios *attB*) a un vector donante (con sitios *attP*) mediante la recombinación que se produce a través de los sitios *attB* y los sitios *attP* (ver **Figura 1, Resultados**).

Todas las reacciones de recombinación se llevaron a cabo en un volumen final de 5 μ L, en donde se agregaron 25 ng de producto amplificado, 100 ng del vector pDONRTM201 (Invitrogen), 2 μ L de *buffer* TE pH 8,0 (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA), 1 μ L de la mezcla enzimática BP ClonaseTM II (Invitrogen) y agua estéril hasta completar el volumen. Las mezclas se dejaron incubando durante toda la noche a 25°C. Luego se agregó 1 μ L de la solución Proteinase K (2 μ g/ μ L proteinasa K, Invitrogen) y se las dejó incubando 10 min a 37°C.

6.3.2 Segunda reacción de recombinación: reacción LR.

La reacción de recombinación LR facilita la transferencia del producto clonado en el vector de entrada (con sitios *attL*) a un vector de destino (con sitios *attR*) mediante la recombinación que se produce a través de los sitios *attL* y los sitios *attR*.

Todas las reacciones de recombinación se llevaron a cabo en un volumen final de 5 μ L, en donde se agregaron 100 ng del vector de entrada, 150 ng del vector de destino, 2 μ L de *buffer* TE pH 8,0, 1 μ L de la mezcla enzimática LR ClonaseTM II (Invitrogen) y agua estéril hasta completar el volumen. Las mezclas se dejaron incubando durante toda la noche a 25°C. Luego se agregó 1 μ L de la solución Proteinase K (2 μ g/ μ L proteinasa K, Invitrogen) y se las dejó incubando 10 min a 37°C.

Los productos de recombinación fueron transformados por electroporación o por “shock” térmico en las cepas DH10B, DH5 α o TOP10 (ver punto 3.1.1).

7. Cebadores utilizados.

TGBp1GW-up: oligonucleótido sentido que combinado con el TGBp1GW-down sirve para levantar la secuencia de TGBp1 y las versiones mutantes. Contiene los sitios attB1 para el clonado por sistema Gateway a un vector intermediario (pDONRTM201).

Secuencia: 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGATATTCTCATCATTAG 3'
attB1 TGBp1

TGBp1GW-down: oligonucleótido antisentido que combinado con el TGBp1GW-up sirve para levantar la secuencia de TGBp1 y las versiones mutantes. Contiene los sitios attB2 para el clonado por sistema Gateway a un vector intermediario (pDONRTM201).

Secuencia: 5'GGGGACCACTTTGTACAAAGCTGGGTCTATGCTCCTGCGCGGACATAAG3'.

attB2

TGBp1

TGBp1.nostopGW-down: oligonucleótido antisentido que combinado con el TGBp1GW-up sirve para levantar la secuencia de TGBp1 y las versiones mutantes sin el codón stop para fusiones C-terminales a GFP. Contiene los sitios attB2 para el clonado por sistema Gateway a un vector intermediario (pDONRTM201).

Secuencia: 5'GGGGACCACTTTGTACAAAGCTGGGTCTGCTCCTGCGCGGACATAAG3'.

attB2

TGBp1

TGBp1.noPESTGW-down: oligonucleótido antisentido que combinado con el TGBp1GW-up sirve para levantar TGBp1 sin la secuencia PEST final (1- 537 nt). Contiene los sitios attB2 para el clonado por sistema Gateway a un vector intermediario (pDONRTM201). Para las fusiones a GFP N-terminales se le agregó el codón *stop* al cebador (CTA).

Secuencia: 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAACAAATTCAACTCCGTGC3'

attB2

TGBp1

PEST.TGBp1GW-up: oligonucleótido sentido que combinado con el TGBp1GW-down sirve para levantar la secuencia de PEST de TGBp1 y las versiones mutantes (537-681 nt) para fusiones N-terminales a proteínas reporteras. Contiene los sitios attB1 para el clonado por sistema Gateway a un vector intermediario (pDONRTM201).

Secuencia:

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAAGCCGTGCCAAGTCACGGG3'

attB1

PEST TGBp1

PEST.TGBp1.AUG.GW-up: oligonucleótido sentido que combinado con el TGBp1.nostopGW-down sirve para levantar la secuencia de PEST de TGBp1 y las versiones mutantes (537-681 nt) para fusiones C-terminales a proteínas reporteras. Contiene los sitios attB1 para el clonado por sistema Gateway a un vector intermediario (pDONRTM201).

Secuencia: 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGAAGCCGTGCCAAGTCACGGG3'

attB1

PEST TGBp1

8. 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 5X (glicerol 10%, azul de bromofenol 0,5%). Los geles fueron fotografiados utilizando luz ultravioleta (UV) de 365 nm en un transiluminador *Multi Genius Bio Imaging System* (Syngene).

9. Plásmidos.

9.1 Plásmidos comerciales.

pTOPO (Invitrogen Life Technologies): vector de clonado para productos de amplificación por PCR utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa.

pDONRTM201 (Invitrogen Life Technologies): vector de clonado intermediario del sistema Gateway, utilizado para clonar fragmentos de ADN obtenidos mediante amplificación por PCR.

pK7WG2D: vector con tecnología Gateway, para la expresión de proteínas en plantas (Karimi *et al.*, 2002).

pB7FWG2: vector del sistema Gateway utilizado para la expresión de proteínas en plantas bajo la forma de fusiones C-terminales a la proteína GFP (Karimi *et al.*, 2002).

pK7WGF2: vector del sistema Gateway utilizado para la expresión de proteínas en plantas bajo la forma de fusiones N-terminales a la proteína GFP (Karimi *et al.*, 2002).

pH7RWG2: vector del sistema Gateway utilizado para la expresión de proteínas en plantas bajo la forma de fusiones C-terminales a la proteína RFP (Karimi *et al.*, 2002).

pH7WGR2: vector del sistema Gateway utilizado para la expresión de proteínas en plantas bajo la forma de fusiones N-terminales a la proteína RFP (Karimi *et al.*, 2002).

pMKZ: vector de doble híbrido del sistema “Split Ubiquitin” (tecnología Gateway) que permite la expresión de una proteína fusionada al dominio C-terminal de la proteína ubiquitina y a la proteína reportera URA3 (orotidina 5'- fosfato decarboxilasa) (Deslandes *et al.*, 2003).

NUI: vector de doble híbrido del sistema “Split Ubiquitin” (tecnología Gateway) que permite la expresión de una proteína fusionada al dominio N-terminal de la proteína ubiquitina (Deslandes *et al.*, 2003).

pUC57: vector de clonado para *E. coli*.

9.2 Plásmidos cedidos por otros laboratorios.

pBIN61: vector binario utilizado como base para el clonado de transgenes. Su “cassette” incluye el promotor 35S y el terminador 35S del CaMV (*Cauliflower mosaic virus*) (Bendahmane *et al.*, 2002).

pBIN61-GFP: plásmido recombinante que expresa la secuencia del ADNc de mGFP5 (Haseloff *et al.*, 1997).

pBIN61-p19: plásmido recombinante que expresa la proteína p19 del *Tomato Bushy Stunt Virus*. Cedido cordialmente por el Dr. D. Baulcombe (John Innes Institute, Reino Unido).

pDEST15-StREM1.3: plásmido de expresión en bacterias del sistema Gateway para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas al marcador GST. La expresión del gen de interés es regulada por la T7 ARN polimerasa (Raffaele *et al.*, 2009). Esta construcción expresa la proteína remorina de *Solanum tuberosum* fusionada a GST y fue cedida por el Dr. Sebastien Mongrand de la Universidad de Bordeaux.

pDONR-StREM1.3: plásmido intermediario del sistema Gateway (Invitrogen) que tiene clonada la secuencia ADNc de la remorina de *Solanum tuberosum* (Raffaele *et al.*, 2009). Fueron cedidas las versiones con y sin codon *stop*. Construcción cedida por el Dr. Sebastien Mongrand de la Universidad de Bordeaux.

pDONR-NtREM: plásmido intermediario del sistema Gateway (Invitrogen) que tiene clonada la secuencia ADNc de la remorina de *Nicotiana tabacum* (Raffaele *et al.*, 2009). Construcción cedida por el Dr. Sebastien Mongrand de la Universidad de Bordeaux.

pMKZ-StREM y pMKZ-NtREM: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en levaduras las secuencias codificantes de la proteína remorina de *Solanum tuberosum* y de *Nicotiana tabacum*. Este plásmido permite la expresión constitutiva de ambas versiones fusionadas en sus extremos C-terminales al extremo C-terminal de la ubiquitina y del gen reportero URA3. Este plásmido confiere auxotrofia para histidina (His⁻). Estos plásmidos fueron desarrollados en el laboratorio del Dr. Mongrand (Universidad de Bordeaux).

pK7WG2D-StREM: vector del sistema Gateway que fue utilizado para expresar de forma transitoria en plantas la proteína remorina de *Solanum tuberosum* bajo el promotor 35S de CaMV. Este vector fue cedido por el Dr. Sebastien Mongrand de la Universidad de Bordeaux.

pSLJ7292-PVX.GUSΔTGBp1: plásmido recombinante que expresa en plantas la secuencia completa del genoma de PVX y que presenta una deleción de 357 nt en el gen que codifica la proteína TGBp1. Además, PVX.GUSΔTGBp1 presenta el gen que codifica la β-glucuronidasa (GUS) bajo el promotor duplicado de la cápside de PVX (Howard *et al.*, 2004). Plásmido cedido por la Dra. Verchot-Lubicz de la Universidad de Oklahoma.

pH7RWG2-PDLP1: vector del sistema Gateway que fue utilizado para expresar la proteína de localización en el plasmodosmo 1 (PDLP1) bajo la forma de fusión C-terminal a la proteína RFP (Amari *et al.*, 2010). Este vector fue cedido por la Dra. Emmanuelle Bayer de la Universidad de Bordeaux.

9.3 Plásmidos construidos previamente en nuestro laboratorio.

pET28-TGBp1: plásmido que permite la expresión en *E. coli* de la proteína TGBp1 del *Potato virus X*. Fue desarrollada en el laboratorio en base al vector comercial pET28a(+) (Novagen).

pET28-TGBp1T193A, pET28-TGBp1T193D, pET28-TGBp1T214A, pET28-TGBp1T214D: plásmidos que permiten la expresión en *E. coli* de la proteínas mutantes TGBp1T193A, TGBp1T193D, TGBp1T214A y TGBp1T214D. Dichos vectores fueron desarrollados en el laboratorio en base al vector comercial pET28a(+) (Novagen). Las mutantes se construyeron por amplificación por PCR mediante el uso de megaoligonucleótidos específicos reemplazando los residuos fosforilables por alanina o por ácidos aspárticos (Módena, 2011).

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 del CaMV y del terminador de nopalina sintetasa (NOS) de *A. tumefaciens*.

pGEMT-GFP5: plásmido recombinante que expresa la secuencia del gen *gfp5*.

9.4 Plásmidos construidos en este trabajo.

pDONR-TGBp1, pDONR-T193A, pDONR-T193D, pDONR-T214A y pDONR-T214D: construcciones intermediarias del sistema Gateway, donde se clonaron los fragmentos de ADN correspondientes a la TGBp1 salvaje y versiones mutantes obtenidos mediante amplificación por PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos TGBp1GW-up y TGBp1GW-down.

pDONR-TGBp1st, pDONR-T193Ast, pDONR-T193Dst, pDONR-T214Ast y pDONR-T214Dst: construcciones intermediarias del sistema Gateway, donde se clonaron los fragmentos de ADN correspondientes a la TGBp1 salvaje y versiones mutantes sin codón stop obtenidos mediante amplificación por PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos TGBp1GW-up y TGBp1nostopGW-down.

pK7WG2D-TGBp1, pK7WG2D-T193A, pK7WG2D-T193D, pK7WG2D-T214A y pK7WG2D-T214D: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en plantas la secuencia codificante de la proteína TGBp1 o de las

versiones mutantes para los sitios fosforilación de TGBp1 de PVX bajo el promotor constitutivo 35S del CaMV.

pB7FWG2-TGBp1, pB7FWG2-T193A, pB7FWG2-T193D, pB7FWG2-T214A y pB7FWG2-T214D: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en plantas la secuencia codificante de la proteína TGBp1 o de las versiones mutantes para los sitios fosforilación de TGBp1 de PVX fusionadas en sus extremos C-terminales a la secuencia de GFP.

pK7WGF2-TGBp1, pK7WGF2-T193A, pK7WGF2-T193D, pK7WGF2-T214A y pK7WGF2-T214D: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en plantas la secuencia codificante de la proteína TGBp1 o de las versiones mutantes para los sitios fosforilación de TGBp1 de PVX fusionadas en sus extremos N-terminales a la secuencia de GFP.

pDONR-PEST.TGBp1, pDONR-PEST.T93A y pDONR-PEST.T193D: construcciones intermediarias del sistema Gateway, donde se clonaron los fragmentos de ADN correspondientes a las secuencias PEST C-terminales de la TGBp1 salvaje y de las versiones mutantes mediante amplificación por PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos PEST.TGBp1GW-up y TGBp1GW-down.

pDONR- PEST.TGBp1st, pDONR- PEST.T93Ast y pDONR- PEST.T193Dst: construcciones intermediarias del sistema Gateway, donde se clonaron los fragmentos de ADN correspondientes a las secuencias PEST C-terminales de la TGBp1 salvaje y de las versiones mutantes mediante amplificación por PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos PEST.TGBp1.AUG.GW-up y TGBp1.nostopGW-down.

pB7FWG2-PEST.TGBp1, pB7FWG2-PEST.T193A, pB7FWG2-PEST.T193D: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en plantas las secuencias PESTs de la proteína TGBp1 y de las versiones T193A y T193D respectivamente. Estas versiones se encuentran fusionadas en sus extremos C-terminales a la secuencia de GFP.

pK7WGF2-PEST.TGBp1, pK7WGF2-PEST.T193A, pK7WGF2-PEST.T193D: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en plantas las

secuencias PESTs de la proteína TGBp1 y de las versiones T193A y T193D respectivamente. Estas versiones se encuentran fusionadas en sus extremos N-terminales a la secuencia de GFP.

pCU57-GarVC-TGBp1: vector intermediario del sistema Gateway. Se clonó el fragmento de ADN correspondiente a la TGBp1 del *Garlic virus C* (GarVC, *Allexivirus*). La secuencia de la TGBp1 del GarVC se encuentra flanqueada por los sitios attL que permiten clonar directamente a un vector de destino determinado. Este vector permite únicamente realizar fusiones N-terminales a la secuencia de TGBp1. Esta construcción fue sintetizada por la empresa Genscript.

pCU57-PVM-TGBp1: vector intermediario del sistema Gateway. Se clonó el fragmento de ADN correspondiente a la TGBp1 del *Potato virus M* (PVM, *Carlavirus*). La secuencia de la TGBp1 del PVM se encuentra flanqueada por los sitios attL que permiten clonar directamente a un vector de destino determinado. Este vector permite únicamente realizar fusiones N-terminales a la secuencia de TGBp1. Esta construcción fue sintetizada por la empresa Genscript.

pCU57-LRSV-TGBp1: vector intermediario del sistema Gateway. Se clonó el fragmento de ADN correspondiente a la TGBp1 del *Lichnys ringspot virus* (LRSV, *Hordeivirus*). La secuencia de la TGBp1 del LRSV se encuentra flanqueada por los sitios attL que permiten clonar directamente a un vector de destino determinado. Este vector permite únicamente realizar fusiones N-terminales a la secuencia de TGBp1. Esta construcción fue sintetizada por la empresa Genscript.

pUC57-GarVC-T201A: vector intermediario del sistema Gateway. Se clonó la secuencia de la TGBp1 del *Garlic virus C* (*Allexivirus*) donde la treonina 201 fue reemplazada por una alanina. La secuencia mutante de la TGBp1 del GarVC se encuentra flanqueada por los sitios attL que permiten clonar directamente a un vector de destino determinado. Este vector permite únicamente realizar fusiones N-terminales a la secuencia de mutante de TGBp1. Esta construcción fue sintetizada por la empresa Genscript.

pUC57-PVM-T191A: vector intermediario del sistema Gateway. Se clonó la secuencia de la TGBp1 del *Potato virus M* (*Carlavirus*) donde la treonina 191 fue reemplazada

por una alanina. La secuencia mutante de la TGBp1 del PVM se encuentra flanqueada por los sitios attL que permiten clonar directamente a un vector de destino determinado. Este vector permite únicamente realizar fusiones N-terminales a la secuencia de mutante de TGBp1. Esta construcción fue sintetizada por la empresa Genscript.

pK7WGF2-GarVC-TGBp1 y pK7WGF2-PVM-TGBp1: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en plantas la secuencia codificante de la proteína TGBp1 del virus *Garlic virus C (Allexivirus)*, del *Potato virus M (Carlavirus)*. Estos plásmidos permiten que todas las versiones se encuentren fusionadas en sus extremos N-terminales a la secuencia de GFP.

pK7WGF2-GarVC-T201A y pK7WGF2-PVM-T191A: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en plantas las secuencias codificantes de la proteína TGBp1 del virus *Garlic virus C (Allexivirus)* y del *Potato virus M (Carlavirus)*. Estos plásmidos permiten que todas las versiones se encuentren fusionadas en sus extremos N-terminales a la secuencia de GFP.

pMKZ-TGBp1, pMKZ-T193A, pMKZ-T193D, pMKZ-T214A, pMKZ-T214D: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en levaduras las secuencias codificantes de la proteína TGBp1 o de las versiones mutantes para los sitios fosforilación de TGBp1 de PVX. Estos plásmidos permiten la expresión constitutiva de todas las versiones fusionadas en sus extremos C-terminales al extremo C-terminal de la ubiquitina y del gen reportero *URA3*. Este plásmido confiere auxotrofia para histidina (His-).

pMKZ-N.TGBp1 y pMKZ-C.TGBp1 : plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en levaduras los dominios funcionales N- y C-terminal, de la proteína TGBp1 de PVX. Estos plásmidos permiten la expresión constitutiva de todas las versiones fusionadas en sus extremos C-terminales al extremo C-terminal de la ubiquitina y del gen reportero *URA3*. Este plásmido confiere auxotrofia para histidina (His-). El dominio N-terminal involucra la secuencia 1-179 nt de TGBp1 y el C-terminal involucra la secuencia 180-226 nt de TGBp1.

NUI-TGBp1, NUI-T193A, NUI-T193D, NUI-T214A, NUI-T214D: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresan en levaduras las secuencias codificantes de la proteína TGBp1 o de las versiones mutantes para los sitios fosforilación de TGBp1 de PVX. Estos plásmidos permiten la expresión constitutiva de todas las versiones fusionadas en sus extremos N-terminales al extremo N-terminal de la ubiquitina. Este plásmido confiere auxotrofia para triptófano (Trp-).

NUI-StREM: plásmido recombinante obtenido mediante el sistema Gateway que expresa en levaduras la secuencia codificante de la proteína remorina de *Solanum tuberosum*. Este plásmido permite la expresión constitutiva de REM fusionada en su extremo N-terminal al extremo N-terminal de la ubiquitina. Este plásmido confiere auxotrofia para triptófano (Trp-).

NUI-Allex, NUI-Carla y NUI-Hordei: plásmidos recombinantes obtenidos mediante el sistema Gateway que expresa en levaduras la secuencia codificante de la proteína TGBp1 de *Garlic virus C (Allexivirus)*, del *Potato virus M (Carlavirus)* y del *Lichnys ringspot virus (LRSV, Hordeivirus)*. Estos plásmidos permiten la expresión constitutiva de dichas TGBp1s fusionadas en sus extremos N-terminales al extremo N-terminal de la ubiquitina. Este plásmido confiere auxotrofia para triptófano (Trp-).

10. Ensayos de agroinfiltración.

Los ensayos de agroinfiltración se llevaron a cabo según el protocolo citado por Wroblewski *et al.*, 2005.

Los cultivos de *A. tumefaciens* se crecieron bajo las condiciones citadas en el punto 3.2.1. Los antibióticos rifampicina (100 µg/mL) y gentamicina (50 µg/mL) fueron agregados a todos los cultivos de *A. tumefaciens*. Además se agregaron a los cultivos los antibióticos correspondientes a los plásmidos binarios con los cuales habían sido transformadas previamente las bacterias. Al día siguiente se largaron cultivos frescos de 20 mL, inoculando 2 mL (dilución 1:10) del cultivo crecido durante toda. Se los dejó creciendo durante 5 horas a 28°C en agitación hasta que la D.O._{600nm} estuviese entre 0,6 y 1,2. Una vez crecidos los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min y luego

se los resuspendió en agua dionizada de manera tal que la D.O._{600nm} final fuese de 1. Para las coagrofiltraciones se combinaron los diferentes cultivos de tal manera de obtener densidades ópticas específicas para cada construcción según el experimento realizado.

Las infiltraciones se hicieron según el protocolo descrito por Schob *et al.*, 1997. Este consiste en la infiltración con una jeringa sin aguja de las suspensiones bacterianas mediante la aplicación de una presión contra la parte abaxial de la hoja. En estos experimentos se usaron hojas jóvenes que estuvieran ampliamente expandidas (tercera a quinta hoja). Las plantas fueron mantenidas en las condiciones descritas en el punto 1.

11. Ensayos de bombardeo por biobalística.

Para los ensayos de biobalística se utilizaron hojas plenamente expandidas de *Nicotiana benthamiana*. Las hojas fueron bombardeadas con los respectivos plásmidos o mezcla de los mismos usando el sistema "Gene Gun" PDS 1000/He (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Para preparar las "bullets" se siguieron las indicaciones del proveedor. Se pesaron 6 mg de partículas de oro de 1 μm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) por cada "bullet" y se las colocó en un tubo *ependorf* de 1,5 mL. Se agregó 100 μL de espermidina 0,05M a las partículas de oro y se las sonicó por 20 segundos. Luego se adicionó el ADN (20 μg de cada plásmido) y se vorteoó la suspensión por 30 segundos. Posteriormente se agregó gota a gota 100 μL de CaCl_2 1M y se dejó a temperatura ambiente por 10 min para que precipite el ADN. Pasado los 10 min se realizaron 3 lavados con etanol 100% y finalmente se resuspendió la mezcla ADN/oro con 1 mL de PVP/Etanol (7,5 μL of 20mg/mL PVP stock más 3.5 mL de etanol 100%).

A continuación se preparó el tubo (Cartridge Tubing, BioRad) a partir del cual se producen las "bullets". Para esto se cortó 30 pulgadas de tubo y se lo dejó secar en la estación de tubo con gas de N_2 (0,4 de presión) por un mínimo de 20 min. Transcurrido ese tiempo se apagó el N_2 en la estación de la tubería y se removi6 el tubo seco. Este mismo se conect6 a una jeringa de 10 mL y se fue aspirando la suspensión oro/PVP lentamente para evitar burbujas (se dej6 4 cm libres de ambos extremos del tubo).

Luego con el tubo todavía unido a la jeringa, se llenó con la suspensión de oro/PVP y se colocó cuidadosamente el tubo en la estación. Se dejó reposar el oro por 5 min con la jeringa acoplada. Luego, se fue succionando lentamente la solución. Se desconectó la jeringa, se encendió el N₂ (la válvula debe estar entre 0,4 y 0,5 LPM) y se giró el tubo recubierto de oro por 5 min para su secado. Finalmente se retiró el tubo y se lo cortó generando las “bullets” de unos 2 cm de largo.

Para el bombardeo se cargaron las “bullets” en la “Gene Gun” PDS 1000/He. Se conectó la pistola en la manguera conectada al tanque de gas helio y se seteó la presión del tanque a 180 PSI. Finalmente se disparó al tejido con el difusor de 0,5 a una distancia de 1,5 cm. Luego de los disparos, las plantas se mantuvieron por 5 dpi en las condiciones mencionadas en el punto 1.

12. Tinción histoquímica de hojas con el sustrato X-Gluc.

Las hojas previamente bombardeadas, con el plásmido PVX.GUSΔTGBp1 o con una combinación del mismo con las diferentes mutantes de TGBp1 se tiñeron con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-ácido glucurónico (X-Gluc) con el fin de detectar la actividad de la enzima GUS. Para esto se cortaron las hojas bombardeadas y se las infiltró por vacío con una solución de trabajo (10 mM EDTA, 0,5 mM K₃ (FeCN)₆, 0,5 mM K₄ (FeCN)₆ y 1,2 mM 5-bromo-4-cloro-3-indoxlyl-β-D-glucuronidasa ciclohexylamonio (X-Gluc) (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)) y se las dejó incubando durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se procedió a desteñirlas con sucesivos lavados con alcohol 95% por 10 min. Los focos de infección fueron capturados usando una cámara Optronics Magnafire (Intelligent Imaging Innovations, Inc., Denver, CO) acoplada a un microscopio Nikon E600.

13. Visualización de GFP.

La detección visual de GFP en las plantas agroinfiltradas se hizo usando una lámpara UV (Black Ray B-100AP, UVP). Las hojas fueron fotografiadas con una cámara digital montada con filtro UV. Las imágenes fueron procesadas con el programa Adobe Photoshop.

14. Microscopía de Epifluorescencia y Confocal.

En los ensayos donde se estudió la actividad de apertura de los plasmodesmos (“gating”) de TGBp1 y sus fosfomutantes se utilizó un microscopio de epifluorescencia Nikon E600. Para la captura de las imágenes se utilizó una cámara Optronics Magnafire (Intelligent Imaging Innovations, Inc.) acoplada a dicho microscopio.

Para los experimentos de localización subcelular de TGBp1 se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP2 acoplado al software LCS Lite Leica. La puesta a punto de los láseres y de los parámetros para la visualización de las imágenes se basó en Brandizzi *et al.*, 2002. Este mismo microscopio también se utilizó para la caracterización de las localizaciones subcelulares de los dominios N- y C-terminal de TGBp1 de PVX. Las imágenes donde se analizó la colocalización de proteínas fusionadas a GFP y a RFP se generaron usando el programa Image J.

15. Ensayos con inhibidores del proteosoma.

Para los ensayos con el inhibidor del proteosoma se infiltraron plantas *N. benthamiana* (ver punto 10) con cultivos de *A. tumefaciens* transformadas con las respectivas construcciones junto con el inhibidor MG132 (Fermentas). El inhibidor fue disuelto en DMSO 0,1% y agregado a los cultivos de *Agrobacterium* a una concentración final de 50 μ M y 500 μ M. A las 48 horas se tomaron muestras de las hojas infiltradas, se procesaron y se analizaron por *Western blot*. Teniendo en cuenta que el inhibidor MG132 es un compuesto que se degrada rápidamente, se realizó también otra estrategia de estudio. La misma consistió en primero infiltrar el cultivo de *A. tumefaciens* transformado con la construcción que expresa la proteína a estudiar. Transcurridos los 2 d.p.i se infiltró el inhibidor a una concentración de 50 μ M. Luego de 8 y 24 horas, respectivamente, se recolectó tejido foliar de las hojas agroinfiltradas y se extrajeron proteínas totales para evaluar la acumulación de las proteínas mediante análisis de *Western blot*.

16. Ensayos de doble híbrido por el sistema “Split-Ubiquitin”.

Los ensayos de doble híbrido se realizaron según Deslandes *et al.*, 2003.

16.1 Selección de interacciones positivas por doble híbrido en levaduras.

Se picaron 3 colonias independientes de levaduras cotransformadas con los plásmidos pMKZ (carnada) y NUI (presa), conteniendo las proteínas X e Y respectivamente, de la placa de transformación (SC His-Trp-). Estas tres colonias se las estriaron en una nueva placa SC His-Trp- (placa maestra) y se las incubó durante 48 hs a 30°C para luego proceder a evaluar la activación de los genes reporteros.

16.2 Ensayo en placa con 5'FOA: "screening" de interacción.

Se crecieron las diferentes colonias transformadas en 1 mL de medio SC His-Trp- durante toda la noche a 30°C en tubos falcons de 15 mL con agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se agregó nuevo medio hasta completar un volumen de 5 mL y se los dejó creciendo durante 5 horas. Una vez transcurrido el tiempo se midió la D.O._{600nm} de cada cultivo de levaduras, se pelletearon a 4000 rpm por 3 min y se resuspendieron en agua estéril hasta una D.O._{600nm} final de 1. Luego se procedió a hacer diluciones seriadas de cada cultivo (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) y se plaqueó 20 μ L de cada una en placas con medio sólido SC His-Trp- que contenían 1 mg/mL de 5'FOA (ácido 5-fluoroorótico, Fermentas). Las placas se dejaron en estufa a 30°C por 4 días.

17. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias.

El plásmido de expresión pDEST15-StREM1.3 fue transformado por electroporación en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) utilizando los procedimientos previamente descritos (ver punto 3.1.3). Se inocularon 300 mL de medio LB con 3 mL de un cultivo saturado de bacterias transformadas crecidas previamente a 37°C. Se incubó el cultivo hasta alcanzar una D.O._{600nm} = 0,6-0,8 (aproximadamente 3 hs). Pasado ese tiempo se tomó una muestra de 1 mL del cultivo no inducido y luego se adicionó al cultivo madre IPTG (Fermentas) a una concentración final de 1 mM. El cultivo se incubó a 37°C con agitación durante 4 hs. Al finalizar las 4 hs de incubación,

se tomaron nuevamente muestras de 1 mL. Las muestras de 1 mL del cultivo no inducido e inducido se cosecharon a 4.500 rpm durante 5 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 200 µl de *buffer* de siembra de proteínas 5X (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,5% SDS, 5% glicerol, 1% v/v β-mercaptoetanol, 0,05 mg/mL azul de bromofenol) y se guardó a -20°C para su posterior análisis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

18. Ensayos de “Pull down”.

18.1 Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST.

Inducido el cultivo, se procedió a la purificación de la proteína recombinante. Se centrifugó los 300 mL de cultivo inducido a 9000 rpm por 15 min a 4°C. Luego se resuspendió el pellet de bacterias con 50 mL de *buffer* de lisis (TBS pH 7,4, 20mM β-mercaptoetanol, 1 M PMSF, 0,2 g/L lisozima y coctel de inhibidores de proteasas (Roche)) y se dejó actuar la lisozima por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron sonicadas 15 veces con pulsos de 30 seg a una amplitud de 80% en hielo. Una vez terminados los ciclos de sonicación se agregó Tritón a una concentración final de 1%. El lisado de células se centrifugó a 9000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se incubó durante toda la noche a 4°C con 1 mL de resina de Sefarosa conjugada a glutatión (Glutathione Sepharose High Performance, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con *buffer* de lisis. Al día siguiente se centrifugó a 4000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* de resina se lavó con 50 mL de *buffer* de lisis por 10 min a 4°C. El lavado de la resina se repitió dos veces con volúmenes de 50 y 15 mL respectivamente. Finalmente la resina se resuspendió en 1 mL de *buffer* de lisis y se guardó a 4°C para su posterior utilización. En cada uno de los pasos (percolado y lavados), se tomó una alícuota de 40 µL para analizar el perfil de la purificación por SDS-PAGE y tinción con Coomasie Blue.

18.2 Preparación de los extractos de proteínas.

Se infiltraron (ver punto 10) tres hojas de *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las construcciones que expresan las proteínas en

estudio fusionadas a GFP. A los 3 d.p.i. se procesaron las hojas inoculadas con N₂ líquido. Las proteínas fueron extraídas agregando 4 mL de *buffer* de extracción (50mM TrisHCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1% TX100, 5 mM β-mercaptoetanol, 2,5 mM Na ortovanadato, 10 mM NaF y coctel de inhibidores de proteasas (Roche). El homogenato de plantas fue filtrado con un filtro Miracloth y centrifugado a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para los ensayos de interacción con la proteína purificada GST-StREM1.3 (ver punto 18.1). De estos sobrenadantes se tomó una muestra de 40 μL y se les agregó 40 μL de *buffer* de siembra de proteínas 5X para evaluar por *Western blot* la eficiencia de la extracción y la cantidad de proteínas con el que se empieza el ensayo de “pull down”.

18.3 Ensayos de interacción.

En los ensayos de interacción se incubó 1 mL de extractos de plantas obtenidos en el punto 18.2 con 20 μL de la resina pre incubada con la GST-StREM1.3, o con 20 μL de resina sin pre incubar, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 1000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. La resina fue lavada con 1mL de *buffer* de extracción por 5 min a 4°C. Se realizaron tres lavados. Finalmente, se agregó a cada tubo 20 μL de *buffer* de siembra 5X para evaluar por *Western blot* la interacción entre proteínas.

19. Análisis de ARN.

19.1 Extracción de ARN total de plantas.

La extracción de ARN total se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Kreuze *et al.*, 2005.

Se procesó 1 gramo de tejido vegetal con N₂ en un mortero. Al tejido macerado se le agregó 1 mL de TRIzol LS Reagent (Invitrogen Life Technologies) y se lo dejó a temperatura ambiente por 5 min. El macerado se transfirió a un tubo *ependorf* de 2 mL y se centrifugó 10 min a 13.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo

ependorf limpio, se le agregó 400 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 seg y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Luego los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C por 15 min separando la fase acuosa de la fase orgánica. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo *ependorf* y se le agregó 600 µL de isopropanol para luego centrifugarla a 13.000 rpm por 20 min a 4°C. Se lavaron los “pellets” con EtOH 70% y se centrifugaron a 13.000 rpm por 5 min a 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió el precipitado en 100 µL de agua libre estéril. Para verificar el resultado de la extracción se corrieron geles de agarosa 1% conteniendo 0,5 µg/mL de bromuro de etidio libre de ARNasas. Se sembró 1 µl de muestra más 1 µl de *buffer* de siembra 10X libre de ARNasas (50% glicerol, 10mM EDTA, 0.25% BPB) más agua estéril hasta completar un volumen de 10 µl.

19.2 Ensayos de Northern Blot.

19.2.1 Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes.

Se prepararon geles de agarosa 1.5% conteniendo formaldehído 4,5% y *buffer* MOPS 10X (0,2M MOPS, 50mM NaAcO y 10mM EDTA, pH 7). Las muestras de ARN se prepararon con *buffer* de siembra 2X (65% formamida, 13% MOPS 10X, 20% formaldehído, 0,25% BPB, 1,3% de bromuro de etidio). Luego se calentaron 10 min a 100°C y se incubaron 2 min en hielo. Se sembraron 10 µg de cada muestra. El *buffer* de corrida utilizado fue 10% MOPS 10X, 18% formaldehído. El gel se corrió a 100V y posteriormente fue fotografiado utilizando luz UV de 365 nm en un transiluminador *Multi Genius Bio Imaging System* (Syngene).

Una vez terminada la separación, el gel se lavó con agua desionizada y se transfirió a una membrana de Nylon (Hybond N⁺, Amersham) utilizando el sistema por capilaridad durante toda la noche. Al día siguiente, el ARN se fijó a la membrana por exposición a radiación UV (Crossliker, Stratagene). La membrana se guardó a temperatura ambiente hasta la hibridación.

19.2.2 Preparación de los moldes para sondas de ADN.

Sonda GFP: la secuencia de GFP se liberó del plásmido pGEM-T-GFP5 por digestión con las enzimas de restricción *Apal* y *SmaI*. Los productos de reacción se corrieron en un gel de agarosa 1% y se purificó el fragmento de 650 pb (ver punto 6.2.2).

Sonda TGBp1: la secuencia de TGBp1 se amplificó por PCR con iniciadores específicos. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1% y se purificó el fragmento de 650 pb (ver punto 6.2.2).

19.2.3 Marcación de sondas por iniciación al azar de la polimerización.

Se utilizó el kit comercial *Prime-a-Gene* (Promega) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Se desnaturalizó el ADN calentándolo 5 min a 100°C. Luego se lo colocó en hielo. La reacción de marcación se realizó a temperatura ambiente durante 1h, en un volumen final de 50 µL conteniendo 30 ng de ADN desnaturalizado, el *buffer* de reacción 1X, 400 µg/mL BSA, dNTPs (dATP, dGTP y dTTP, 20 µM cada uno), 50µCi [C-³²P]-dCTP y 5 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa. La reacción se detuvo agregando EDTA 0,5M. Antes de agregar la sonda a la solución de hibridación, ésta se calentó 10 min a 100°C.

19.2.4 Hibridación.

La hibridación se realizó en hornos de hibridación rotatorios. Las membranas se colocaron en un tubo de hibridación y se pre-hibridaron con *buffer* Church (7% SDS, 1% BSA, 0,5M NaHPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA pH8) a 65°C durante 2hs. Luego, se agregó a la solución la sonda desnaturalizada y se incubó a 65°C durante toda la noche. Al día siguiente se le realizaron tres lavados: 1) 15 min a temperatura ambiente con solución 2X SSC + 0,1% SDS, 2) 15min a 65°C con solución 2X SSC + 0,1% SDS, y 3) 15 min a 65°C con solución 0,2X SSC + 0,1% SDS. Finalmente, las membranas se expusieron en placas radiográficas usando las películas Kodak BioMax XAR Film y una pantalla intensificadora a -70°C por períodos de tiempo variables. Las membranas también se analizaron en un “*phosphoimager*” (phosphoimager Storm 820, Amersham) con el programa image Quant5.2. Para re-hibridar las membranas, se eliminó la sonda unida

(*stripp-off*) calentando la membrana en una solución de SDS 0,1% a 100°C. Se dejó en dicha solución hasta que la misma llegara a temperatura ambiente.

19.3 Detección de ARN pequeños.

19.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Se prepararon geles (14 cm x 16 cm ó 10 cm x 12 cm) de poliacrilamida 18% conteniendo *buffer* TBE 1X (10mM EDTA, 90 mM Tris-base, 90 mM ácido bórico, pH 8) y 42% de urea. Las muestras de ARN (10 µg) se prepararon con *buffer* de siembra 10X (90 mM Tris-HCl pH 8, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, 7 M urea, 12% ficoll, 0,01% BPB, 0,02% xylene cyanol). Luego se calentaron 10 min a 100°C y se incubaron 5 min en hielo. El gel se pre-corrió 30 min a 200V. Luego las muestras se sembraron y se corrieron 30 min a 100V y después 4 hs a 250V.

19.3.2 Ensayos de Northern blot de ARN pequeños.

El *Northern blot* de los ARN de bajo peso molecular se realizó siguiendo el protocolo descrito por Kreuze *et al.*, 2005.

Las muestras de ARN se corrieron en geles de poliacrilamida 18% preparados según se explicó en el punto 19.3.1. El gel fue corrido en *buffer* TBE 1X. Una vez terminada la corrida, el gel se lavó con SSC 10X (30 mM citrato de sodio, 0,3 M NaCl) y se transfirió en SSC 10X a una membrana de Nylon (Hybond N⁺, Amersham) utilizando el sistema por capilaridad durante toda la noche. Al día siguiente, el ARN se fijó a la membrana por exposición a radiación UV (Crossliker, Stratagene). La membrana se guardó a temperatura ambiente hasta la hibridación.

19.3.3 Preparación de los moldes para sondas de ARN.

Sonda GFP: se linealizó el plásmido pGEM-T-GFP5 con la enzima *Clal*. Se agregó 1 µL de proteinasa K (Fermentas) y se incubó 30 min a 37°C. Se agregaron 350 µL de H₂O destilada y se realizaron 2 extracciones con fenol/cloroformo. Luego se agregaron 0,3

volúmenes de NH₄AcO 6 M y 2,5 volúmenes de etanol. Se incubó toda la noche a -20°C y posteriormente se centrifugó 15 min a 13.000 x g. Finalmente, se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70% y se resuspendió en H₂O destilada.

Sonda microARN-168: oligonucleótido (Invitrogen) de 21 nucleótidos que corresponde a la secuencia complementaria del microARN-168. Su secuencia es 5'TTCCCGACCTGCACCAAGCGA3'.

19.3.4 Marcación de sonda para detección de siARN.

Las sondas utilizadas para la detección de ARNs pequeños se prepararon mediante transcripción *in vitro* con la enzima ARN polimerasa del fago T7 (*Riboprobe in vitro transcription systems*; Promega). Se mezcló 0,2-1 mg de fragmento molde con 4 µL de *buffer* 5X; 2 µL de DTT 100 mM; 1 µL de RNAsin 40 U/µL; 3 µL de una solución de rATP-rCTP-rGTP de 2,5 mM cada uno; 1 µL de rUTP 240 µM; 5 µL 5' [α ³²P]rUTP (10 mCi/mL) 150 µCi con actividad específica de 3.000 Ci/mmol; 1,5 µL T7 ARN polimerasa 18 U/µL; en un volumen final de 20 µL. Esta mezcla se incubó durante 1 h a 37°C y luego se la utilizó en la hibridación.

19.3.5 Marcación de sonda para detección de microARN.

Se utilizó oligonucleótidos marcados para la detección de los microARNs. La reacción de marcación se realizó a 37°C durante 1h, en un volumen final de 20 µl conteniendo 30 pmoles del oligonucleótido elegido (Invitrogen), *buffer* de reacción 1X, 50 µCi [γ-³²P]-dATP y 5U de la polinucleótido quinasa (Promega). La reacción se detuvo calentando por 10 min a 68°C. Luego los oligos marcados fueron purificados utilizando columnas de shepadex (MicroSpin™ G-25 Columns, Amersham).

19.3.6 Hibridación.

La hibridación se realizó en hornos de hibridación rotatorios. Las membranas se colocaron en un tubo de hibridación y se pre-hibridaron con el *buffer* comercial

“Perfect HybPlus” (Sigma-Aldrich) a 40°C durante 2hs. Luego, se agregó a la solución la sonda y se incubó a 40°C durante toda la noche. Al día siguiente, se le realizaron tres lavados de 15 min con la solución de lavado (SSPE 3X, 5% SDS). Finalmente, las membranas se expusieron en placas radiográficas usando las películas Kodak BioMax XAR Film y una pantalla intensificadora a –70°C por períodos de tiempo variables. Las membranas también se analizaron en un “*phosphoimager*” (phosphoimager Storm 820, Amersham) con el programa image Quant5.2.

20. Análisis de Proteínas.

20.1 Extracción de proteínas totales de plantas.

Se procesaron y homogeneizaron 2 - 3 discos de tejido vegetal con 150 µL de *buffer* de siembra de proteínas 5X. Para los ensayos de *Western blot*, se centrifugó el extracto a 13.000 rpm por 2 min y se sembraron entre 5-20 µL de la muestra, dependiendo el ensayo, en geles de poliacrilamida 15%.

20.2 Electroforesis y transferencia de proteínas.

20.2.1 Geles de poliacrilamida-SDS PAGE.

Se prepararon geles desnaturizantes de poliacrilamida de 10 x 10 cm y de 1 ó 1,5 mm de espesor, utilizando el sistema armador SE 260 *Mini Vertical Unit* Hoeffler (Amersham Biosciences) o *Mini Protean III* (BioRad). Los mismos fueron preparados de la siguiente manera: para un volumen de 10 mL de gel separador se colocó 4 mL de agua, 3.3 mL de acrilamida 30% (acrilamida 29,2: bisacrilamida 0,8), 2,5 mL Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 100 µL de SDS 10%, 100 µL de persulfato de amonio 10% y 8 µL de TEMED. Para un volumen de 5 mL de gel concentrador se colocó 3,4 mL de agua, 830 µL de acrilamida 30%, 1 mL de Tri-HCl 1M pH 6,8, 75 µL de SDS 10%, 75 µL de persulfato de amonio 10% y 10µL de TEMED. Las muestras se prepararon en *buffer* de siembra 5X y se calentaron a 100°C durante 5 min para desnaturizar totalmente las proteínas. La

electroforesis se realizó a 100-180 V constantes en *buffer* Tris-Glicina (25 mM Tris-HCl pH 8,8; 190 mM glicina; 0,1% SDS).

20.2.2 Tinción con Coomassie Brilliant Blue.

Los geles se incubaron a 37°C durante 2 hs o durante toda la noche a temperatura ambiente en solución de tinción (0,05% Coomassie Brilliant Blue R250; 40% metanol; 10% ácido acético). Luego, esta solución se reemplazó por una solución de lavado (50% metanol; 10% ácido acético) y se incubó a temperatura ambiente. Se hicieron sucesivos lavados con dicha solución hasta desteñir el gel por completo. Para acelerar este proceso, en ciertas ocasiones, los lavados se realizaron en un microondas a máxima potencia por 1 min.

20.2.3 Transferencia de proteínas.

Se utilizó el sistema de transferencia para geles pequeños “Mini Trans-Blot™” (BioRad). Los geles se sumergieron en *buffer* de transferencia (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 196 mM glicina, 20% metanol). La membrana de nitrocelulosa (Hybond C-Extra, GE Healthcare Life Science, USA) del tamaño del gel se hidrató 10 min en el mismo *buffer*. El “cassette” de transferencia se armó de la siguiente manera: una esponja tipo Scotch Brite (BioRad), una hoja de papel de filtro, el gel, la membrana, otro papel de filtro y otra esponja. Todo esto se ensambló en el cartucho de transferencia y se colocó dentro de la cuba de electrotransferencia (BioRad), que luego se llenó con *buffer* de transferencia. La transferencia se llevó a cabo a 100V durante una hora. 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 transferencia. 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.

20.3 Tinción con Ponceau.

Una vez transferidas las membranas de proteínas las mismas fueron teñidas con solución de Rojo Ponceau (650mM rojo Ponceau, 1% ácido acético) para corroborar que la transferencia haya sido correcta.

21. Ensayos de Western Blot.

Las membranas transferidas se incubaron en solución de bloqueo (TTBS [TBS (100mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl) y 0,1% Tween 20] + 3% de leche descremada en polvo) durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se agregó el primer anticuerpo diluido en solución de bloqueo y se lo incubó 1 h a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados de 10 min con TTBS y al finalizar el último, se agregó el segundo anticuerpo comercial diluido en solución de bloqueo. Finalmente, se hicieron 2 lavados de 10 min con TTBS y 1 lavado de 5 min con TBS. Finalizados los lavados se procedió a revelar las membranas con unos de los dos sistemas de revelado.

21.1 Anticuerpos utilizados.

- IgG de conejo anti-cápside (anti-CP) de PVX. Dilución de uso: 1/1000.
- IgG de conejo anti-TGBp1 de PVX. Dilución de uso: 1/500
- IgG de conejo anti-GFP. Dilución de uso: 1/3000 o 1/10.000
- IgG de conejo anti-remorina (anti-REM) de *Solanum tuberosum*. Dilución de uso: 1/500.
- Anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (AP). Dilución de uso: 1/4.000 (NEN Life Science).
- Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). Dilución de uso: 1/4.000 (NEN Life Science).

Todos los anticuerpos, excepto el anti-REM, fueron diluidos en solución de bloqueo TTBS + 3% de leche. El anticuerpo anti-REM fue diluido directamente en TBS.

21.2 Revelado con sustrato cromogénico: NBT/BCIP.

Las membranas incubadas con los anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina (AP) se revelaron utilizando los sustratos NBT (*Nitroblue tetrazolium*, Sigma-Aldrich) y BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato, Sigma-Aldrich). Luego de los lavados finales, las membranas se incubaron durante 10 min en *buffer* fosfatasa (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). Posteriormente, cada membrana se incubó en 10 mL de *buffer* fosfatasa conteniendo 100 µL de BCIP (30 mg/mL en dimetilformamida 100%) y 100 µL de NBT (50 mg/mL, en dimetilformamida 70%) en oscuridad. La reacción se retuvo removiendo la solución de revelado y agregando H₂O destilada.

21.3 Revelado por quimioluminiscencia.

Los anticuerpos conjugados a peroxidasa (HRP) se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema casero de ECL. Las membranas fueron incubadas con la solución de quimioluminiscencia [500 µL de 1 mM Tris-HCl pH 8, 500 µL de solución de revelado (110 µL solución *enhancer* (9 mg de ácido p-cumárico en 625 µL DMSO) + 25 mL de luminol (11mg de luminol en 25 mL de 1 mM Tris-HCl pH 8), 2% H₂O₂ 30 volúmenes] durante 3 min. Las membranas tratadas se expusieron en oscuridad durante tiempos que variaron entre 1-15 min con películas radiográficas Kodak X-Omat (Kodak). Luego las placas fueron reveladas en la máquina reveladora con las soluciones Revelador/Fijador READYMATIC (Kodak).

22. Medios de cultivo y soluciones.

- LB (peptona de carne 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L)
- LB agar (LB, 2% agar)
- *Buffer* de transformación TFBI estéril pH 5,8 (30 mM KAc, 100 mM KCl, 10mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂ y 15% glicerol)
- *Buffer* de transformación TFBII estéril pH 6,5 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl y 15% glicerol)

- YPD (10g/L extracto de levaduras, 20 g/L bacto-peptona, 2g/L glucosa)
- YPD agar (YPD, 15g/L bacto-agar)
- AcLi/TE 10X (20X AcLi: 2M AcLi, pH 7.5, 20X TE: 0.2 M Tris-Cl, 20 mM EDTA pH 7.5)
- Solución de resuspensión (25mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA, 100µg/mL ARNsA)
- Solución de lisis (0,2 N NaOH, 1% SDS)
- Solución de neutralización (3 M acetato de potasio pH 5,5)
- *Buffer* TE 1X pH 8 (10mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA)
- TAE 10x (400 mM Tris-ácido acético , 10 mM EDTA disódico)
- TAE 1x (40 mM Tris-ácido acético pH 8, 2 mM EDTA disódico)
- *Buffer* de siembra de ADN (5 %glicerol, 0,1 % azul de bromofenol)
- Solución de tinción de GUS (10 mM EDTA, 0,5 mM K₃ FeCN₆, 0,5 mM K₄ (FeCN)₆ y 1,2 mM 5-bromo-4-cloro-3-indoxyl-β-D-glucuronidasa ciclohexylamonio (X-Gluc)
- Medio SC His- Trp- (6,7g/L extracto base de levaduras, 0,72g/L “drop out” His-Trp- , 20g/L glucosa, 20g/L agar)
- *Buffer* de lisis de bacterias (TBS pH 7,4, 20mM β-mercaptoetanol, 1 M PMSF, 0,2 g/L lisozima y coctel de inhibidores de proteasas (Roche))
- *Buffer* de extracción de proteínas (50mM TrisHCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1% TX100, 5 mM β-mercaptoetanol, 2,5 mM Na ortovanadato, 10 mM NaF y coctel de inhibidores de proteasas (Roche))
- MOPS 1X (MOPS 10X: 0,2 M MOPS, 0,05 M acetato de sodio, 0,01 M EDTA disódico, pH 7)
- *Buffer* de siembra de ARN 2X (65% formamida, 13% MOPS 10X, 20% formaldehído, 0,25% BPB, 1,3% de bromuro de etidio)
- *Buffer* de siembra de ARN pequeños 10X (90 mM Tris-HCl pH 8, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, 7 M urea, 12% ficoll, 0,01% BPB, 0,02% xylene cyanol).
- SSC 10X (1,5 M NaCl, 0,15 M citrato de sodio pH 7)
- *Buffer* Church (7% SDS, 1% BSA, 0,5 M NaHPO₄ pH7,2, 1mM EDTA pH8)

- *Buffer* de siembra de proteínas 5X (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,5% SDS, 5% glicerol, 1% v/v β -mercaptoetanol, 0,05 mg/mL azul de bromofenol)
- *Buffer* de corrida SDS-PAGE (25 mM Tris-HCl pH 8,8; 190 mM glicina y 0,1% SDS)
- Solución de *Coomasie Brilliant Blue* (0,05% CBB R250, 40% metanol, 10% ácido acético)
- *Buffer* de transferencia (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 196 mM glicina, 20% metanol)
- *Buffer* TTBS (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20)
- *Buffer* TBS (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl)
- *Buffer* fosfatasa (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$)
- TBE 1X (10 mM EDTA, 90 mM Tris-base, 90 mM ácido bórico, pH 8)

Resultados y Discusión

Capítulo I

Estudio del rol de la fosforilación sobre las funciones de la proteína de movimiento TGBp1 de PVX

1. Estudio del efecto de las fosfomutantes T193 y T214 de TGBp1 sobre la movilización célula a célula de PVX.

Como se mencionó en la *Introducción*, resultados previos de nuestro laboratorio señalaron que tanto la simulación de la fosforilación, como las modificaciones que impiden la fosforilación de los residuos T193 y T214 de la proteína TGBp1 afectan negativamente el ciclo de infección del virus PVX (Módena, 2011). Esto sugiere que el balance dinámico entre las formas de TGBp1 fosforiladas y no fosforiladas es crucial para mantener la capacidad infectiva del virus.

Sabiendo que la proteína TGBp1 es indispensable para el transporte de las partículas virales a través del plasmodesmo, se decidió estudiar inicialmente el efecto de las mutaciones que simulan o impiden la fosforilación de los residuos T193 y T214 de TGBp1 sobre la movilización célula a célula de PVX. Para este fin se llevaron a cabo ensayos de transcomplementación de un virus PVX defectivo para la proteína TGBp1 (PVX.GUSΔTGBp1), con las proteínas TGBp1s mutagenizadas. El vector PVX.GUSΔTGBp1 permite la expresión de una copia del genoma de PVX a partir del promotor 35S del *Cauliflower mosaic virus* (35S CaMV) (Verchot *et al.*, 1998). La copia del genoma de PVX del vector PVX.GUSΔTGBp1 posee una delección de 357 nucleótidos dentro de la secuencia codificante de TGBp1. Esta delección lleva a la producción de una proteína TGBp1 truncada, la cual es defectiva en el transporte de viriones a través del plasmodesmo. A su vez, el vector PVX.GUSΔTGBp1 permite la expresión del gen reportero *uidA*, que codifica la enzima β-glucuronidasa (GUS), a partir del promotor subgenómico duplicado de la cápside (Chapman *et al.*, 1992). Cuando esta construcción es bombardeada con un cañón génico en hojas de *N. benthamiana* produce el virión defectivo PVX.GUSΔTGBp1 que es capaz de replicar pero no de moverse más allá de la célula de entrada. Por esta razón, luego de la tinción histoquímica de las hojas bombardeadas para revelar la expresión del gen reportero, sólo es posible observar al microscopio células aisladas (**Figura 4 a**). El movimiento

célula a célula de PVX.GUSΔTGBp1 puede ser restaurado al cobombardear este vector con un vector que expresa la propia TGBp1 (Morozov *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 2004). En este caso es posible observar al microscopio grupos de células teñidas como resultado de la movilización del virus PVX.GUSΔTGBp1 hacia las células vecinas (**Figura 4 b**).

1.1 Clonado de TGBp1 y las fosfomutantes T193 y T214 en el vector binario pK7WG2D para su expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*.

Como primer paso para la realización de los ensayos de transcomplementación, se llevó a cabo el clonado en el vector binario pK7WG2D de las secuencias codificantes correspondientes a las proteínas TGBp1 salvaje y a las TGBp1 mutadas en los sitios de fosforilación T193 y T214. Estas fosfomutantes fueron generadas previamente en nuestro laboratorio mediante mutagénesis dirigida, donde se reemplazaron los residuos treonina 193 y 214 por residuos de alanina (un aminoácido no fosforilable) y por residuos de ácido aspártico (un aminoácido que simula la carga negativa de la fosforilación), obteniéndose las fosfomutantes T193A, T193D, T214A y T214D, respectivamente. Tanto la secuencia codificante correspondiente a la TGBp1 salvaje como a las fosfomutantes fueron clonadas en el vector pET-28a (Módena, 2011). A partir de estos vectores se amplificaron por PCR las secuencias correspondientes a los ORFs de la TGBp1 salvaje y de las fosfomutantes T193 y T214 utilizando oligonucleótidos específicos que incluyen las secuencias de recombinación necesarias para el clonado por el sistema Gateway (**Figura 1**). Una vez obtenido los productos de PCR, éstos fueron recombinados junto con el vector pDONR, para dar origen a los vectores de entrada (pDONR-TGBp1, pDONR-T193A, pDONR-T193D, pDONR-T214A y pDONR-T214D). Luego, los vectores de entrada junto con el correspondiente vector de destino fueron recombinados para dar origen a los diferentes vectores finales. Para el caso de los ensayos de transcomplementación del virus defectivo para TGBp1, el vector de destino fue un vector binario denominado pK7WG2D, el cual permite la expresión en plantas de las secuencias clonadas bajo la regulación del promotor constitutivo 35S del CaMV. Los vectores originados se denominaron: pK7WG2D-TGBp1

(TGBp1), pK7WG2D-T193A (T193A), pK7WG2D-T193D (T193D), pK7WG2D-T214A (T214A) y pK7WG2D-T214D (T214D) (**Figura 2**).

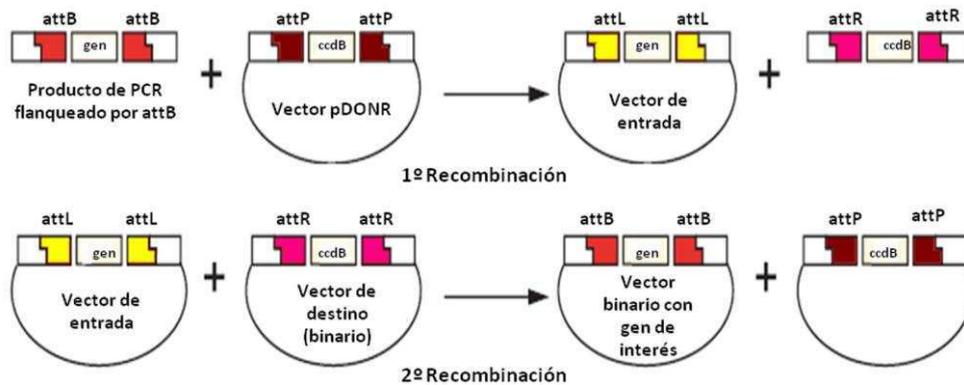


Figura 1. Esquema de clonado por sistema Gateway. Los productos de PCR flanqueados por los sitios *attB* son recombinados con el vector intermediario pDONR (*attP*) para dar origen al vector de entrada (*attL*). El vector de entrada luego es recombinado con el vector de destino (*attR*). *ccdB*: gen que codifica una proteína que inhibe a la ADN girasa de *E.coli*, permite seleccionar negativamente a los vectores intermediario y de destino luego de la recombinación.

1.2 Evaluación de la capacidad de las fosfomutantes T193 y T214 de TGBp1 de complementar el movimiento célula a célula de un PVX defectivo en esta función.

Para los ensayos de transcomplementación de la movilización célula a célula del virus defectivo, se cobombardearon hojas de *N. benthamiana* con la construcción PVX.GUSΔTGBp1 junto con los vectores binarios de la serie pK7WG2D que permiten la expresión de la TGBp1 salvaje y de sus versiones fosfomutantes (pK7WG2D-TGBp1, pK7WG2D-T193A, pK7WG2D-T193D, pK7WG2D-T214A y pK7WG2D-T214D) (**Figura 3**). Como control se bombardeó el vector PVX.GUSΔTGBp1 solo (**Figura 4 a**). Transcurridos 5 días postbombardeo (d.p.b.) se recolectaron las hojas bombardeadas y se realizó la tinción histoquímica con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-ácido glucurónico (X-Gluc) con el fin de detectar la actividad de la enzima GUS. Los focos de infección fueron observados utilizando un microscopio Nikon E600 y las imágenes

fueron capturadas usando una cámara Optronics Magnafire (Intelligent Imaging Innovations, Inc., Denver, CO) acoplada al mismo.

En la **Figura 4**, se presentan los resultados de la movilización de PVX.GUSΔTGBp1 en presencia de TGBp1 salvaje o en presencia de las diferentes fosfomutantes. Para la cuantificación de la complementación en el movimiento viral se midieron los diámetros correspondientes a los halos de movilización del PVX.GUSΔTGBp1 complementado con las diferentes fosfomutantes y se los analizó respecto al halo de movilización del PVX.GUSΔTGBp1 complementado con la TGBp1 salvaje. Para determinar la significancia de la capacidad de cada fosfomutante de complementar la movilización se midieron los diámetros de los halos y los mismos se analizaron respecto al de la TGBp1 salvaje por el test estadístico ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey.

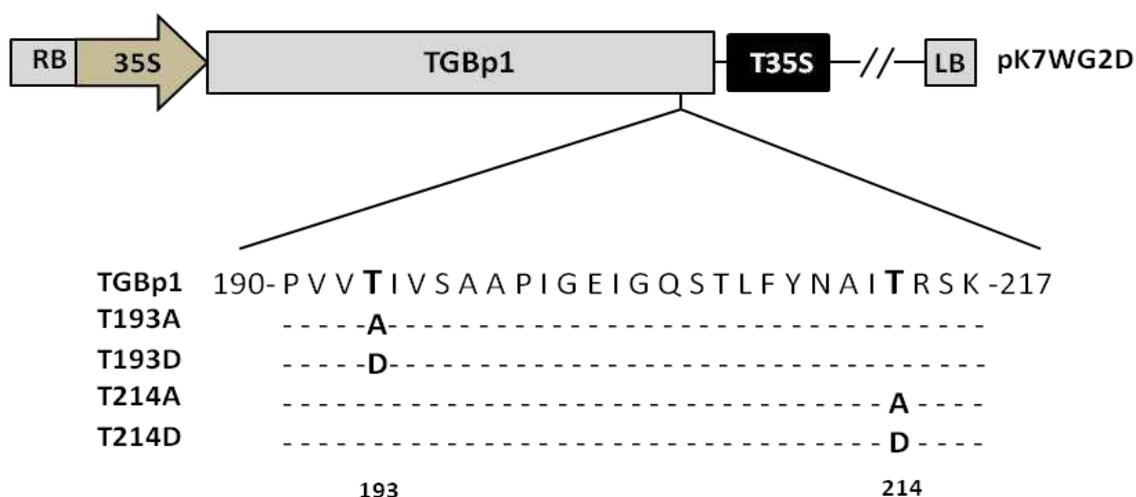


Figura 2. Representación esquemática de las construcciones que permiten la expresión de TGBp1 y de las fosfomutantes T193 y T214 en plantas. Se indica un fragmento de la secuencia aminoacídica de TGBp1 de PVX (residuos 190 – 217 de la secuencia proteica), y la posición de las mutaciones de reemplazo de residuos. El vector binario de destino fue el pK7WG2D. RB: borde derecho del ADN-T de *A. tumefaciens*, 35S: promotor 35S del CaMV, T35S: terminador 35S del CaMV, LB: borde izquierdo del ADN-T de *A. tumefaciens*. A: alanina; D: ácido aspártico.

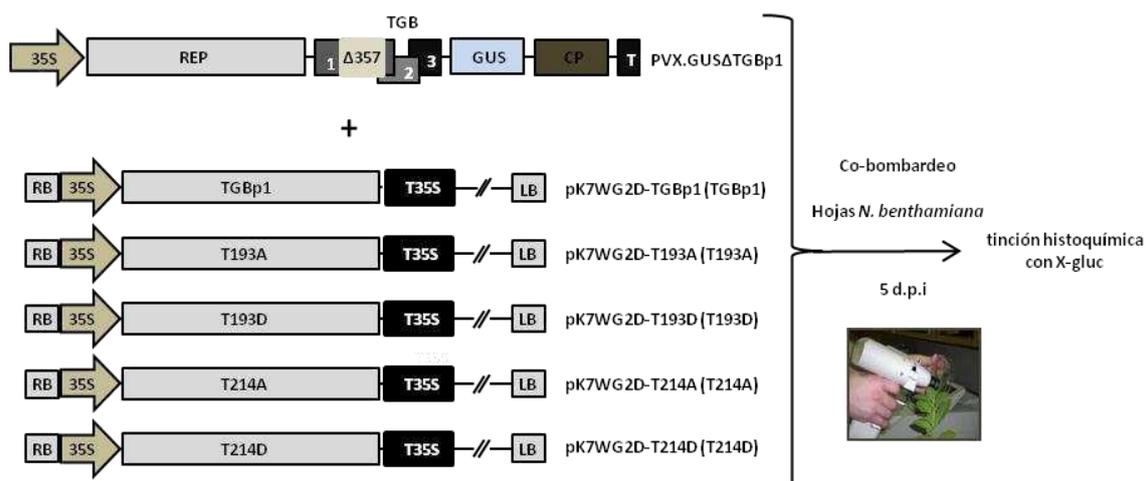


Figura 3. Esquema del procedimiento utilizado para la evaluación de la movilización célula a célula de PVX.GUSΔTGBp1 en ensayos de transcomplementación con la TGBp1 salvaje y con las fosfomutantes T193 y T214. En cada esquema se indica el nombre de la construcción utilizada correspondiente a la serie pK7WG2D. Se cobombardaron hojas de *N. benthamiana* con la construcción PVX.GUSΔTGBp1 y con cada uno de los vectores de la serie pK7WG2D que expresan la TGBp1 salvaje, la T193A, la T193D, la T214A y la T214D respectivamente. A los 5 d.p.b. se tiñeron histoquímicamente las hojas con el sustrato X-Gluc para detectar la actividad de GUS en las zonas de movilización viral. 35S: promotor 35S del CaMV, REP: replicasa viral, TGB: Triple Bloque de Genes, GUS: ORF de la β-glucuronidasa, CP: cápside viral, T: terminador transcripcional de la nopalina sintetasa (NOS), T35S: terminador transcripcional 35S del CaMV, RB: borde derecho del ADN-T de *A. tumefaciens*, LB: borde izquierdo del ADN-T de *A. tumefaciens*.

En las plantas bombardeadas con la construcción PVX.GUSΔTGBp1 sola, la actividad de GUS fue detectada en células aisladas, lo que se consideró como resultado negativo para la movilización viral (**Figura 4**, panel **a**). En las plantas cobombardadas con la construcción PVX.GUSΔTGBp1 y la TGBp1 salvaje o las diferentes fosfomutantes se obtuvieron grupos de células teñidas (focos de infección) que se consideraron como resultado positivo para la movilización viral (**Figura 4**, paneles **b**, **c**, **d**, **e** y **f**). Estos resultados demostraron que tanto la TGBp1 salvaje como las fosfomutantes fueron capaces de complementar la movilización de los viriones de PVX deficientes para dicha proteína. Sin embargo, el análisis estadístico de los diámetros de los halos de infección indicaron que la complementación de la movilización por las fosfomutantes fue en todos los casos significativamente menor que la de la TGBp1 salvaje (**Figura 4**, gráfico de barras). Al comparar la capacidad de complementar la movilización de las diferentes fosfomutantes entre sí se observaron diferencias entre las mutantes T193 y T214. El

análisis estadístico permitió determinar que la mutante T214D complementa significativamente mejor que la mutante T214A, mientras que no se observan diferencias significativas en la capacidad de las mutantes T193A y T193D de complementar la movilización viral (**Figura 4**, gráfico de barras).

En resumen, los resultados de estos experimentos demuestran que las modificaciones en las treoninas 193 y 214 resultan perjudiciales en todos los casos para la complementación de la movilización del PVX.GUSΔTGBp1. El hecho que tanto las mutantes que simulan la fosforilación como las que la impiden no sean funcionales sugiere que un balance dinámico entre las formas de TGBp1 fosforiladas y no fosforiladas es crucial para promover el movimiento viral.

Los resultados obtenidos sugieren que una o más funciones de TGBp1 se encuentran afectadas en las fosfomutantes estudiadas. Dentro de las funciones que podrían estar afectadas, y que son necesarias para la movilización viral, cabe mencionar la capacidad de promover la apertura de plasmodesmos, el movimiento célula a célula del complejo de movilización, y la supresión del silenciamiento génico mediado por ARN (Lough *et al.*, 1998; Howard *et al.*, 2004; Bayne *et al.*, 2005). Por otra parte, el efecto observado también podría estar dado por una menor acumulación de las proteínas mutantes.

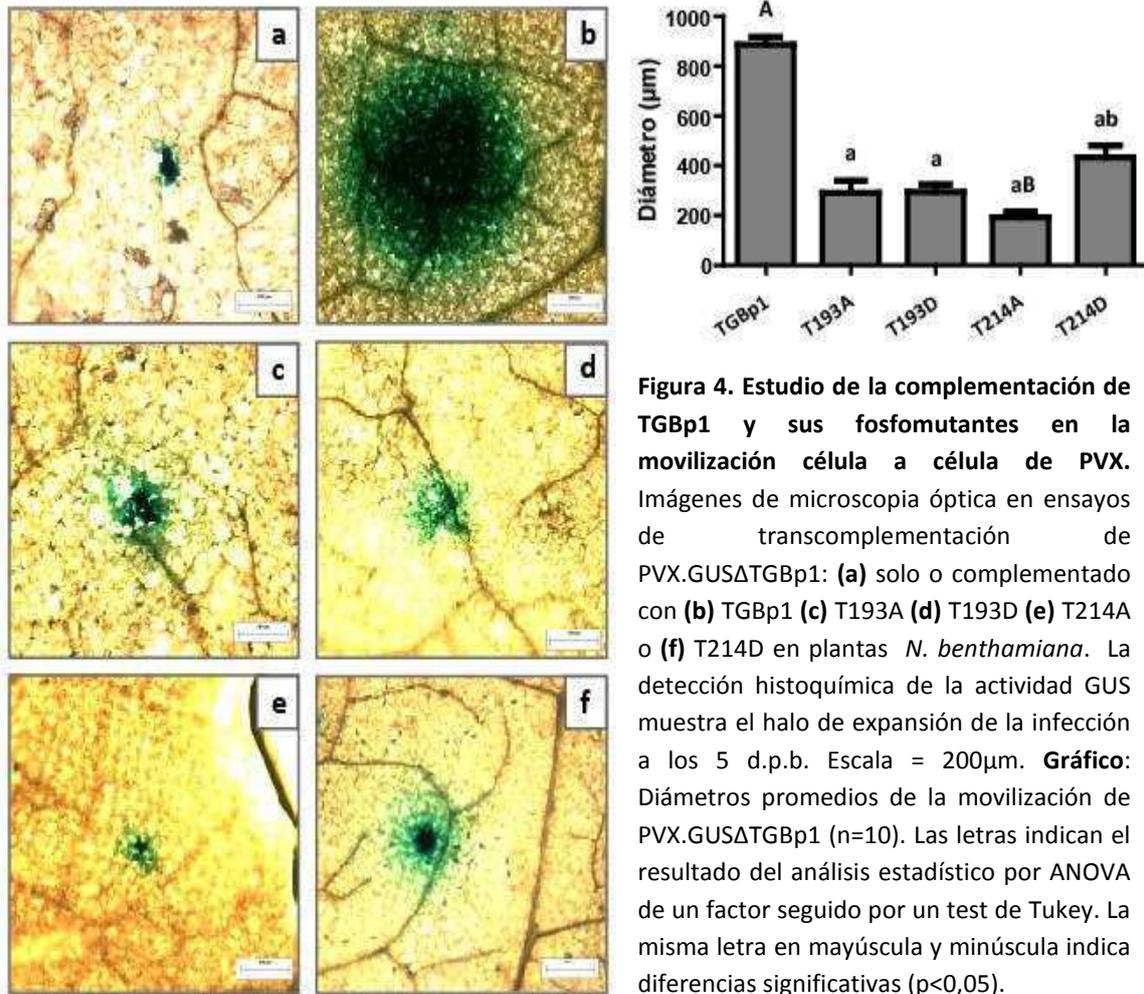


Figura 4. Estudio de la complementación de TGBp1 y sus fosfomutantes en la movilización célula a célula de PVX. Imágenes de microscopía óptica en ensayos de transcomplementación de PVX.GUSΔTGBp1: (a) solo o complementado con (b) TGBp1 (c) T193A (d) T193D (e) T214A o (f) T214D en plantas *N. benthamiana*. La detección histoquímica de la actividad GUS muestra el halo de expansión de la infección a los 5 d.p.b. Escala = 200µm. **Gráfico:** Diámetros promedios de la movilización de PVX.GUSΔTGBp1 (n=10). Las letras indican el resultado del análisis estadístico por ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey. La misma letra en mayúscula y minúscula indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

2. Estudio de los niveles de acumulación de las fosfomutantes T193 y T214 en experimentos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*.

Dado que en los experimentos de transcomplementación de la movilización célula a célula de PVX todas las versiones mutantes fueron defectivas, se decidió evaluar como primer paso los niveles de acumulación de las mismas con el fin de determinar si una acumulación diferencial podría explicar los resultados observados. Con este fin se realizaron ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*. Se agroinfiltraron hojas con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las construcciones de la serie pK7WG2D que expresan las proteínas TGBp1 y las fosfomutantes T193 y T214. Como control negativo se agroinfiltró una planta con un

cultivo de *A. tumefaciens* sin transformar. En la **Figura 5** se presenta un esquema del procedimiento utilizado.

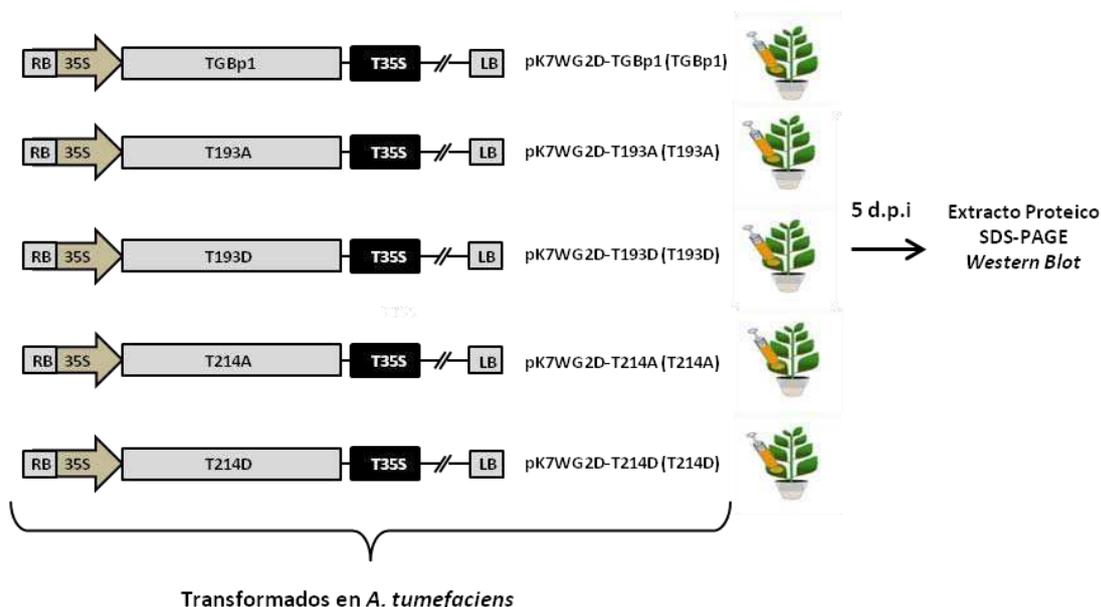


Figura 5. Esquema del procedimiento utilizado para el estudio de los niveles de acumulación de la TGBp1 y de las fosfomutantes T193 y T214. El esquema indica el nombre de la construcción correspondiente a la serie pK7WG2D. Cada una de ellas fue transformada en *A. tumefaciens*. Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con los cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las construcciones descritas en la figura. Luego de 5 días post-infiltración (d.p.i) se tomaron muestras de tejido foliar de hojas inoculadas, se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS_PAGE) 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se revelaron con un anticuerpo específico para TGBp1.

Las plantas agroinfiltradas se conservaron en cámaras de cultivo durante un período de 5 días. Transcurrido ese tiempo se recolectó tejido foliar de las hojas agroinfiltradas y se extrajeron proteínas totales para evaluar la presencia de TGBp1 y de las mutantes mediante análisis de *Western blot* con anticuerpos específicos anti TGBp1. Se efectuaron 5 experimentos independientes con 2 réplicas de cada una de las construcciones evaluadas. La intensidad de las bandas detectadas en los ensayos de *Western blot* se cuantificó utilizando el programa Gel-Pro Analyzer. Las intensidades fueron normalizadas a la intensidad de la banda de la subunidad mayor de la Rubisco, cuantificada mediante tinción con Rojo Ponceau. Finalmente, para determinar la

significancia de las intensidades de las fosfomutantes respecto a la intensidad de la TGBp1 salvaje, las mismas fueron analizadas por el test estadístico ANOVA de un factor seguido por un test de Dunnett.

En las **Figura 6** se presentan los resultados del análisis por *Western blot* de los niveles de acumulación de las proteínas TGBp1 salvaje y las mutantes T193A, T193D, T214A y T214D en hojas de *N. benthamiana*. Luego de 5 d.p.i. se pudo observar que los niveles de expresión obtenidos con la proteína TGBp1 salvaje y las fosfomutantes T193D y T214A fueron similares (**Figura 6** comparar calles **2, 4, 5** y gráfico de barras). Sin embargo los niveles de proteína correspondientes a las mutantes T193A y T214D fueron significativamente menores respecto a la TGBp1 salvaje y a las mutantes T193D y T214A (**Figura 6** comparar calles **2, 3, 6** y gráfico de barras).

A continuación se evaluaron los niveles de acumulación del ARN mensajero (ARNm) de las distintas construcciones para confirmar la correcta transcripción de las mismas. Para ello se extrajo el ARN total de las hojas infiltradas a los 5 d.p.i. y se evaluaron los niveles del ARNm de la TGBp1 salvaje y de cada una de las fosfomutantes por *Northern blot*. El ARN total obtenido se separó en geles de agarosa desnaturalizantes y se transfirió a membranas de Nylon. La membrana fue revelada utilizando una sonda que reconoce específicamente los transcritos de TGBp1 y de cada una de las fosfomutantes. La intensidad de las bandas de hibridación y las bandas correspondientes al control de carga (ARN ribosomal) se cuantificaron utilizando el programa Gel-Pro Analyzer. Cada una de las bandas se normalizó al valor de la banda correspondiente al control de carga. Como se observa en la **Figura 7**, todas las construcciones expresan el ARNm del tamaño esperado, pero difieren en su nivel de acumulación. Los niveles de acumulación del ARNm correspondientes a la TGBp1 salvaje y a la fosfomutante T214A fueron similares, correlacionando con los niveles de proteína observados previamente (**Figura 7**, calles **1** y **4**). Sorprendentemente, los niveles de acumulación de los ARNm de las mutantes T193A, T193D y T214D fueron menores que los de la TGBp1 salvaje (**Figura 7**, calles **1, 2, 3** y **5**). En el caso de las fosfomutante T193A y T214D los niveles de sus ARNm correlacionaron con los bajos niveles de acumulación de su proteína, mientras que para la mutante T193D los bajos niveles de acumulación de su ARNm no correlacionaron con los niveles de proteína producidos.

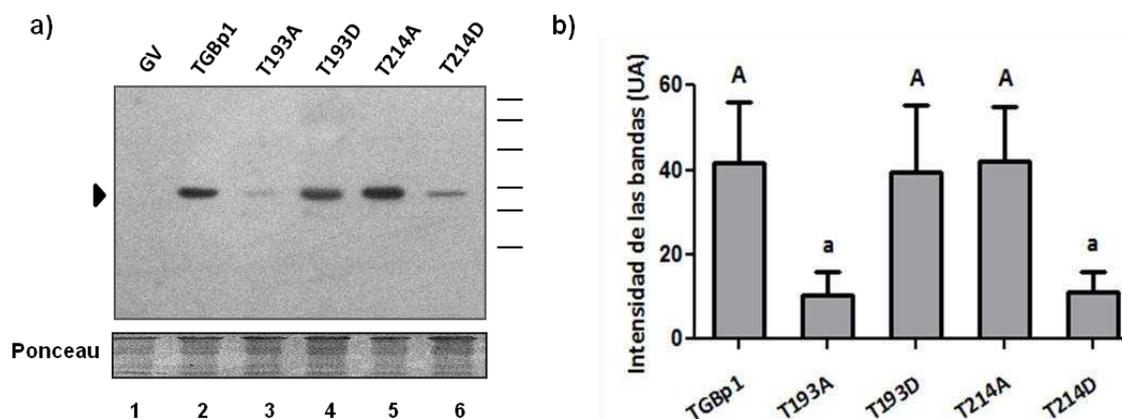


Figura 6. Evaluación de los niveles de acumulación de las proteínas TGBp1 y de las fosfomutantes T193 y T214 en ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*. (a) A partir de las muestras tomadas a los 5 d.p.i. de hojas agroinfiltradas se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles SDS-PAGE 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se revelaron con anticuerpo anti TGBp1. La flecha indica la posición de TGBp1 y de las fosfomutantes. Como control de carga de proteínas se realizó una tinción con Rojo Ponceau (panel inferior). Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa. GV: control negativo donde se infiltró una hoja con un cultivo de *A. tumefaciens* sin transformar. (b) Las intensidades de las bandas correspondientes a la detección de TGBp1 y de las fosfomutantes en los ensayos de *Western blot* se cuantificaron mediante el programa Gel-Pro A. Las intensidades fueron normalizadas a la intensidad de la banda de la subunidad mayor de la Rubisco, cuantificada mediante tinción con Ponceau. Las letras indican el resultado del análisis estadístico por ANOVA de un factor seguido por un test de Dunnett (n=5). La misma letra en mayúscula y minúscula indica diferencias significativas ($p < 0,05$). UA: unidades arbitrarias.

Es sabido que en ensayos de expresión transitoria, donde se expresan transgenes a partir de promotores fuertes, los niveles de expresión de los mismos se encuentran afectados por el silenciamiento génico postranscripcional gatillado por la planta (Voinnet *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta este hecho y que TGBp1 es una proteína supresora del PTGS, se podría pensar que una mutante de TGBp1 deficiente en dicha actividad llevaría a una disminución de la acumulación de su propio ARNm y por ende a una menor acumulación de su proteína.

Por otra parte, la menor acumulación de TGBp1 podría estar dada por un aumento de la degradación de la proteína, lo cual también llevaría a una disminución de su propio mensajero. En este caso, la disminución del ARNm estaría dada por una

menor actividad supresora del PTGS en el ensayo, producida por la baja acumulación de la proteína y no por la producción de una proteína defectiva en esta función. Debido a esto, no es posible saber si el efecto que se observa en la disminución de los ARNm de las mutantes T193A, T193D y T214D es debido a que estas fosfomutantes tienen afectada la capacidad de suprimir el PTGS *per se* o si efectivamente existe un problema en la estabilidad de las proteínas mutantes.

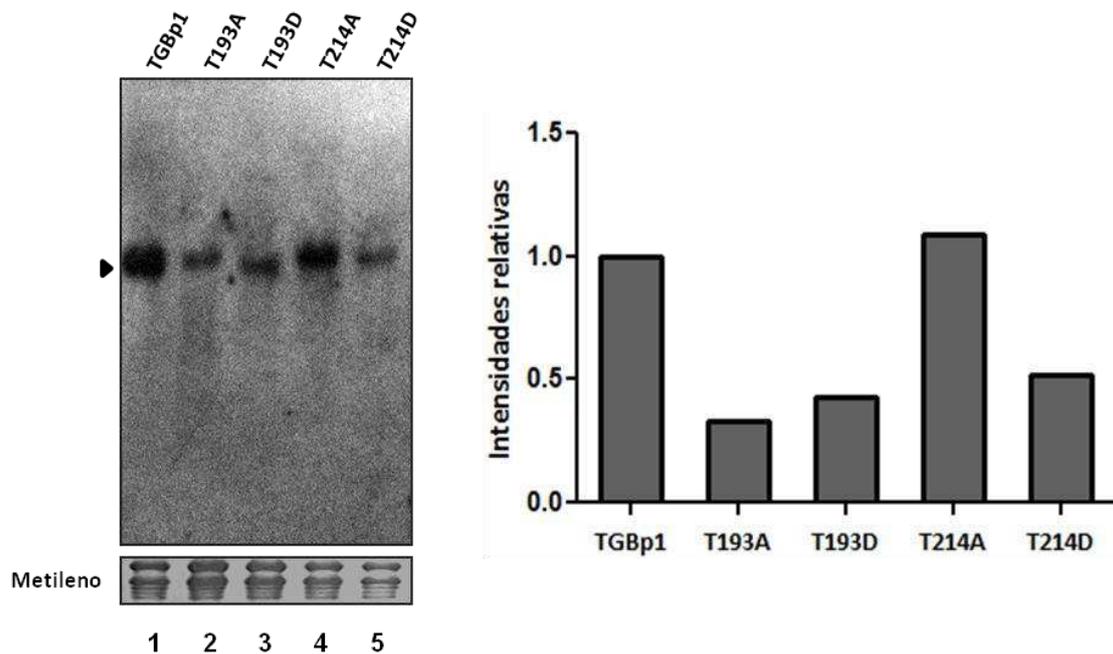


Figura 7. Evaluación de los niveles de acumulación de los ARNm de TGBp1 y de las fosfomutantes T193 y T214 en ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* por Northern blot. (a) Autorradiografías de las membranas hibridadas con sonda marcada con ^{32}P , que reconoce específicamente los transcritos de TGBp1 y de las respectivas fosfomutantes (panel superior). En el panel inferior se muestra la tinción de la membrana con azul de metileno para visualizar el ARN ribosomal (ARNr, control de carga). (b) Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el programa Gel-Pro A. Las intensidades de las bandas correspondientes a las fosfomutantes se relativizaron a la banda correspondiente a la TGBp1 salvaje.

Para demostrar que la disminución de los ARNm de las fosfomutantes T193A, T193D y T214D se debe a una menor actividad supresora del PTGS, se evaluó la expresión transitoria de dichas mutantes en presencia de una proteína supresora del PTGS, la p19 del *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), de manera de independizarse de la

actividad supresora del PTGS de las distintas mutantes de TGBp1 en el ensayo. Para ello se realizaron mezclas de cultivos de *A. tumefaciens* transformados con los vectores que expresan la TGBp1 salvaje y las respectivas fosfomutantes junto con un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el vector que expresa la proteína p19 de TBSV. Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana*, luego de 5 d.p.i. se extrajo el ARN total de las hojas infiltradas y se evaluaron los niveles de ARNm por *Northern blot*. Paralelamente, se tomaron muestras de las hojas infiltradas para analizar los niveles de acumulación de proteínas por ensayos de *Western blot*.

Los resultados obtenidos muestran que tanto la mutante T193D como la mutante T214D, al ser expresadas en presencia del supresor p19, aumentan sus niveles de ARNm alcanzando los niveles de la TGBp1 salvaje (**Figura 8 a**, calles **1, 3 y 4**). Concomitantemente es posible observar un aumento en la acumulación de la proteína T214D, alcanzando niveles semejantes a los de la proteína TGBp1 salvaje (**Figura 8 b**, calles **5-6 y 7-8**). Teniendo en cuenta estos resultados se puede postular que las fosfomutantes T193D y T214D tendrían afectada la capacidad de suprimir el PTGS y que la estabilidad de dichas proteínas no estaría afectada.

En el caso de la fosfomutante T193A, si bien los niveles de expresión de su ARNm aumentaron obteniéndose niveles similares a los de la TGBp1 salvaje y al del resto de las fosfomutantes (**Figura 8 a**, calles **1 y 2**), los niveles de acumulación de la proteína continuaron siendo significativamente menores que los de la TGBp1 salvaje o de las otras mutantes (**Figura 8 b**, calles **1-2 y 7-8**). Este resultado sugiere que la fosfomutante T193A tendría afectada la estabilidad de la proteína. De esta manera una menor cantidad de proteína supresora en el ensayo, producto de una mayor inestabilidad, llevaría a una menor acumulación de su ARNm.

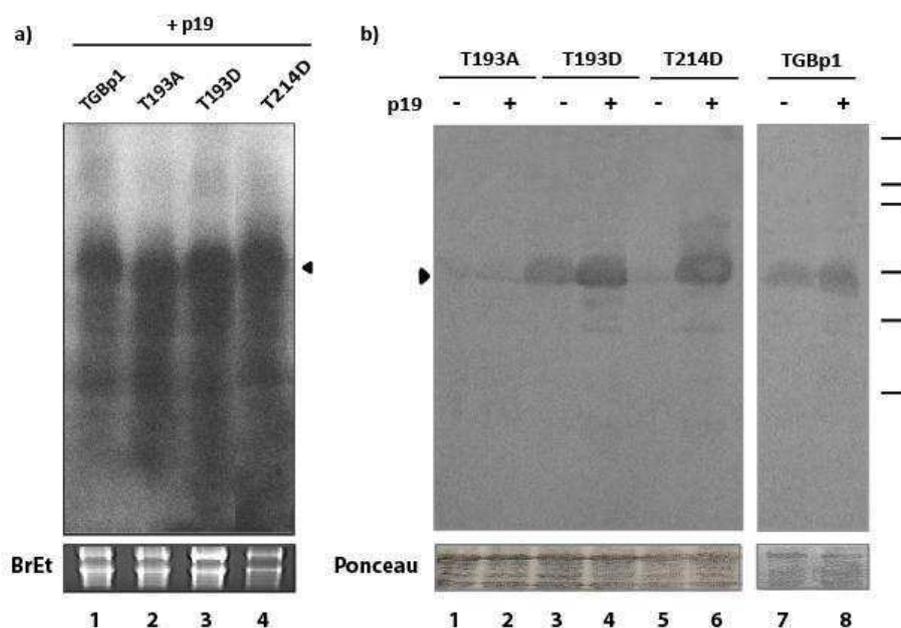


Figura 8. Ensayos de expresión transitoria de la TGBp1 y las fosfomutantes en plantas de *N. benthamiana* en presencia de p19. (a) Evaluación de los niveles de acumulación del ARNm por Northern blot. Se muestran la autorradiografía de las membranas hibridadas con sonda marcada con ^{32}P , que reconoce específicamente los transcritos de TGBp1 y de las respectivas mutantes (panel superior). En el panel inferior se muestra el gel teñido con bromuro de etidio (BrEt) para visualizar el ARN ribosomal (ARNr, control de carga). **(b) Evaluación de los niveles de acumulación de proteína por Western blot.** A partir de las muestras tomadas a los 5 d.p.i. de hojas agroinfiltradas se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas mostradas se revelaron con anticuerpo anti TGBp1. Como control de carga de proteína se realizó una tinción con Rojo Ponceau (panel inferior). Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa.

3. Estudio del rol de la fosforilación de la T193 en la regulación de la degradación de TGBp1 de PVX.

En los últimos años, varios trabajos han demostrado el rol del sistema UPS – 26S en la interacción planta-patógeno (Vierstra, 2009; Dielen *et al.*, 2010). Interesantemente, se ha postulado que el sistema UPS – 26S no solo es usado por las plantas como un mecanismo de defensa, sino que también puede ser manipulado por ciertos patógenos, incluyendo los virus, para su propio beneficio. Por otro lado, existen numerosas evidencias que demuestran como la degradación de proteínas se encuentra

regulada por diferentes modificaciones postraduccionales, en especial por la fosforilación y/o desfosforilación de las mismas (Callis, 1995; Lin *et al.*, 1996; Vierstra, 1996; Martinez *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009). Particularmente, existen trabajos que muestran que la fosforilación de ciertas proteínas virales, tales como la proteína de movimiento (MP) de TMV o la ARN polimerasa ARN dependiente de TYMV, regula la estabilidad *in vivo* de dichas proteínas (Kawakami *et al.*, 1999; Jakubiec *et al.*, 2006; Camborde *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta estas observaciones y en base a los resultados obtenidos en el punto 2, se decidió estudiar en mayor profundidad la regulación de la degradación de TGBp1 por fosforilación en la treonina 193. Como se pudo observar en los ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*, la fosfomutante T193A fue claramente más inestable y los niveles de acumulación fueron menores que los de la proteína salvaje. Contrariamente, al estudiar la fosfomutante T193D se observó que ésta era más estable respecto a la TGBp1 salvaje y alcanzaba niveles de acumulación comparables a esta última.

3.1 Estudio del rol del sistema UPS – 26S en la degradación de la fosfomutante T193A de TGBp1.

Para evaluar que la degradación de la fosfomutante T193A se encuentra mediada por el sistema UPS – 26S, se analizaron los niveles de acumulación de la misma en ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* en presencia del inhibidor del proteosoma MG132. Con este fin se agroinfiltraron plantas *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con la construcción que expresa la fosfomutante T193A en ausencia y en presencia de 50 μ M y 500 μ M del inhibidor MG132. Las plantas agroinfiltradas se conservaron en cámaras de cultivo durante un período de 48 hs. Transcurrido ese tiempo se recolectó tejido foliar de las hojas agroinfiltradas y se extrajeron proteínas totales para evaluar los niveles de acumulación de la fosfomutante T193A mediante *Western blot* con anticuerpos específicos anti TGBp1. Este tipo de experimento se realizó dos veces con 3 réplicas independientes.

En la **Figura 9 a** se puede observar que el agregado del inhibidor del proteosoma MG132 lleva a un aumento en la acumulación de la fosfomutante T193A y que dicho efecto es dosis dependiente. Teniendo en cuenta que el inhibidor MG132 es un compuesto que se degrada rápidamente se reevaluó su efecto sobre la estabilidad de la fosfomutante T193A infiltrándolo luego de transcurridas 48 hs de la agroinfiltración con el cultivo de *A. tumefaciens*. Luego de 8 hs y 24 hs postinfiltración del inhibidor MG132 a una concentración de 50 μ M, se evaluaron los niveles de acumulación de la proteína mutante T193A por *Western blot*. Tanto a las 8 hs como a las 24 hs se observó un aumento en los niveles de la mutante T193A en presencia del inhibidor respecto del control infiltrado con DMSO 0,1%, siendo más pronunciado el efecto a tiempos más cortos (**Figura 9 b**). Los resultados obtenidos demuestran que la fosfomutante T193A es blanco de degradación del proteosoma y sugiere que la vía del sistema ubiquitina proteosoma - 26S estaría involucrada en la degradación de la proteína TGBp1 de PVX.

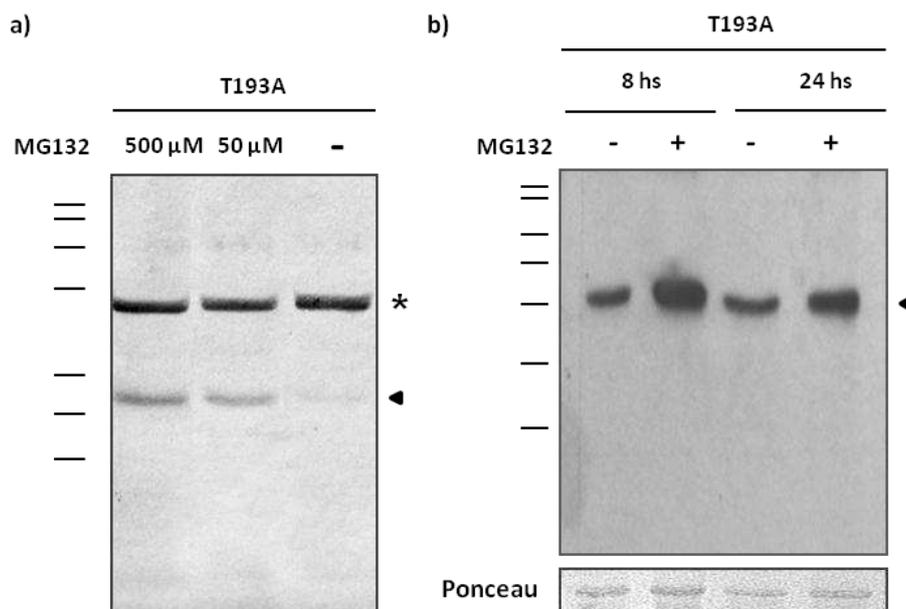


Figura 9. Evaluación de los niveles de acumulación de la mutante T193A de PVX en presencia del inhibidor del proteosoma MG132. (a) Hojas de *N. benthamiana* fueron coinfiltradas con un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con la mutante T193A junto con una solución en DMSO 0,1% del inhibidor MG132 a concentraciones de 500 μ M y 50 μ M. Como controles negativos se infiltraron hojas con cultivos de *A. tumefaciens* transformado con la mutante T193A en presencia de una solución de DMSO 0,1% (-). A partir de las muestras tomadas a los 2 d.p.i. se extrajeron proteínas totales. La flecha indica la posición de la mutante T193A. (*): banda inespecífica. **(b)** Hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con la mutante T193A. A las 48 hs se infiltraron las hojas con una solución de DMSO 0,1 % (-) o con una solución en DMSO 0,1% del inhibidor MG132 a una concentración de 50 μ M. Se extrajeron proteínas totales a las 8 y 24 hs postinfiltración del inhibidor, se resolvieron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas mostradas en esta figura se revelaron con anticuerpo anti TGBp1. La flecha indica la posición de la mutante T193A. Los marcadores de peso molecular corresponden a 82,2 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa.

3.2 Efecto de la fusión de las fosfomutantes T193 de TGBp1 sobre la estabilidad de la proteína GFP.

Como primer paso para establecer la importancia de la fosforilación en la treonina 193 sobre la regulación de la degradación y estabilidad de la proteína TGBp1 de PVX, se estudió la expresión transitoria de las versiones fosfomutantes de TGBp1 correspondientes a la T193A y a la T193D fusionadas a la proteína GFP, tanto en su extremo N- como C-terminal. Con este fin, los vectores de entrada pDONR-TGBp1; pDONR-T193A y pDONR-T193D obtenidos en el punto 1.1 fueron recombinados con el

vector binario de destino pK7WGF2, el cual permite la expresión de la TGBp1 y de las fosfomutantes como fusiones N-terminales a la proteína GFP. De esta manera se generaron las siguientes construcciones: pK7FWG2-TGBp1 (GFP-TGBp1), pK7FWG2-T193A (GFP-193A) y el pK7FWG2-T193D (GFP-T193D) (**Figura 10**). Por otro lado, para la obtención de las versiones fusionadas al extremo C-terminal de GFP se amplificaron los ORFs de la TGBp1 y de las fosfomutantes utilizando oligonucleótidos que permiten delecionar el codón "stop" de las mismas. Las secuencias salvaje y mutagenizadas fueron clonadas en el vector pDONR generando los vectores pDONR-TGBp1st, pDONR-T193Ast y pDONR-T193Dst. Éstos fueron recombinados con el vector binario de destino pB7WGF2 que permite la expresión de las diferentes versiones como fusiones C-terminales a la proteína GFP. Los vectores obtenidos fueron: el pB7WGF2-TGBp1 (TGBp1-GFP), el pB7WGF2-T193A (T193A-GFP) y el pB7WGF2-T193D (T193D-GFP) (**Figura 10**).

Una vez obtenidas las diferentes proteínas de fusión, se llevaron a cabo ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana*. Con este fin se realizaron mezclas de cultivos de *A. tumefaciens* transformados con los vectores que expresan las construcciones desarrolladas junto con un cultivo de *A. tumefaciens* que expresa la proteína supresora del PTGS p19. Las infiltraciones se realizaron en presencia del supresor p19 con el objetivo de independizarse del efecto de la inducción del PTGS que se produce en las células al expresar transgenes ya que tiene una consecuencia directa sobre la acumulación de las proteínas en estudio. El esquema del procedimiento utilizado fue el mismo que se muestra en la **Figura 5**. Las plantas agroinfiltradas se conservaron en cámaras de cultivo durante un período de 3 días. Transcurrido ese tiempo se recolectó tejido foliar de las hojas agroinfiltradas y se extrajeron proteínas totales para evaluar la presencia de TGBp1 y de las mutantes mediante análisis de *Western blot* con anticuerpos específicos anti GFP. Se efectuaron 4 experimentos independientes con 2 réplicas de cada una de las construcciones evaluadas. Las intensidades de las bandas en los ensayos de *Western blots* fueron cuantificadas utilizando el programa Gel-Pro Analyzer y normalizadas a la intensidad de la banda de la subunidad mayor de la Rubisco, cuantificada mediante tinción con Rojo Ponceau. Para determinar la significancia de las intensidades, las mismas fueron analizadas por el test estadístico ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey.

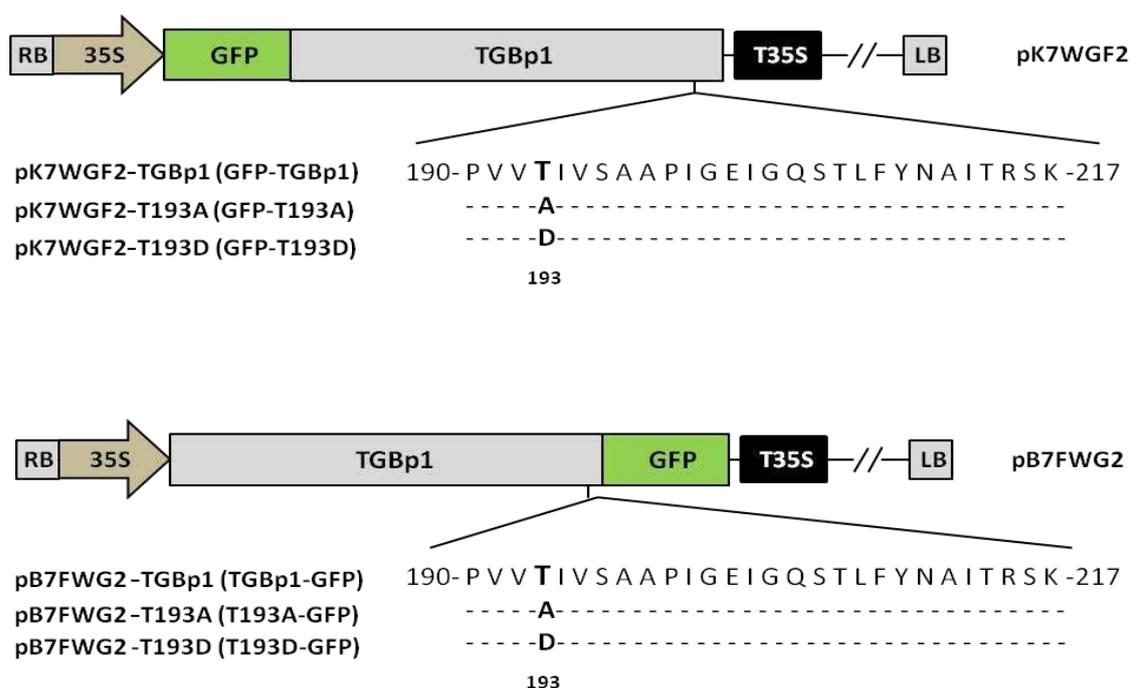


Figura 10. Representación esquemática de las construcciones de TGBp1 y de las fosfomutantes T193A y T193D que permiten la expresión de dichas proteínas fusionadas a GFP en sus extremos N- o C- terminales. Se indica un fragmento de la secuencia aminoacídica de TGBp1 (residuos 190 – 217 de la secuencia proteica), y la posición de las mutaciones de reemplazo de los residuos. RB: borde derecho del ADN-T de *A. tumefaciens*, 35S: promotor 35S del CaMV, T35S: terminador transcripcional 35S del CaMV, LB: borde izquierdo del ADN-T de *A. tumefaciens*. A: alanina; D: ácido aspártico. GFP: proteína verde fluorescente.

En la **Figura 11**, se muestran los resultados de un ensayo tipo correspondiente al estudio de la expresión de TGBp1, T193A y T193D fusionada a GFP en sus extremos N-terminales (GFP-TGBp1, GFP-T193A y GFP-T193D). Como se puede observar, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos cuando se evaluó la expresión transitoria de las proteínas TGBp1 salvaje y las fosfomutantes T193A y T193D sin fusionar (ver punto 2, **Figura 6**). La mutante GFP-T193D presentó niveles significativamente similares en la acumulación respecto a la GFP-TGBp1 salvaje (**Figura 11**). Por otro lado, la mutante GFP-T193A presentó niveles de acumulación de proteína significativamente menores que los obtenidos con las proteínas GFP-T193D y GFP-TGBp1 (**Figura 11**).

A continuación se analizaron los niveles de acumulación del ARNm de cada una de las construcciones ensayada con el fin de confirmar que la disminución en los

niveles de proteína no están dados por una disminución en la acumulación sus ARNm. Para ello se extrajo el ARN total de las hojas agroinfiltradas a los 3 d.p.i. y se evaluaron los niveles de ARNm con una sonda radioactiva que reconoce específicamente la secuencia de GFP. Como se puede observar en la **Figura 12**, los resultados revelaron que ninguna de las versiones estudiadas presentó diferencias en cuanto a la acumulación de sus respectivos ARNm.

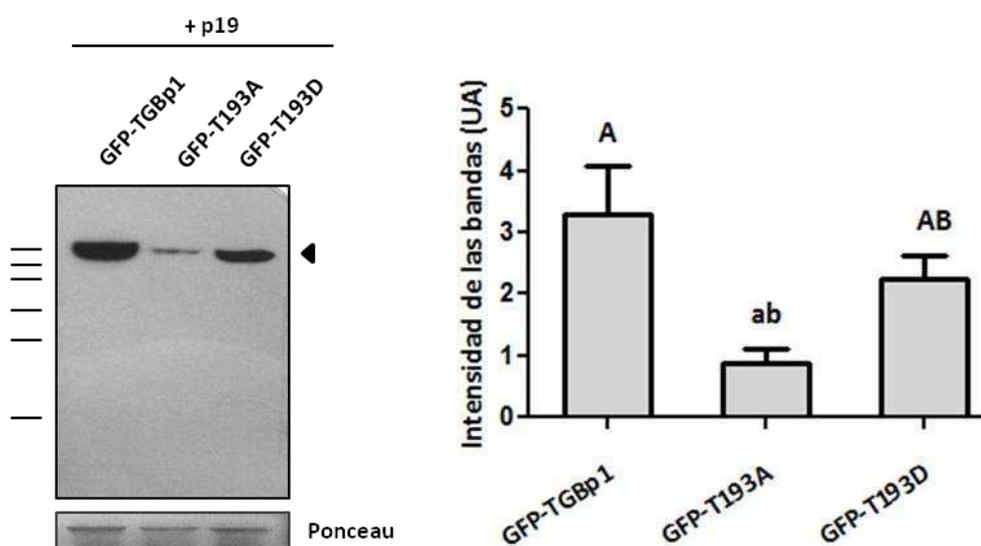


Figura 11. Evaluación de los niveles de acumulación de las proteínas TGBp1 y las fosfomutantes T193 fusionadas a GFP en sus extremos N-terminales en plantas de *N. benthamiana* en presencia del supresor p19. Análisis de *Western blot* anti GFP. A partir de las muestras tomadas a los 3 d.p.i. de hojas agroinfiltradas se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas mostradas se revelaron con anticuerpo anti GFP. La flecha indica la posición de TGBp1 y de las correspondientes fosfomutantes. Como control de carga de proteínas se realizó una tinción con Rojo Ponceau (panel inferior). Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa. Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el programa Gel-Pro Analyzer. Las letras indican el resultado del análisis estadístico por ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey (n=4). La misma letra en mayúscula y minúscula indica diferencias significativas (p<0,05). UA: unidades arbitrarias.

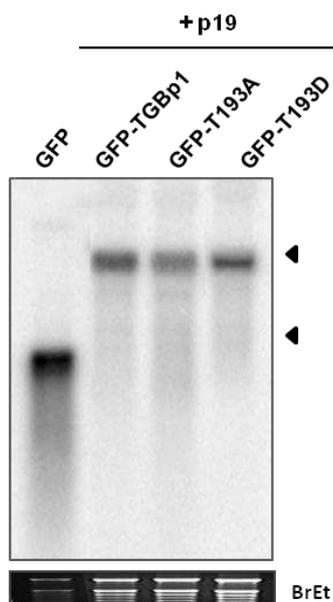


Figura 12. Evaluación de los niveles de acumulación de los ARNs de TGBp1 y de las fosfomutantes T193 fusionadas a GFP en sus extremos N-terminales en ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* en presencia del supresor p19. Northern blot de ARN total extraído de plantas infiltradas con las construcciones GFP-TGBp1, GFP-T193A y GFP-T193D. Se muestran las autorradiografías de las membranas hibridadas con sonda marcada con ^{32}P , que reconoce específicamente la secuencia de GFP (flechas) (panel superior). En el panel inferior se muestra el gel teñido con bromuro de etidio (BrEt) para visualizar el ARN ribosomal (ARNr, control de carga).

A continuación se estudió la expresión transitoria de TGBp1 y de las fosfomutantes T193A y T193D fusionadas a GFP en sus extremos C-terminales (**Figura 10**). En la **Figura 13**, se puede observar que la fosfomutante T193D-GFP presentó niveles de acumulación significativamente similares a los de la proteína TGBp1-GFP, confirmando los resultados obtenidos con las fusiones N-terminales. Sorpresivamente, la fosfomutante T193A-GFP presentó niveles de acumulación significativamente similares a los de la TGBp1-GFP salvaje, difiriendo su comportamiento del observado previamente para la fusión N-terminal de la misma (**Figura 11**) y para su versión no fusionada (**Figura 6**).

Las diferencias observadas respecto a la estabilidad de la fosfomutante T193A según se encuentre fusionada en su extremo N- o C- terminal a GFP, indicarían que la degradación de TGBp1 requiere que el extremo C- terminal de la proteína se encuentre estructuralmente accesible. Este comportamiento sugiere la presencia de un elemento regulatorio de la degradación en el extremo C- terminal de la proteína TGBp1 de PVX.

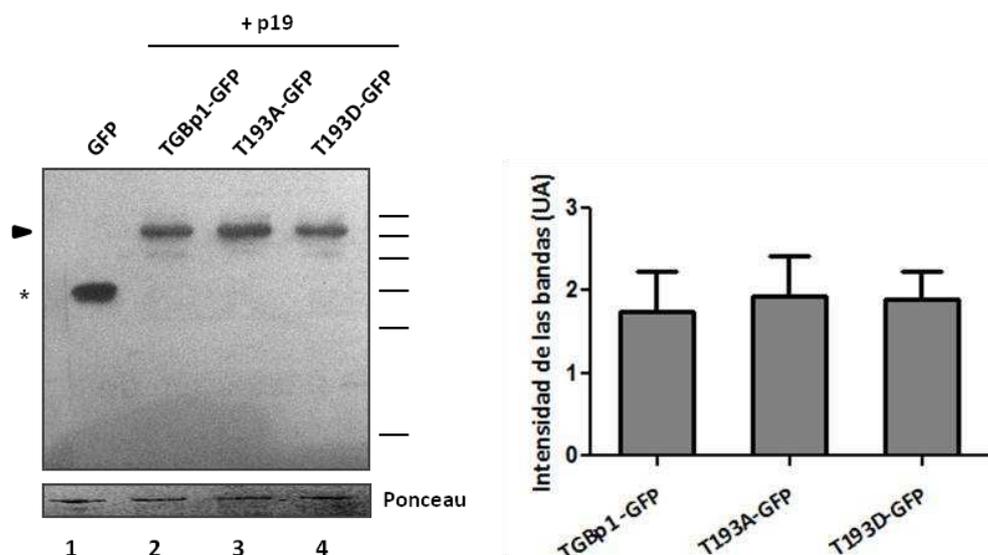


Figura 13. Evaluación de los niveles de acumulación de las proteínas TGBp1 y de las fosfomutantes T193 fusionadas a GFP en sus extremos C- terminales en plantas de *N. benthamiana* en presencia del supresor p19. Análisis de *Western blot* anti GFP. A partir de las muestras tomadas a los 3 d.p.i. de hojas agroinfiltradas se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas mostradas se revelaron con anticuerpo anti GFP. La flecha indica la posición de la TGBp1 y de las diferentes fosfomutantes fusionadas a GFP en sus extremos C- terminales. El asterisco indica la posición de GFP sola. Como control de carga de proteína se realizó una tinción con Rojo Ponceau (panel inferior). Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa. Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el programa Gel-Pro Analyzer. Los resultados se analizaron por el test estadístico ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey (n=4). Los resultados no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). UA: unidades arbitrarias.

3.3 Estudio de la presencia de una secuencia PEST como posible regulador de la estabilidad de la proteína TGBp1 de PVX.

Uno de los principales determinantes de la vida media de una proteína es la presencia de señales de degradación o "degrones", los cuales pueden estar ubicados tanto en el extremo N-terminal como C-terminal de la misma (Glickman y Ciechanover, 2002; Ravid y Hochstrasser, 2008). Los dominios PEST son secuencias ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina que han sido asociados a la inducción de la degradación de proteínas y a una corta vida media de las mismas (Rechsteiner y Rogers, 1996). En base a la hipótesis de que TGBp1 tendría una señal de degradación en su extremo C-terminal se decidió estudiar la posible existencia de secuencias

regulatorias de la degradación en la proteína TGBp1. Con este fin se llevó a cabo el análisis *in silico* para la identificación de posibles secuencias PEST presentes en la proteína TGBp1. Usando el algoritmo PESTfind se identificaron dos posibles secuencias PEST en la secuencia de TGBp1, uno de ellos ubicado en la región que abarca gran parte del extremo C-terminal de la proteína y que incluye a la treonina 193 (**Figura 14**).

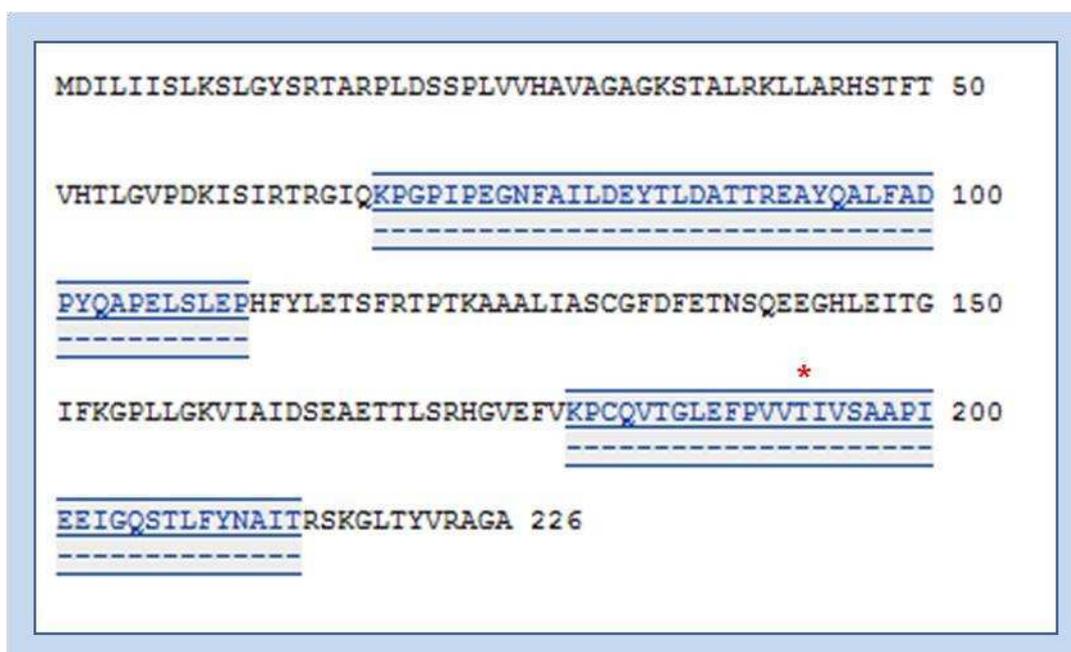


Figura 14. Análisis de dominios PEST en la secuencia de TGBp1 de PVX. Mediante el uso del software PESTfind se identificaron dos posibles dominios PEST. Los dos se muestran en la figura de arriba resaltados con color celeste. El asterisco rojo marca la posición de la treonina 193.

Una de las características de los elementos regulatorios de degradación PEST es que son transferibles y suficientes para ejercer su efecto en proteínas modelo (Fleming *et al.*, 2000; Camborde *et al.*, 2010). Con el fin de analizar la función de la secuencia PEST C-terminal en la degradación de la TGBp1 de PVX y su posible regulación por la fosforilación de la T193, se estudió el impacto de dicha secuencia PEST sobre la acumulación de GFP. Para ello se fusionó a la proteína GFP, en su extremo N- y C-terminal, la secuencia que se extiende desde el aminoácido 180 al 226 y que contiene la secuencia PEST C-terminal de la TGBp1 y de las fosfomutantes T193A y T193D (**Figura 15**). Para la obtención de las versiones PEST fusionadas en su extremo N-terminal se amplificaron por PCR las secuencias PESTs de las tres proteínas y se

clonaron al vector pDONR, dando como resultado los vectores pDONR-PEST.TGBp1, pDONR-PEST.T93A y pDONR-PEST.T193D. Los vectores resultantes se recombinaron con el vector binario pK7WGF2, obteniéndose los vectores que permiten la expresión de las versiones de fusión N-terminal a GFP (pK7WGF2-PEST.TGBp1 (GFP-PEST.TGBp1), pK7WGF2-PEST.T193A (GFP-PEST.T193A) y pK7WGF2-PEST.T193D (GFP-PEST.T193D)) (**Figura 15**). Por otra parte, para la obtención de las versiones PEST fusionadas en su extremo C-terminal se procedió de igual manera pero en este caso la amplificación se realizó con oligonucleótidos que permiten el agregado del codón de iniciación para la traducción y la delección del codón "stop". Los vectores pDONR generados (pDONR-PEST.TGBp1st, pDONR-PEST.T93Ast y pDONR-PEST.T193Dst) se recombinaron con el vector pB7WGF2, obteniéndose los vectores que permiten la expresión de las versiones de fusión C-terminal a GFP (pB7FWG2-PEST.TGBp1 (PEST.TGBp1-GFP), pB7FWG2-PEST.T193A (PEST.T193A-GFP) y pB7FWG2-PEST.T193D (PEST.T193D-GFP)) (**Figura 15**).

A continuación, se realizaron ensayos de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las diferentes construcciones realizadas. El esquema del procedimiento utilizado fue el mismo que se muestra en la **Figura 5**. Al igual que en el punto anterior, las agroinfiltraciones de las distintas construcciones se realizaron junto con un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el vector que expresa la proteína supresora del PTGS p19. Las plantas agroinfiltradas se conservaron en cámaras de cultivo durante un período de 3 días. Transcurrido ese tiempo se recolectó tejido foliar de las hojas agroinfiltradas y se extrajeron proteínas totales para evaluar la acumulación de las proteínas de fusión mediante análisis de *Western blot* con anticuerpos específicos anti GFP. A su vez se visualizó la acumulación de GFP mediante la observación de la fluorescencia en las hojas infiltradas con lámpara UV. Se efectuaron 4 experimentos independientes con 2 réplicas de cada una de las construcciones evaluadas. Las intensidades de las bandas en los ensayos de *Western blots* fueron cuantificadas utilizando el programa Gel-Pro Analyzer y normalizadas a la intensidad de la banda de la subunidad mayor de la Rubisco, cuantificada mediante tinción con Rojo Ponceau. Para determinar la significancia de las intensidades, las mismas fueron analizadas por el test estadístico ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey.

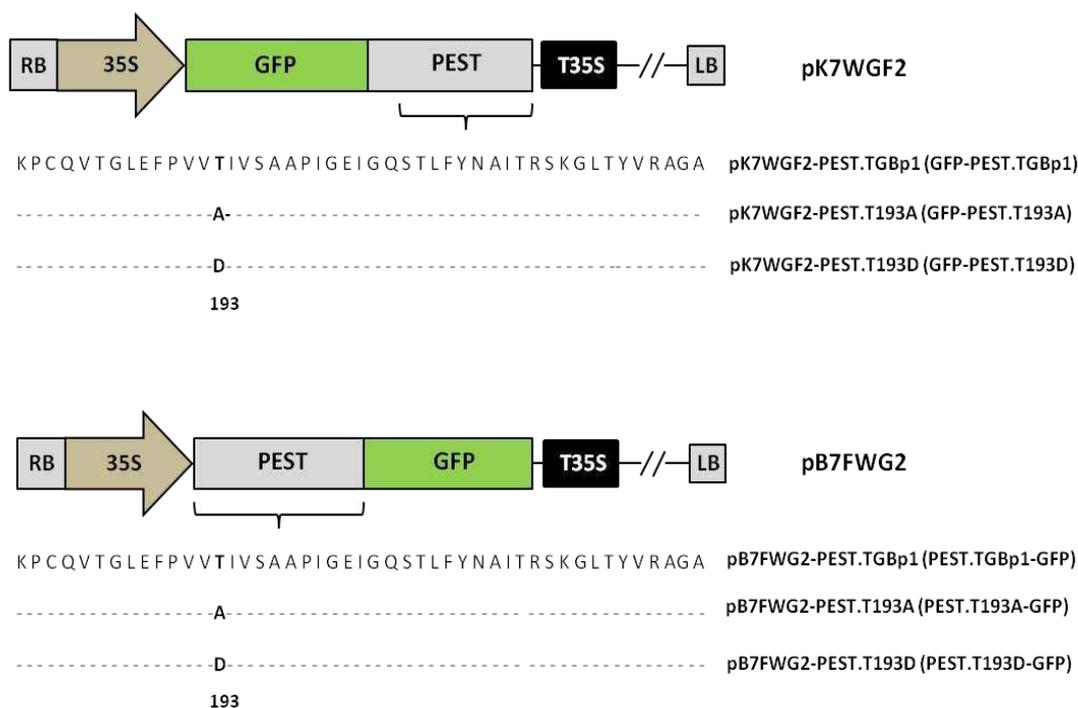


Figura 15. Representación esquemática de las construcciones que permiten la expresión de las secuencias PEST C-terminal de TGBp1 y de las fosfomutantes T193A y T193D fusionadas a GFP en sus extremos N- o C- terminales. Se indica la secuencia aminoacídica correspondiente al dominio PEST C-terminal de TGBp1 identificado mediante el programa PESTfind. RB: borde derecho del ADN-T de *A. tumefaciens*, 35S: promotor 35S del CaMV, T35S: terminador transcripcional de 35S del CaMV, LB: borde izquierdo del ADN-T de *A. tumefaciens*. A: alanina; D: ácido aspártico. GFP: proteína verde fluorescente.

En la **Figura 16** se muestran los resultados de un ensayo tipo para la evaluación de la expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* de las versiones PESTs salvaje y mutantes fusionadas a GFP en sus extremos N-terminales. Como puede observarse en la **Figura 16 a**, los niveles de fluorescencia de GFP correspondientes a la versión GFP-PEST.T193D fueron mucho mayores que los obtenidos con la versión salvaje GFP-PEST.TGBp1 y con la fosfomutante no fosforilable; mientras que los niveles de fluorescencia de estas dos últimas fueron similares entre sí. Estos resultados fueron corroborados por ensayos de *Western blot* con anticuerpos específicos anti GFP (**Figura 16 b**). Como se puede observar, los niveles de acumulación de la proteína de fusión GFP-PEST.T193D fueron significativamente mayores que los de las proteínas fusionadas a la secuencia PEST salvaje o la secuencia PEST de la mutante T193A (**Figura 16 b**, calles 2, 3 y 4). Por otra parte, la diferencia observada en los niveles de

acumulación de la GFP-PEST.TGBp1 y la GFP-PEST.T193A resultó estadísticamente significativa, siendo menor la acumulación de la proteína mutante (**Figura 16 b**, calles **2** y **3**).

A continuación se analizaron los niveles de acumulación del ARNm de cada una de las construcciones ensayada con el fin de confirmar que la disminución en los niveles de proteína no estaba dada por una disminución en la acumulación de sus ARNms. Para ello se extrajo el ARN total de las hojas agroinfiltradas a los 3 d.p.i. y se evaluaron los niveles de ARNm con una sonda radioactiva que reconoce específicamente la secuencia de GFP. En la **Figura 16 c** se puede observar que ninguna de las versiones estudiadas presentó diferencias en cuanto a la acumulación de sus respectivos ARNms. Estos resultados permiten concluir que las diferencias observadas en la acumulación de las proteínas GFP fusionadas a las secuencias PEST salvaje y mutantes son debido a diferencias en la estabilidad de las proteínas.

En la **Figura 17** se muestran los resultados de un ensayo tipo para la evaluación de la expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* de las versiones PESTs salvaje y mutantes fusionadas a GFP en sus extremos C-terminales en presencia de la proteína supresora p19. Los niveles de fluorescencia de GFP observados con luz UV y la acumulación de las proteínas de fusión PEST.TGBp1-GFP, PEST.T193A-GFP y PEST.T193D-GFP por *Western blot* fueron similares (**Figura 17 a y b**). Como era de esperar, al analizar por *Northern blot* los niveles de acumulación de los ARNm de las construcciones estudiadas, tampoco se observaron diferencias en los niveles de sus respectivos ARNms (**Figura 17 c**).

De acuerdo a los resultados presentados en esta sección, se puede concluir que la secuencia C-terminal de la proteína TGBp1 de PVX que contiene la secuencia PEST es suficiente para ejercer un efecto negativo en la estabilidad de la proteína GFP funcionando como un motivo de degradación transferible. Por otra parte, se puede confirmar que para ejercer dicho efecto la secuencia debe estar ubicada en el extremo C-terminal de la proteína. A su vez, es posible corroborar lo previamente observado que la fosfomutante no fosforilable T193A es más inestable y sugiere que la fosforilación de este residuo estabiliza la proteína.

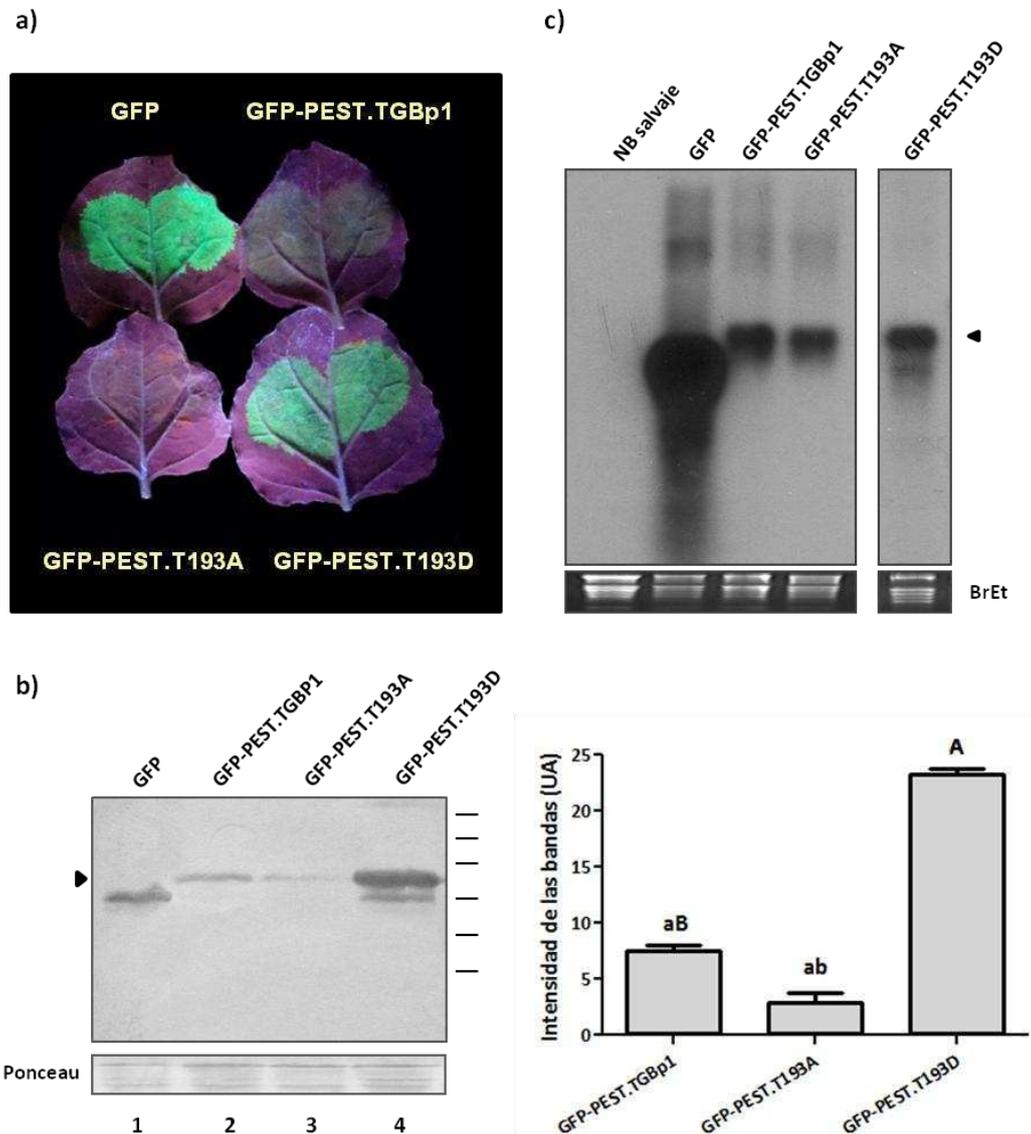


Figura 16. Estudio de los niveles de acumulación de GFP-PEST.TGBp1, GFP-PEST.T193A, GFP-PEST.T193D en plantas de *N. benthamiana* en presencia de p19. **(a)** Evaluación de los niveles de acumulación mediante la visualización de GFP con lámpara UV. A los 3 d.p.i se observaron los niveles de GFP con luz UV. **(b)** Evaluación de los niveles de acumulación por *Western blot*. A partir de las muestras tomadas a los 3 d.p.i. de hojas agroinfiltradas se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas mostradas se revelaron con anticuerpo anti GFP. La flecha indica la posición de las versiones PEST fusionadas a GFP en el N-terminal. Como control de carga de proteína se realizó una tinción con Rojo Ponceau. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa. Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el programa Gel-Pro Analyzer. Las letras indican el resultado del análisis estadístico por ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey (n=4). La misma letra en mayúscula y minúscula indica diferencias significativas (p<0,05). UA: unidades arbitrarias. **(c)** Evaluación de los niveles acumulación de los ARNm por *Northern blot*. Se muestran las autorradiografías de las membranas hibridadas con una sonda que reconocen la secuencia de GFP. La flecha indica la posición de los ARNm de las secuencias PETS fusionadas a GFP en el N-terminal. En el panel inferior se muestra la tinción del gel con bromuro de etidio (BrEt). NB: muestra de hojas de *N. benthamiana* sin infiltrar.

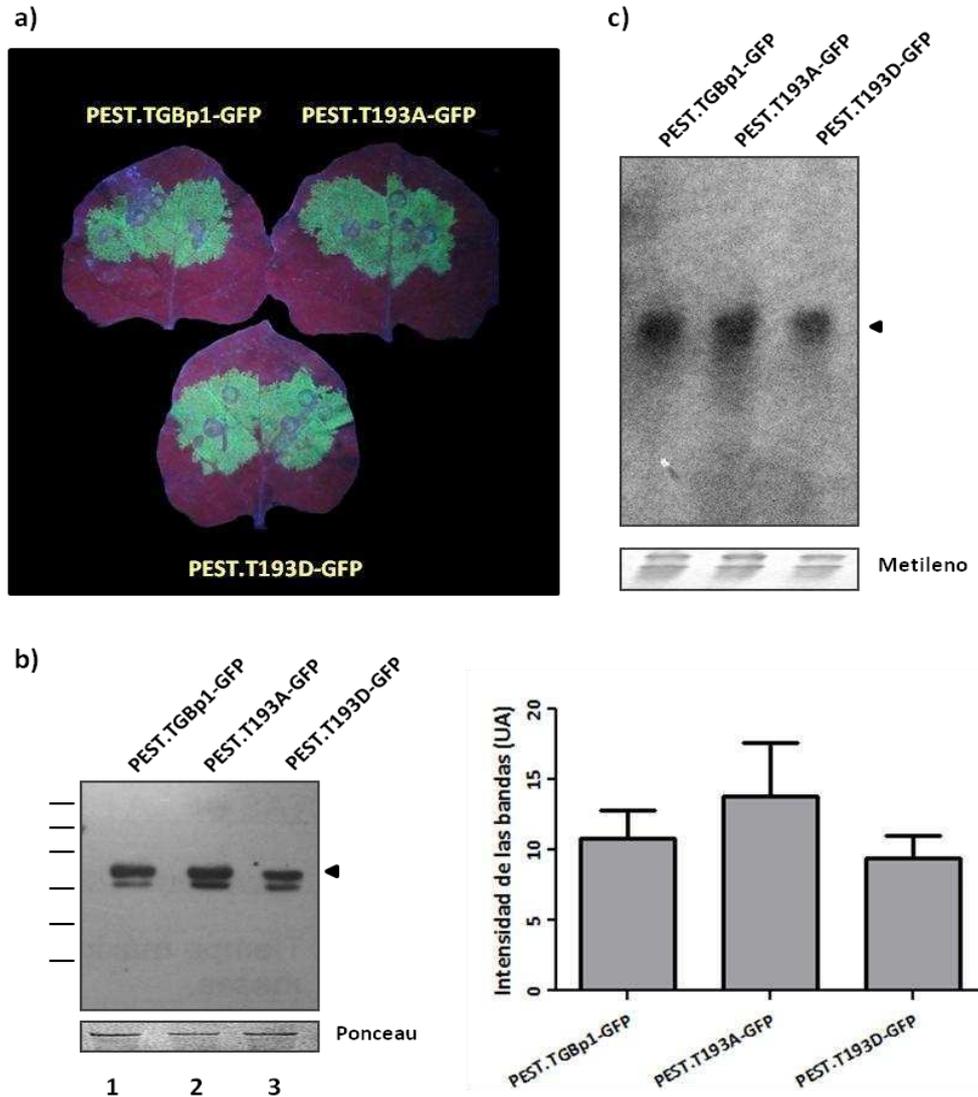


Figura 17. Estudio de los niveles de acumulación de PEST.TGBp1-GFP, PEST.T193A-GFP, PEST.T193D-GFP en plantas de *N. benthamiana* en presencia de p19. (a) Evaluación de los niveles de acumulación de mediante la visualización de GFP con lámpara UV. A los 3 d.p.i se observaron los niveles de GFP con luz UV. (b) Evaluación de los niveles de acumulación por Western blot. A partir de las muestras tomadas a los 3 d.p.i. de hojas agroinfiltradas se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se revelaron con anticuerpo anti GFP. La flecha indica la posición de las versiones PEST fusionadas a GFP en el C-terminal. Como control de carga de proteína se realizó una tinción con Rojo Ponceau (panel inferior). Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa. Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el programa Gel-Pro Analyzer. Los resultados se analizaron por el test estadístico ANOVA de un factor seguido por un test de Tukey (n=4). Los resultados no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$). UA: unidades arbitrarias.. UA: unidades arbitrarias. (c) Evaluación de los niveles acumulación de los ARNms por Northern blot. Se muestran las autorradiografías de las membranas hibridadas con una sonda que reconocen la secuencia de GFP. La flecha indica la posición de los ARNms de las secuencias PETS fusionadas a GFP en el C-terminal. En el panel inferior se muestra la tinción del gel con bromuro de etidio (BrEt). NB: muestra de hojas de *N. benthamiana* sin infiltrar.

3.4 Estudio del rol de la T193 en la estabilidad de las proteínas TGBp1s pertenecientes a virus que utilizan la estrategia de movilización del TGB.

Como se ha comentado anteriormente los virus pertenecientes a los géneros *Potexvirus* (*Alphaflexiviridae*), *Allexivirus* (*Alphaflexiviridae*) y *Carlavirus* (*Betaflexiviridae*) utilizan coordinadamente las proteínas TGBp1, TGBp2 y TGBp3, agrupadas en el módulo genético TGB, para el transporte de los genomas virales a través de los plasmodesmos (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). Como primer paso para determinar si la regulación en la estabilidad de TGBp1 por fosforilación de la T193 se encuentra conservada entre virus que utilizan la estrategia de movilización del TGB, se determinó el grado de conservación filogenética de este residuo entre distintos virus pertenecientes a los géneros *Potexvirus*, *Allexivirus* y *Carlavirus*. Utilizando la herramienta de alineamiento múltiple ClustalW2, se compararon un total de 19 secuencias aminoacídicas de virus pertenecientes a los géneros mencionados.

En la **Figura 18** se presenta el resultado del alineamiento de secuencias de aminoácidos de las diferentes TGBp1s. 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 refleja el grado de conservación de las propiedades físico-químicas para cada posición del alineamiento, el puntaje más alto se adjudica a la posición que presenta residuos idénticos. A pesar de la baja conservación de secuencia entre las TGBp1s de los diferentes virus, es posible observar el alto grado de conservación del residuo T193 (índice 9) en todas las secuencias analizadas. De hecho las secuencias que no presentan un residuo treonina en dicha posición lo reemplazan por un residuo serina, sugiriendo un efecto de selección en favor de la presencia de residuos fosforilables en dicha posición. La composición aminoacídica de las regiones aledañas al residuo T193 también se encuentra parcialmente conservada y muestra un cierto grado de enriquecimiento en residuos prolina, serina, treonina y ácido aspártico. Por otra parte, el análisis de las secuencia de estos virus utilizando el algoritmo PESTfind permitió la identificación de posibles secuencias PEST dentro de la misma región en todos los virus pertenecientes a los géneros *Potexvirus*, *Allexivirus* y *Carlavirus*.

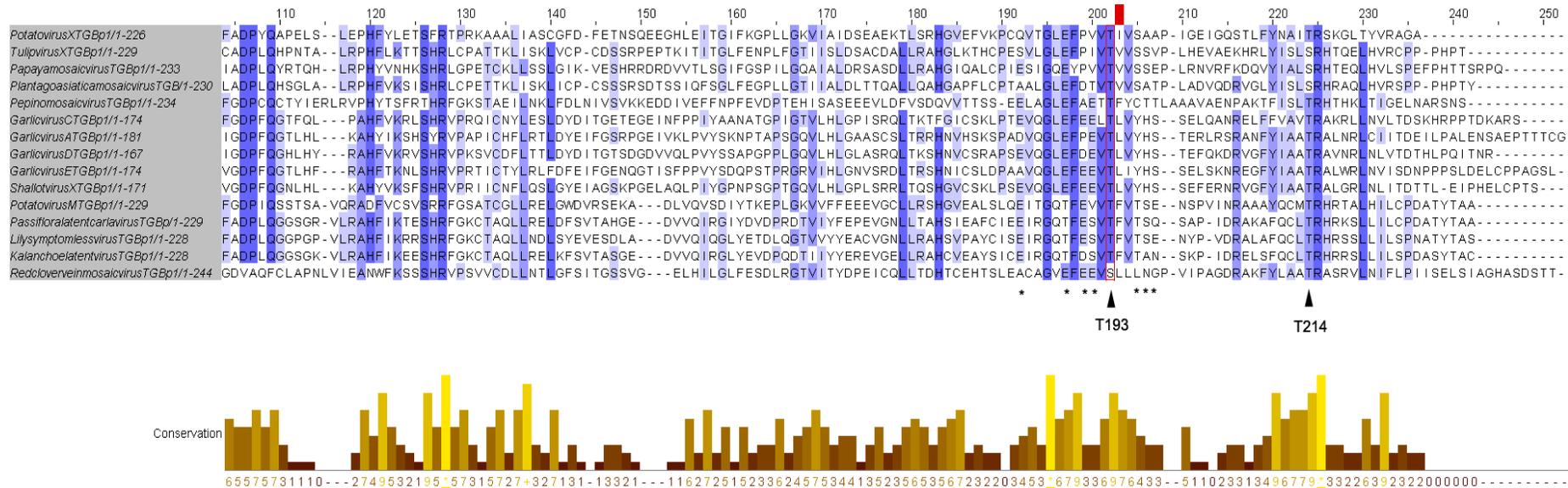


Figura 18. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de TGBp1 de virus pertenecientes a las familias *Alphaflexiviridae* y *Betaflexiviridae*. Las secuencias fueron analizadas utilizando el software Clustaw 2. Las secuencias alineadas corresponden a los virus de los géneros *Potexvirus* (*Potato virus X*, *Tulip virus X*, *Papaya mosaic virus*, *Plantago asiatica mosaic virus* y *Pepino mosaic virus*); *Allexivirus* (*Garlic virus C*, *Garlic virus A*, *Garlic virus D*, *Garlic virus E* y *Shallot virus X*) y *Carlavirus* (*Potato virus M*, *Passiflora latent virus*, *Lily symptomless virus*, *Kalanchoe latent virus* y *Red clover vein mosaic virus*). Se presentan la alineación correspondiente a la secuencia C-terminal comprendida entre los aminoácidos 124 y 226 según la secuencia de PVX que incluye la secuencia PEST identificada. El gráfico de barras indica el grado de conservación expresado en una escala numérica de 0 a 9. Las flechas señalan la posición correspondiente a los aminoácidos T193 y T214 según la secuencia de PVX. Los asteriscos indican las posiciones de residuos E, S y P parcialmente conservados dentro de la región identificada como una secuencia PEST en la TGBp1 de PVX.

Dada la conservación de este residuo en todas las secuencias analizadas se decidió estudiar si la inestabilidad de la proteína TGBp1 de PVX causada por la presencia de un residuo alanina en la posición 193 era un efecto conservado entre las TGBp1s de tipo Potex. Con este fin se llevaron a cabo ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*. Para ello se sintetizaron los ORFs de las TGBp1s de los virus *Garlic virus C* (GarVC, *Allexivirus*) y *Potato virus M* (PVM, *Carlavirus*). A las secuencias se les adicionó los sitios de recombinación attL y fueron clonados al vector pUC57, generando los vectores pCU57-GarVC-TGBp1 y pCU57-PVM-TGBp1. Esta misma estrategia se realizó para las versiones no fosforilables de las TGBp1s del GarVC y del PVM donde la treonina homóloga a la T193 de PVX fue reemplazada por un residuo alanina. La treonina homóloga para el GarVC corresponde a la T201 y para el PVM corresponde a la T191. De esta manera se obtuvieron los vectores pUC57-GarVC-T201A y pUC57-PVM-T191A. Los vectores pUC57 correspondientes a las TGBp1s salvajes y mutantes no fosforilables fueron recombinados con el vector binario de destino pK7WGF2 que permite la expresión de proteínas fusionadas a GFP en sus extremos N-terminales. Los vectores generados fueron el pK7WGF2-GarVC-TGBp1 (GarVC-GFP-TGBp1), el pK7WGF2-GarVC-T201A (GarVC-GFP-T201A), el pK7WGF2-PVM-TGBp1 (PVM-GFP-TGBp1) y el pK7WGF2-PVM-T191A (PVM-GFP-T191A) (**Figura 19**). Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con los vectores de la serie pK7WGF2 que codifican las distintas TGBp1s salvajes y sus versiones no fosforilables fusionadas a GFP junto con un cultivo de *A. tumefaciens* que expresa la proteína supresora del PTGS p19. El esquema del procedimiento utilizado es el mismo que se muestra en la **Figura 5**. Las plantas agroinfiltradas se conservaron en cámaras de cultivo durante un período de 3 días. Transcurrido ese tiempo se recolectó tejido foliar de las hojas agroinfiltradas y se extrajeron proteínas totales para evaluar la acumulación de las distintas TGBp1s y de las mutantes mediante análisis de *Western blot* con anticuerpos específicos anti GFP. Se efectuaron 3 experimentos independientes con 2 réplicas de cada una para las construcciones evaluadas. Las intensidades de las bandas en los ensayos de *Western blots* fueron cuantificadas utilizando el programa Gel-Pro Analyzer y normalizadas a la intensidad de la banda de la subunidad mayor de la Rubisco, cuantificada mediante

tinción con Rojo Ponceau. Para determinar la significancia de las intensidades, las mismas fueron analizadas por el test estadístico T-Student.

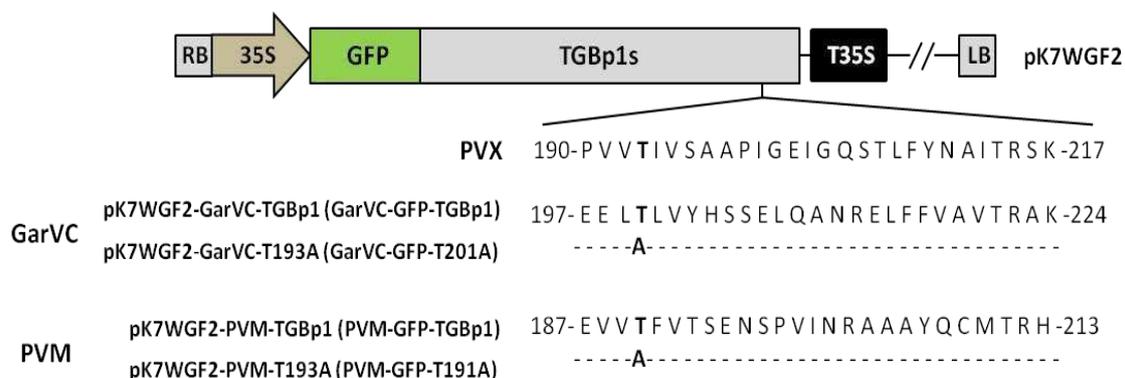


Figura 19. Representación esquemática de las construcciones de las TGBp1s y sus respectivos mutantes no fosforilables de los virus GarVC y PVM fusionadas a GFP en sus extremos N-terminales. Se indica un fragmento de cada secuencia aminoacídica de las TGBp1s correspondientes a los virus PVX (*Potato virus X*, residuos 190 – 217 de la secuencia proteica), GarVC (*Garlic virus X*, residuos 197 – 224 de la secuencia proteica) y PVM (*Potato virus M*, residuos 187 – 213 de la secuencia proteica). En cada caso se indica en la secuencia proteica la treonina en estudio. Además se muestra la alanina que reemplaza a la treonina en estudio. RB: borde derecho del ADN-T de *A. tumefaciens*, 35S: promotor 35S del CaMV, T35S: terminador transcripcional de 35S del CaMV, LB: borde izquierdo del ADN-T de *A. tumefaciens*. A: alanina; GFP: proteína verde fluorescente.

En la **Figura 20** se muestran los resultados del análisis de la expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* de las TGBp1s y de sus versiones mutantes correspondientes a los virus GarVC y PVM. Al comparar los niveles de acumulación de las TGBp1 salvajes y mutantes de los virus GarVC y PVM se puede observar que el reemplazo del residuo treonina por un residuo alanina lleva a una menor acumulación de la proteína mutante (**Figura 20 a y b**).

Paralelamente se extrajo el ARN total de las hojas agroinfiltradas y se evaluaron los niveles de ARNm por *Northern blot* utilizando una sonda radioactiva que reconoció específicamente la secuencia de GFP. La evaluación de los niveles de acumulación de sus ARNs mostró que los niveles de expresión fueron similares entre

las TGBp1 salvajes y las mutantes, indicando que las diferencias observadas en la acumulación de las proteínas son probablemente debidas a una menor estabilidad de la proteína mutante (**Figura 20 c**).

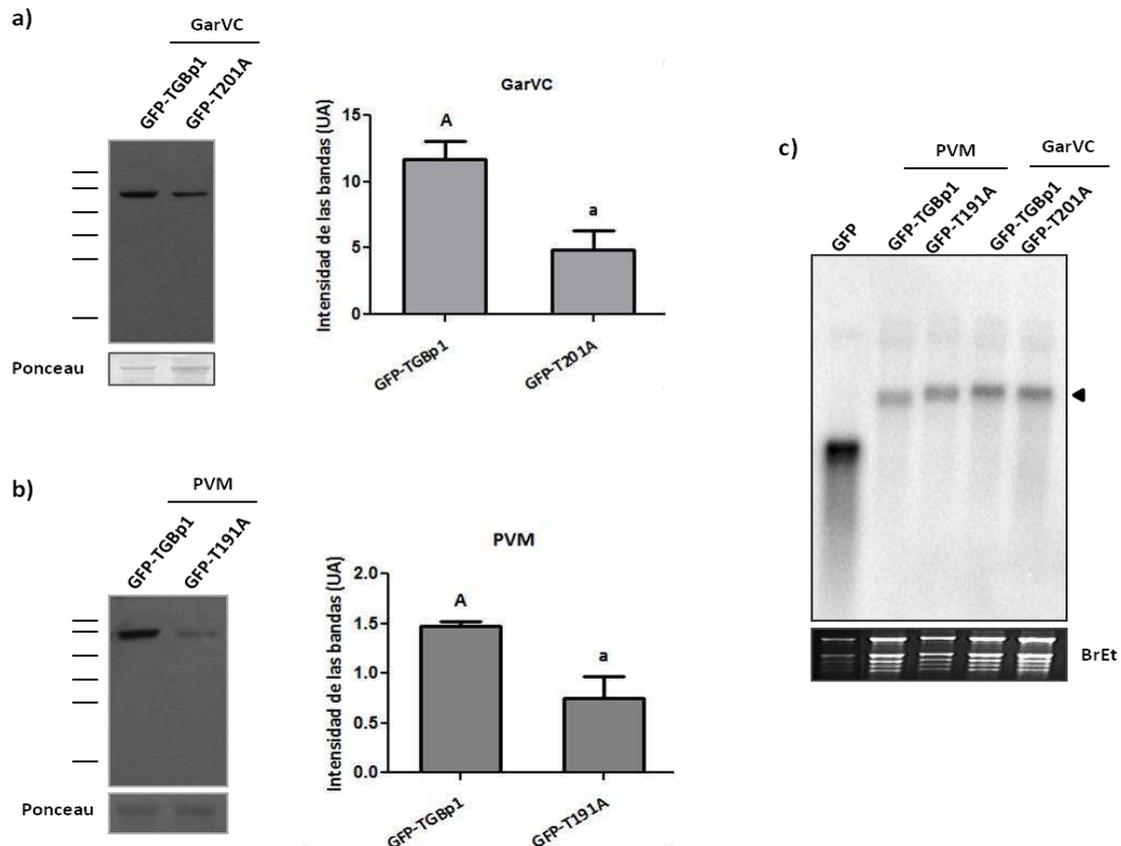


Figura 20. Ensayos de expresión transitoria de las TGBp1s salvaje y mutante de los virus GarVC y PVM en plantas de *N. benthamiana* en presencia de p19. (a) y (b) Evaluación de los niveles de acumulación de las proteínas por *Western blot*. A partir de las muestras tomadas a los 3 d.p.i. de hojas agroinfiltradas se extrajeron proteínas totales, se resolvieron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas mostradas se revelaron con anticuerpo anti GFP. (a) Evaluación de los niveles de acumulación de la TGBp1 y la T201A del GarVC. (b) Evaluación de los niveles de acumulación de la TGBp1 y la T191A del PVM. Como control de carga de proteína se realizó una tinción con Rojo Ponceau (panel inferior). Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el programa Gel-Pro A. El Test T-student fue utilizado para estudiar la significancia de las muestras. La misma letra en mayúscula y minúscula indica diferencias significativas ($p < 0,05$). UA: unidades arbitrarias. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa. (c) Evaluación de los niveles de acumulación de los ARNs por *Northern blot*. Se muestran las autorradiografías de las membranas hibridadas con una sonda que reconoce la secuencia de GFP. La flecha indica la posición de los ARNs de las TGBp1s salvajes y mutantes. En el panel inferior se muestra la tinción del gel con bromuro de etidio (BrEt).

Estos resultados muestran que el cambio de una treonina por un residuo alanina en las TGBp1s de los virus GarVC y PVM, en el residuo homólogo a la T193 de la TGBp1 de PVX, lleva a la inestabilidad de las proteínas en cuestión. Esto sugiere que la regulación por fosforilación de la degradación de las proteínas TGBp1s de los virus tipo Potex podría ser un mecanismo conservado entre los mismos.

4. Rol de la fosforilación de TGBp1 de PVX sobre la actividad supresora del silenciamiento génico mediado por ARN.

Dado que los resultados obtenidos en el punto 2 sugerían un posible rol regulatorio de la fosforilación sobre la actividad supresora de TGBp1 se decidió estudiar en mayor profundidad dicho efecto. Diversas metodologías han sido desarrolladas para la detección de proteínas supresoras del silenciamiento génico postranscripcional. La estrategia utilizada en este trabajo fue desarrollada en el laboratorio del Dr. David Baulcombe y corresponde al estudio del PTGS inducido por un transgén (Voinnet *et al.*, 2000). Este método utiliza plantas *N. benthamiana* transgénicas que sobreexpresan la proteína verde fluorescente (GFP) (*N. benthamiana* línea 16c). Brevemente, se agroinfiltran hojas de plantas de la línea 16c con un cultivo de *A. tumefaciens* conteniendo un vector que expresa la secuencia completa de GFP (pBIN-GFP), la cual desencadena la degradación secuencia específica del ARNm de GFP endógeno y exógeno. El establecimiento del PTGS se detecta a los 5 días postinfiltración mediante la evaluación de los niveles de acumulación en hojas infiltradas de la proteína GFP y de su ARNm, así como de los ARNs de bajo peso molecular (siARNs) de GFP. Los niveles de acumulación de GFP se analizan por observación de las hojas infiltradas con luz UV y por *Western blot*. Dado que la proteína verde fluorescente tiene un espectro de absorción de 460-500 nm y un espectro de emisión de 510-560 nm, la expresión de la misma en plantas de la línea 16c puede ser detectada al ser iluminadas con luz ultravioleta. Cuando una planta que no expresa GFP es iluminada con luz UV se ve de color rojo a simple vista debido a la emisión de la clorofila (absorción 450-500nm/emisión 650 -700 nm), mientras que la

excitación de la proteína GFP con luz UV produce una emisión verde claramente distinguible en los tejidos vegetales que la expresan. Por otro lado, se analizan los niveles de expresión de GFP mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo específico anti GFP. Los niveles de acumulación de los ARNm y de los siARNs de GFP se estudian mediante ensayos de *Northern blot*.

Para caracterizar el rol regulatorio de la fosforilación en la actividad supresora del PTGS de la proteína TGBp1 y sus fosfomutantes se coinfiltraron hojas de la línea 16c con cultivos de *A. tumefaciens* que portan el vector pBIN-GFP y los vectores de la serie pK7WG2D que expresan la proteína TGBp1 y las fosfomutantes (pK7WG2D-TGBp1, pK7WG2D-T193A, pK7WG2D-T1193D, pK7WG2D-T214A y pK7WG2D-T214D) (**Figura 21**). Como control positivo de la inducción del PTGS de GFP se agroinfiltraron hojas de la línea 16c sólo con el cultivo de *A. tumefaciens* que porta el vector pBIN-GFP (**Figura 21**). La densidad óptica final de la mezcla de agrobacterias con que se infiltró fue la misma para todos los tratamientos ($D.O_{600nm}$: 0,8). Para alcanzar este valor en los casos en que fue necesario se completaron las mezclas con agrobacterias sin transformar hasta alcanzar la $D.O_{600nm}$ deseada. Para este tipo de ensayos es necesario que los niveles de acumulación de las diferentes TGBp1s sean los mismos, dado que el grado de eficiencia en la supresión del PTGS es dependiente de la cantidad de la proteína supresora producida. En el punto anterior demostramos que los niveles de acumulación fueron diferentes para las mutantes T913A y T214D, por esta razón se agroinfiltraron los cultivos de *A. tumefaciens* transformadas con dichas versiones con una densidad óptica mayor respecto al cultivo transformado con la TGBp1 salvaje. Tanto para la T193A como para la T214D la $D.O_{600nm}$ final de su respectivo cultivo fue 5 veces mayor (5X) respecto al cultivo de *A. tumefaciens* de la TGBp1 salvaje. Para el caso de la T214D, al infiltrar con un cultivo 5X se lograron obtener niveles de acumulación de proteína similares a los de la proteína salvaje. Sin embargo, para el caso de la T193A, aún con un cultivo de $D.O_{600nm}$ final 10 veces mayor, no fue posible obtener niveles similares a los de TGBp1.

Las plantas agroinfiltradas se conservaron en cámaras de cultivo durante un período de 5 días. Transcurrido los 5 d.p.i se recolectó tejido foliar de las hojas agroinfiltradas y se extrajeron proteínas totales para evaluar los niveles de acumulación de la proteína TGBp1 y de las fosfomutantes mediante análisis de

Western blot con anticuerpos específicos anti TGBp1. Por otro lado, para evaluar la supresión del PTGS se recolectó tejido foliar de las hojas agroinfiltradas a los 5 d.p.i y se extrajeron proteínas totales para evaluar los niveles de GFP por *Western blot*. También a los 5 d.p.i. se extrajo ARN total para analizar los niveles del ARNm y de los siARNs correspondientes a GFP. Además, la expresión de GFP se observó por fluorescencia a los 5 d.p.i. iluminando las plantas con luz ultravioleta. Se efectuaron 6 experimentos independientes con 2 réplicas de cada una de las construcciones evaluadas.

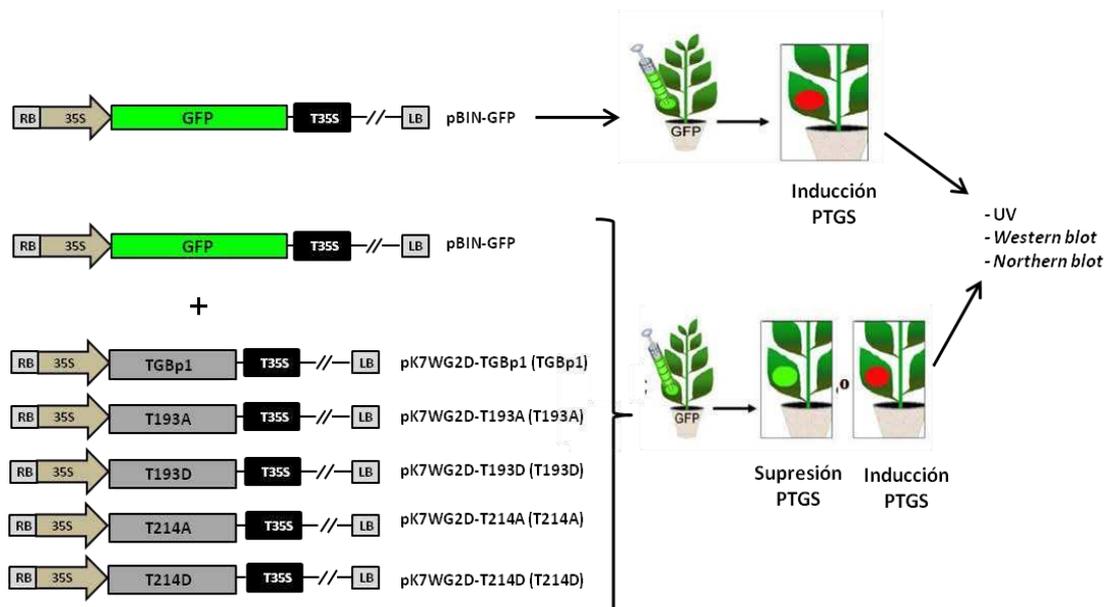


Figura 21. Esquema de los ensayos para el estudio del rol de la fosforilación en la actividad supresora del PTGS inducido por transgén de TGBp1 y de sus fosfomutantes. Para inducir el PTGS por transgén, se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* 16c con el vector pBIN-GFP. Para evaluar la actividad supresora de la proteína TGBp1 de PVX y de las versiones mutagenizadas, se coagroinfiltraron plantas con las construcciones pBIN-GFP y las versiones pK7WG2D de cada una de las proteínas en estudio (TGBp1, T193A, T193D, T214A y T214D). A 5 d.p.i. se observaron las plantas bajo luz UV y se extrajeron muestras de ARN y proteína totales de los tejidos agroinfiltrados para realizar ensayos de *Northern* y *Western blot*, respectivamente. El color rojo observado al iluminar las hojas con luz UV corresponde a la fluorescencia característica de la clorofila, y el color verde brillante corresponde a GFP.

Como se comentó anteriormente, en primer lugar se evaluaron los niveles de expresión transitoria de la proteína TGBp1 y sus fosfomutantes con el fin de determinar si los niveles de acumulación de las mismas eran comparables a los de la

TGBp1 salvaje. En este caso, se observó que las mutantes T193D, T214A y T214D alcanzaron niveles de expresión similares a los de la TGBp1 (**Figura 22 b y 23 b**). Sin embargo, para el caso de la mutante T193A no se pudieron obtener los mismos niveles de acumulación que la proteína salvaje, aún utilizando cultivos con una densidad óptica 10 veces mayor (**Figura 22 b**).

En la **Figura 22 a y 23 a** se presentan los resultados del análisis de la acumulación de GFP en la hojas infiltradas mediante la observación de la fluorescencia de GFP por iluminación con UV para las fosfomutantes T193 y T214, respectivamente. En las hojas agroinfiltradas solo con el vector que expresa GFP, que corresponden al control positivo de la inducción del PTGS, se pudo observar un parche de color rojo debido a la fluorescencia de la clorofila y a la ausencia de niveles detectables de expresión de GFP. De forma contraria, cuando se infiltró GFP junto con la proteína TGBp1, dado que ésta es capaz de suprimir el PTGS, se observó un parche de color verde brillante debido a la fluorescencia de la proteína GFP (control positivo de la supresión del PTGS). Al analizar la acumulación de GFP en presencia de las fosfomutantes T193 se observó que tanto la T193A como la T193D presentaron parches de color rojo similares a los del control positivo de inducción del silenciamiento (**Figura 22 a**). Por otra parte, al analizar la expresión de GFP en presencia de las fosfomutantes T214 se observó que la mutante T214A presentó niveles de fluorescencia similares a los de la hoja infiltrada con la TGBp1 salvaje (**Figura 23 a**). Sin embargo, la mutante T214D, al igual que las fosfomutantes T193, presentó un halo de color rojo debido a los bajos niveles de la proteína GFP (**Figura 23 a**).

Los resultados obtenidos por análisis de la fluorescencia de GFP fueron corroborados analizando los niveles de GFP por *Western blot* (**Figura 22 e y 23 e**). Como se puede observar, la TGBp1 salvaje presentó niveles de acumulación de GFP más altos que el control de la inducción del PTGS, indicando que la TGBp1 suprimió efectivamente el silenciamiento (**Figura 22 e y 23 e**, comparar calles **2 y 3**). En cuanto a las fosfomutantes T193, los niveles de acumulación de GFP fueron menores que los obtenidos con la proteína TGBp1 salvaje (**Figura 22 e**, comparar calles **4 y 5 con 3**) y similares al control de inducción del PTGS (**Figura 22 e**, comparar calles **4 y 5 con 2**). Por otro lado, cuando se evaluaron las fosfomutantes T214, se observó que la acumulación de GFP en la hoja agroinfiltrada con la mutante T214A presentó niveles

similares a la TGBp1 salvaje (**Figura 23 e**, comparar calles **3** y **4**); mientras que la mutante T214D mostró una disminución de los niveles de proteína de GFP llegando a niveles similares a los observados para el control de inducción del silenciamiento (**Figura 23 e**, comparar calles **2** y **5**). Los resultados obtenidos por *Western blot* confirman lo observado en la visualización de GFP con luz UV.

Al estudiar los niveles de expresión del ARNm de GFP, se observó que tanto la TGBp1 salvaje como todas las fosfomutantes presentaron niveles similares a los del control de inducción del silenciamiento (**Figura 22 c** y **23 c**). El resultado obtenido no fue similar al reportado previamente para la TGBp1 de PVX (Voinnet *et al.*, 2000), donde su acción como supresora del PTGS se evidencia por un aumento en los niveles del ARNm de GFP debido a su capacidad de protegerlo de la degradación específica de secuencia. Sin embargo, cabe destacar que un estudio más reciente demostró que los niveles de protección de la degradación del ARNm por la TGBp1 de PVX son bajos comparados con las TGBp1s de otros *Potexvirus* (Senshu *et al.*, 2009), y de hecho el resultado obtenido en dicho trabajo fue muy similar al presentado en esta Tesis. La variabilidad observada en la capacidad de la TGBp1 de PVX de proteger el ARNm de GFP de la degradación en este tipo de ensayos, podría explicar la incapacidad para detectar un aumento en la acumulación del ARNm de GFP en nuestros experimentos. Sin embargo, sí fue posible observar diferencias en los niveles de acumulación de los siARNs correspondientes a GFP. Como se puede observar en las **Figuras 22 d** y **23 d**, los niveles de siARNs correspondientes a las hojas infiltradas con la proteína TGBp1 salvaje disminuyeron con respecto a los observados en el control de inducción del PTGS (**Figuras 22 d** y **23 d**, comparar calles **2** y **3**), confirmando la supresión del PTGS por parte de TGBp1. Por otra parte, el análisis de las fosfomutantes mostró que sólo la fosfomutante T214A fue capaz de disminuir los niveles de acumulación de los siARNs de GFP (**Figura 23 d**, comparar calles **4** y **3**), mientras que las fosfomutantes T193A, T193D y T214D presentaron niveles de siARNs de GFP comparables a los del control de inducción del PTGS (**Figura 22 d**, comparar calles **4** y **5** con **2**; **Figura 23 d**, comparar calle **5** con **2**).

A partir del análisis de los resultados obtenidos se puede concluir que la fosfomutante T193D tiene afectada negativamente la capacidad supresora del

silenciamiento mediado por ARN. En cuanto a la fosfomutante T193A, se pudo establecer que bajo las condiciones experimentales utilizadas, no fue posible detectar actividad supresora del PTGS debido a que nunca se lograron niveles de acumulación proteica comparables a los de la TGBp1 salvaje. En este caso no es posible establecer si la falta de actividad supresora del PTGS es atribuible a un efecto específico de la mutación sobre dicha actividad o bien una consecuencia del bajo nivel de acumulación de la proteína mutante. Por otra parte, se puede concluir que la fosfomutante T214A no tiene afectada su actividad supresora, mientras que la fosfomutante T214D es incapaz de suprimir el PTSG gatillado por un transgén, proponiendo un rol regulatorio de la fosforilación de la T214 en la actividad supresora del PTGS de TGBp1. Por otro lado, estos resultados indican que la simulación de la fosforilación en la T193 y T214 afecta negativamente la actividad supresora de TGBp1.

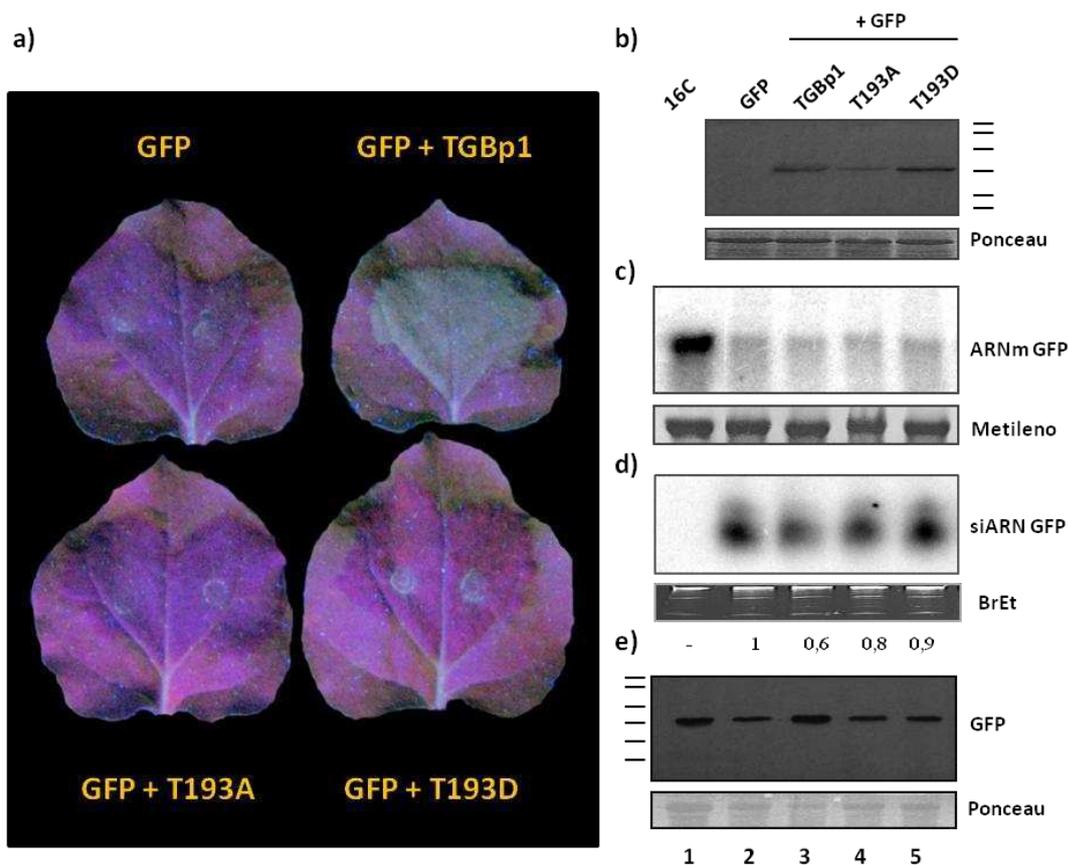


Figura 22. Evaluación de la actividad supresora del PTGS inducido por transgén de la TGBp1 y de los fosfomutantes T193. Ensayos de agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* 16c para la evaluación de la actividad supresora del PTGS de la TGBp1 salvaje y las fosfomutantes T193. **(a)** Fotografía de las plantas coagroinfiltradas con las construcciones indicadas iluminadas con luz UV a los 5 d.p.i. **(b)** Análisis de los niveles de acumulación de TGBp1 y de las fosfomutantes a los 5 d.p.i. por *Western blot* anti TGBp1 a partir de extractos proteicos extraídos de hojas de plantas agroinfiltradas. El panel inferior muestra el control de carga mediante la tinción de las proteínas con Rojo Ponceau. **(c)** Análisis de los niveles de acumulación del ARNm de GFP a los 5 d.p.i. por *Northern blot* a partir de ARN total extraído de hojas de plantas agroinfiltradas. La hibridación se efectuó con una sonda específica para la secuencia de GFP. El panel inferior muestra el control de carga mediante la tinción de los ARNs ribosomales con azul de metileno. **(d)** Análisis de los niveles de acumulación de los siARNs de GFP a los 5 d.p.i. por *Northern blot* a partir de ARN total extraído de hojas agroinfiltradas. La hibridación se efectuó con una ribosonda específica. Los números indicados en la parte inferior del panel corresponden a los niveles de acumulación relativa de siARNs de GFP luego de haber sido normalizados respecto al control de carga de ARN. El panel inferior muestra el control de carga mediante la tinción de los ARN ribosomales con bromuro de etidio (BrEt). **(e)** Análisis de los niveles de expresión de GFP a los 5 d.p.i. por *Western blot* a partir de extractos proteicos extraídos de hojas de plantas agroinfiltradas utilizando un anticuerpo específico anti GFP. El panel inferior muestra el control de carga mediante la tinción de las proteínas con Rojo Ponceau. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa.

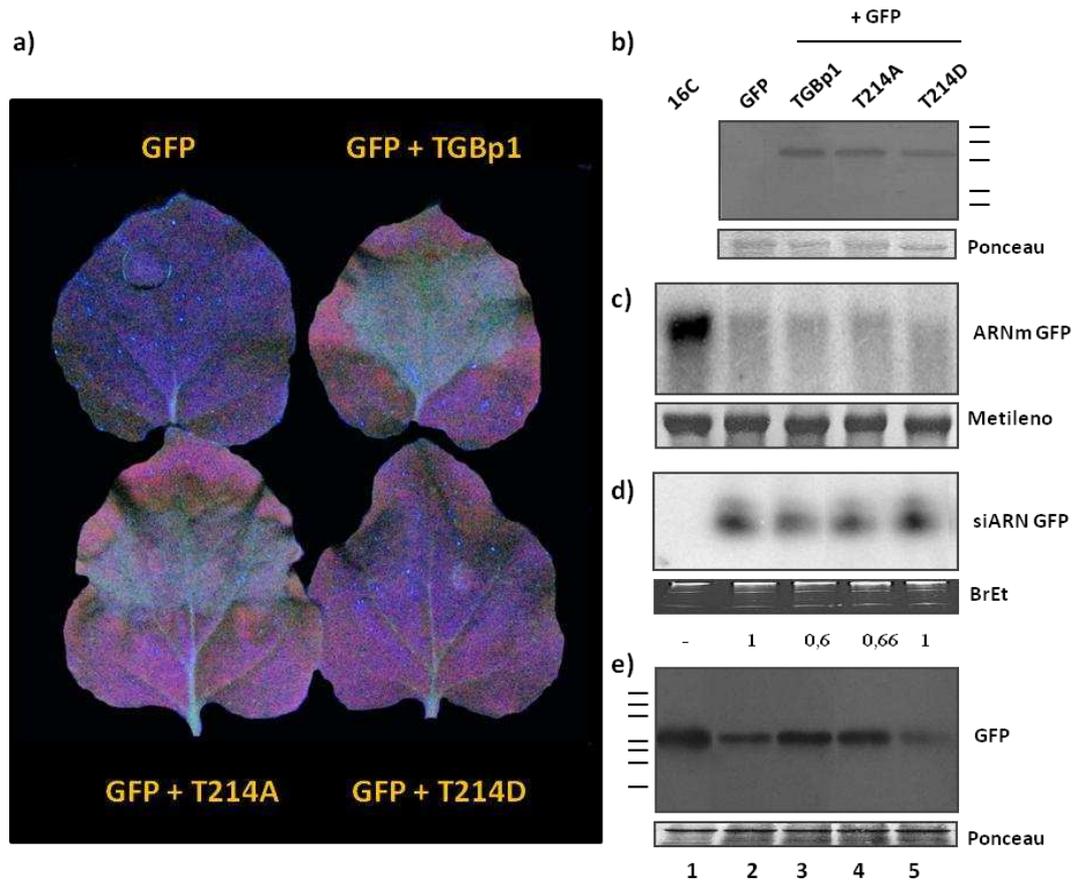


Figura 23. Evaluación de la actividad supresora del PTGS inducido por transgén de la TGBp1 y de las fosfomutantes T214. Ensayos de agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* 16c para la evaluación de la actividad supresora del PTGS de la TGBp1 salvaje y las fosfomutantes T214. **(a)** Fotografía de las plantas coagroinfiltradas con las construcciones indicadas iluminadas con luz UV a los 5 d.p.i. **(b)** Análisis de los niveles de acumulación de TGBp1 y de las fosfomutantes a los 5 d.p.i. por *Western blot* anti TGBp1 a partir de extractos proteicos extraídos de hojas de plantas agroinfiltradas. El panel inferior muestra el control de carga mediante la tinción de las proteínas con Ponceau. **(c)** Análisis de los niveles de acumulación del ARNm de GFP a los 5 d.p.i. por *Northern blot* a partir de ARN total extraído de hojas de plantas agroinfiltradas. La hibridación se efectuó con una sonda específica para la secuencia de GFP. El panel inferior muestra el control de carga mediante la tinción de los ARN ribosomales con metileno. **(d)** Análisis de los niveles de acumulación de los siARNs de GFP a los 5 d.p.i. por *Northern blot* a partir de ARN total extraído de hojas agroinfiltradas. La hibridación se efectuó con una ribosonda específica. Los números indicados en la parte inferior del panel corresponden a los niveles de acumulación relativa de siARNs de GFP luego de haber sido normalizados respecto al control de carga de ARN. El panel inferior muestra el control de carga mediante la tinción de los ARN ribosomales con bromuro de etidio (BrEt). **(e)** Análisis de los niveles de expresión de GFP a los 5 d.p.i. por *Western blot* a partir de extractos proteicos extraídos de hojas de plantas agroinfiltradas utilizando un anticuerpo específico anti GFP. El panel inferior muestra el control de carga mediante la tinción de las proteínas con Ponceau. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa.

5. Rol de la fosforilación de TGBp1 en la acumulación del microARN-168, regulador de los niveles de expresión de la proteína AGO1.

Mediante experimentos de inmunoprecipitación se ha demostrado que la TGBp1 de PVX interactúa con la proteína AGO1 mediando su degradación vía proteosoma (Chiu *et al.*, 2010). Como se ha comentado en la *Introducción*, la proteína AGO1 es un componente clave en la vía de los microARNs y de los siARNs en plantas y participa activamente en los mecanismos de defensa mediados por silenciamiento (Mallory y Vaucheret, 2010). De hecho, numerosos trabajos han demostrado el aumento de la acumulación del ARNm de AGO1 en infecciones virales (Zhang *et al.*, 2006; Csorba *et al.*, 2007; Havelda *et al.*, 2008), así como un aumento en los niveles de acumulación del microARN-168 (Várallyay *et al.*, 2010; Bazzini *et al.*, 2011).

La homeostasis de los niveles de acumulación de la proteína AGO1 es lograda mediante una serie de “loops” regulatorios que involucran al microARN-168 y que aseguran el correcto funcionamiento de las vías de los microARNs y de los siARNs. Estos “loops” incluyen la degradación del ARNm de AGO1 mediado por el microARN-168 vía PTGS (Vaucheret *et al.*, 2004), la estabilización del microARN-168 por parte de la proteína AGO1, que lleva a un aumento de acumulación del mismo cuando los niveles de AGO1 son altos (Vaucheret *et al.*, 2006), y la represión traduccional del ARNm de AGO1 mediada por AGO10 y guiado por el microARN-168 (Várallyay *et al.*, 2010). Por otra parte, el correcto funcionamiento del mecanismo homeostático que regula los niveles de AGO1 también depende de la vía de los siARNs, demostrándose que a partir de la degradación del ARNm de AGO1 dirigida por el microARN-168 se producen siARNs de AGO1 que también contribuyen a la regulación de los niveles del ARNm de dicha proteína (Mallory y Vaucheret, 2009).

Habiéndose demostrado que las infecciones producidas por PVX inducen la acumulación del microARN-168 (Várallyay *et al.*, 2010) y que en el caso del *Cymbidium ringspot virus* este efecto era producido por acción de la proteína supresora p19, decidimos evaluar si la proteína responsable del efecto observado sobre los niveles del microARN-168 en las infecciones producidas por PVX era la proteína TGBp1. Por otra parte, teniendo en cuenta el rol de la fosforilación en la actividad supresora del PTGS

de TGBp1 observado en el punto anterior, se decidió evaluar el posible rol regulatorio de la fosforilación en la acumulación del microARN-168.

Para ello se estudió el efecto de TGBp1 y de sus fosfomutantes sobre la acumulación del microARN-168 mediante ensayos de expresión transitoria en plantas *N. benthamiana*. Se evaluaron los niveles de dicho microARN en plantas de *N. benthamiana* infiltradas con los vectores de la serie pK7WG2D que expresan la TGBp1 salvaje y las diferentes versiones fosfomutantes (**Figura 2**). Para este tipo de ensayos, se utilizaron las mismas condiciones que en los experimentos de evaluación de la supresión del PTGS. Los cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las fosfomutantes T193A y T214D se agroinfiltraron con una densidad óptica 5 veces mayor respecto al cultivo transformado con la TGBp1 salvaje, la T193D y la T214A. Como control negativo se infiltró un cultivo de *A. tumefaciens* sin transformar. Transcurridos 5 días postinfiltración se recolectó tejido foliar de hojas inoculadas, a partir de las cuales se extrajeron proteínas totales para evaluar la presencia de la TGBp1 salvaje y de la fosfomutantes mediante análisis por *Western blot*. Además se tomaron hojas infiltradas para extraer ARN total con el fin de evaluar la acumulación del microARN-168 mediante *Northern blot* de ARN pequeños usando una sonda radioactiva específica para dicho microARN. Se realizaron dos experimentos independientes con 2 réplicas de cada una de las construcciones evaluadas.

Comparando las calles **1** y **2** de la **Figura 24 b**, se puede observar un claro aumento en los niveles de acumulación del microARN-168 en las hojas infiltradas con la TGBp1 salvaje, este mismo resultado se obtuvo para la mutante T214A (**Figura 24 b**, calle **5**). Por otro lado, los niveles de acumulación del microARN-168 en las plantas agroinfiltradas con las fosfomutantes T193A, T193D y T214D resultaron similares a los obtenidos en las plantas infiltradas con un cultivo de *A. tumefaciens* sin transformar (**Figura 24 b**, comparar calle **1** con calles **3**, **4** y **6**). En la **Figura 24 a** se puede corroborar que los niveles de expresión de las proteínas TGBp1 y sus fosfomutantes en los ensayos de expresión transitoria son similares, a excepción de la fosfomutante T193A como se demostró anteriormente.

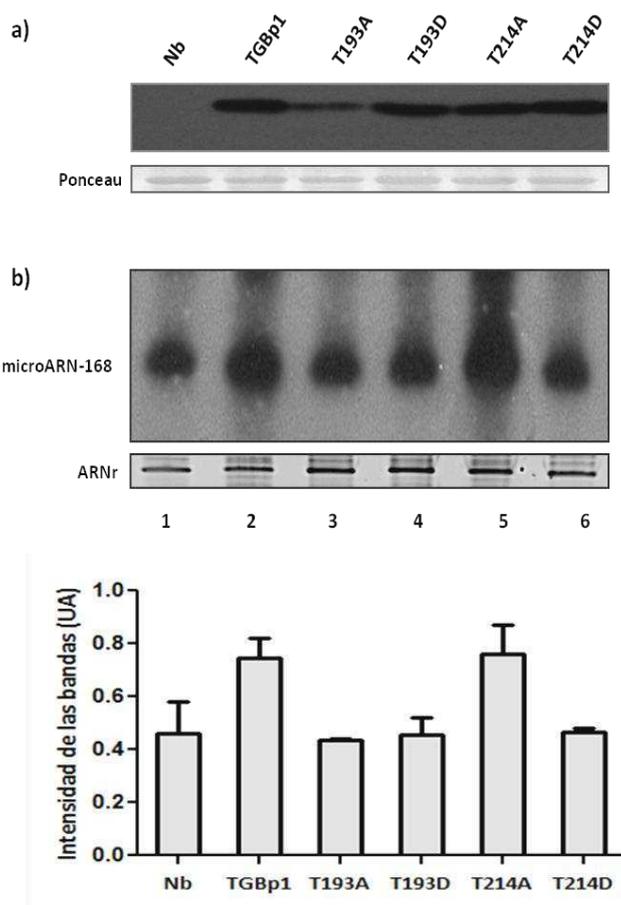


Figura 24. Evaluación de los niveles de acumulación del microARN-168 en ensayos de expresión transitoria de TGBp1 y las fosfomutantes T193 y T214 en plantas de *N. benthamiana*. (a) Estudio de los niveles de acumulación de TGBp1 y de las fosfomutantes mediante *Western blot* usando un anticuerpo específico anti TGBp1. (b) Detección de los niveles de acumulación del microARN-168 mediante *Northern blot*. Autorradiografía de las membrana hibridadas con sonda marcada con ^{32}P que reconoce específicamente el microARN-168. En el panel inferior se muestra la tinción del gel con bromuro de etidio para visualizar el ARN ribosomal (ARNr, control de carga). **Gráfico:** Las intensidades de las bandas de los ensayos realizados se cuantificaron mediante el programa Gel-Pro A y se normalizaron al control de carga. La intensidad promedio de los dos ensayos se muestra en el gráfico de barras. Nb: muestra de *N. benthamiana* infiltrada con cultivo de *A. tumefaciens* sin transformar. UA: unidades arbitrarias.

Los resultados presentados en esta sección muestran que la sobreexpresión de la proteína TGBp1 de PVX en ensayos de expresión transitoria produce un aumento en la acumulación del microARN-168. Además se puede concluir que este efecto es dependiente de la actividad supresora de TGBp1 dado que las fosfomutantes defectivas en dicha actividad, T193D y T214D, no son capaces de aumentar los niveles de acumulación del microARN-168.

6. Estudio de la fosforilación de TGBp1 de PVX sobre su capacidad de promover la apertura de plasmodesmos.

En plantas, tanto las proteínas como las partículas virales se mueven célula a célula a través de los plasmodesmos. Numerosos trabajos han demostrado que las proteínas de movimiento de diversos virus se encuentran involucradas en el aumento del tamaño de exclusión de los plasmodesmos (SEL), y en particular en PVX, se ha comprobado que esta actividad es ejercida por la proteína TGBp1 (Angell *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 2004). Esta función, también denominada “gating”, permite aumentar el tamaño de estos canales celulares promoviendo el paso de los complejos ribonucleoproteicos a través de las células. Es probable que esta actividad se encuentre estrictamente regulada, en parte, para disminuir el daño provocado en la planta huésped por una actividad de “gating” constante (Reichel y Beachy, 2000). De hecho, se ha demostrado un efecto regulatorio de la fosforilación de la MP de TMV en el transporte de las mismas a través de los PDs (Lee *et al.*, 2005; Trutnyeva *et al.*, 2005).

A continuación se estudió el rol de la fosforilación de TGBp1 en la regulación de su actividad de “gating”. Para ello se siguió el protocolo descrito por Bayne *et al.*, 2005. El mismo consiste en la agroinfiltración de hojas maduras de *N. benthamiana* con un vector que expresa la proteína GFP a concentraciones muy bajas, de forma tal que las células que reciben el plásmido se encuentren aisladas unas de otras. Este tipo de ensayo permite evaluar la capacidad de la proteína TGBp1 o de proteínas funcionalmente equivalentes, de aumentar el SEL de los plasmodesmos permitiendo el pasaje de GFP. Cuando el vector que expresa GFP se infiltra solo se pueden observar al microscopio células fluorescentes aisladas (control negativo). Dado que se infiltran hojas maduras, donde los plasmodesmos ya poseen una estructura secundaria más compleja y ramificada, el SEL se encuentra restringido y GFP queda circunscripto en la célula transformada (Oparka *et al.*, 1999). Por el contrario, cuando el mismo vector es transcomplementado con un cultivo que expresa la proteína TGBp1 de PVX, o proteínas funcionalmente equivalentes, la proteína GFP es capaz de movilizarse a las células vecinas y puede observarse un “cluster” de células fluorescentes alrededor de la célula inicialmente transformada.

Con este fin se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el vector pBIN61-GFP que permite la expresión de GFP a partir del promotor 35S del CaMV. El cultivo se infiltró a una dilución 10^{-4} (D.O._{600nm}: 1 cultivo inicial), para la obtención de células aisladas. Paralelamente, se coinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con el mismo cultivo junto con un cultivo sin diluir (D.O._{600nm}: 1 cultivo inicial) de *A. tumefaciens* transformado con los vectores de la serie pK7WG2D que permiten la expresión de la proteína TGBp1 salvaje y de las distintas fosfomutantes (pK7WG2D-TGBp1, pK7WG2D-T193A, pK7WG2D-T193D, pK7WG2D-T214A y pK7WG2D-T214D) (**Figura 2**). En ambos casos, las agroinfiltraciones se realizaron coinfiltrando con un cultivo sin diluir (D.O._{600nm}: 1) de *A. tumefaciens* que permite la expresión del supresor del PTGS p19. De esta forma se puede independizar la evaluación de la actividad de “gating” del efecto del PTGS inducido por la planta sobre los niveles de acumulación de las distintas proteínas TGBp1. Esto es posible porque se ha demostrado que p19 no es capaz de promover la apertura de los plasmodesmos ni se encuentra relacionado con la movilización viral de PVX (Bayne *et al.*, 2005). Luego de 3 días postinfiltración, se cortaron rectángulos de hoja, se montaron en un portaobjetos y se visualizaron al microscopio de fluorescencia. Se evaluó la presencia de células aisladas cuantificando 40 focos. La actividad de “gating” se midió calculando el porcentaje de focos que presentaron movilización de GFP tomando como movilización la presencia de focos fluorescentes conformados por más de dos células adyacentes. En la **Figura 25** se muestra un esquema del diseño experimental. Para analizar la significancia de las frecuencias de movimiento observadas respecto a la TGBp1 salvaje se utilizó el test estadístico Chi².

En la **Tabla 1** se resumen los resultados obtenidos de la evaluación de la capacidad de las distintas TGBp1s mutantes de promover la apertura de los plasmodesmos. En primer lugar puede observarse en el control negativo que la proteína GFP sola presenta un 5% de movilización, es decir que sólo un 5% de los focos observados presentaron más de dos células fluorescentes, siendo su localización mayoritariamente restringida a una única célula (**Figura 25, a**). En presencia de la TGBp1 salvaje se verificó la movilización de GFP a las células adyacentes por su acción promotora de la apertura de los plasmodesmos, observándose un porcentaje de movilización del 62,5% (**Figura 25, b**). Las fosfomutantes correspondientes a la T214

mantuvieron su capacidad de realizar “gating” ya que ambas presentaron un porcentaje de movilización de GFP similar a la proteína salvaje. Por otro lado, la mutante T193D fue capaz de conservar su capacidad de promover la apertura de los PD, ya que presentó un porcentaje de movilización de GFP similar al de la versión salvaje. Sin embargo, al estudiar la mutante correspondiente a la T193A se observaron diferencias significativas en su capacidad de promover el aumento del SEL de los plasmodesmos respecto a la TGBp1 salvaje. En este caso la mutante T193A presentó un porcentaje de movilización de la proteína GFP similar al control negativo.

Teniendo en cuenta estos resultados se puede decir que la función de apertura de los plasmodesmos de la TGBp1 de PVX no estaría regulada por la fosforilación de la T214. En cuanto a la fosforilación en la T193 los resultados sugieren que la fosforilación de la misma no afecta su capacidad de promover la apertura de los plasmodesmos, y que el menor porcentaje de movilización observado al evaluar la mutante T193A podría ser debido a una menor cantidad de proteína presente en el ensayo, producto de su degradación. Si bien el ensayo se realizó en presencia del supresor p19, como se ha demostrado anteriormente, la menor acumulación de la mutante T193A no puede ser contrarrestado por la presencia de dicho supresor **(Figura 8)**.

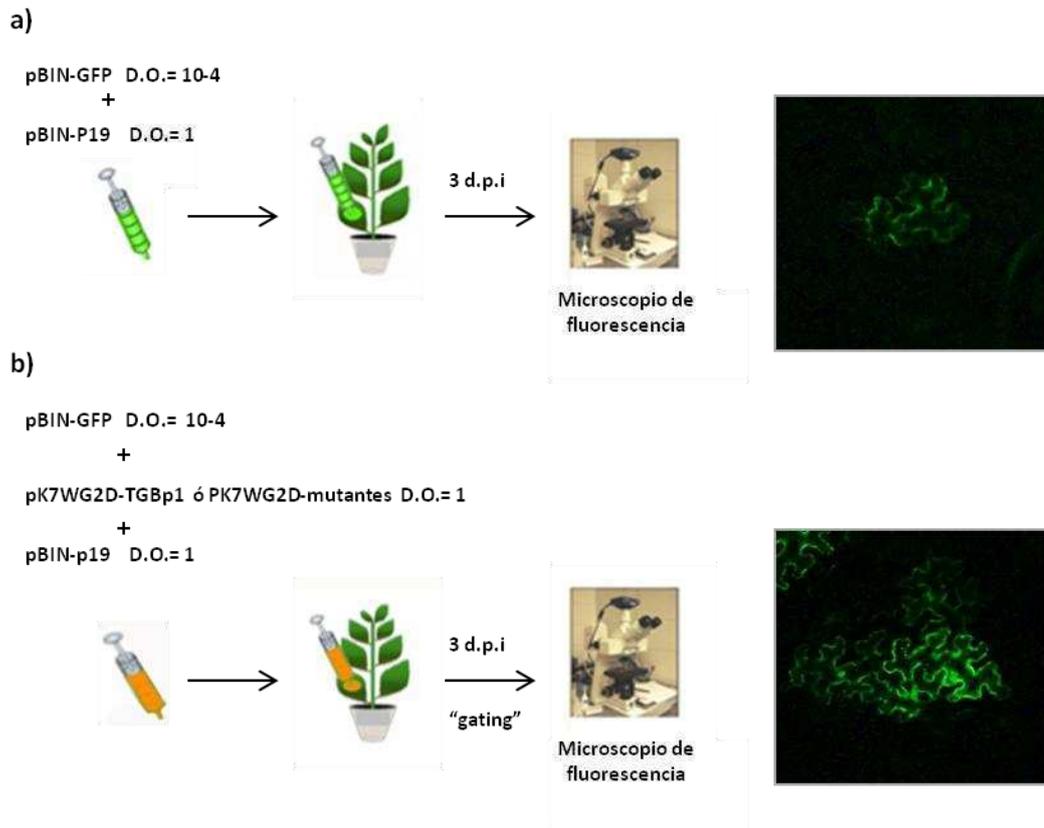


Figura 25. Esquema del estudio de la actividad de TGBp1 y de las fosfomutantes T193 y T214 en la promoción de la apertura de plasmodesmos. (a) Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con una mezcla de cultivos que expresan la proteína GFP (O.D._{600nm}: 10⁻⁴) y el supresor p19 (O.D._{600nm}: 1) (control negativo). A los 3 d.p.i se observaron las hojas bajo un microscopio de fluorescencia para visualizar GFP en células aisladas. (b) Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con una mezcla de los cultivos que expresan la proteína GFP (O.D._{600nm}: 10⁻⁴), la TGBp1 o fosfomutantes (O.D._{600nm}: 1) y la proteína supresora p19 (O.D._{600nm}: 1). Luego de los 3 d.p.i, se observaron las hojas infiltradas bajo un microscopio de fluorescencia para visualizar la movilización de GFP a través de los plasmodesmos.

| | % de movilización | | |
|-------|-------------------|---------|---|
| GFP | 5 % | (2/40) | a |
| TGBp1 | 62,5 % | (25/40) | A |
| T193A | 17,5 % | (7/40) | a |
| T193D | 57,5 % | (23/40) | A |
| T215A | 62,5 % | (25/40) | A |
| T215D | 55 % | (22/40) | A |

Tabla 1. Estudio de la capacidad de promover la apertura de plasmodesmos de TGBp1 y de las fosfomutantes T193 y T214 en plantas *N. benthamiana* en presencia de p19. Un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el vector que codifica GFP fue diluido 10.000 veces y mezclado en una relación 1:1:1 con cultivos transformados con la TGBp1 salvaje y/o mutantes junto con un cultivo transformado con el supresor p19. Las mezclas fueron infiltradas en hojas de *N. benthamiana* y a los 3 d.p.i. se contaron 40 focos fluorescentes. Aquellos focos que presentaron más de dos células contiguas con expresión de GFP se consideraron focos positivos para la movilización de dicha proteína. La actividad de “gating” se midió calculando el porcentaje de focos positivos para movilización de GFP. En paréntesis se muestran las frecuencias de focos de movilización positiva. Las letras indican el resultado del análisis estadístico Chi² (n=40). La misma letra en mayúscula y minúscula indica diferencias significativas (p<0,05).

Conclusiones y Discusión

La TGBp1 del *Potato virus X* es una proteína de movimiento que posee múltiples funciones dentro del ciclo viral. Esta proteína posee actividad ATPasa, helicasa y se encuentra involucrada en la movilización local y sistémica del virus, en la apertura del tamaño de los plasmodesmos, en la activación de la traducibilidad de los complejos de transporte y en la supresión del silenciamiento génico mediado por ARN (Bayne *et al.*, 2005). Recientemente, se demostró que la TGBp1 de PVX tiene también un rol fundamental en la organización de los cuerpos X involucrados en la replicación viral y que es capaz de interactuar con la proteína remorina (Tilsner *et al.*, 2012; Raffaele *et al.*, 2009). Dado que TGBp1 posee diferentes actividades es lógico suponer

la existencia de distintas isoformas que cumplan las múltiples funciones necesarias para el establecimiento de una infección viral exitosa. La generación y el balance entre las diferentes isoformas podrían producirse mediante procesos reversibles que involucren modificaciones postraduccionales. Un mecanismo basado en eventos de fosforilación/desfosforilación podría constituir una forma ideal para regular las diferentes actividades en las que está involucrada la TGBp1 durante el curso de la infección viral. En tal sentido, se ha demostrado que la fosforilación de proteínas virales cumple un rol regulatorio en diversos procesos infectivos donde la fosforilación/no fosforilación de residuos específicos es crucial para el mantenimiento de la capacidad infectiva de diferentes virus (Karpova *et al.*, 1999; Kawakami *et al.*, 1999; Waigmann *et al.*, 2000; Trutnyeva *et al.*, 2005; Zayakina *et al.*, 2008; Link *et al.*, 2011; Vijayapalan *et al.*, 2012). El ejemplo más estudiado corresponde a la MP de TMV. Los estudios iniciales con virus mutantes señalaron que la fosforilación de la MP 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 MP (Trutnyeva *et al.*, 2005). Por otro lado, la fosforilación de esta MP inhibe su capacidad de reprimir la traducción de los complejos de movilización. 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).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la TGBp1 de PVX es fosforilada al menos por una proteína quinasa celular con características de caseína quinasa 2 (CK2) (Módena *et al.*, 2008). Por otra parte, el análisis en geles bidimensionales de las isoformas de TGBp1 presentes en extractos de plantas de *N. tabacum* infectadas con PVX, mostró que la proteína producida *in vivo* durante la infección viral presenta múltiples isoformas (Módena, 2010). Se trata de una proteína compleja con al menos nueve isoformas, las cuales 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 modificación postraduccional. Respecto a la TGBp1 de PVX, se han identificado hasta el momento, las treoninas en la posición 193 y 214 (T193 y T214) como sitios de fosforilación por la quinasa CK2 de *N. tabacum* (Módena, 2010). Se ha demostrado que tanto la simulación de la fosforilación, como las modificaciones que impiden la fosforilación de los residuos T193 y T214 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 de PVX.

En base a estos antecedentes, se decidió estudiar en el transcurso de este trabajo de Tesis Doctoral el rol de la fosforilación en la regulación funcional de la proteína de movimiento TGBp1 de PVX.

Para que el virus pueda moverse de una célula a la otra, la proteína TGBp1 debe realizar en forma coordinada una serie de funciones que incluyen: (1) organizar y formar los cuerpos X, (2) unirse al ARN viral e inhibir su traducibilidad para formar los complejos de movilización, (3) transportar los complejos de movilización desde los cuerpos X hasta el PD, (4) interactuar con la maquinaria del PD para inducir el aumento del tamaño de exclusión del poro, (5) mediar en el transporte de los complejos y de ella misma a través del PD y (6) suprimir el PTGS para permitir la dispersión del virus (Lough *et al.*, 1998; Howard *et al.*, 2004; Bayne *et al.*, 2005; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010; Tilsner *et al.*, 2012).

Para analizar la importancia funcional de la fosforilación de los residuos identificados se evaluó la funcionalidad de dos tipos de proteínas TGBp1 mutantes: aquellas donde los residuos no pueden ser fosforilados (reemplazo por un residuo de alanina) y aquellas donde los residuos imitan la carga negativa por la adición de un grupo fosfato (reemplazo por un residuo de ácido aspártico). Esta estrategia fue exitosamente utilizada para el estudio de la regulación de la fosforilación de otras proteínas virales. (Kim *et al.*, 2002, Karger *et al.*, 2003; Waigmann *et al.*, 2000; Trutnyeva *et al.*, 2005; Jakubiec *et al.*, 2006; Vijayapalani *et al.*, 2012).

Como primer paso se analizó el efecto de la fosforilación de TGBp1 en los residuos T193 y T214 sobre su capacidad de promover el movimiento viral en ensayos de transcomplementación de la movilización de un virus PVX defectivo para dicha

función. Los resultados obtenidos señalaron que tanto las fosfomutantes que simulan la fosforilación (T193D y T214D), como aquellas que la impiden (T193A y T214A), tienen afectada su capacidad de promover el movimiento célula a célula del virión. Estos resultados explican la incapacidad de los viriones de PVX que expresan dichas TGBp1 mutantes de establecer una infección exitosa (Módena, 2011). A su vez indican que un balance entre la presencia de isoformas de TGBp1 fosforiladas y no fosforiladas es necesaria para que TGBp1 promueva la movilización célula a célula de los viriones. Resultados similares han sido observados para la regulación de la movilización viral en otros virus, donde se observó que ambas clases de fosfomutantes presentan un efecto deletéreo que restringe la dispersión del virus en la planta (Ivanov *et al.*, 2003; Vijayapalani *et al.*, 2012).

La incapacidad de las distintas fosfomutantes T193 y T214 de complementar la movilización del virus sugiere que una o más funciones de TGBp1 se encuentran afectadas. Sin embargo, debido a que los ensayos de transcomplementación son dependientes de la cantidad de proteína expresada no se puede descartar que un resultado negativo sea consecuencia de una menor acumulación de la proteína mutante causada por una inestabilidad de la misma.

Por esta razón, el primer paso consistió en estudiar los niveles de acumulación de las diferentes TGBp1 mutantes. Para interpretar los resultados de los ensayos de análisis de la acumulación de proteínas debemos tener en cuenta: (1) que la sobreexpresión de transgenes se encuentra afectada negativamente por el PTGS, y (2) que TGBp1 es una proteína supresora del PTGS. Por lo tanto, el nivel de acumulación de los ARNs de TGBp1, y por ende los de sus proteínas, es el resultado de un balance entre la degradación del ARNm por el PTGS de la planta y el efecto supresor de TGBp1 sobre el mismo. Independientemente de este efecto, las distintas mutantes de TGBp1 pueden tener afectada su estabilidad, lo que podría llevar a una menor acumulación proteica que resultaría en una menor acumulación de su ARNm al disminuir la actividad supresora del PTGS de TGBp1 en el ensayo.

Los resultados obtenidos mostraron que las fosfomutantes T193A y T214D presentaban niveles de acumulación de proteína significativamente menores que la TGBp1, mientras que las fosfomutantes T193D y T214A producían los mismos niveles de acumulación que la proteína salvaje. Por otra parte, las fosfomutantes T193A,

T193D y T214D presentaron niveles de acumulación de sus ARNm sustancialmente menores que los de la TGBp1 y de la fosfomutante T214A. La menor acumulación de los ARNMs de las fosfomutantes T193A, T193D y T214D, puede estar dada por una menor actividad supresora del PTGS en el ensayo de expresión transitoria. Como se ha dicho, esta menor actividad supresora puede ser causada tanto por la expresión de una proteína mutante que tienen afectada *per se* la capacidad de suprimir el PTGS o bien, por una proteína mutante con menor estabilidad y una menor acumulación de la misma. Para dilucidar cuál de estos dos efectos podrían explicar los resultados obtenidos se evaluaron los niveles de acumulación de las proteínas T193A, T193D y T214D y de sus ARNMs en presencia del supresor del PTGS p19. Si la fosfomutante tiene afectada su actividad supresora *per se*, se espera que la coexpresión con el supresor del PTGS lleve a un aumento en la acumulación de su ARNm con el concomitante aumento en los niveles de acumulación de su proteína. Por otra parte, si la fosfomutante posee una menor estabilidad se espera observar un aumento en los niveles de acumulación de su ARNMs, sin producir un aumento en los niveles de acumulación de su proteína. Los resultados obtenidos demostraron de forma preliminar que la fosfomutante T193A tiene afectada su estabilidad, mientras que las fosfomutantes T193D y T214D son incapaces de suprimir el PTGS.

En los últimos años ha habido un creciente aumento de evidencias que involucran al sistema UPS-26S en las interacciones plantas y patógenos (Zeng *et al.*, 2006; Dreher y Callis, 2007; Citovsky *et al.*, 2009; Craig *et al.*, 2009; Trujillo y Shirasu, 2010). En *A. thaliana* aproximadamente un 20% de la expresión de genes se encuentra modificada cuando la planta es atacada por patógenos y hay una regulación positiva de genes relacionados con el sistema UPS-26S (Rietz y Parker, 2007). Por ejemplo, se ha demostrado la inducción en *N. tabacum* de enzimas involucradas en la ubiquitinación en infecciones virales con los virus ToMV y TMV (Takizawa *et al.*, 2005) sustentando la idea que el sistema UPS-26S participa en el diálogo molecular entre los virus y las plantas hospedadoras. Por otra parte, se ha observado que la inhibición del sistema ubiquitina-proteosoma lleva a un aumento en la acumulación de las MPs de los virus TMV y TYMV, demostrando que estas proteínas son blanco de esta vía de degradación (Reichel y Beachy, 2000; Camborde *et al.*, 2010). En este trabajo de Tesis Doctoral, se demostró que el inhibidor MG132 específico del proteosoma, bloquea la degradación

de la fosfomutante T193A sugiriendo que el sistema UPS-26S estaría involucrado en la degradación de TGBp1 de PVX.

Mediante el análisis de los niveles de acumulación de las proteínas TGBp1 y de las fosfomutantes T193 fusionadas a GFP, en ensayos de expresión transitoria, se pudo confirmar que el cambio de la T193 por un residuo alanina desestabiliza a la proteína, y esta desestabilización puede ser revertida por el cambio de la T193 por un aminoácido que simula la fosforilación. Este resultado indica que la degradación de TGBp1 es influenciada por la ausencia de una carga negativa en la secuencia C-terminal de la proteína. Por otro lado, se observó que este efecto regulatorio se perdía si el extremo C-terminal de la proteína se encontraba bloqueado, sugiriendo la presencia de una secuencia regulatoria de la degradación en el extremo C-terminal.

Uno de los mayores determinantes en la vida media de las proteínas es la presencia de señales de degradación o dregones en los extremos N-terminales y C-terminales de las mismas (Glickman y Ciechanover, 2002; Ravid y Hochstrasser, 2008). Los dominios PEST son secuencias ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina que han sido asociados a la inducción de la degradación de proteínas y a una corta vida media de las mismas (Rechsteiner y Rogers, 1996). Numerosas evidencias han demostrado que las secuencias PESTs funcionan como secuencias condicionales de degradación reguladas por la fosforilación y desfosforilación de residuos presentes en dichos dominios (Martinez *et al.*, 2003; Hunter, 2007; Camborde *et al.*, 2010; Tornavaca *et al.*, 2011).

El análisis *in silico* de la secuencia de TGBp1 utilizando el algoritmo PESTfind dio como resultado la presencia de dos posibles secuencias PESTs en la secuencia de TGBp1, una de ellas ubicada en la región que abarca el extremo C-terminal de la proteína y que contiene la T193. Los resultados obtenidos durante este Trabajo de Tesis permitieron mapear la región comprendida entre los aminoácidos 180-226 como la responsable de la degradación de TGBp1. Dentro de esta región se encuentra ubicada una posible secuencia PEST C-terminal. Por lo tanto, basados en los resultados que muestran la habilidad de esta región para funcionar como un determinante de inestabilidad mínimo transferible y regulable por fosforilación, se puede concluir que se trata de una secuencia PEST funcional. Llamativamente la fusión al extremo C-terminal de GFP de la secuencia PEST de la TGBp1 salvaje produce una mayor

inestabilidad de la proteína GFP que la fusión de la propia TGBp1 salvaje entera. Este comportamiento podría ser explicado por una menor eficiencia de la fosforilación de la T193 presente en la secuencia PEST aislada de la TGBp1 salvaje con respecto a la eficiencia de fosforilación de la T193 en el contexto de la TGBp1 completa. Dado que TGBp1 es multifosforilada, la presencia de otros sitios de fosforilación, los cuales aún no han sido identificados podría influir en la eficiencia de fosforilación de la T193. La diferencia en la eficiencia de fosforilación postulada llevaría a que la secuencia PEST aislada correspondiente a la TGBp1 salvaje a que se encuentre mayormente en el estado desfosforilado lo cual aumentaría la inestabilidad de GFP.

Notablemente esta secuencia PEST C-terminal, así como el residuo homólogo a la T193 de PVX, fueron identificados invariablemente, en las diferentes TGBp1 de virus pertenecientes a las familias *Alpha-* y *Bethaflexiviridae*, sugiriendo que el efecto regulatorio sobre la degradación de TGBp1 puede constituir una característica común entre los flexivirus. Esta hipótesis es reforzada por los resultados que muestran que el reemplazo del residuo homólogo a la T193 de PVX por un residuo alanina en las TGBp1 de los flexivirus GarVC y PVM lleva a la desestabilización de la proteína.

Si bien las MPs de los virus son blancos de degradación por el sistema UPS-26S, aún no se sabe si este mecanismo es una respuesta de defensa de la planta a la infección viral o bien una estrategia del virus para cooptar al sistema de degradación de la planta para su propio beneficio. Por un lado, las MPs son elementos centrales en la dispersión viral, y por lo tanto, blancos obvios de la maquinaria de defensa de la planta. Por otro lado, la acumulación de las MPs es potencialmente detrimental para la planta hospedadora, debido a su deposición e interferencia en el plasmodesmo (Ding *et al.*, 1992) o la disrupción de la estructura del retículo endoplasmático (Reichel *et al.*, 1998). En el caso de TMV su MP es degradada vía proteosoma, y llamativamente se ha demostrado que la supresión de la maquinaria de ubiquitinación lleva a un aumento de la resistencia de la planta a la infección por TMV, reforzando la idea que la proteólisis de la MP es beneficiosa para el patógeno (Reichel y Beachy, 2000). Sin embargo, no se ha demostrado que TMV posea un mecanismo regulatorio que le permita controlar los niveles de acumulación de su proteína, por ejemplo mediante la promoción de su degradación por fosforilación. Dado que la fosforilación de TGBp1 en la T193 lleva a una estabilización de la proteína se propone que esta modificación

postraducciona es un mecanismo de escape del virus frente a la respuesta de degradación de su huésped. Teniendo en cuenta el alto grado de conservación de la T193 en las diferentes TGBp1s de flexivirus se puede sugerir que la fijación de este residuo, a lo largo de la evolución, podría tener un valor adaptativo que le permite a los virus con estrategia de movilización del tipo TGB hacer frente al ataque de las plantas. En conclusión, se ha demostrado que la fosforilación de la T193 de TGBp1 de PVX sería un mecanismo de regulación de la degradación de la proteína y se encontraría conservado en los virus con estrategia de movilización del tipo TGB.

Dado que los resultados preliminares obtenidos sugerían que las fosfomutantes T193D y T214D tenían afectada su capacidad para suprimir el PTGS, el siguiente objetivo de este trabajo de Tesis consistió en profundizar el estudio del efecto de la fosforilación de TGBp1 en los residuos T193 y T214 sobre su actividad supresora del PTGS. Para ello se utilizó el sistema experimental de inducción del silenciamiento por transgén en plantas de *N. benthamiana* 16c, el cual ha sido aplicado en la identificación de la mayoría de los supresores virales caracterizados hasta el momento (Voinnet *et al.*, 2000).

La TGBp1 de PVX ha sido previamente descrita como una proteína supresora del silenciamiento mediado por ARN (Voinnet *et al.*, 2000; Bayne *et al.*, 2005). En este trabajo se comprobó que la TGBp1 del PVX cepa CP2 es capaz de suprimir el PTGS inducido por transgén. Fue posible confirmar su actividad supresora al observar un claro efecto en su capacidad de aumentar la acumulación de la proteína GFP y de disminuir los siARNs de GFP respecto al control de inducción del silenciamiento. Sin embargo, no fue posible detectar un aumento considerable en los niveles de acumulación del ARNm de GFP como había sido previamente descrito para la TGBp1 de PVX cepa UK3 (Voinnet *et al.*, 2000). Trabajos previos han demostrado que la proteína TGBp1 de PVX es un supresor débil comparada con las TGBp1s de otros *Potexvirus*, en los cuales se puede observar un claro aumento de los niveles de ARNm de GFP por efecto de la inhibición de la degradación de los mismos (Voinnet *et al.*, 1999; Senshu *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que se trata de un supresor débil se planteó que nuestra imposibilidad para detectar un aumento en los niveles de ARNm de GFP podría estar dada en parte por una dificultad técnica para cuantificar pequeños cambios en los niveles de acumulación del ARNm de GFP. De hecho, en los trabajos

realizados por Voinnet *et al.*, 2000 y Senshu *et al.*, 2009, donde ambos utilizan la TGBp1 perteneciente a la cepa de PVX UK3, los resultados obtenidos fueron contradictorios; en el primer caso fue posible observar un claro aumento en los ARNm de GFP, mientras que en el segundo, los niveles de acumulación del mismo no difirieron mayormente del control de inducción del silenciamiento.

Al analizar el efecto de la fosforilación de TGBp1 sobre su actividad supresora del PTGS observamos que la simulación de la fosforilación de TGBp1 en los residuos T193 y T214 regula negativamente la actividad supresora de TGBp1. Por otra parte, la TGBp1 no fosforilada en la T214 es capaz de suprimir el PTGS, sugiriendo que la fosforilación/desfosforilación de la T214 sería un mecanismo que regula la actividad supresora de TGBp1. Lamentablemente, el hecho que la TGBp1 no fosforilada en la T193 sea altamente inestable no permite, en este tipo de ensayos, determinar si esta isoforma es funcional, de manera de confirmar el rol regulatorio de la fosforilación de la T193 en la actividad supresora del PTGS.

Teniendo en cuenta que TGBp1 podría estar ejerciendo, en parte, su actividad supresora por una interacción directa con la proteína AGO1 (Chiu *et al.*, 2010), la función de estas fosforilaciones podría ser regular la interacción TGBp1-AGO1. De esta forma, se puede postular que la isoforma de TGBp1 no fosforilada en la T214 es capaz de interactuar con AGO1, ejerciendo su actividad supresora, y al ser fosforilada perdería afinidad por la misma permitiendo su interacción con otros componentes celulares o virales necesarios para promover el movimiento célula a célula del virus. Si el efecto de la fosforilación de TGBp1 en las T193 o T214 son efectos independientes, o si la fosforilación de un sitio afecta la fosforilación por el otro deberá ser determinada estudiando la actividad supresora del PTGS de TGBp1 doble mutantes. Sin embargo, el hecho que la no fosforilación en la T193 lleva a la producción de una proteína inestable dificulta la interpretación de los resultados que se puedan obtener con las dobles mutantes. Resultados no presentados en este trabajo muestran que la doble mutante T193AT214A es tan inestable como la mutante simple T193A, sugiriendo un efecto dominante de la no fosforilación en la T193 sobre la estabilidad de la proteína.

Recientemente se ha propuesto que los virus de plantas utilizan como estrategia general de contradefensa la inducción de los niveles del microARN-168, los cuales actuarían reprimiendo la traducción del ARNm de AGO1, generando una

disminución en la acumulación de dicha proteína (Várallyay *et al.*, 2010). Las responsables de este mecanismo serían las proteínas supresoras del PTGS; sin embargo, esta última hipótesis sólo fue corroborada para el supresor p19 del *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV, *Tombusvirus*). En dicho trabajo los autores muestran que las infecciones producidas por PVX inducen la acumulación del microARN-168 (Várallyay *et al.*, 2010). Por otro parte, resultados de nuestro laboratorio confirman que la sobreexpresión de TGBp1 en plantas transgénicas de *N. benthamiana* y *A. thaliana* producen un aumento de los niveles de acumulación del microARN-168 (Temprana, 2010). En base a estos resultados se decidió analizar si la TGBp1 es responsable del aumento en la acumulación del microARN-168 y si su fosforilación en los residuos que regulan su actividad supresora está relacionada con la acumulación del mismo. Los resultados obtenidos muestran que la TGBp1 es capaz de inducir un aumento de los niveles de acumulación del microARN-168 y que la fosforilación en las T193 y T214 inhiben la acumulación del mismo. Dado que la fosforilación de las T193 y T214 de TGBP1 afecta tanto su actividad supresora del PTGS como su capacidad de inducir un aumento del micro-ARN168, se puede plantear que la actividad supresora de TGBP1 sería ejercida sobre un componente común entre las vías de los siARNs y los microARNs, apoyando las evidencias que proponen a AGO1 como blanco de acción de esta proteína viral.

Los niveles de AGO1 y del microARN-168 son regulados en la célula mediante un “loop” autoregulatorio. Este “loop” se encuentra determinado por el clivaje del ARNm de AGO1 catalizado por AGO1 y guiado por el microARN-168 y por la estabilización del microARN-168 mediada por AGO1 (Mallory y Vaucheret, 2009). De esta manera un aumento en los niveles de AGO1 lleva a un aumento de los niveles del microARN-168 mediante su estabilización, lo cual genera un aumento de la degradación del ARNm de AGO1 y la concomitante disminución de AGO1. Paralelamente, altos niveles del microARN-168 también llevan a una disminución de los niveles de AGO1 mediante la represión traduccional del ARNm de AGO1 mediado por AGO10 y guiado por el microARN-168 (Várallyay *et al.*, 2010). En base a nuestros resultados la proteína TGBp1 induce el aumento del microARN-168, y teniendo en cuenta que se ha demostrado la interacción de TGBp1 con AGO1, se propone que el aumento de los niveles del microARN-168 sería resultado de la acción de TGBp1 sobre

la proteína AGO1. Hasta el momento se ha demostrado que la TGBp1 interacciona con AGO1 y promueve su degradación vía proteosoma (Chiu *et al.*, 2010). Sin embargo, la inducción de la acumulación del microARN-168 por TGBp1 es difícil de explicar si la TGBp1 actuara degradando a AGO1, dado que la degradación de la misma llevaría según el mecanismo del “loop” autoregulatorio, a la inestabilidad del microARN-168. Por lo tanto, la sobreexpresión de TGBp1 debería promover una disminución, y no un aumento como se ha demostrado, en los niveles del microARN-168. De hecho, la disminución en los niveles del microARN-168 por sobreexpresión de una proteína supresora que degrada a AGO1 ha sido observada para la proteína P0 del *Beet western yellows virus* (BWYV, *Polerovirus*). P0 es la única proteína supresora del PTGS que hasta el momento se ha demostrado fehacientemente su capacidad de promover la degradación de AGO1. Esta proteína supresora interactúa con una E3 ligasa de la familia de las SCF (del inglés, “*SKP1-CUL1-F-box protein*”) a través de un dominio F-box promoviendo la ubiquitinación de AGO1 y su degradación (Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007). En este caso, la disminución de la acumulación de AGO1 por degradación es acompañada por un aumento de los niveles de su ARNm y una disminución en la acumulación del microARN-168 (Bortolamiol *et al.*, 2007). En el caso de TGBp1 sólo existen evidencias indirectas que indican su capacidad de promover la degradación de AGO1 (Chiu *et al.*, 2010), por lo tanto, en base a los resultados que demuestran la interacción de TGBp1 con AGO1 y la inducción del aumento de los niveles del microARN-168, se propone que la TGBp1 podría estar inhibiendo la capacidad de AGO1 de degradar o reprimir la traducción de los ARNm blancos. Según esta hipótesis, TGBp1 impediría la degradación del ARNm de AGO1 vía el microARN-168, lo cual produciría un aumento de los niveles de AGO1, estabilizando de esta forma al microARN-168 y llevando a un aumento en la acumulación del mismo. Paralelamente, este aumento activaría la regulación negativa de la expresión de AGO1 vía la represión traduccional de su ARNm mediada por AGO10.

La proteína TGBp1 requiere asociarse en forma sucesiva con diferentes complejos macromoleculares para desempeñar las distintas funciones en que está involucrada. Las fosforilaciones de residuos aminoacídicos determinan modificaciones estructurales, por lo tanto, se podría postular que la fosforilación de TGBp1 funcionaría como un mecanismo regulatorio que permite la interconversión de isoformas de

TGBp1 con distinta función biológica. Hasta el momento, se ha demostrado que la fosforilación de TGBp1 en las T193 y T214 produce una isoforma de TGBp1 incapaz de suprimir el PTGS. Esta fosforilación podría ser necesaria para la conversión de TGBp1 en una isoforma capaz de interactuar con otro componente celular o viral requerido para la movilización viral. Como se ha dicho, existen evidencias que muestran un efecto regulatorio de la fosforilación de las MPs en el transporte de las mismas a través de los PDs. Por ejemplo, se ha demostrado que la fosforilación de la MP de TMV por una quinasa asociada a plasmodesmos (Lee *et al.*, 2005) favorece su direccionamiento al PD y su posterior transporte (Trutnyeva *et al.*, 2005). Por esta razón se evaluó el efecto de la fosforilación de la T193 y T214 en la capacidad de TGBp1 de promover el aumento del SEL de los PDs. Se analizó la capacidad de las diferentes fosfomutantes de promover el movimiento de una proteína reportera (GFP) a través de los plasmodesmos. Los resultados obtenidos demostraron que ninguna de las fosfomutantes estudiadas presentaron diferencias significativas en cuanto a su capacidad de promover el aumento del tamaño del poro de los PDs. La única mutante que presentó diferencia en la movilización de GFP fue la mutante T193A. Sin embargo, no se puede aseverar que se trate de un efecto *per se* de la mutación debido a que estos ensayos son dosis dependiente y, como se ha demostrado previamente, esta fosfomutante presenta muy bajos niveles de acumulación debido a su inestabilidad. Estos resultados demuestran que la fosforilación en la T193 y T214 no afectan la actividad "gating" de TGBp1; sin embargo, dado que TGBp1 es una proteína multifosforilada no se puede descartar que otros sitios de fosforilación aún no identificados puedan estar regulando dicha actividad. Cabe destacar que la quinasa involucrada en la regulación del transporte intercelular de la MP de TMV es una quinasa asociada a PDs, mientras que en el caso de TGBp1 la quinasa que fosforila los sitios T193 y T214 se encuentra presente en la fracción soluble. En tal sentido será interesante estudiar en un futuro si la proteína TGBp1 es blanco de fosforilación de la quinasa asociada a PDs y si dicha fosforilación regula actividad su capacidad de aumentar el SEL de los PDs.

Capítulo II

Estudio del rol de la proteína vegetal Remorina en la infección por PVX

La remorina (REM) es una proteína hidrofílica, específica de plantas vasculares, que se encuentra presente en microdominios lipídicos de la membrana plasmática denominados "lipid rafts" y en los plasmodesmos (Raffaele *et al.*, 2009). Se piensa que los "lipid rafts" actúan como sitios de anclaje para proteínas involucradas en importantes procesos celulares tales como la secreción, la transducción de señales y la percepción de patógenos (Rajendran y Simons, 2005). Recientemente, se ha demostrado que REM juega un importante rol en la regulación de la infección por PVX en plantas de *Solanum lycopersicum* y *N. benthamiana*, impidiendo la movilización célula a célula del virus (Raffaele *et al.*, 2009; Mongrand S. comunicación personal). Se ha comprobado mediante estudios de "pull down" y doble híbrido que REM es capaz de interactuar con la proteína TGBp1 de PVX y que las mismas colocalizan en la membrana plasmática (Raffaele *et al.*, 2009).

El objetivo de este capítulo es profundizar el estudio de la interacción PVX-TGBp1/REM determinando el posible rol regulatorio de la fosforilación de TGBp1 en dicha interacción y el mapeo de posibles dominios de interacción. También se determinará si la interacción de REM con TGBp1 puede ser generalizada a otros géneros virales que utilizan estrategias de movilización similares a los de PVX. Este capítulo forma parte de un proyecto de investigación que se realiza en colaboración con el Dr. Sebastien Mongrand y Sylvie German-Retana de la Universidad de Bordeaux, Francia.

1. Estudio del rol de la fosforilación de TGBp1 en la regulación de la interacción con REM.

Habiéndose demostrado previamente la capacidad de la TGBp1 de PVX de interactuar con la REM de *S. tuberosum* (StREM) (Raffaele *et al.* 2009) se procedió a analizar si la fosforilación de TGBp1 en las T193 y T214 podría ser una señal para promover la interacción con la misma. Para ello se realizaron ensayos de doble híbrido

en levaduras y ensayos de “pull down”, estudiándose la unión de StREM a las diferentes mutantes de fosforilación de TGBp1.

Los ensayos de doble híbrido se realizaron mediante el sistema “Split Ubiquitin” adaptado a la estrategia de clonado Gateway (Deslandes *et al.*, 2003) (**Figura 26**). Este sistema consiste en expresar en las levaduras una proteína “a” fusionada al dominio N-terminal de la ubiquitina, y una proteína “b” fusionada al dominio C-terminal de la ubiquitina. Si las proteínas a y b interactúan se reconstituye la proteína ubiquitina, la cual es reconocida por el sistema UPS-26S. La ubiquitina, al estar fusionada al marcador URA3, produce que este último sea degradado por el proteosoma. En presencia de 5-ácido 5-fluorótico (5'FOA, del inglés “5-fluorotic acid”), el marcador URA3 convierte al 5'FOA en un compuesto tóxico y la levadura no puede crecer, por el contrario si el URA 3 es degradado, el 5'FOA no puede ser transformado en un compuesto tóxico y las levaduras crecen. Por lo tanto, si hay interacción entre las proteínas en estudio, las levaduras crecen en presencia de 5'FOA, y si no hay interacción entre ambas proteínas no se observa crecimiento. Los vectores utilizados en este sistema se denominan pMKZ (“carnada”) y NUI (“presa”) (**Figura 26 b**).

Para los ensayos de doble híbrido, se construyeron una serie de vectores pMKZ que permiten la expresión de la TGBp1 y de las fosfomutantes T193A, T193D, T214A y T214D en levaduras. Para ello los vectores de entrada pDONR-TGBp1st, pDONR-T193Ast, pDONR-T193Dst, pDONR-T214Ast y pDONR-T214Dst fueron recombinados con el vector de destino pMKZ, dando origen a los vectores pMKZ-TGBp1, pMKZ-T193A, pMKZ-T193D, pMKZ-T214A y pMKZ-T214D. Por otra parte, se clonó la secuencia completa de StREM en el vector pDONR obteniéndose el vector pDONR-StREM. El mismo fue recombinado con el vector NUI dando como resultado el vector NUI-StREM. Los vectores de la serie pMKZ se transformaron en la cepa de levaduras JD53 y se seleccionaron en un medio carente del aminoácido histidina (H⁻). Las levaduras transformadas con cada uno de los vectores de la serie pMKZ se transformaron con el vector NUI-StREM y las mismas se seleccionaron en medio carente de los aminoácidos histidina y triptófano (H⁻ T⁻). Para evaluar la interacción de las proteínas TGBp1, T193A, T193D, T214A y T214D con REM se plaquearon las levaduras doble transformantes en un medio con 1 mg/mL de 5'FOA. Como controles

negativos se transformaron levaduras con los plásmidos pMKZ y NUI y con los plásmidos pMKZ-TGBp1 y NUI. El ensayo se realizó tres veces de forma independiente.

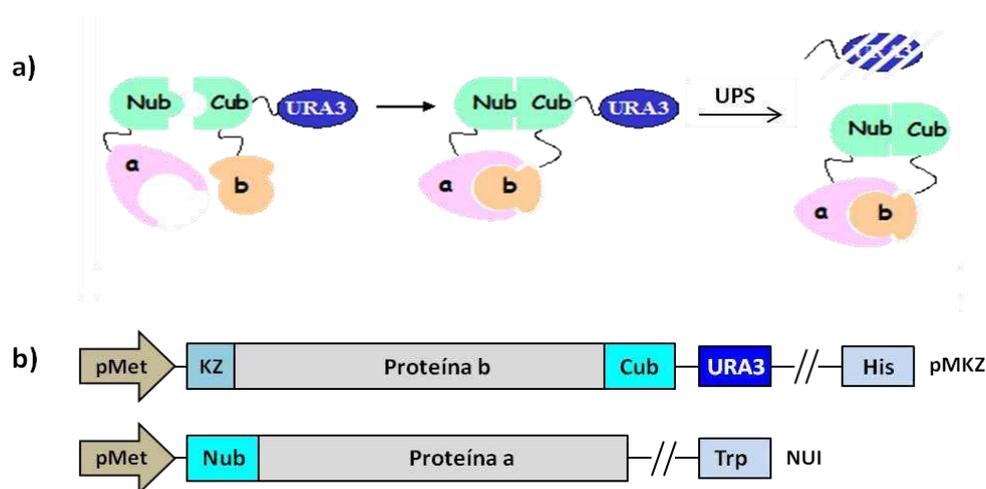


Figura 26. (a) Representación esquemática del sistema de doble híbrido “Split Ubiquitin”. La proteína “a” está fusionada al dominio N-terminal de la ubiquitina, mientras que la proteína “b” está fusionada al dominio C-terminal de la ubiquitina. Si las proteínas a y b interactúan se reconstituye la proteína ubiquitina, la cual es reconocida por el sistema UPS-26S. La ubiquitina al estar fusionada al marcador URA3 produce que este último sea degradado por el proteosoma. En presencia de 5´FOA, la falta del marcador URA3 no permite la conversión de este producto en un compuesto tóxico y la levadura puede crecer. **(b) Representación de los vectores del sistema “Split Ubiquitin”.** El vector pMKZ es el vector “carnada” y el NUI el “presa”. pMet: promotor reprimible por metionina. KZ: secuencia que hace más eficiente la transcripción (ACCATG). Cub: secuencia C-terminal de la ubiquitina. URA3: secuencia que codifica la 5-fosfato decarboxilasa. His: marcador de selección que complementa la auxotrofia para histidina. Nub: secuencia N-terminal de la ubiquitina. Trp: marcador de selección que complementa la auxotrofia para triptofano.

En la **Figura 27** se muestran los resultados correspondientes al ensayo de doble híbrido para estudiar la interacción entre las distintas mutantes de TGBp1 y la StREM. Como se puede observar, en todos los casos analizados hubo crecimiento de las levaduras en presencia de 1 mg/mL de 5´FOA. A los 4 días las levaduras transformadas con las diferentes mutantes fueron capaces de crecer aún en la dilución más alta de los cultivos (10^{-4}). Estos resultados demostraron que hubo interacción entre las versiones T193A, T193D, T214A y T214D con la proteína remorina de *S. tuberosum*.

Como siguiente paso se evaluó la interacción de la StREM con las fosfomutantes de TGBp1 mediante ensayos de “pull down”. Los ensayos de "pull down" consisten brevemente en la incubación de extractos proteicos obtenidos de plantas de *N. benthamiana* que expresan las proteínas a analizar con la proteína GST-StREM recombinante unida a la resina de Sefarosa conjugada a glutatión (Gluthatione-Sepharose). Como control negativo de la interacción se incuban los mismos extractos de plantas con la resina Gluthatione-Sepharose sola. Mediante centrifugación se aíslan los complejos de interacción y la composición de los mismos se analiza por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos.

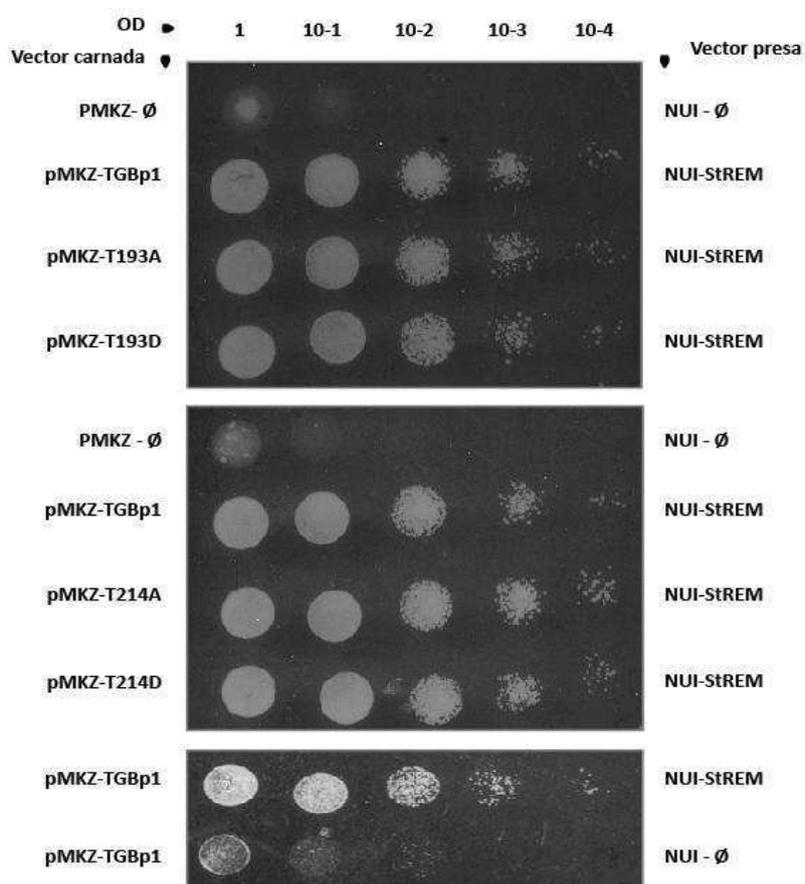


Figura 27. Estudio del rol de la fosforilación de TGBp1 de PVX en la interacción con StREM. Ensayos de doble híbrido con el sistema de “Split Ubiquitin”. Diluciones seriadas de la cepa de levaduras JD53 transformadas con los vectores pMKZ que expresan las diferentes fosfomutantes de TGBp1 y transformadas con el NUI-StREM. Las levaduras fueron crecidas en medio sintético His⁻ y Trp⁻ en presencia de 1mg/mL de 5’FOA. Las levaduras se dejaron crecer durante 4 días a 30°C para observar la interacción. ∅: vector vacío.

Con este fin se clonó la secuencia de StREM a un vector que permite la expresión en bacterias de dicha proteína fusionada a la proteína Glutathione S-transferasa (GST), obteniéndose de esta manera la proteína recombinante GST-StREM. Por otra parte, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con los vectores pB7WGF2-TGBp1 (TGBp1-GFP), pB7WGF2-T193A (T193A-GFP), pB7WGF2-T193D (T193D-GFP), pB7WGF2-T214A (T214A-GFP), pB7WGF2-T214D (T214D-GFP) que expresan la TGBp1 salvaje y las diferentes mutantes fusionadas a GFP en sus extremos C-terminales.

Para inhibir el PTGS gatillado por la sobreexpresión de los transgenes y aumentar de esta manera los niveles de expresión de los mismos, los cultivos fueron coinfiltrados con un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el vector pBIN-p19 que permite la expresión del supresor del PTGS p19. Como control negativo se utilizaron extractos proteicos obtenidos a partir de hojas de *N. benthamiana* sin infiltrar. Luego de 3 d.p.i las hojas fueron cosechadas y procesadas manualmente para la obtención de extractos proteicos. Los extractos fueron incubados en presencia de Glutathione-Sepharose previamente incubada, o no, con la proteína GST-StREM. Luego de sucesivas centrifugaciones y lavados para eliminar interacciones inespecíficas se analizaron por *Western blot* los complejos de interacción presentes en los precipitados con anticuerpos específicos anti GFP y anti REM. El ensayo se repitió dos veces de forma independiente.

A continuación se presentan los resultados correspondientes a un ensayo de “pull down” tipo. En la **Figura 28 a** se puede observar la correcta expresión de las proteínas TGBp1 y de las distintas fosfomutantes en los extractos iniciales. El análisis utilizando anticuerpos anti REM nos permite confirmar la correcta presencia de la proteína GST-REM (60 kDa) en los precipitados obtenidos a partir de las incubaciones realizadas en presencia de la resina Glutathione-Sepharose preincubada con GST-REM (**Figura 28 b**, panel derecho). A su vez, se pudo observar una banda de menor peso molecular correspondiente probablemente a un producto de proteólisis de la StREM recombinante o a la proteína REM endógena. Por otra parte, se muestran los resultados obtenidos luego de analizar por *Western blot* la identidad de las proteínas que se encuentran presentes en el precipitado luego de haber sido incubados durante toda la noche en presencia de la proteína la GST-StREM. El análisis utilizando

anticuerpos anti GFP nos permite detectar en el precipitado la presencia tanto de la proteína TGBp1 como de las distintas fosfomutantes (**Figura 28 b**, panel izquierdo). Estos resultados confirman la capacidad de TGBp1 así como de las distintas fosmutantes de interactuar con la StREM. Finalmente, la no detección por *Western blot* de la presencia de TGBp1 o de las distintas fosfomutantes en los precipitados obtenidos a partir de las incubaciones realizadas en presencia de la resina Glutathione-Sepharose no preincubada con GST-REM indican la interacción específica entre StREM y las distintas fosmutantes de TGBp1 (**Figura 28 c**).

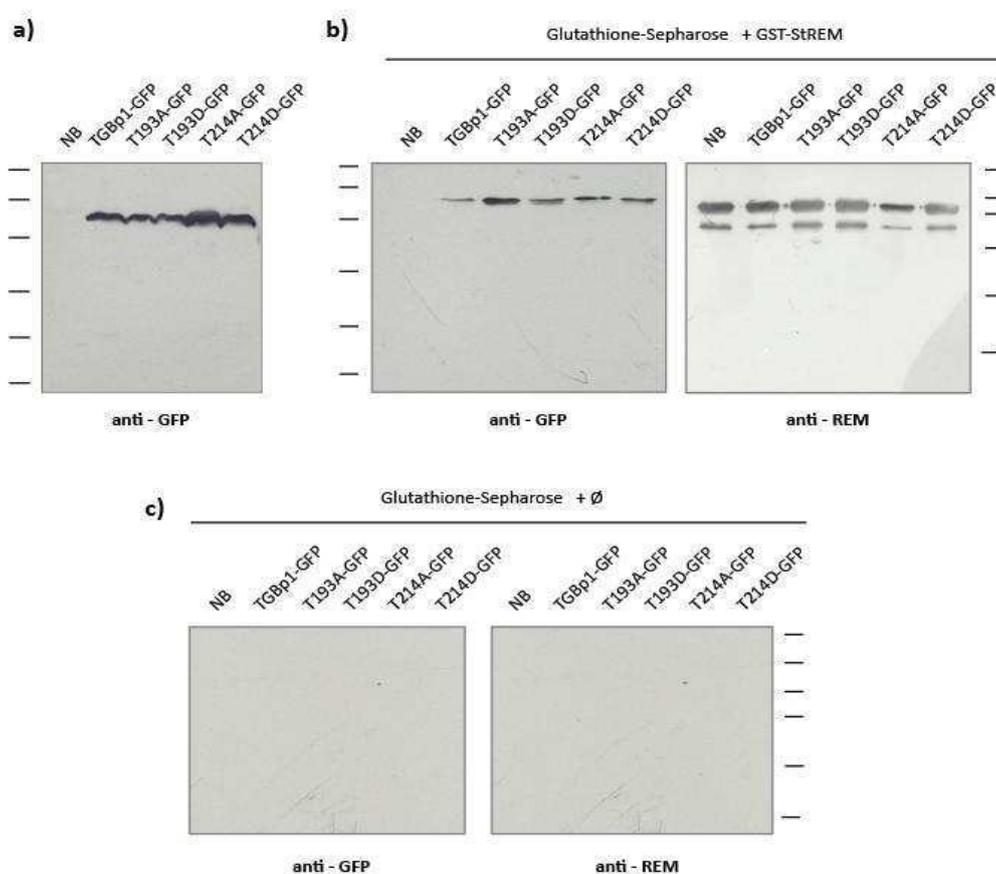


Figura 28. Estudio de la interacción de las mutantes de fosforilación de TGBp1 y StREM en ensayos de “pull down”. Las proteínas TGBp1-GFP, T193A-GFP, T193D-GFP, T214A-GFP y T214D-GFP fueron expresadas en hojas de *N. benthamiana* en presencia de p19. Luego de 3 d.p.i. se procesaron las muestras. **(a)** Extractos crudos iniciales fueron analizados por *Western blot* con anticuerpo anti GFP. **(b)** y **(c)** Los extractos fueron incubados durante la noche con la resina Glutathione-Sepharose previamente incubada en presencia o en ausencia de la proteína GST-StREM. Los mismos fueron centrifugados a 1000 rpm durante 1 min y los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en buffer y recentrifugados tres veces para eliminar las interacciones inespecíficas. Los precipitados obtenidos fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos anti GFP y anti REM. NB: extracto de planta sin infiltrar. Los marcadores de peso molecular corresponden a 120, 86, 47, 34, 26 y 20 kDa.

Según análisis filogenéticos las proteínas remorinas pueden ser subdivididas en 6 grupos (Raffaele *et al.*, 2007). La proteína StREM pertenece al subgrupo 1 de las remorinas, las cuales se caracterizan por poseer un extremo N-terminal rico en prolinas y por estar asociadas a membranas. Con el fin de demostrar que la interacción entre la TGBp1 de PVX y REM se encuentra conservada entre las proteínas REM pertenecientes al subgrupo 1, se procedió a analizar la interacción de TGBp1 de PVX y sus fosfomutantes con la proteína REM de *Nicotiana tabacum* (NtREM) por ensayos de doble híbrido.

En este caso la proteína NtREM fue clonada en el vector pMKZ y las distintas TGBp1s en el vector NUI. La construcción pMKZ-NtREM fue desarrollada en laboratorio del Dr. Sebastien Mongrand. Las construcciones para la expresión de la TGBp1 y sus fosfomutantes se obtuvieron por recombinación de los vectores pDONR-TGBp1, pDONR-T193A, pDONR-T193D, pDONR-T214A y pDONR-T214D con el vector NUI obteniéndose los vectores NUI-TGBp1, NUI-T193A, NUI-T193D, NUI-T214A y NUI-T214D. Se transformó la cepa JD53 con el plásmido pMKZ-NtREM y se seleccionaron las levaduras transformadas en un medio sin histidina (H^-). Luego las levaduras que incorporaron el vector pMKZ-NtREM fueron transformadas de forma independiente con cada uno de los vectores NUI que contenían las secuencias de TGBp1 y de las fosfomutantes. A continuación se seleccionaron las transformantes en un medio H^- Trp $^-$. Para observar la interacción se plaquearon las levaduras transformadas en un medio con 1 mg/mL de 5'FOA y se dejaron creciendo a 30°C durante 4 días. Como controles negativos se transformaron levaduras con los plásmidos pMKZ y NUI y con los plásmidos pMKZ y NUI-TGBp1. El ensayo se repitió dos veces de forma independiente.

En la **Figura 29** se puede observar la interacción específica entre la TGBp1 de PVX y la REM de *N. tabacum*. En el panel superior, se muestran los resultados de la interacción entre las fosfomutantes correspondientes a la T193 y la NtREM. Se puede observar un claro crecimiento de las levaduras en la dilución 10^{-3} y un leve crecimiento en la dilución más alta. Por su parte, en el segundo panel se observa la interacción entre las fosfomutantes correspondientes a la T214 y la NtREM. Tanto las levaduras transformadas con la mutante T214A, como con la mutante T214D, fueron capaces de crecer en la dilución 10^{-3} y 10^{-4} en presencia de 5'FOA. En los paneles inferiores se

muestran los controles negativos del ensayo donde se observa crecimiento hasta la dilución 10^{-2} .

En base a estos resultados se puede concluir que la TGBp1 de PVX interactúa tanto con la proteína REM de *S. tuberosum*, como con la de *N. tabacum*. Asimismo en ambos casos, se confirmó que todas las mutantes de fosforilación de TGBp1 fueron capaces de interactuar con ambas remorinas.

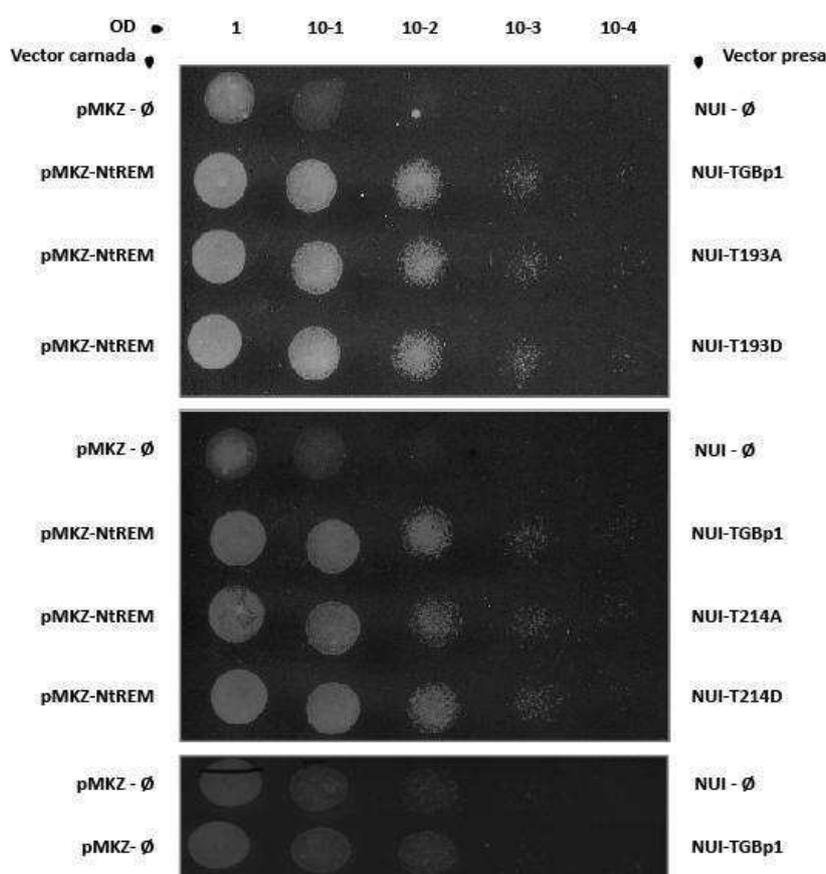


Figura 29. Análisis de la interacción entre TGBp1 de PVX y NtREM. Estudio del rol de la fosforilación de TGBp1 en dicha interacción. Ensayos de doble híbrido con el sistema de "Split Ubiquitin". Diluciones seriadas de la cepa de levaduras JD53 transformadas con el vector pMKZ-NtREM y transformadas con los NUI que expresan las diferentes mutantes de TGBp1. Las levaduras fueron crecidas en medio sintético His⁻ y Trp⁻ en presencia de 1mg/mL de 5'FOA. Las levaduras se dejaron crecer durante 4 días a 30°C para observar la interacción. ∅: vector vacío.

2. Estudio de los dominios funcionales de TGBp1 involucrados en la interacción con REM.

Se propone que la proteína TGBp1 de PVX consiste en al menos dos dominios funcionales independientes: un dominio N-terminal que incluye los motivos helicasa I, IA, II, III y IV y un dominio C-terminal que incluye los motivos V y VI (Morozov *et al.*, 1999). El dominio N-terminal determina las funciones enzimáticas involucradas en el transporte viral como su actividad ATPasa y la capacidad de unir ARN, mientras que el dominio C-terminal tendría presumiblemente un rol en la interacción con otras proteínas durante la infección con PVX (Morozov *et al.*, 1999; Leshchiner *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió caracterizar la interacción de cada uno de los dominios N - o C - terminal de TGBp1 con la proteína remorina de *S. tuberosum* (StREM). Para la caracterización de la interacción se realizaron ensayos de doble híbrido en levaduras y ensayos de “pull down” descritos en el punto anterior.

Para el análisis de la interacción de los dominios de TGBp1 y StREM se construyeron una serie de vectores pMKZ que permiten la expresión de los dominios funcionales de la TGBp1 en levaduras. Para este fin se amplificaron las secuencias que comprenden los dominios N-terminal (nucleótidos 1-537) y C-terminal (nucleótidos 538-681) con oligonucleótidos que no incluyen un codón "stop". Las secuencias amplificadas se clonaron en el vector pDONR generando los vectores pDONR-N.TGBp1st y pDONR-C.TGBp1st. Estos vectores y el pDONR-TGBp1st se recombinaron con el vector pMKZ obteniéndose los vectores pMKZ-N.TGBp1, pMKZ-C.TGBp1 y pMKZ-TGBp1, respectivamente. Los vectores pMKZ-N.TGBp1, pMKZ-C.TGBp1 y pMKZ-TGBp1, se transformaron en la cepa de levaduras JD53 y se seleccionaron en un medio carente del aminoácido histidina (H^-). Luego las levaduras transformadas con cada uno de los vectores de la serie pMKZ, se transformaron con el vector NUI-StREM. Las levaduras transformantes se seleccionaron en medio carente de los aminoácidos histidina y triptófano ($H^- T^-$). Para evaluar la interacción de los dominios N.TGBp1, C.TGBp1 y la proteína TGBp1 con REM las levaduras doble transformantes se plaquearon en un medio con 1 mg/mL de 5'FOA. Como control negativo se transformaron levaduras con los plásmidos pMKZ y NUI-StREM. El ensayo se repitió dos veces de forma independiente.

Como se observa en la **Figura 30** tanto el dominio N- terminal como el C-terminal fueron capaces de interactuar con la proteína StREM. Las levaduras transformadas con ambos dominios fueron capaces de crecer de igual manera que la TGBp1 completa. En presencia del compuesto 5'FOA todas las levaduras transformadas con las diferentes versiones (N.TGBp1, C.TGBp1 y TGBp1) presentaron una interacción positiva y fuerte con la StREM aún en la dilución más baja de los cultivos (10^{-4}). El control realizado con los plásmidos pMKZ y NUI-StREM no fue capaz de crecer luego de 4 días en presencia de 1 mg/mL 5'FOA en la dilución 10^{-3} y 10^{-4} .

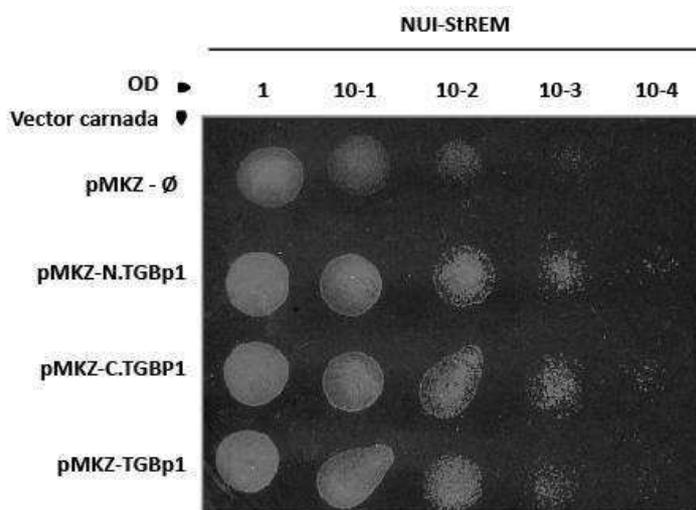


Figura 30. Estudio de la interacción de los dominios de TGBp1 con la StREM. Ensayos de doble híbrido con el sistema de “Split Ubiquitin”. Diluciones seriadas de las levaduras transformadas con los vectores pMKZ y NUI que expresan los dominios N- o C-terminales de TGBp1 y la StREM, respectivamente. Las levaduras fueron crecidas en medio sintético His⁻ y Trp⁻ en presencia de 1mg/mL de 5'FOA y se dejaron crecer durante 4 días a 30°C para observar la interacción. ∅: vector vacío.

Resultados similares fueron obtenidos mediante ensayos de “pull down”. Los vectores pDONR-N.TGBp1st y pDONR-C.TGBp1st se recombinaron con el vector pB7FWG2 que permite la expresión a partir del promotor 35S del CaMV los dominios N- y C- terminal fusionados a la proteína GFP en sus extremos C-terminales. De esta

manera, se obtuvieron los vectores pB7FWG2-N.TGBp1 (N.TGBp1-GFP) y pB7FWG2-C.TGBp1 (C.TGBp1-GFP). A continuación, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con los vectores pB7FWG2-TGBp1, pB7FWG2-N.TGBp1 y pB7FWG2-C.TGBp1 y se procedió con la metodología descrita en el punto anterior. El ensayo se repitió dos veces de forma independiente. En la **Figura 31**, se presentan los resultados correspondientes a un ensayo de “pull down” tipo. Se puede observar la correcta expresión de las proteínas TGBp1 y sus dominios funcionales en los extractos iniciales, sin embargo, en el caso de la versión C.TGBp1-GFP fue posible detectar a su vez una banda proteica cuyo peso molecular corresponde al de la GFP sola, lo cual indica un cierto grado de proteólisis de esta proteína de fusión (**Figura 31 a**). En la **Figura 31 b** se muestran los resultados obtenidos al analizar por *Western blot* la identidad de las proteínas que se encuentran presentes en el precipitado luego de haber sido incubados durante toda la noche en presencia de la proteína la GST-StREM. El análisis utilizando anticuerpos anti REM permitió confirmar la correcta presencia de la proteína GST-REM (60 kDa) en los precipitados (**Figura 31 b**, panel derecho). La banda de menor peso molecular corresponde probablemente a un producto de proteólisis de la StREM recombinante o a la proteína REM endógena. Por otra parte, el análisis utilizando anticuerpos anti GFP nos permite detectar en el precipitado la presencia tanto de la proteína TGBp1 como de sus dominios funcionales (**Figura 31 b**, panel izquierdo). Estos resultados confirman la capacidad de TGBp1 de interactuar con REM e indican que ambos dominios son suficientes para establecer dicha interacción. En la **Figura 31 c** se muestran los resultados obtenidos luego de analizar por *Western blot* la identidad de las proteínas que se encuentran presentes en los precipitados luego de haber sido incubados durante toda la noche en presencia de la resina Gluthatione-Sepahrose no preincubada con la proteína GST-StREM. Como puede observarse los anticuepros anti GFP y anti REM no detectaron la presencia de ninguna banda específica, por lo que se concluye que las bandas detectadas en la **Figura 31 b** son específicas de la interacción entre la StREM y los dominios de TGBp1.

Los resultados presentados hasta el momento permiten concluir que no existe un dominio específico de TGBp1 involucrado en la interacción con la REM de *S. tuberosum*.

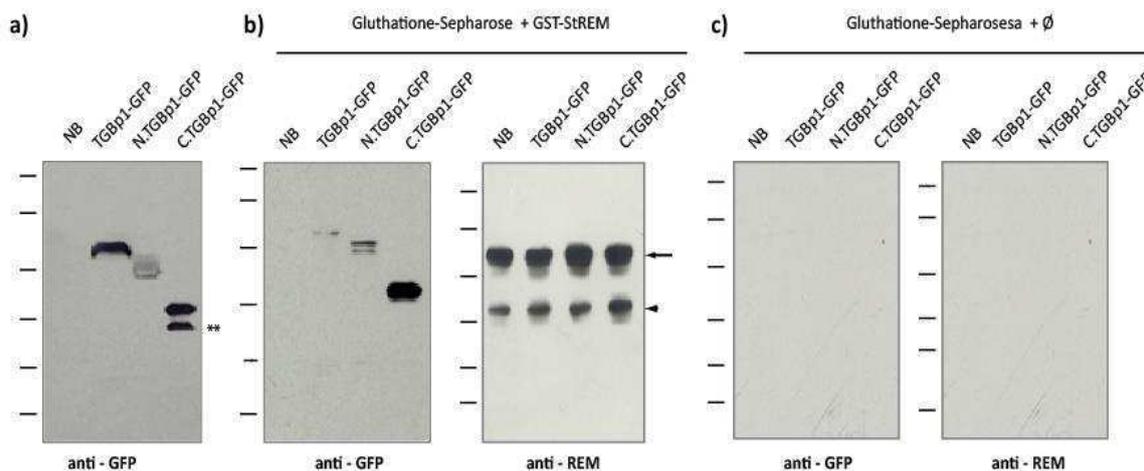


Figura 31. Estudio de la interacción de los dominios de TGBp1 y StREM en ensayos de “pull down”. Las proteínas TGBp1-GFP, N.TGBp1-GFP y C.TGBp1-GFP fueron expresadas transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* en presencia de p19. Luego de 3 d.p.i. se procesaron las muestras. **(a)** Extractos crudos iniciales fueron analizados por *Western blot* con anticuerpo anti GFP. ** indica la posición correspondiente a la GFP sola. **(b)** y **(c)** Los extractos fueron incubados durante la noche con la resina Glutathione-Sepharose previamente incubada en presencia o en ausencia de la proteína GST-StREM. A continuación los mismos fueron centrifugados a 1000 rpm durante 1 min y los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en buffer y recentrifugados tres veces para eliminar las interacciones inespecíficas. Finalmente los precipitados obtenidos fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos anti GFP y anti REM. NB: extracto de planta sin infiltrar. La flecha indica la posición de la GST-StREM y la cabeza de la flecha indica la posición de la StREM sola. Los marcadores de peso molecular corresponden a 120, 86, 47, 34, 26 y 20 kDa.

3. Estudio del rol de REM en la interacción con TGBp1s pertenecientes a otros géneros virales.

Con el objetivo de determinar si la interacción de la proteína TGBp1 se encuentra conservada entre los distintos géneros virales que utilizan la estrategia de movilización basada en el TGB se analizó la interacción entre la StREM y las TGBp1s de virus pertenecientes a las familias *Alpha-* y *Betaflexiviridae* que poseen TGBp1s de tipo Potex, y virus de la familia *Virgaviridae* que poseen TGBp1 de tipo Hordei. Los virus elegidos para el estudio fueron: el *Potato virus M* (PVM, *Carlavirus*, *Betaflexiviridae*), el *Garlic virus C* (GarVC, *Allexivirus*, *Alphaflexiviridae*) y el *Lichnys ringspot virus* (LRSV, *Hordeivirus*, *Virgaviridae*). La interacción entre la StREM y las diferentes TGBp1s fue

estudiada por ensayos de doble híbrido en levaduras utilizando el sistema "Split-ubiquitin" descrito anteriormente.

Para la realización de los ensayos de doble híbrido se clonaron las distintas TGBp1 en el vector NUI. Para ello se utilizaron los vectores pUC57-GarVC-TGBp1, pUC57-PVM-TGBp1 previamente desarrollados. Para el desarrollo del vector pUC57-LRSV-TGBp1 se sintetizó el ORF correspondiente al virus LRSV flanqueado por las secuencias correspondientes a los sitios de recombinación attL y se clonó en el vector pUC57. La serie de vectores pUC57 se recombinaron con el vector NUI obteniéndose los vectores NUI-Allex, NUI-Carla y NUI-Hordei. El vector NUI-Allex contiene el ORF que codifica la TGBp1 del GarVC, el NUI-Carla contiene el ORF que codifica la TGBp1 del PVM y el NUI-Hordei contiene el ORF que codifica la TGBp1 del LRSV. Las levaduras transformadas con el vector pMKZ-StREM, desarrollado en el laboratorio del Dr. S. Mongrand, se retransformaron con los vectores NUI-Allex, NUI-Carla y NUI-Hordei, respectivamente. Posteriormente, se seleccionaron en medio carente de los aminoácidos histidina y triptófano (H⁻ T⁻). Para evaluar la interacción, se plaquearon las levaduras transformadas en un medio con 1 mg/mL de 5'FOA. Como controles negativos se transformaron levaduras con los plásmidos pMKZ-StREM y NUI. A su vez como control positivo, se utilizaron las levaduras transformadas con los vectores pMKZ-StREM y NUI-TGBp1 de PVX. Se efectuaron 2 experimentos independientes.

Como se observa en la **Figura 32**, tanto la TGBp1 de PVX, como las TGBp1 correspondientes a los otros tres géneros virales fueron capaces de interactuar con la StREM a bajas densidades ópticas de los cultivos de levaduras. En el control negativo, pMKZ-StREM - NUI, se observó crecimiento de las levaduras en la dilución 10⁻², mientras que en las levaduras transformadas con las TGBp1 de PVX, GarVC, PMV y LRSV y la StREM, se observó crecimiento en la dilución 10⁻⁴.

En resumen los resultados obtenidos muestran que las TGBp1s pertenecientes a los géneros *Allexivirus*, *Carlavirus* y *Hordeivirus* son capaces de interactuar con la remorina de *S. tuberosum*, lo que aporta las primeras evidencias de que la interacción de la proteína TGBp1 y REM podría ser un mecanismo conservado entre virus que utilizan las estrategia de movilización del tipo TGB.

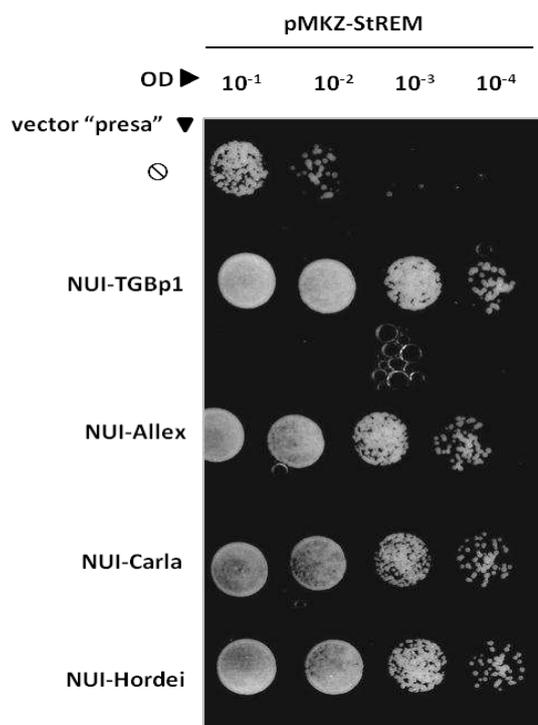


Figura 32. Estudio de la interacción de la TGBp1 de *Potexvirus*, *Alexivirus*, *Carlavirus* y *Hordeivirus* con la StREM. Ensayo de doble híbrido con el sistema “Split Ubiquitin”. Diluciones seriadas de la cepa de levaduras transformadas con el vector pMKZ-StREM y los NUI-TGBp1 (PVX) y el NUI-Allex (GarVC), NUI-Carla (PMV), NUI-Hordei (LRSV). Las levaduras fueron crecidas en medio sintético His⁻ y Trp⁻ en presencia de 1mg/mL de 5’FOA. Las levaduras se dejaron crecer durante 4 días a 30°C para observar la interacción. Ø: vector NUI vacío.

4. Estudio del efecto de REM sobre la actividad supresora del PTGS de TGBp1 de PVX.

Como se ha comentado anteriormente, el impedimento de la movilización de PVX en plantas que sobreexpresan la remorina estaría dada por la interacción entre dicha proteína y la TGBp1. Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto biológico y funcional que tiene la proteína remorina sobre TGBp1. Dado que esta proteína viral tiene, entre otras funciones, la capacidad de suprimir el silenciamiento génico mediado por ARN, se analizó el efecto de REM sobre la actividad supresora del PTGS de TGBp1. Con tal fin se utilizó la estrategia descrita en el punto 5 del *Capítulo I* (**Figura 21**). Se coinfiltraron hojas de *N. benthamiana* 16c con una mezcla de agrobacterias transformadas con los vectores pK7WG2D-TGBp1, pK7WG2D-StREM y de pBIN-GFP (TGBp1+ StREM + GFP); con una mezcla de agrobacterias transformadas con los vectores pK7WG2D-TGBp1 y pBIN-GFP (TGBp1 + GFP); y con un cultivo de agrobacterias transformadas con el vector pK7WG2D-StREM (StREM) solo. Como control de inducción del PTGS se infiltraron hojas con agrobacterias transformadas solo con el vector pBIN-GFP. La densidad óptica final de la mezclas de bacterias con

que se agroinfiltró fue la misma para todos los tratamientos (O.D._{600nm}: 0,6). Para alcanzar este valor en los casos en que fue necesario se completaron las mezclas con agrobacterias sin transformar (cepa GV3101) hasta alcanzar la O.D._{600nm} deseada. Luego de 5 d.p.i. se evaluaron los niveles de expresión de GFP por observación de la fluorescencia en las plantas iluminadas con luz UV y por ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo específico anti GFP. Se efectuaron 3 experimentos independientes con 3 réplicas de cada una.

En la **Figura 33 a** se presentan fotografías tomadas bajo iluminación con luz UV de hojas de *N. benthamiana* 16c agroinfiltradas con las distintas construcciones a los 5 d.p.i. En las hojas agroinfiltradas solo con el vector pBIN-GFP se puede observar un parche de color rojo tenue debido a la fluorescencia de la clorofila y a los bajos niveles de GFP producto de la eficiente inducción del PTGS de GFP (**Figura 33 a**, ambos paneles). Por otra parte en las hojas agroinfiltradas con la StREM sola se observa un parche de color rojo tenue, similar al control de la inducción del PTGS, permitiendo confirmar que la proteína REM *per se* no tiene efecto supresor del silenciamiento (**Figura 33 a**, panel derecho). De forma contraria, en las hojas infiltradas con TGBp1 + GFP, se observó un parche de color verde brillante que corresponde a un aumento en la acumulación de la proteína GFP, confirmando el efecto supresor del PTGS de TGBp1 (control positivo de supresión del PTGS) (**Figura 33 a**, ambos paneles). Al comparar la fluorescencia de GFP en los parches de las hojas agroinfiltradas con GFP+TGBp1 y GFP+TGBp1+StREM se puede corroborar que no se observan diferencias en las intensidades de fluorescencia (**Figura 33 a**, panel izquierdo).

Estos resultados fueron corroborados analizando los niveles de expresión de GFP y REM por *Western blot*. En la **Figura 33 b** se puede observar la presencia de la proteína REM en todas las hojas agroinfiltradas con el vector pK7WG2D-StREM (calles **3** y **4**), confirmando la correcta expresión de la proteína. Incluso es posible apreciar un mayor nivel de acumulación de REM en presencia de TGBp1, sugiriendo que REM no afecta negativamente la actividad supresora de TGBp1. La banda de mayor peso molecular que es detectada por el anticuerpo anti REM en todas las hojas agroinfiltradas corresponde a la REM endógena de *N. benthamiana* (**Figura 33 b**, calles **1 - 4**).

Al analizar los niveles de expresión de GFP se encontró que la infiltración de GFP sola produce una disminución en la acumulación de GFP respecto a una planta 16c sin infiltrar, confirmando el gatillado del PTGS de GFP (**Figura 33 c**, calles **1** y **2**). Por otro lado, la coexpresión de TGBp1 con GFP (TGBp1 + GFP) provocó un aumento de los niveles de acumulación de GFP respecto al control de la inducción del silenciamiento, confirmando su acción supresora del PTGS (**Figura 33 c**, calles **1** y **3**). En las hojas agroinfiltradas con TGBp1+REM+GFP se observó el mismo nivel de acumulación de GFP que el encontrado en las hojas agroinfiltradas con GFP+TGBp1 confirmando que REM no es capaz de inhibir la actividad supresora del PTGS de TGBp1 (**Figura 33 c**, calles **3** y **4**). Finalmente, los niveles de acumulación de las hojas agroinfiltradas con GFP sola y GFP + REM fueron similares (**Figura 33 c**, calles **1** y **5**) confirmando que REM no suprime el PTGS.

En base a estos resultados se puede concluir que la sobreexpresión de la REM de *S. tuberosum* no afecta la actividad supresora del silenciamiento postranscripcional de TGBp1 de PVX.

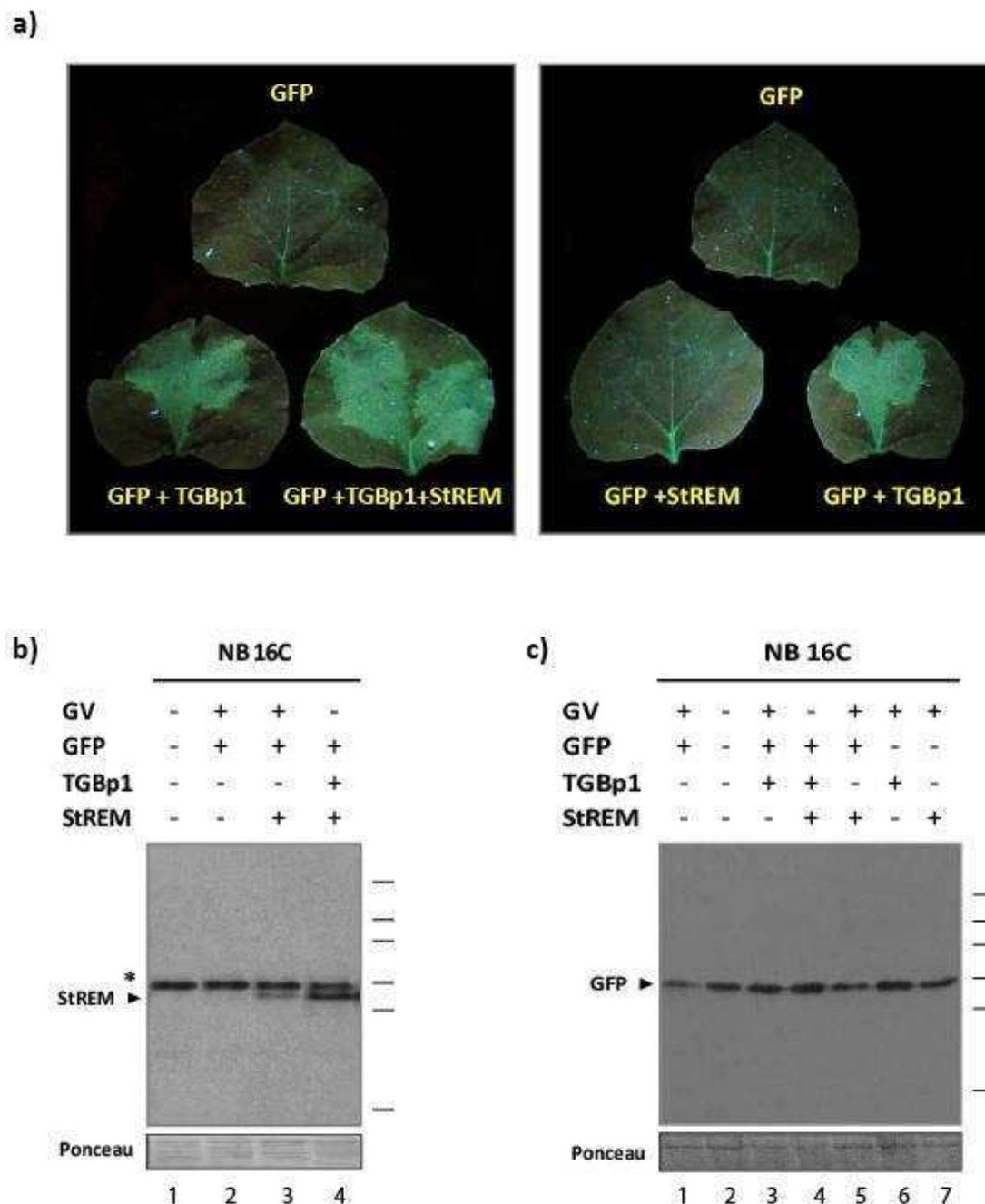


Figura 33. Análisis del efecto de REM sobre la actividad supresora del PTGS de TGBp1 de PVX. Ensayos de agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* 16c. **(a)** Fotografía de las plantas coagroinfiltradas con las construcciones indicadas iluminadas con luz U.V a los 5 d.p.i. **(b)** y **(c)** A partir de las muestras tomadas a los 5 d.p.i. de hojas inoculadas se extrajeron las proteínas totales. Las mismas fueron resueltas en geles SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron reveladas con anticuerpo anti REM o anti GFP. La flecha indica la posición de StREM **(b)** y de GFP **(c)**. Los marcadores de peso molecular corresponden a 64.2, 48.8, 37.1, 25.9, 19.4 y 14.8 kDa. El asterisco (*) indica la REM endógena de *N. benthamiana*. GV: cultivo de *A. tumefaciens* cepa GV3101 sin transformar.

Conclusiones y Discusión

Las remorinas son proteínas hidrofílicas específicas de plantas que se asocian a estructuras particulares de las membranas plasmáticas denominadas “lipid rafts” (Raffaele *et al.*, 2009; Lefebvre *et al.*, 2010). En plantas y animales, estos “lipid rafts” constituyen plataformas para la traducción de señales, la interacción con patógenos, la inducción de la apoptosis y la respuesta a estrés abiótico (Raffaele *et al.*, 2007; Mongrand *et al.*, 2010; Jarsch y Ott, 2011). Originalmente se demostró que la remorina de papa (StREM) se asociaba a la membrana plasmática y que era fosforilada al ser tratada con ácido poligalacturónico (Farmer *et al.*, 1989). Aunque se ha sugerido que las remorinas pertenecientes al grupo 1 tienen similitud con proteínas de movimiento de ciertos virus (Reymond *et al.*, 1996), solo se ha demostrado recientemente que la sobreexpresión de la remorina de papa en plantas de tomate es capaz de inhibir el movimiento de PVX a través de las células (Raffaele *et al.*, 2009). En concomitancia se ha demostrado que esta remorina interacciona de forma específica con la proteína TGBp1 de PVX y que además se localiza en los plasmodesmos (Raffaele *et al.*, 2009).

El objetivo de esta sección fue caracterizar en mayor profundidad la interacción entre la TGBp1 de PVX y la proteína REM y estudiar su posible función con otros virus pertenecientes a géneros virales que utilizan la estrategia de movilización de tipo TGB. Además se intentó dilucidar el posible rol fisiológico de REM en infecciones virales con PVX.

Se propone que la proteína TGBp1 de PVX consiste en al menos dos dominios funcionales: un dominio N-terminal y un dominio C-terminal, donde el dominio C-terminal estaría involucrado en la interacción de la proteína MP con otras proteínas (Morozov *et al.*, 1999). Se estudió la interacción de los distintos dominios de TGBp1 con la proteína remorina de *Solanum tuberosum* (StREM). Los resultados obtenidos mediante ensayos de doble híbrido y de “pull down” permiten concluir que tanto el dominio N-terminal como el dominio C-terminal de la proteína TGBp1 de PVX son necesarios para la interacción con la StREM. Estas observaciones indican que la interacción entre ambas proteínas no ocurre mediante dominios específicos de la proteína viral. Dado que estos estudios son a nivel cualitativo no es posible determinar

si existe una afinidad diferencial en la interacción de StREM con los dominios estudiados.

La movilización viral requiere de la acción coordinada de todas las proteínas virales. A su vez, para el establecimiento de una infección viral exitosa son necesarias las interacciones entre las proteínas del virus y las proteínas correspondientes a la planta huésped. Uno de los posibles mecanismos por el cual TGBp1 podría regular la interacción con las diferentes proteínas del hospedante es mediante la fosforilación de sus residuos T193 y T214. Los resultados presentados en el *Capítulo I* demuestran que la fosforilación de TGBp1 en las T193 y T214 produce una isoforma de TGBp1 incapaz de suprimir el PTGS. Esta isoforma de TGBp1 generada por la fosforilación en las T193 y T214 podría interactuar con otro componente celular, como por ejemplo la proteína REM. Se estudió por ensayos de doble híbrido y “pull down” si la fosforilación de TGBp1 regulaba la interacción con la proteína StREM. Se demostró que tanto la TGBp1 salvaje como las diferentes fosfomutantes fueron capaces de interactuar con la StREM en ambos tipos de ensayos, indicando que la fosforilación en estos residuos no regula la interacción con la StREM.

Con el objetivo de estudiar el grado de conservación de la interacción TGBp1-REM, se incluyó en el estudio la proteína REM de *Nicotiana tabacum*, (NtREM), la cual pertenece al mismo grupo filogenético que la StREM. En ensayos de doble híbrido se determinó que la TGBp1 de PVX interactúa con la NtREM y que dicha interacción tampoco se encuentra regulada por fosforilación de los residuos T193 y T214.

A continuación se analizó si la interacción de TGBp1-REM se encontraba conservada entre los virus que utilizan la estrategia del TGB. Se observó que la StREM es capaz de interactuar con las MPs del *Potato virus M* (PVM, *Carlavirus*, *Betaflexiviridae*), del *Garlic virus C* (GarVC, *Allexivirus*, *Alphaflexiviridae*) y del *Lichnys ringspot virus* (LRSV, *Hordeivirus*, *Virgaviridae*). Los resultados obtenidos demuestran que las TGBp1s pertenecientes a los géneros *Allexivirus*, *Carlavirus* y *Hordeivirus* son capaces de interactuar con la StREM aportando las primeras evidencias de que la interacción entre las proteínas TGBp1s y REM podría ser un mecanismo conservado en los virus que utilizan la estrategia de movilización de tipo TGB. Evidencias preliminares en ensayos de infección con los virus PVM y LRSV en plantas de *N. benthamiana* que sobreexpresan la StREM indican que la aparición de síntomas y la dispersión del virus

se encuentra retrasada respecto a plantas salvajes (comunicación personal del Dr. S. Mongrand). Estos resultados demuestran que la interacción de REM con las proteínas TGBp1s podría ser un mecanismo conservado y extendido a otros virus relacionados, con estrategias de movilización de tipo Potex u Hordei. Asimismo, este mecanismo sería específico para este grupo de virus, ya que estos resultados no fueron observados en virus pertenecientes a los géneros *Potyvirus* y *Tobamovirus*, confirmando que el blanco de REM es la proteína TGBp1 (comunicación personal del Dr. Mongrand).

Hasta el día de hoy no hay una función biológica concreta descrita para las remorinas. Si bien existen evidencias que la vinculan con un rol regulatorio en la traducción de señales y en la interacción planta-patógeno, poco se conoce sobre los mecanismos por los cuales las remorinas se encuentran involucradas en dichos procesos. De hecho, si bien se ha demostrado que la sobreexpresión de la StREM en plantas de tomate es capaz de inhibir la movilización de PVX a través de los plasmodesmos, hasta el momento no se conoce el mecanismo por el cual REM restringe el movimiento viral. Se sabe que la proteína TGBp1 está involucrada en este proceso, por lo cual se postula que REM estaría titulando o secuestrando a TGBp1 evitando que cumpla funciones esenciales para la movilización viral. Dado que la actividad supresora del PTGS de TGBp1 es necesaria para el movimiento célula a célula de PVX, se estudió el posible efecto de StREM sobre la función supresora de TGBp1. Los resultados obtenidos demostraron que la TGBp1 de PVX fue capaz de suprimir el silenciamiento mediado por ARN aún en presencia de la StREM, demostrando que la interacción entre ambas proteínas no influye en la actividad supresora del PTGS de TGBp1. Otra posible explicación es que REM secuestre a la isoforma de TGBp1 que interactúa con el complejo ribonucleoproteico evitando así su movilización, o bien que titule a la isoforma que está implicada en la promoción de la apertura de los plasmodesmos. Resultados preliminares realizados con nuestro grupo colaborador indican que la sobreexpresión de REM inhibe la capacidad de TGBp1 de promover el aumento SEL. Estos resultados están en concordancia con la observación de la co-localización de REM y TGBp1 en PDs (Samuels *et al.*, 2007; Raffaele *et al.*, 2009), y con nuestros resultados que indican que la fosforilación de TGBp1 en las T193 y T214 no regulan la interacción de TGBp1 con REM, ni su actividad de "gating". Recientemente se ha propuesto que REM funcionaría directa o indirectamente en el anclaje de las

proteínas que unen la membrana plasmática con el desmotúbulo dentro de los plasmodesmos determinando la apertura y el tamaño de los mismos (Tilsner *et al.*, 2010). Según esta propuesta, la unión de TGBp1 de PVX a la REM podría bloquear las interacciones entre REM y las proteínas que se encuentran involucradas en la estabilización de la estructura del PD, produciendo la relajación y apertura del poro. En este caso, el efecto dosis dependiente de REM en la movilización célula a célula de PVX (Raffaele *et al.*, 2009) podría estar dado porque la sobreexpresión de REM requeriría más TGBp1s para alcanzar el mismo grado de apertura de los plasmodesmos, contrariamente el silenciamiento de REM provocaría un aumento en la movilización del virus debido a que al haber menos cantidad de REM es necesario menor cantidad de TGBp1 para alcanzar la apertura del PD requerida para el transporte viral.

Capítulo III

Evaluación de la localización subcelular de TGBp1 de PVX

El estudio de la localización subcelular de proteínas juega un rol muy importante en la determinación y el conocimiento de las posibles funciones y actividades de las mismas. En el caso de la TGBp1 de PVX, se ha estudiado su localización subcelular desde 1993 (Davies *et al.*, 1993; Morozov *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2004; Samuels *et al.*, 2007). Sin embargo, han existido diferentes controversias respecto a este tema y no hay en la literatura un trabajo que haya demostrado detalladamente la localización de TGBp1 de PVX.

En 1993 Davies *et al.*, utilizando técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica propusieron que la TGBp1 de PVX, en un contexto de infección viral, se encontraba asociada a inclusiones citoplasmáticas estando ausente en plasmodesmos o en fracciones de la pared celular. Dichas estructuras en forma de agregados tenían la forma de cuentas de un collar apiladas en una serie de láminas de aproximadamente 3 nm de espesor (**Figura 34 a**). Posteriormente, mediante la estrategia de bombardeo de construcciones de TGBp1 fusionadas a GFP en hojas de *N. benthamiana*, diferentes laboratorios estudiaron la localización de dicha proteína usando técnicas de microscopía de fluorescencia (Morozov *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2004; Samuels *et al.*, 2007). A lo largo de estos estudios se analizaron la localización de la proteína TGBp1 de PVX fusionada a su extremo N- y C- terminal a GFP (GFP-TGBp1 y TGBp1-GFP, respectivamente) y se determinó la capacidad de dichas proteínas de fusión de promover el movimiento célula a célula del virus así como la apertura de los plasmodesmos. Los resultados obtenidos por los distintos laboratorios fueron contradictorios. Las evidencias presentadas por Morozov *et al.*, 1999 mostraban que la TGBp1-GFP, y no la GFP-TGBp1, era capaz de restaurar el movimiento célula a célula de un virus PVX defectivo para dicha función y que la proteína se localizaba como un punteado adyacente a la pared celular y así como también dentro de la misma (**Figura 34 b**). Contrariamente, los resultados obtenidos por Yang *et al.*, 2000 mostraron que ambos tipos de fusiones de TGBp1 eran capaces de promover el movimiento viral. En este trabajo la TGBp1-GFP se acumulaba principalmente en agregados citoplasmáticos, mientras que la GFP-TGBp1 se encontraba localizada en el núcleo, en el citoplasma, en

agregados en forma de bastón y nunca asociada a la pared celular (Yang *et al.*, 2000). Finalmente demostraron que la fusión N-terminal GFP-TGBp1 modificada su patrón de localización en el contexto de una infección viral localizándose en el núcleo, en agregados citoplasmáticos con forma de bastones y en un punteado en la pared celular reminiscente a la localización en plasmodesmos (Samuels *et al.*, 2007). En ninguno de los trabajos reportados se demostró efectivamente la localización de TGBp1 en los PDs.

Dada las diferencias encontradas en los diferentes trabajos se decidió estudiar la localización subcelular de TGBp1 de la cepa de PVX utilizada en nuestro laboratorio, con el objetivo que posteriormente sirviera como patrón para el estudio de las localizaciones de las diferentes mutantes de fosforilación. El estudio se realizó utilizando los vectores que expresan las TGBp1s fusionadas a GFP en su extremo N- y C-terminal y los ensayos se realizaron en ausencia y en presencia del virus (**Figura 10**). La metodología utilizada consistió en agroinfiltrar cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las construcciones que expresan las TGBp1s fusionadas a GFP en hojas de *N. benthamiana*. En el caso donde la localización de TGBp1 se realizó en presencia del virus, los cultivos que expresan las proteínas TGBp1s fusionadas a GFP se coinfiltraron con un cultivo que expresa el vector PVX Δ TGBp1. El vector PVX Δ TGBp1, desarrollado previamente en nuestro laboratorio, permite la expresión del genoma de PVX, al cual se le ha delecionado la proteína TGBp1, a partir del promotor 35S del CaMV. Las plantas agroinfiltradas se conservaron en cámaras de cultivo durante un período de 3 días. Transcurrido ese tiempo se observaron las hojas infiltradas con un microscopio confocal Leica TCS SP2 acoplado al software LCS Lite Leica.

La localización en plasmodesmos se confirmó utilizando la proteína marcadora de plasmodesmos, PDLP1 (Amari *et al.*, 2010). Para ello se coinfiltró con un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el plásmido que permite la expresión de PDLP1 fusionada a la proteína roja fluorescente (RFP). Otra estrategia utilizada para visualizar la localización en los plasmodesmos consistió en infiltrar una solución de azul de anilina segundos antes de cortar la hoja para ser observada al microscopio. Esta sustancia tiñe la calosa depositada en las entradas a los plasmodesmos y se visualiza de color rojo. Como marcador de membrana plasmática se utilizó el colorante lipofílico FM4-64, el cual tiñe la membrana plasmática de color rojo. Para algunos casos se

infiltró una solución de manitol 0,4 M para plasmolizar las células vegetales con el objetivo de diferenciar las localizaciones de las proteínas en plasmodesmos o en la membrana plasmática.

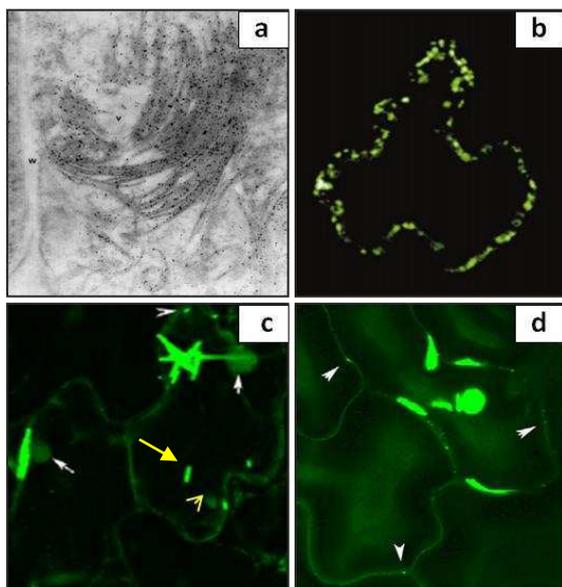


Figura 34. Localización celular de TGBp1 de PVX reportada en la literatura. (a) Microscopía electrónica donde se detecta TGBp1 con anticuerpos marcados con partículas de oro en presencia de PVX en hojas de *N. tabacum* (Davies *et al.*, 1993). **(b)** Microscopía de fluorescencia donde se muestra la presencia de TGBp1-GFP en forma de punteado dentro o al lado de la pared celular en hojas de *N. benthamiana* (Morozov *et al.*, 1999). **(c) y (d)** Microscopía de fluorescencia donde se muestra la GFP-TGBp1 en presencia de PVX en hojas de *N. benthamiana*. Localización citoplasmática, nuclear (flecha blanca), punteado en la pared celular (cabeza de flecha blanca) y estructuras de bastones (flecha amarilla) (Samuels *et al.*, 2007).

1. Estudio de la localización celular de la TGBp1 fusionada a GFP en su extremo N-terminal.

Como primer paso se analizó la localización de TGBp1 fusionada a GFP en su extremo N-terminal (GFP-TGBp1) en ausencia del virus. En la **Figura 35**, se muestra los distintos patrones de localización observados en las células analizadas. Como se puede observar en la **Figura 35 a y b**, TGBp1 se encontró principalmente en el citoplasma, núcleo y en agregados citoplasmáticos. En la **Figura 35 a**, se puede ver claramente las corrientes o hilos citoplasmáticos que demuestran la presencia de TGBp1 en el citoplasma. En la mayoría de las células se observó la formación de inclusiones celulares, que al ser analizadas con mayor aumento, presentaron forma de bastones alargados (**Figura 35 b**, recuadro). Estos agregados en forma de bastones podían estar dispersos por el citoplasma (**Figura 35 b**), apilados unos sobre otros (**Figura 35 b**, recuadro) o cerca de la membrana celular debido al aplastamiento del citoplasma por

la gran vacuola central (**Figura 36 a**, flecha amarilla). Por otro lado, se encontró un patrón bastante frecuente que se caracterizó por la presencia de la GFP-TGBp1 en el citoplasma de una célula central y en forma de punteado sobre la pared celular en las células vecinas (**Figura 35 c**). También en la célula central se observó el patrón punteado, pero en mucha menor medida que en las células vecinas. En todas las células adyacentes el único patrón observado correspondió a puntos en la periferia que podrían estar indicando su localización en plasmodesmos.

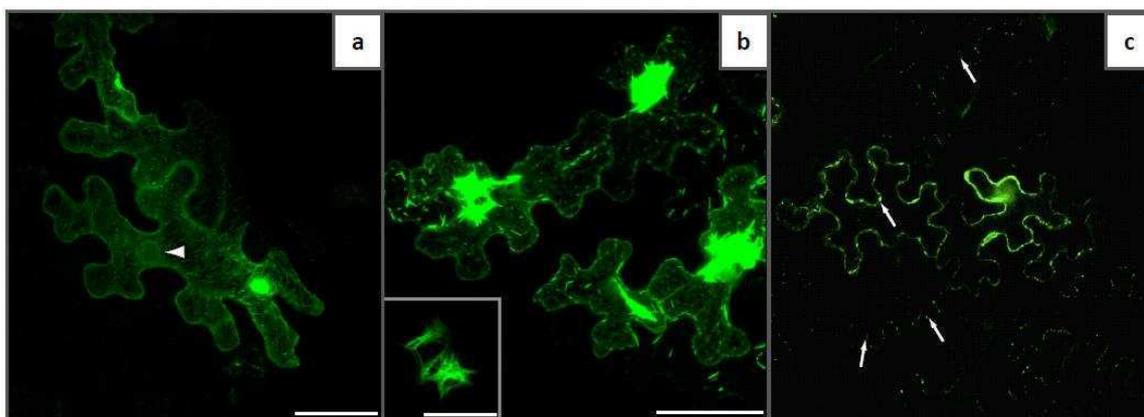


Figura 35. Patrones de localización subcelular de TGBp1 en ausencia de PVX. Un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con la GFP-TGBp1 fue infiltrado en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observó el patrón de localización celular con un microscopio confocal. **(a)** Localización citoplasmática y nuclear (cabeza de flecha blanca). Imagen de máxima proyección bidimensional. Escala = 40 μm . **(b)** Localización citoplasmática con agregados e inclusiones celulares. Imagen de máxima proyección bidimensional. Escala = 50 μm . El cuadrado muestra el detalle de los agregados verdes brillantes que se encuentran en el citoplasma. Escala = 10 μm . **(c)** Localización citoplasmática en célula central y punteado en la pared celular de la célula central y vecina (flechas blancas). Imagen en un solo plano.

Para corroborar que el punteado observado en la célula central y en las células vecinas correspondía a una localización de TGBp1 en plasmodesmos, se infiltraron las hojas con una solución de azul de anilina para teñir la calosa localizada en dichos canales celulares. En la **Figura 36**, se observó como los puntos presentes en la periferia de la célula central y en las células adyacentes a la misma correspondieron a una localización en plasmodesmos. Cuando se superpusieron las imágenes que muestran la fluorescencia verde correspondiente a TGBp1 y la fluorescencia roja correspondiente a

la calosa presente en la entrada de los PDs, se observó una clara colocalización entre las mismas (**Figura 36**, flechas blancas).

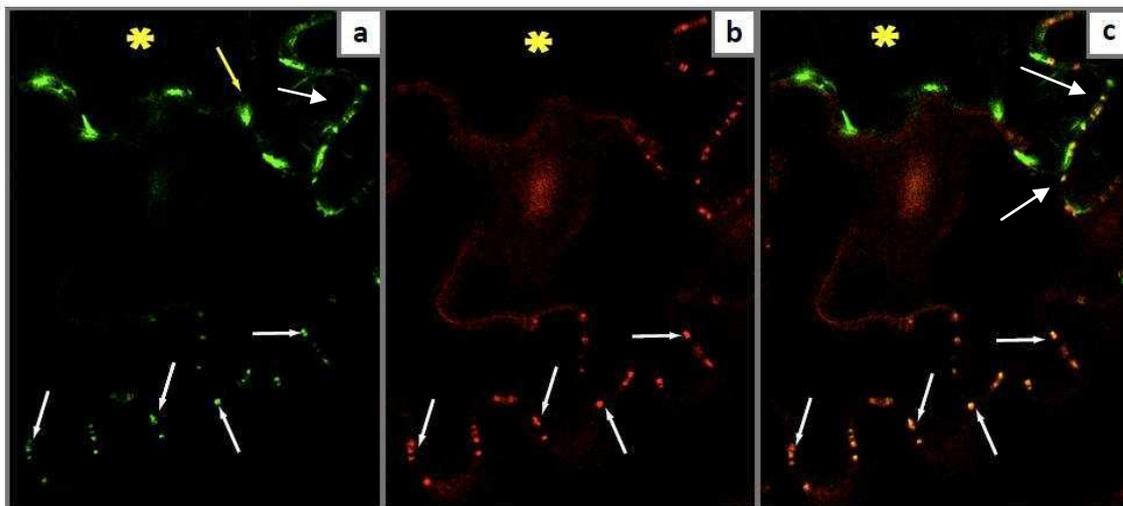


Figura 36. Estudio de la localización en plasmodesmos de GFP-TGBp1 en la periferia de la célula central y vecina en ausencia de PVX. Un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con la GFP-TGBp1 fue infiltrado en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observó los patrones de localización celular con un microscopio confocal. **(a)** Localización punteada de GFP-TGBp1 en la periferia de la célula central y vecina (flechas blancas). En la célula central (estrella amarilla) se observan agregados celulares sobre la membrana plasmática (flecha amarilla). **(b)** Misma célula que en **(a)** pero imagen tomada con el filtro que permite ver la tinción de la calosa con azul de anilina. **(c)** Superposición de las imágenes **(a)** y **(b)** para ver la colocalización de los puntos correspondientes a GFP-TGBp1 y a la calosa. Las flechas blancas indican los puntos donde hubo colocalización.

Como segundo paso se estudió la localización de GFP-TGBp1 en presencia del virus PVX. Al estudiar la localización de GFP-TGBp1 en un contexto de infección viral, se observó algunas diferencias respecto a lo observado sin la presencia de PVX. La mayor diferencia fue la ausencia de GFP-TGBp1 en el núcleo. Sin embargo, sí se observó en el citoplasma, como agregados celulares y en forma de punteado en la periferia de las células (**Figura 37 a-d**). En la **Figura 37 a**, se muestra la presencia de GFP-TGBp1 como agregados citoplasmáticos con forma de bastones. Estos agregados podían estar agrupados, alineados con la membrana plasmática o dispersos en el citoplasma (**Figura 37 a-b** y **Figura 38 a**, flechas azules). Al ser visualizados con un mayor aumento se caracterizaron por tener una estructura laminar (**Figura 37 a**, recuadro blanco y **c**).

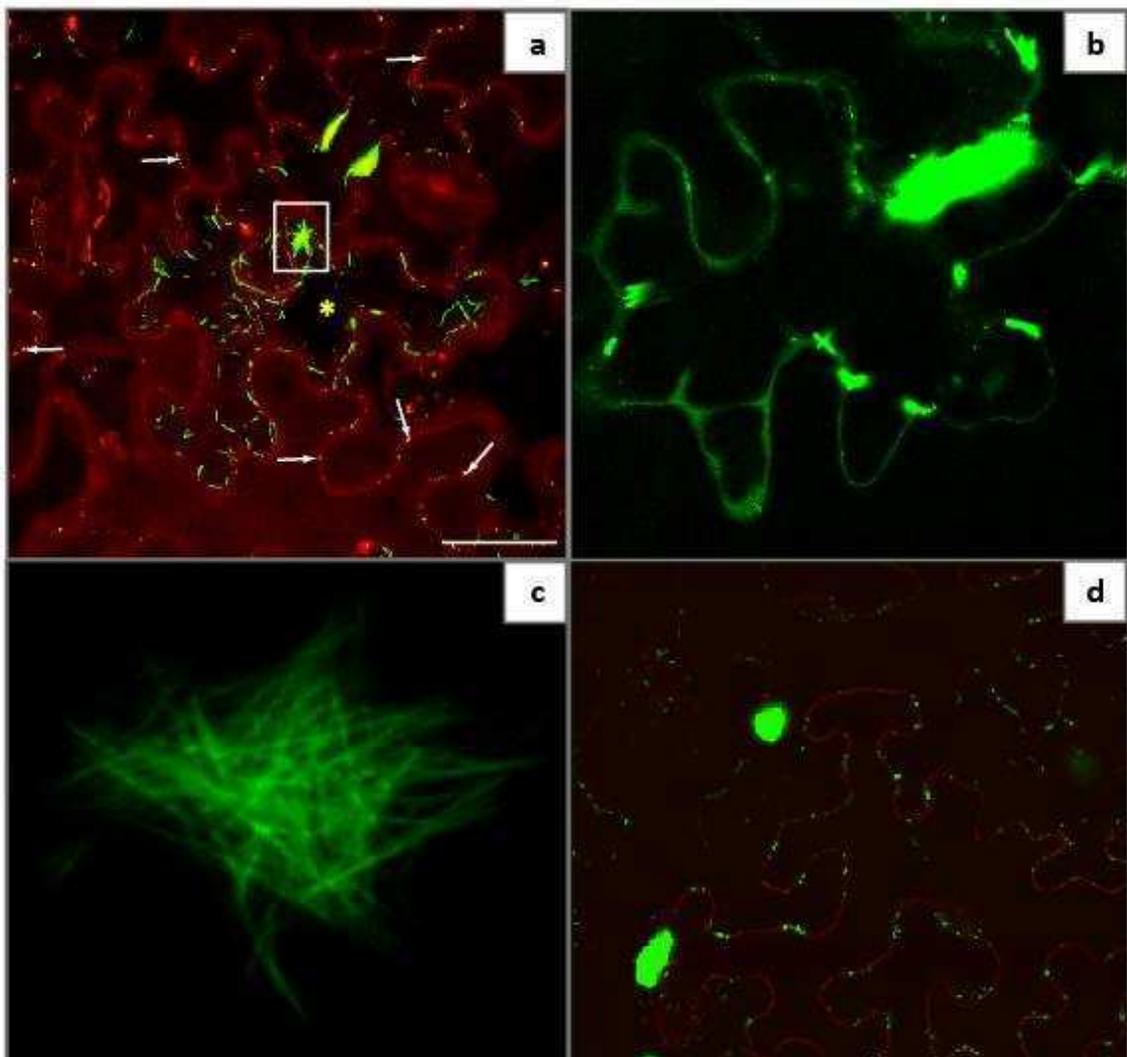


Figura 37. Patrones de localización subcelular de GFP-TGBp1 en presencia de PVX. Una mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* transformado con la GFP-TGBp1 y con el vector PVX Δ TGBp1 fue infiltrada en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observó los patrones de localización celular con un microscopio confocal. **(a)** Localización en forma de agregados citoplasmáticos (bastones) en la célula central (asterisco amarillo) y en forma punteada en la célula vecina (flechas blancas). Tinción con azul de anilina. Escala = 40 μ m. **(b)** Localización en el citoplasma y en forma de agregados citoplasmáticos. **(c)** Imagen de las estructuras laminares en forma de bastones observadas en **(a)** (recuadro blanco). Imagen de máxima proyección bidimensional. **(d)** Localización de agregados citoplasmáticos y en forma de punteado en la periferia de todas las células del campo observado. Tinción con el colorante FM4-64.

Además del patrón descrito, la gran mayoría de las células presentaron el punteado característico en la periferia de las células (**Figura 37 a y d y Figura 38**).

Nuevamente los puntos verdes se observaron tanto en la célula central como en muchas células vecinas. Una diferencia importante respecto a la localización de la GFP-TGBp1 sola es que, en presencia de PVX, una mayor cantidad de células vecinas presentaron localización compatible con plasmodesmos. Al teñir con azul de anilina se comprobó que tanto en la célula central como en la célula vecina, numerosos puntos verdes correspondientes a la localización de TGBp1 colocalizaban con la tinción de la calosa en la entrada de los PDs (**Figura 38**).

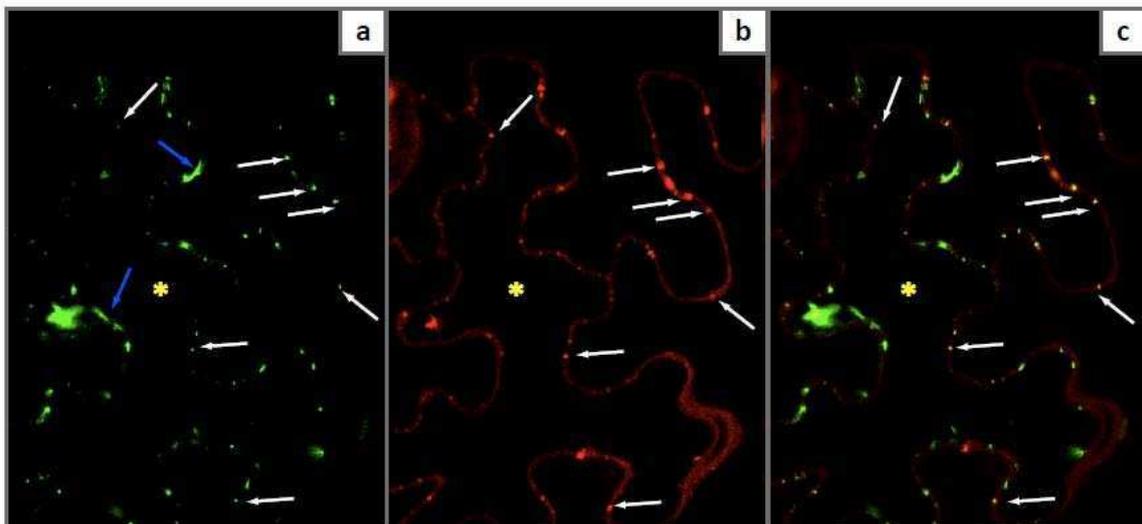


Figura 38. Estudio de la localización en plasmodesmos de GFP-TGBp1 en la periferia de la célula central y vecina en presencia de PVX. Una mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* transformado con la GFP-TGBp1 y con el vector PVX Δ TGBp1 fue infiltrada en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observó los patrones de localización celular con un microscopio confocal. **(a)** Localización punteada de GFP-TGBp1 en la periferia de la célula central (asterisco amarillo) y en la periferia de células vecinas (flechas blancas). Las flechas azules indican agregados citoplasmáticos adyacentes a la membrana plasmática. **(b)** Mismas células que en **(a)** pero imagen tomada con el filtro que permite ver la tinción de la calosa con azul de anilina. **(c)** Superposición de las imágenes **(a)** y **(b)** para ver la colocalización de los puntos correspondientes a GFP-TGBp1 y a la calosa. Las flechas blancas indican algunos de los puntos donde se observa localización de GFP-TGBp1 en plasmodesmos.

Para confirmar esta observación, se coexpresó la GFP-TGBp1 con la proteína PDLP1 fusionada a RFP y se plasmolizaron las células previas a ser visualizadas al microscopio. En la **Figura 39** (paneles **a**, **b** y **c**) se observan las imágenes tomadas de las

hojas que fueron infiltradas con GFP-TGBp1 y PDLP1-RFP en células no plasmolizadas. Como se puede observar se pudo corroborar que la mayoría de la proteína GFP-TGBp1 presente como puntos en la pared celular colocalizaba con PDLP1-RFP. Por otra parte, al plasmolizar las células se pudo confirmar que la proteína GFP-TGBp1 en forma de punteado en la periferia de la célula quedaba retenida dentro de la pared celular demostrando fuertemente la localización de TGBp1 en plasmodesmos (**Figura 39**, paneles **d, e y f**).

Como última estrategia para confirmar la presencia de TGBp1 en plasmodesmos en presencia de PVX, se plasmolizaron las células con una solución de manitol 0,4 M y al mismo tiempo se infiltró una solución de FM4-64 para teñir la membrana plasmática. Esta metodología permite, al retraerse la membrana plasmática, visualizar las proteínas que quedan retenidas en la pared celular dentro de los plasmodesmos. En la **Figura 40 a y b**, se muestran imágenes donde se puede observar la retención de GFP-TGBp1 dentro de la pared celular entre las dos membranas plasmáticas teñidas en rojo. Este resultado corrobora una vez más la presencia de GFP-TGBp1 en plasmodesmos en presencia del virus.

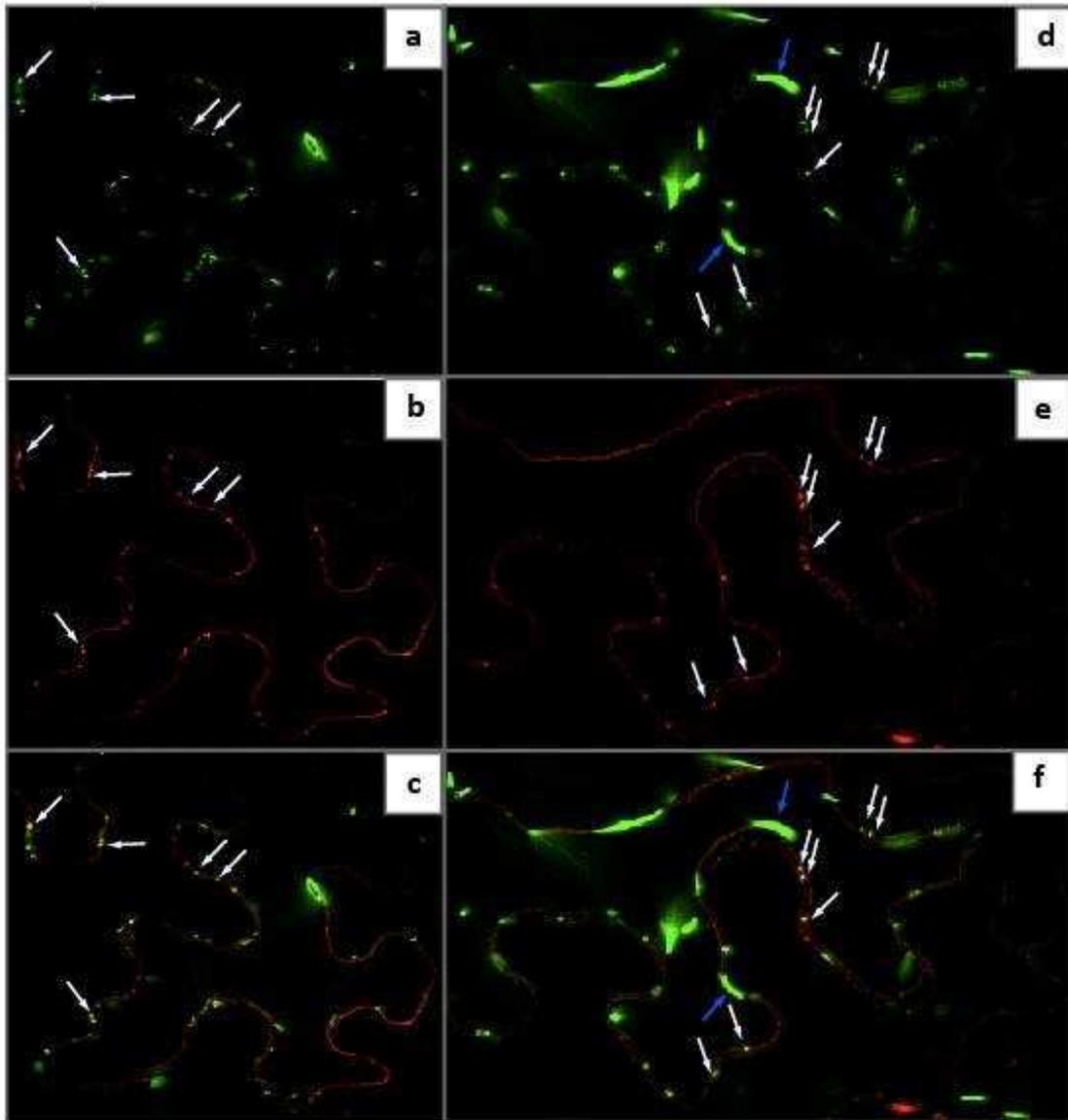


Figura 39. Estudio de la localización en plasmodesmos de GFP-TGBp1 y el marcador PDLP1 en presencia de PVX. Una mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* transformado con GFP-TGBp1, con el vector PVX Δ TGBp1 y con PDLP1-RFP fue infiltrada en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observó los patrones de localización celular con un microscopio confocal. **(a, b y c)** células no plasmolizadas; **c, d y f** células plasmolizadas con manitol 0,4M. **(a) y (d)** Localización punteada de GFP-TGBp1 en la periferia de la célula (flechas blancas). Las flechas azules indican agregados citoplasmáticos adyacentes a la membrana plasmática. **(b) y (e)** Misma célula que en **a y d** pero imagen tomada con el filtro para visualizar RFP. Las flechas blancas indican la localización en plasmodesmos de la proteína PDLP1. **(c) y (f)** Superposición de las imágenes **a-b** y **d-e** para ver la colocalización de los puntos correspondientes a GFP-TGBp1 y PDLP1-RFP. Las flechas blancas indican algunos de los puntos donde hubo colocalización.

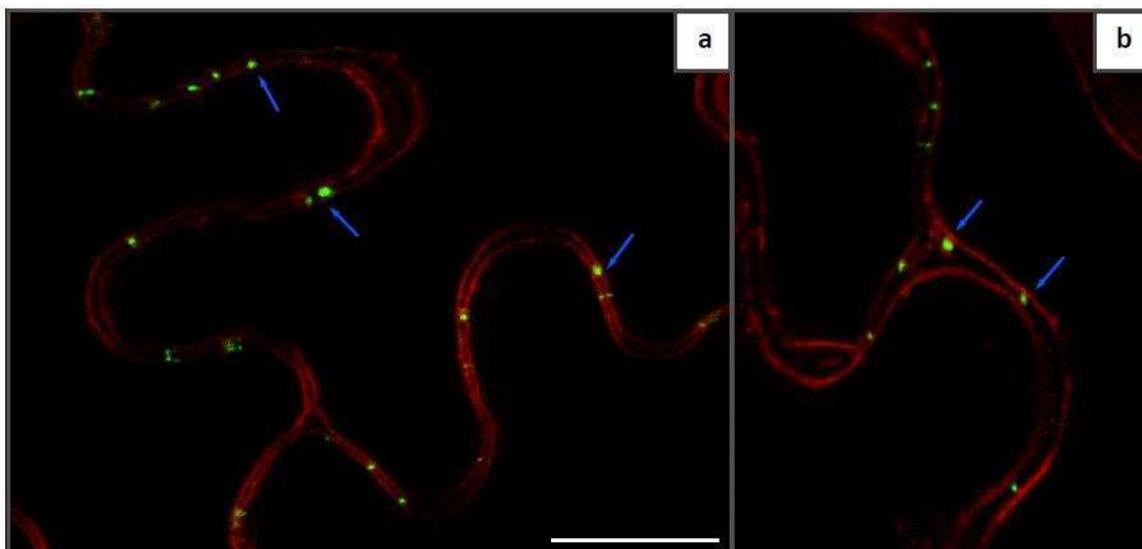
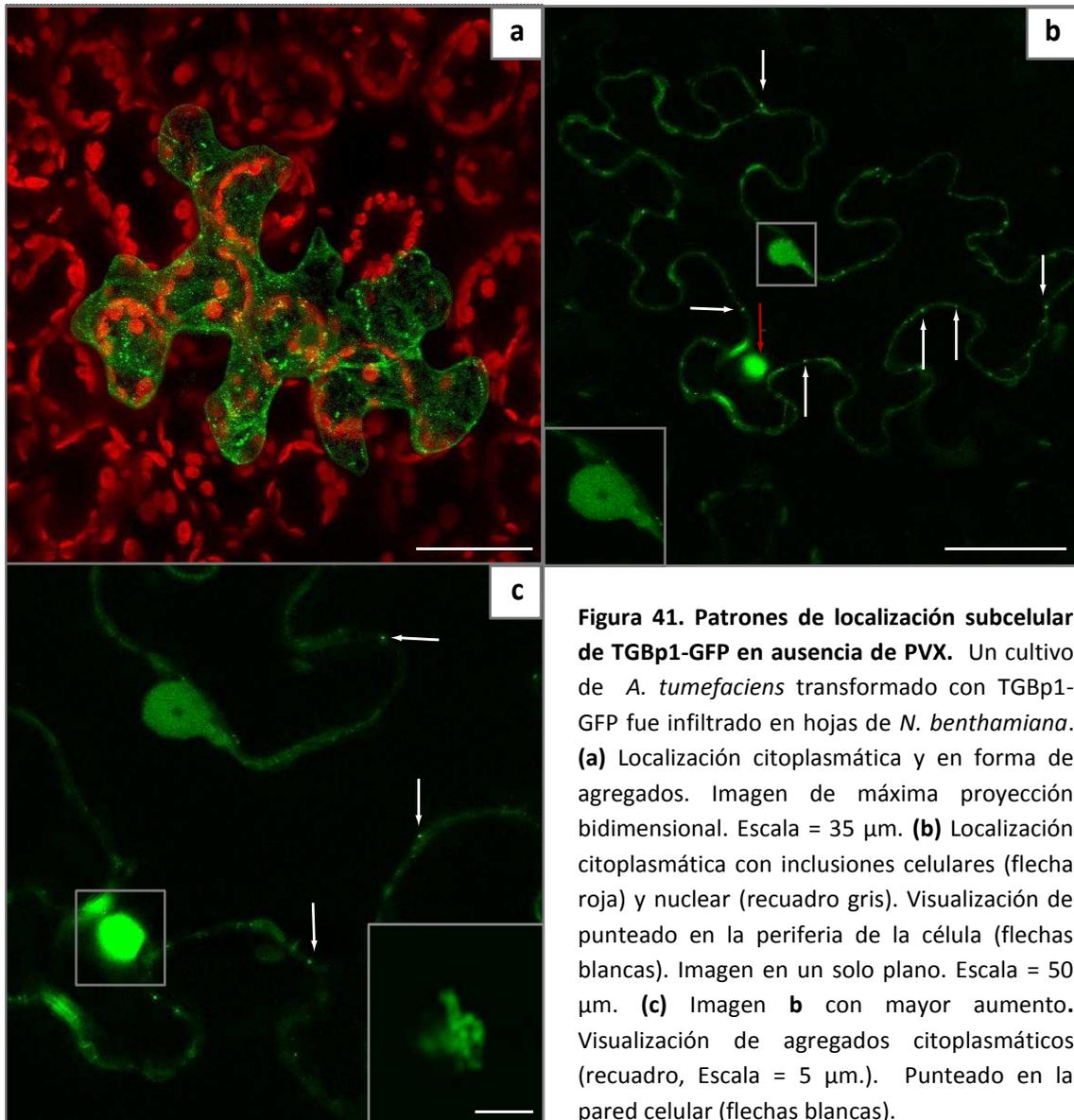


Figura 40. Estudio de la localización en plasmodesmos de GFP-TGBp1 en presencia de PVX utilizando el marcador de membrana plasmática FM4-64. Una mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* transformado con GFP-TGBp1 y con el vector PVXΔTGBp1 fue infiltrada en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observó los patrones de localización celular con un microscopio confocal. **(a)** y **(b)** Las células fueron plasmolizadas con una solución de manitol 0,4M e infiltradas con una solución de FM4-64 para teñir la membrana plasmática. Las flechas azules indican a retención de GFP-TGBp1 dentro de la pared celular producto de su ubicación en los plasmodesmos. Escala = 14 μ m.

2. Estudio de la localización celular de TGBp1 fusionada a GFP en su extremo C-terminal.

A continuación se estudió la localización de TGBp1 fusionada a GFP en su extremo C-terminal (TGBp1-GFP) en ausencia del virus (**Figura 41**). La **Figura 41 a** es una proyección bidimensional que reconstruye todas las imágenes tomadas en varios planos de una célula. De esta manera se observó que la proteína TGBp1-GFP se localiza en el citoplasma tanto en forma soluble como en forma de agregados citoplasmáticos. La localización en el citoplasma como proteína soluble se puede observar claramente en la **Figura 41 a** donde la proteína se encuentra dispersa en forma homogénea por toda la célula. En la **Figura 41**, paneles **b** y **c**, se visualiza a la TGBp1-GFP en el núcleo y en puntos en la periferia de la célula central. Al estudiar los agregados citoplasmáticos en mayor detalle se observó que los mismos tenían formas globulares amorfas,

diferentes a los agregados laminares observados con la GFP-TGBp1 (Figura 41 c, recuadro).



También se encontró el patrón frecuente donde una célula central presentaba TGBp1-GFP en el citoplasma y en forma de punteado sobre la pared celular en las células vecinas (Figura 42). Para corroborar que el punteado observado en las células correspondía a una localización de TGBp1 en plasmodesmos, se infiltraron las hojas con una solución de azul de anilina para teñir la calosa localizada en dichos canales celulares. En la Figura 42 (paneles a, b y c) se observa la colocalización de TGBp1-GFP

con la calosa presente en la entrada de los PDs. Se observó que algunos puntos verdes correspondientes a la TGBp1-GFP presente en la periferia de las células colocalizaron con la tinción de calosa, confirmando la localización de dicha proteína en los plasmodesmos.

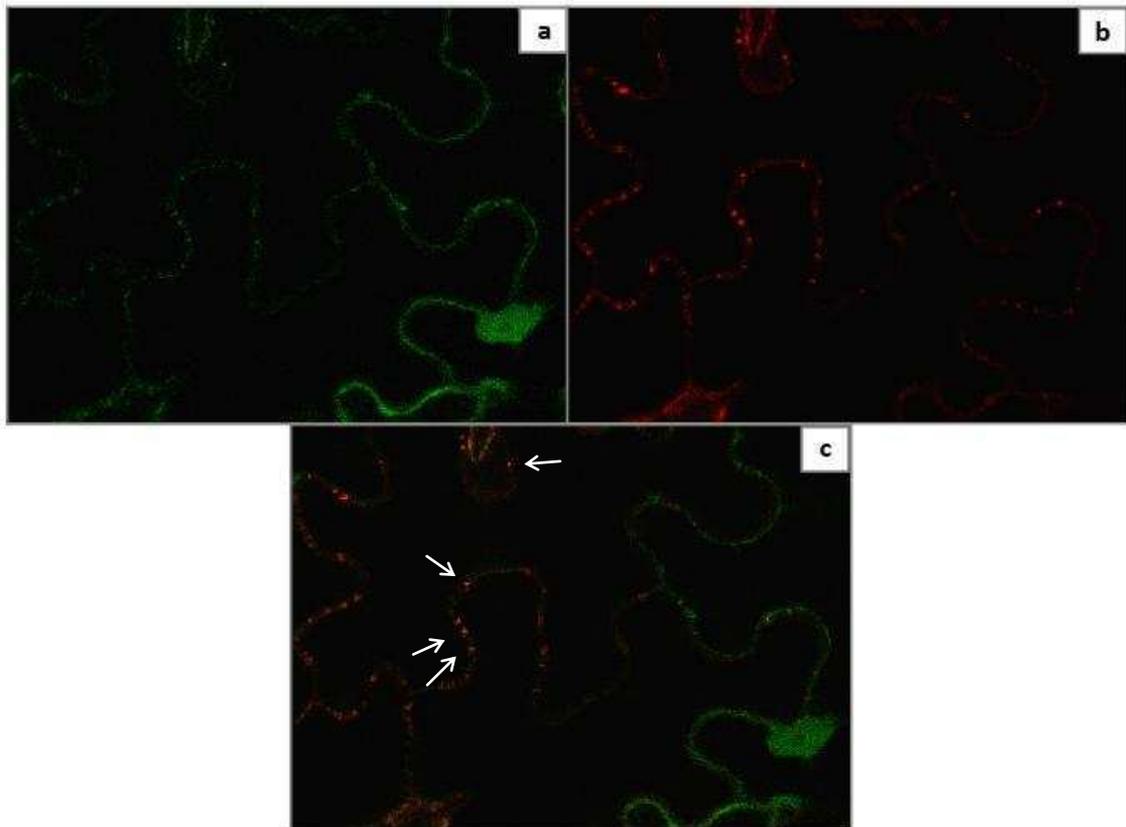


Figura 42. Estudio de la localización en plasmodesmos de TGBp1-GFP en las células vecinas en ausencia de PVX. Un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con la TGBp1-GFP fue infiltrado en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observó los patrones de localización celular con un microscopio confocal. **a)** Localización punteada de TGBp1-GFP en la periferia de la célula vecina. **b)** Misma célula que en **a)** pero imagen tomada con el filtro que permite ver la tinción de la calosa con azul de anilina. **c)** Superposición de las imágenes **a)** y **b)** para ver la colocalización de los puntos correspondientes a TGBp1-GFP y a la calosa. Las flechas blancas indican los puntos donde hubo colocalización.

Como segundo paso se estudió la localización de la TGBp1-GFP en presencia del virus. Los patrones de localización observados para la TGBp1-GFP en presencia de PVX fueron similares a los observados en ausencia del virus a excepción que no se observó localización nuclear (**Figura 43 a y b**). En la **Figura 43 a y b**, se muestran la localización de TGBp1-GFP en el citoplasma, en inclusiones citoplasmáticas y en forma de punteado periférico. Una de las diferencias también observadas fue una mayor cantidad de células vecinas con un patrón punteado en la periferia de las mismas (**Figuras 41 b, 42 a y Figura 43 a**), similar a lo observado con la GFP-TGBp1 en presencia del virus.

Para analizar en mayor profundidad los agregados citoplasmáticos observados en las células centrales, las mismas se plasmolizaron y se tiñeron con el colorante FM4-64. Se observaron agregados citoplasmáticos de diversos tamaños con formas globulares. Estas inclusiones se encontraron por todo el citoplasma, en especial en la periferia de las células. Cuando se estudió con mayor aumento la localización de estos agregados, se observó que los mismos se encontraban sobre la membrana plasmática y no se ubicaban en los plasmodesmos (**Figura 43 c**). Los agregados se estudiaron tomando imágenes de proyecciones bidimensionales de tal manera de reconstruir y analizar su forma tridimensional. Como se puede ver en la **Figura 43 d**, estas inclusiones presentaron formas globulares amorfas notablemente diferentes a las observadas con la GFP-TGBp1.

A continuación se analizó en mayor detalle el punteado verde correspondiente a la localización de TGBp1-GFP en la periferia de las células centrales y vecinas. Como se comentó anteriormente, se observó una mayor cantidad de células centrales y vecinas que presentaban un claro patrón punteado en la pared celular (**Figura 43 a y Figura 44 a**). Al plasmolizar las células y teñirlas con la solución de FM4-64, se confirmó que los puntos aislados se ubicaban dentro de la pared celular en las células vecinas (**Figura 44 b, c y d**). Por otro lado, la tinción con azul de anilina demostró que la calosa teñida colocalizó con el patrón verde punteado observado para la TGBp1-GFP en una célula central demostrando la localización de la misma en los plasmodesmos en presencia de PVX (**Figura 45**).

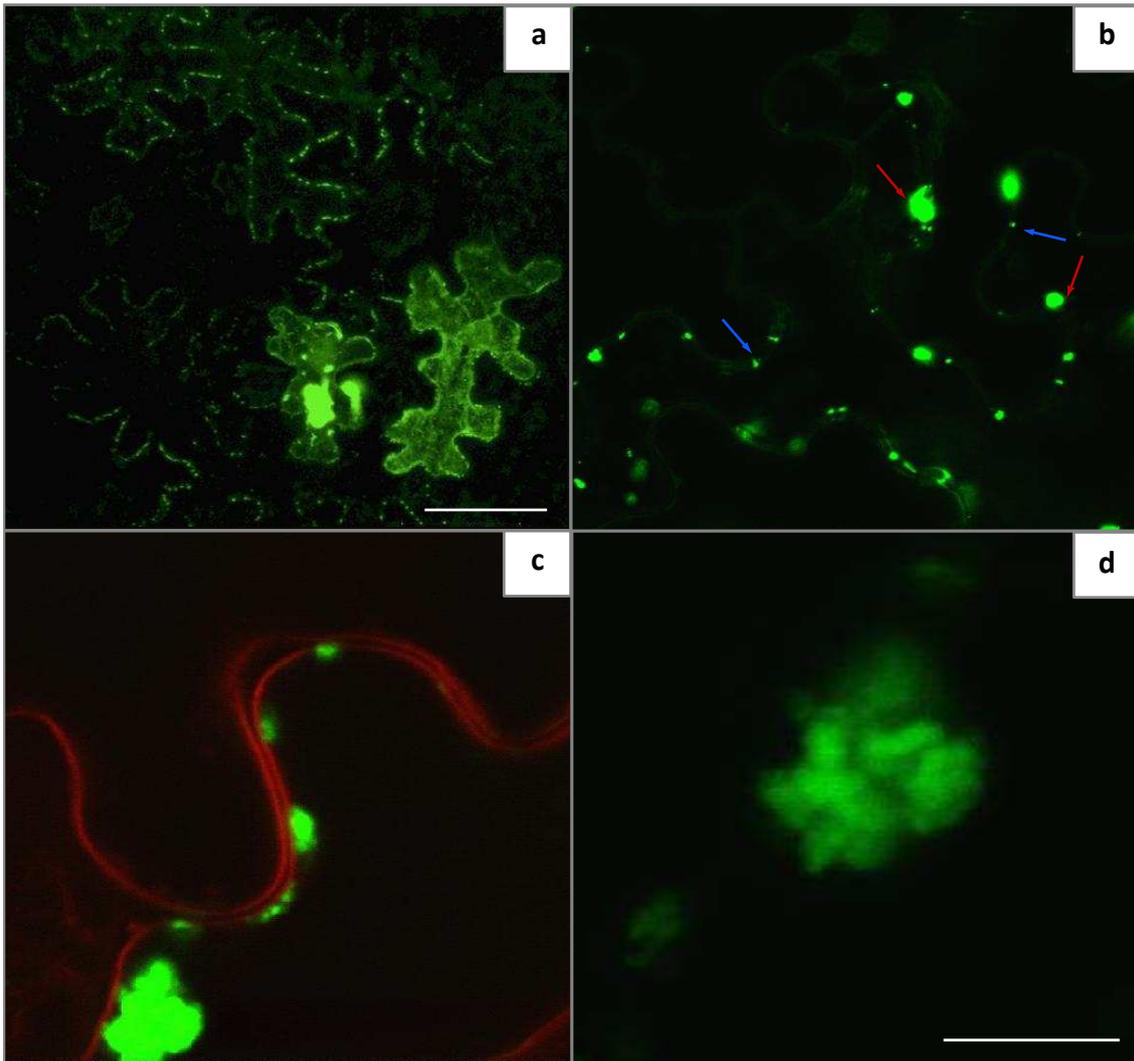


Figura 43. Estudio de la localización subcelular de TGBp1-GFP en presencia de PVX. Una mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* transformado con TGBp1-GFP y con el vector PVX Δ TGBp1 fue infiltrada en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observó los patrones de localización celular con un microscopio confocal. **(a)** Localización citoplasmática y en agregados globulares en la célula central y en forma de punteado en la célula central y vecina. Imagen de máxima proyección bidimensional. Escala = 47 μ m. **(b)** Localización en agregados citoplasmáticos (flechas rojas) y en punteado en la periferia (flechas azules) de la célula central. **(c)** Imágenes de los agregados citoplasmáticos en la periferia de la célula localizados sobre la membrana celular. Célula teñida con FM4-64 y plasmolizada con una solución de manitol 0,4M. **(d)** Imagen de máxima proyección bidimensional de las inclusiones citoplasmáticas. Escala = 5 μ m.

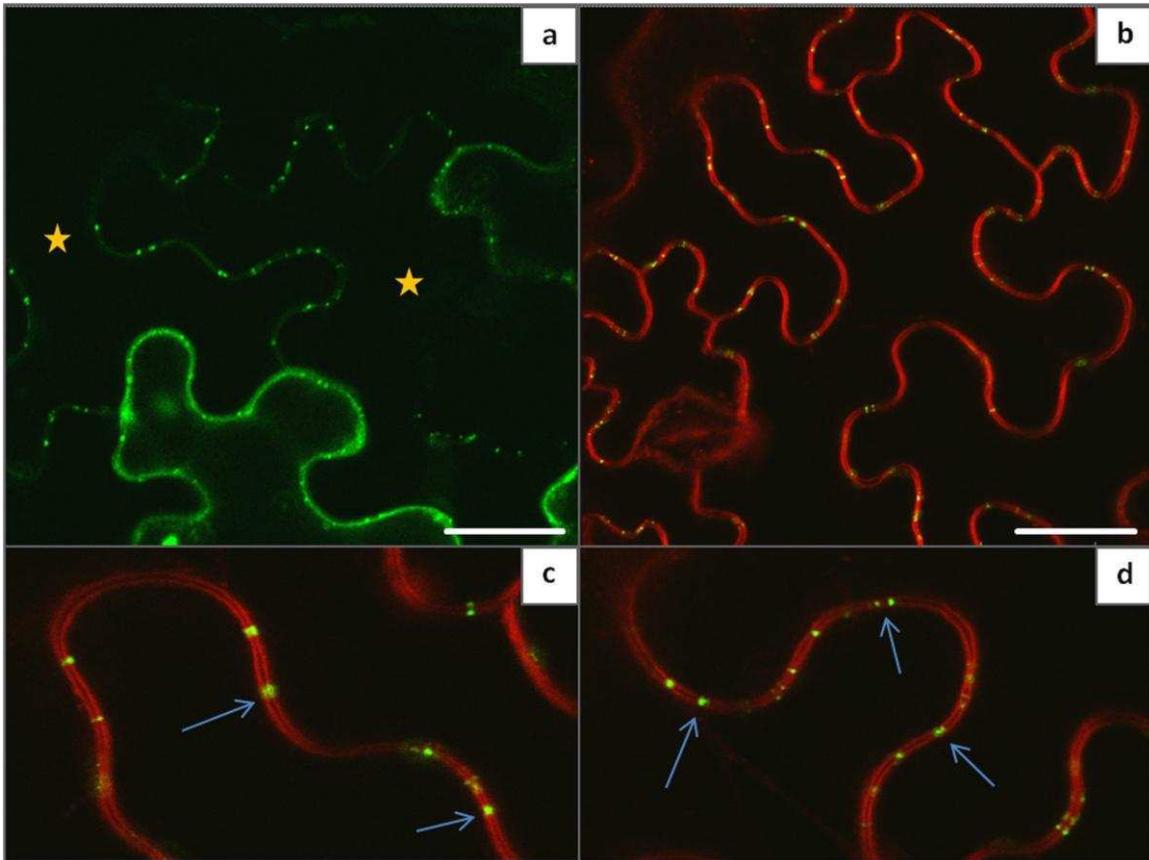


Figura 44. Estudio de la localización en plasmodesmos TGBp1-GFP en la periferia de las células centrales y vecinas en presencia de PVX. Una mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* transformados con TGBp1-GFP y con el amplicón PVXΔTGBp1 fue infiltrada en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observó los patrones de localización celular con un microscopio confocal. **(a)** Localización punteada de TGBp1-GFP en la periferia de las centrales y vecinas (estrellas amarillas) Escala = 22 μm . **(b)** Célula teñida con FM4-64 y plasmolizada con solución de manitol 0,4 M. Localización de TGBp1-GFP en la pared celular de células vecinas. Escala= 25 μm . **(c) y (d)** Imágenes con mayor aumento de células teñidas con FM4-64 y plasmolizadas con solución de manitol 0,4 M. Localización de TGBp1-GFP dentro de la pared celular entre las dos membranas plasmáticas (flechas azules).

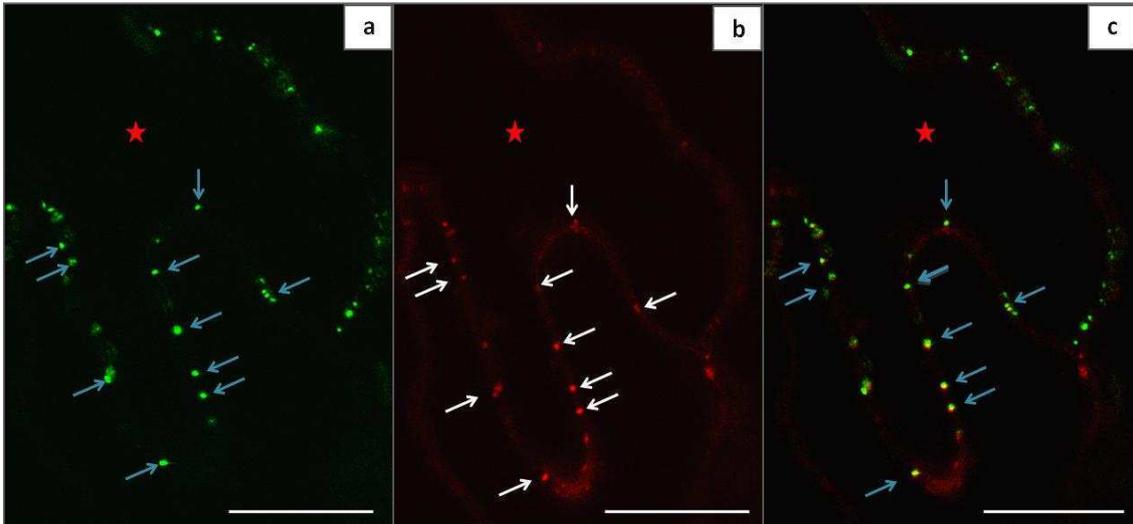


Figura 45. Estudio de la localización en plasmodesmos de TGBp1-GFP en la periferia de una célula central en presencia de PVX. Una mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* transformado con la TGBp1-GFP y con el vector PVXΔTGBp1 fue infiltrada en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 d.p.i se observaron los patrones de localización celular con un microscopio confocal previamente habiendo infiltrado las hojas con una solución de azul de anilina. **(a)** Localización punteada de TGBp1-GFP en la periferia de la célula central (flechas azules). **(b)** Misma célula que en **(a)** (estrella roja) pero imagen tomada con el filtro que permite ver la tinción de la calosa con la solución de azul de anilina. Las flechas blancas indican la tinción de la calosa. **(c)** Superposición de las imágenes **(a)** y **(b)** para ver la colocalización de los puntos correspondientes a TGBp1-GFP y la calosa. Las flechas azules indican algunos de los puntos donde hubo localización de TGBp1-GFP en plasmodesmos. Escala en las tres imágenes = 20 μm.

En resumen, en ausencia de PVX tanto la fusión N- y C- terminal se ubican en núcleo, citoplasma, en agregados celulares y tienen una distribución punteada en la periferia de las células. En ambos casos se demostró que dicha localización punteada correspondía a la ubicación de TGBp1 en plasmodesmos. En presencia del virus, la TGBp1 se localizó principalmente en forma de agregados y en plasmodesmos y no se observó localización nuclear. Se visualizó un aumento de la localización de TGBp1 en PDs cuando la misma era expresada en presencia del virus. La principal diferencia entre ambas fusiones, tanto en presencia como en ausencia de PVX, radica en el tipo de agregados citoplasmáticos que se producen; en el caso de la fusión N-terminal las inclusiones presentan forma de bastones, mientras que la fusión C-terminal presenta agregados de forma globular.

Conclusiones y Discusión

Es importante considerar que los eventos que permiten el desarrollo y el establecimiento de una infección viral exitosa ocurren gracias a procesos altamente regulados y al establecimiento de complejas interacciones a nivel molecular entre las proteínas virales, el ARN viral y las proteínas del hospedante. Estos sucesos generalmente ocurren en compartimientos subcelulares específicos y pueden producirse en asociación con estructuras celulares particulares. Es por esto que el estudio de la localización subcelular de proteínas dentro de una célula es una estrategia rápida y efectiva para deducir características funcionales de las proteínas en estudio.

Como se ha comentado anteriormente, la localización de la TGBp1 de PVX ha sido estudiada desde 1993 por diferentes grupos de investigación (Davies *et al.*, 1993; Morozov *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2004; Samuels *et al.*, 2007). Sin embargo, distintos resultados han sido reportados generando diferentes controversias respecto a este tema. Hasta el día de la fecha no hay en la literatura un trabajo que haya demostrado detalladamente la localización de TGBp1 de PVX.

La distribución subcelular de TGBp1 fue estudiada mediante fusión a proteínas fluorescentes. En algunos trabajos previamente publicados la fusión a la proteína reportera se realizó en el extremo N-terminal de TGBp1, mientras que en otros trabajos se realizó en el extremo C-terminal (Morozov *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2004; Samuels *et al.*, 2007; Tilsner *et al.*, 2012). Dado que ambos tipos de fusiones presentaban resultados contradictorios respecto a la localización y a la funcionalidad de TGBp1, en este trabajo se realizaron ambos tipos de fusiones a GFP con el fin de reevaluar la localización celular de esta proteína viral. De esta manera se pudo examinar el impacto de las diferentes fusiones sobre el comportamiento de la proteína TGBp1 nativa tanto en presencia como en ausencia de PVX en plantas de *N. benthamiana*.

A partir de los resultados presentados en este *Capítulo*, se puede concluir que la versión de TGBp1 fusionada a GFP en su extremo N-terminal expresada en ausencia de PVX posee una localización citoplasmática, nuclear, en agregados alargados con forma de bastones y en plasmodesmos. Estos patrones fueron característicos de las

células centrales, mientras que en las células adyacentes se observó una localización únicamente en los plasmodesmos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Yang *et al.*, 2000 y Samuels *et al.*, 2007., excepto que estos autores no pudieron determinar la presencia de GFP-TGBp1 en PDs en células no infectadas. En este trabajo de Tesis Doctoral, se observa que la GFP-TGBp1 puede localizarse en plasmodesmos aún en ausencia del virus demostrando que el direccionamiento de TGBp1 hacia los PDs no requiere necesariamente la colaboración de otras proteínas virales. Esta localización en PDs, independiente de las otras proteínas virales convalida la capacidad de TGBp1 de aumentar el SEL de los PDs por sí sola (Howard *et al.*, 2004; Bayne *et al.*, 2005). Por otro lado, el patrón de localización observado en presencia del virus fue similar al previamente reportado (Samuels *et al.*, 2007). Se determinó que la ubicación de TGBp1 en las células centrales y en las vecinas fue mayoritariamente en PDs, mientras que en las células centrales también se observó en el citoplasma y en agregados citoplasmáticos en forma de bastón. Sin embargo, a diferencia de otros autores, no fue posible detectar la presencia de TGBp1 en el núcleo (Samuels *et al.*, 2007). Por otra parte, la infección viral llevó a un aumento en el número de células vecinas que presentaban TGBp1, sugiriendo que la presencia del virus aumenta la eficiencia del transporte célula a célula de TGBp1. Este aumento en el transporte de TGBp1 podría pensarse que es debido, en parte, a que la misma se encuentra formando parte del complejo de movilización TGBp1-ARNv-CP. Sin embargo, esta hipótesis contradice resultados preliminares de nuestro laboratorio y de otros autores donde se demuestra que la fusión N-terminal de TGBp1 no es capaz de complementar la movilización viral de un PVX que expresa una TGBp1 defectiva para dicha función (Morozov *et al.*, 1999; Bayne *et al.*, 2005; Gangemi 2012). Otra hipótesis es que el aumento en el transporte de TGBp1 a través de los PDs se vea favorecido por la expresión de TGBp2 y TGBp3. Estas MPs podrían hacer más eficiente el direccionamiento de TGBp1 hacia los plasmodesmos mediante la interacción de las mismas con el RE y el sistema de endomembranas de la célula. Asimismo, TGBp2 podría favorecer la movilización célula a célula de TGBp1 ya que esta MPs podría potenciar el aumento del SEL debido a la capacidad de “gating” (Tamai y Meshi, 2001). El análisis de los patrones de localización de la fusión C-terminal TGBp1-GFP mostró que tanto en presencia como en ausencia del virus, TGBp1 se localizó en el citoplasma,

en forma de agregados globulares y en plasmodesmos. Similarmente a lo observado para la fusión N-terminal en presencia de PVX, TGBp1 no se localizó en el núcleo y fue posible detectar un aumento de la localización de esta MP en los PDs de las células centrales y vecinas. Si bien en el trabajo de Yang *et al.*, 2000 no se pudo detectar la TGBp1-GFP en PDs; previamente Morozov *et al.*, 1999 describió la localización de TGBp1 fusionada a GFP en su extremo C-terminal, tanto en ausencia como en presencia del virus, como un punteado dentro de la pared celular sugiriendo una posible localización en plasmodesmos.

En cuanto a la localización de TGBp1 en PDs, este es el primer trabajo donde se confirma, mediante el uso de marcadores específicos, que efectivamente TGBp1 se localiza en estas estructuras celulares. Teniendo en cuenta que la fusión TGBp1-GFP puede formar agregados globulares de diversos tamaños y que los mismos se pueden localizar pegados a la membrana plasmática, es muy fácil obtener falsas localizaciones de TGBp1 en PDs. De hecho se ha observado que la no utilización de marcadores específicos, puede llevar a la determinación errónea de la ubicación de TGBp1 en PDs.

Dado que GFP es capaz de ingresar al núcleo pasivamente se podría suponer que las fusiones de TGBp1 a GFP también podrían ser lo suficientemente pequeñas para atravesar el poro nuclear. Esto llevaría a pensar que la presencia de TGBp1 en el núcleo, en ausencia de PVX, no reflejaría una localización relacionada a una función biológica de esta proteína. Sin embargo, se ha demostrado previamente, utilizando fusiones de TGBp1 a la proteína GUS, que la localización nuclear de TGBp1 no es producto de una difusión pasiva. En tal sentido, se mostró que la proteína GUS se encuentra restringida en el citoplasma y que se localiza en el núcleo sólo cuando se encuentra fusionada a TGBp1 (Samuels *et al.*, 2007). Estos resultados avalan la observación en el núcleo de las versiones GFP-TGBp1 y TGBp1-GFP en ausencia de PVX. En este caso se podría proponer que la localización de TGBp1 podría estar relacionada con su actividad supresora del PTGS. Se ha demostrado que la proteína supresora del PTGS 2b se localiza en núcleo y que el direccionamiento hacia dicho compartimiento celular está determinado por la presencia de dos secuencias NLS (del inglés, “Nuclear Localization Signal”) (Wang *et al.*, 2004). La proteína 2b interacciona con la AGO4 en el núcleo perturbando la maquinaria celular de metilación del ADN dirigida por ARN (Hamera *et al.*, 2012). Chui *et al.* 2010 demostraron que la TGBp1 de

PVX interacciona con AGO4, lo cual podría explicar una posible localización de esta MP en el núcleo. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la presencia de dominios NSL en la secuencia proteica de TGBp1 que permitan su direccionamiento al núcleo de la célula. Por otro lado, el hecho de que TGBp1, en presencia de PVX, no pueda ser detectada dentro del núcleo, podría deberse a un redireccionamiento de la proteína hacia otros compartimientos celulares guiado por la presencia del ARN viral o de otras proteínas del virus.

Respecto a las características de los agregados citoplasmáticos observados con las fusiones N- y C-terminal, un comportamiento similar fue reportado para la expresión de la TGBp1 del *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), virus perteneciente al género *Foveavirus* de la familia *Betaflexiviridae* (Rebelo *et al.*, 2008). Llamativamente, al igual que para la TGBp1 de PVX la fusión N-terminal presentó agregados en formas de bastones y la C-terminal en formas globulares, indicando que la formación de estos agregados parece ser un comportamiento general de las TGBp1s determinado por la posición relativa de la proteína reportera. Analizando conjuntamente los resultados de localización de las diferentes fusiones de TGBp1 se postula que la única diferencia a nivel de localización subcelular se encuentra dada por el tipo de agregados que se forman, lo cual podría dar cuenta de la diferencia funcional de las fusiones de TGBp1.

En cuanto a la funcionalidad de las fusiones de la TGBp1 de PVX, se ha demostrado que tanto las fusiones N- como C-terminales no afectan la actividad supresora del PTGS (Bayne *et al.*, 2005). Por otro lado, como se ha dicho previamente tres grupos independientes han demostrado que la fusión N-terminal de TGBp1 afecta negativamente su capacidad de complementar la movilización viral (Morozov *et al.*, 1999; Bayne *et al.*, 2005; Gangemi, 2012) contradiciendo los resultados obtenidos por Yang *et al.*, 2000. Las diferencias observadas no pueden ser atribuidas a la técnica de transformación utilizada, ya que tanto por bombardeo como por agroinfiltración, las construcciones que expresan la TGBp1 fusionada a GFP en su extremo N-terminal no son capaces de transcomplementar un virión defectivo (Morozov *et al.*, 1999; Bayne *et al.*, 2005; Gangemi, 2012). El trabajo de Yang *et al.*, 2000 fue el único capaz de demostrar que la versión GFP-TGBp1 era capaz de complementar la movilización de un virus defectivo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la estrategia utilizada en

este trabajo difiere de la de los otros estudios; en donde en lugar de complementar en trans la expresión de un virión defectivo para TGBp1, evaluaron la complementación en cis de la función de TGBp1. Para ello utilizaron un plásmido que permite la expresión de un virión recombinante que posee una delección en TGBp1 y que expresa la fusión N-terminal de TGBp1 a partir del promotor de la cápside. Esta diferente estrategia de estudio de la complementación viral podría ser la causa del comportamiento diferencial respecto de la capacidad de complementación de las distintas fusiones de TGBp1. Por otro lado, en el trabajo de Yang *et al.*, 2000 se presentan resultados contradictorios. En este trabajo se afirma que la fusión C-terminal de TGBp1 a GFP es capaz de complementar un virus defectivo en la movilización viral; sin embargo, al estudiar la capacidad de “gating” de dicha proteína de fusión, se muestra que la misma es incapaz de aumentar el SEL de los PDs. En base a estos últimos resultados, la TGBp1-GFP no podría ser capaz de promover el movimiento de un virus defectivo ya que la actividad de “gating” es indispensable para la movilización viral a través de los PDs. Estas contradicciones llevan a pensar que los resultados observados por Yang *et al.*, 2000 deberían reevaluarse y por ende los resultados más confiables son los que avalan a la fusión C-terminal de TGBp1 como la proteína que conserva su funcionalidad.

Analizando conjuntamente los resultados de localización y funcionalidad de las diferentes fusiones de TGBp1 se podría proponer que la localización de TGBp1 en los agregados globulares podría ser necesaria para que dicha proteína sea completamente funcional. Estos agregados no estarían relacionados con la actividad supresora del PTGS, dado que ambos tipos de fusiones son supresoras del silenciamiento, si no con otra función de TGBp1 necesaria para la movilización viral. La identidad de estos agregados aún no ha sido determinada, aunque cabe destacar que estructuralmente se asemejan a los agregados que se encuentran dentro de los cuerpos X, estructuras subcelulares recientemente reportadas como los sitios de replicación viral en los cuales se localiza TGBp1 (Tilsner *et al.*, 2012). Sin embargo, un estudio más estricto en cuanto a la localización subcelular y composición de estos agregados deberá ser realizado para confirmar esta hipótesis.

En resumen, se puede concluir que la posición de las fusiones de proteínas reporteras puede alterar el comportamiento, la localización subcelular y las funciones

biológicas de las proteínas nativas en estudio. La reevaluación y análisis de la localización de los distintos tipos de fusiones de GFP permite establecer los parámetros de estudio para la futura evaluación del rol de la fosforilación en la T193 y T214 en la ubicación subcelular de la proteína TGBp1 de PVX.

Discusión General

En base a los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación se propuso en la *Introducción* un modelo de movimiento viral célula a célula para los *Potexvirus* (*Introducción*, **Figura 5**) que involucran las siguientes actividades de TGBp1: (1) organizar y formar los cuerpos X, (2) unirse al ARN viral e inhibir su traducibilidad para formar los complejos de movilización, (3) transportar los complejos de movilización hacia el PD, (4) interactuar con la maquinaria del PD para inducir el aumento del tamaño de exclusión del poro, (5) mediar en el transporte de los complejos y de ella misma a través del PD y (6) suprimir el PTGS para permitir la dispersión del virus (Lough *et al.*, 1998; Howard *et al.*, 2004; Bayne *et al.*, 2005; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010; Tilsner *et al.*, 2012). Como se ha dicho anteriormente, este modelo implica la existencia de diferentes isoformas funcionales de TGBp1 las cuales podrían interconvertirse mediante eventos de fosforilación/desfosforilación a lo largo del ciclo de infección viral.

Como resultados de estudios previos realizados en nuestro laboratorio se determinó que TGBp1 presenta múltiples isoformas de punto isoeléctrico durante la infección viral compatibles con distintas isoformas de fosforilación. Por otro lado, se demostró que la misma es fosforilada por quinasas celulares presentes tanto en plantas infectadas como no infectadas, observándose un aumento de la fosforilación de TGBp1 en plantas infectadas (Módena *et al.*, 2008). Se identificó una quinasa tipo CK2 como la responsable de la fosforilación de TGBp1 en los residuos T193 y T214 y se demostró que la fosforilación/desfosforilación de estos residuos es esencial para que PVX pueda infectar (Módena *et al.*, 2008; Módena, 2011). En el presente Trabajo de Tesis se profundizó el estudio de la función regulatoria de estos residuos fosforilables, analizando su rol en las actividades de supresión del PTGS, "gating", e interacción de TGBp1 con la proteína REM.

Según los resultados obtenidos en este Trabajo, la TGBp1 inicialmente producida por el virus que se encuentra desfosforilada en la T193 y T214, es sensible a la degradación por el sistema UPS - 26S de la planta (**Figura 1**). El virus, por su parte, contrarrestaría la respuesta de defensa de la planta estabilizando la proteína TGBp1 mediante su fosforilación en la T193 por una quinasa tipo CK2 constitutivamente expresada en la célula vegetal (**Figura 1**). Durante el estadio inicial del ciclo de infección es necesaria la presencia de isoformas de TGBp1 capaces de suprimir el

PTGS, tanto en la célula inicial como en la célula vecina. La isoforma de TGBp1 desfosforilada en la T193 y T214 podría cumplir esta función; sin embargo, su capacidad para suprimir el PTGS no pudo ser determinada debido a su inestabilidad (**Figura 1**). Con este fin nuevos estudios de análisis de la actividad supresora utilizando versiones de TGBp1 fusionadas a tags en su extremo C-terminal, de manera de estabilizar la proteína, deberán ser realizados. Por otra parte, ensayos preliminares de transcomplementación de la actividad supresora del PTGS de un virión de PVX defectivo para TGBp1 sugieren que la isoforma desfosforilada es capaz de suprimir el PTGS. La subsecuente fosforilación de la TGBp1 en la T193 tendría como función estabilizar la proteína. Adicionalmente la fosforilación en la T193 podría ser necesaria para que la TGBp1 sea fosforilada en la T214, siendo esta última fosforilación la responsable de inactivar su capacidad supresora (**Figura 1**, hipótesis 1). Alternativamente, la fosforilación en la T193 podría regular negativamente la actividad supresora del PTGS *per se*, actuando en este caso en forma independiente a la fosforilación en la T214. De esta manera la fosforilación en cualquiera de los dos residuos, T193 o T214, sería suficiente para inhibir la actividad supresora (**Figura 1**, hipótesis 2). Como se ha dicho anteriormente, la TGBp1 podría estar ejerciendo su actividad supresora, en parte, mediante una interacción directa con la proteína AGO1 (Chiu *et al.*, 2010). Por lo tanto, la función de estas fosforilaciones podría ser regular la interacción TGBp1-AGO1. De esta forma, se puede plantear que la isoforma de TGBp1 no fosforilada en la T193 y en la T214 sería capaz de interactuar con AGO1, mientras que las isoformas que se encuentren fosforiladas en la T214 no serían capaces de interactuar con dicha proteína (**Figura 1**). En cuanto al efecto de la fosforilación de la T193, como se ha planteado, podría llevar tanto a la interacción, o no, con AGO1 dependiendo del rol que cumpla dicha fosforilación. La pérdida de afinidad por AGO1 permitiría que TGBp1 interactuara con otros componentes celulares o virales necesarios para promover el movimiento célula a célula del virus. La sobreexpresión de TGBp1 lleva al aumento del microARN-168, lo cual probablemente sea resultado de la acción de TGBp1 sobre AGO1 (**Figura 1**). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho que las fosforilaciones que regulan la actividad supresora del PTGS de TGBp1 afectan en forma similar la inducción de la acumulación del microARN-168 mediada por TGBp1.

CK2 es 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 y Martínez, 1997; Riera *et al.*, 2001). La subunidad catalítica se localiza en plantas en el núcleo y en menor medida en el citoplasma (Riera *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2006), aunque la misma podría ser regulada por su interacción con las subunidad regulatoria ampliando su patrón de localización a cloroplastos, agregados en el citoplasma y distribución punteada en la membrana. Por otra parte, se la ha relacionado con diferentes procesos que incluyen, entre otros, la regulación del ciclo celular, la degradación mediada por proteosoma, la traducción de ARN y la defensa mediada por ácido salicílico (Hidalgo *et al.*, 2001; Riera *et al.*, 2001; Kang y Klessig, 2005). En particular se ha demostrado su implicancia en la fosforilación de factores de traducción de plantas sugiriendo un rol en la iniciación de la traducción (Dennis y Browning, 2009; Dennis *et al.*, 2009). Por otra parte, recientemente se han presentado evidencias que muestran la localización de AGO1 y de algunos microARNs, entre ellos el micro-ARN168 en polisomas indicando la existencia de una relación entre la maquinaria de silenciamiento y la maquinaria de traducción en plantas (Lanet *et al.*, 2009). Estas evidencias, junto con la localización subcelular reportada para TGBp1, son compatibles con la posibilidad que la TGBp1 que se encuentra interactuando con AGO1 sea fosforilada por CK2 en el entorno de los polisomas.

En una etapa intermedia se debe producir la movilización del complejo de transporte a través del plasmodesmo. Para ello parte del "pool" celular de TGBp1 que se encuentra suprimiendo el PTGS debe estar disponible para asociarse al ARN viral y a la CP para formar los complejos de movilización, ya sea en forma de virión (TGBp1-PVX) o en forma de RNP (TGBp1-ARNv-CP). Esta TGBp1 debe ser capaz de inhibir la traducibilidad de los complejos de movilización para permitir su transporte hacia y a través de los PDs. En tal sentido, se demostró que la fosforilación *in vitro* de TGBp1 es capaz de inhibir la traducción del ARN viral, mientras que la TGBp1 desfosforilada activa la traducibilidad del mismo (Atabekov *et al.*, 2007; Zayakina *et al.*, 2008). De acuerdo a estos resultados, se podría postular que las isoformas de TGBp1 fosforiladas por CK2 que son incapaces de suprimir el PTGS serían las que interactuarían con el complejo de movilización viral para inhibir su traducción y permitir su ulterior

transporte a través de los PDs (**Figura 1**). En favor de esta hipótesis Zayakina *et al.*, 2008 demostró que la fosforilación *in vitro* por una mezcla de enzimas CK1 y CK2 de la TGBp1 lleva a la inhibición de su capacidad de activar la traducibilidad de los viriones; sin embargo, los residuos implicados en la regulación de la traducibilidad del virión no han sido identificados.

Finalmente en la etapa tardía, una vez que el complejo de movilización ha sido transportado hacia una nueva célula vecina, se requeriría nuevamente de la isoforma no fosforilada de la proteína TGBp1, de modo de asegurar la traducibilidad de los complejos de movilización y la reiniciación del ciclo de multiplicación viral. Asimismo las TGBp1s que se encontraban formando parte de los complejos de transporte o que se movilizaron por si solas a través de los PDs, serían desfosforiladas en los residuos T193 y T214 por fosfatasas celulares para llevar a cabo su actividad de supresora del PTGS mediante la interacción con AGO1 (**Figura 1**).

Para que el complejo de movilización pueda ser transportado se requiere isoformas de TGBp1 que sean capaces de promover la apertura de los PDs. En el caso de las MPs de los virus TMV y PLRV se mostró que este proceso es regulado por fosforilación de dos sitios, los cuales de forma independiente promueven el direccionamiento a PDs y, en el caso de TMV, también el aumento de su SEL (Trutnyeva *et al.*, 2005; Link *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluó si la fosforilación en las T193 y T214 de TGBp1 regulaba su capacidad "gating", comprobándose que la fosforilación de ambos residuos no se encontraba implicada en este proceso. Este resultado no es sorprendente teniendo en cuenta que la quinasa implicada en la regulación del "gating" de TMV se encuentra asociada a PDs (Lee *et al.*, 2005), mientras que no existen evidencias que CK2 se localice en los mismos. La importancia de la regulación en la promoción de la apertura del SEL por parte de las MPs con el fin de evitar efectos deletéreos para el hospedador y el hecho de que TGBp1 se encuentra multifosforilada, nos lleva a pensar que otros sitios podrían estar involucrados en la regulación de este proceso.

La membrana plasmática y el retículo en los PDs se encuentran conectados a través de proteínas denominadas "spokes". Recientemente se ha propuesto que REM tendría como función anclar estas proteínas "spokes" a la membrana plasmática,

estabilizando y regulando de esta forma el grado de dilatación del PD (Tilsner *et al.*, 2010). La unión de TGBp1 a la proteína REM en los PDs podría bloquear las interacciones entre REM y las proteínas "spokes" produciendo la relajación y apertura del poro. El hecho que la interacción de TGBp1 con REM, al igual que su actividad "gating", no está regulada por fosforilación en las T193 y T214 refuerza la hipótesis que el mecanismo de acción de TGBp1 para modificar el SEL de los PDs involucra su interacción con REM.

El rol de la proteína TGBp1 como proteína de movimiento resulta 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 regulación de la interacción con distintas proteínas celulares.

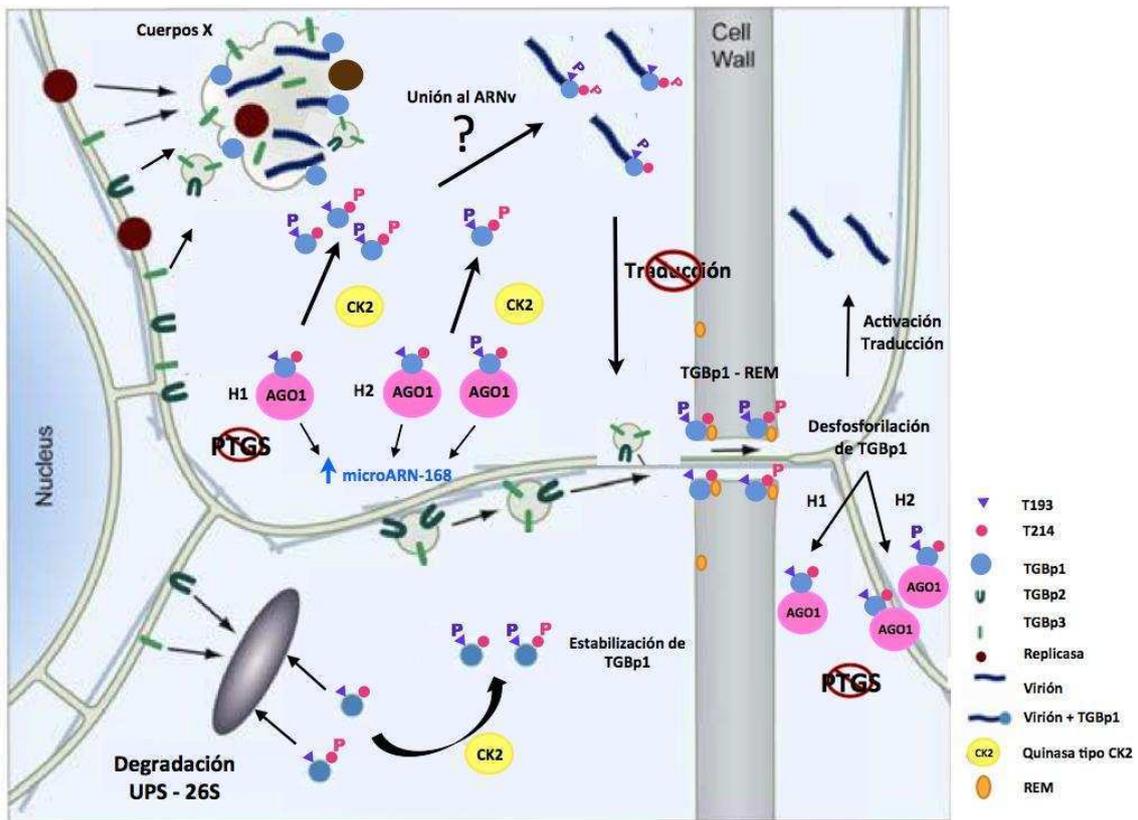


Figura 1. Modelo propuesto para el rol de la fosforilación en la regulación de las diferentes actividades de TGBp1 de PVX. H1: Hipótesis 1 - La fosforilación en la T193 podría regular negativamente la actividad supresora del PTGS *per se*, actuando en este caso en forma independiente a la fosforilación en la T214. De esta manera la fosforilación en cualquiera de los dos residuos de TGBp1, sería suficiente para inhibir la actividad supresora de la misma. H2: La fosforilación en la T193 es necesaria para que la TGBp1 sea fosforilada en la T214, siendo esta última fosforilación la responsable de inactivar la capacidad supresora. Si bien el complejo de movilización que se muestra corresponde al de virión (TGBp1-PVX), también este modelo aplica si el complejo de transporte fuese la forma de RNP (TGBp1-ARNv-CP). UPS – 26S: Sistema de degradación ubiquitina proteosoma – 26S.

Referencias

- 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.
- Akamatsu N., Takeda A., Kishimoto M., Kaido M., Okuno T. y Mise K. (2007). Phosphorylation and interaction of the movement and coat proteins of brome mosaic virus in infected barley protoplasts. *Arch Virology*, **152**(11), 2087-2093.
- Allard H.A. (1916). Some properties of the virus of the mosaic disease of tobacco. *Journal Agricultural Research*, **6**, 649-674.
- Amari K., Boutant E., Hofmann C., Schmitt-Keichinger C., Fernandez-Calvino L., Didier P., Lerich A., Mutterer J., Thomas C.L., Heinlein M., Mély Y., Maule A.J. y Ritzenthaler C. (2010). A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathology*, **6**(9), 100-111.
- Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T.H. y Vance V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(22), 13079-13084.
- Angell S.M., Davies C. y Baulcombe DC. (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**(1), 197-201.
- Angell S.M. y Baulcombe D.C. (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO Journal*, **16**(12), 3675-3684.
- Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Novikov V.K. y Arkhipenko M.V. (2001). Translational activation of encapsidated potato virus X RNA by coat protein phosphorylation. *Virology*, **286**(2), 466-474.
- Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V. y 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**(2), 259-263.
- Atabekov J., Dobrov E., Karpova O. y Rodionova N. (2007). Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution. *Mol Plant Pathology*, **8**(5), 667-775.
- Bamunusinghe D., Hemenway C.L., Nelson R.S., Sanderfoot A.A., Ye C.M., Silva M.A., Payton M. y Verchot-Lubicz J. (2009). Analysis of potato virus X replicase and TGBp3 subcellular locations. *Virology*, **393**(2), 272-285.
- Bariola P.A., Retelska D., Stasiak A., Kammerer R.A., Fleming A., Hijri M., Frank S. y Farmer E.E. (2004). Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants. *Plant Mol Biol.*, **55**(4), 579-594.
- Batten J.S., Yoshinari S. y Hemenway C. (2003) Potato virus X: a model system for virus replication, movement and gene expression. *Molecular Plant Pathology*, **2**, 125-131.
- Baulcombe. (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, **32**, 79-88.
- Baumberger N., Tsai C.H., Lie M., Havecker E. y Baulcombe D.C. (2007). The P1-Protein Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Curr. Biol.*, **17**(18), 1609-1614.
- Bayne E.H., Rakitina D.V., Morozov S.Y. y Baulcombe D.C. (2005). Cell-to-cell movement of potato potyvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant Journal*, **44**(3), 471-482.

- Bazzini A.A., Manacorda C.A., Tohge T., Conti G., Rodriguez M.C., Nunes-Nesi A., Villanueva S., Fernie A.R., Carrari F. y Asurmendi S. (2011). Metabolic and miRNA profiling of TMV infected plants reveals biphasic temporal changes. *PLoS One.*, **6**(12), e28466.
- Beck D.L., Guilford P.J., Voot D.M., Anderson M.T. y Forster R.L.S. (1991). Triple gene block proteins of *White clover mosaic potexvirus* are required for transport. *Virology*, **183**, 695-702.
- Bendahmaney A., Farnham G., Moffett P. y Baulcombe D.C. (2002). Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site–leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *The Plant Journal*, **32**, 195–204.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. y Hannon G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Blevins T., Rajeswaran R., Shivaprasad P.V., Beknazariants D., Si-Ammour A., Park H.S., Vazquez F., Robertson D., Meins Jr. F., Hohn T. y Pooggin M.M. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6233–6246.
- Bollman K.M., Aukerman M.J., Park M.Y., Hunter C., Berardini T.Z. y Poethig R.S. (2003). HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development*, **130**(8), 1493-1504.
- Bortolamiol D., Pazhouhandeh M., Marrocco K., Genschik P. y Ziegler-Graff V. (2007). The Ploverovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr. Biol.*, **17**, 1615–1621.
- Bouche N., Laressergues D., Gascioli V. y Vaucheret H. (2006). An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J.*, **25**, 3347–3356.
- Bozarth C.S., Weiland J.J. y Dreher T.W. (1992). Expression of ORF-69 of turnip yellow mosaic virus is necessary for viral spread in plants. *Virology*, **187**(1), 124-130.
- Brandizzi F., Frangne N., Marc-Martin S., Hawes C., Neuhaus J.M. y Paris N. (2002). The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell*, **14**, 1077–1092.
- Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L. y Voinnet O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, **320**(5880), 1185-1190.
- Brown DA. (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 430-439.
- Buchon N. y Vaury C. (2006). RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity*, **96**, 195-202.
- 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 E.T., Sit T.L. y Lommel S.A. (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol.*, **39**, 419-60.
- Callis J. (1995). Regulation of Protein Degradation. *The Plant Cell*, **7**, 845-857.

- Camborde L., Planchais S., Tournier V., Jakubiec A., Drugeon G., Lacassagne E., Pflieger S., Chenon M. y Jupin I. (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates the accumulation of Turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase during viral infection. *Plant Cell*, **22**(9), 3142-52.
- Campo S., Manrique S., García-Martínez J. y San Segundo B. (2008). Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnol J.*, **6**, 585–608.
- Chang B.Y., Lin N.S., Liou D.Y., Chen J.P., Liou G.G. y Hsu Y.H. (1997). Subcellular localization of the 28 kDa protein of the triple-gene-block of bamboo mosaic potexvirus. *J Gen Virol.*, **78**(Pt 5), 1175-1179.
- Chapdelaine Y. y Hohn T. (1998). The cauliflower mosaic virus capsid protein: assembly and nucleic acid binding in vitro. *Virus Genes*, **17**(2), 139-150.
- Chapman S., Hills G., Watts J. y Baulcombe D. (1992). Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and pathogenicity. *Virology*, **191**, 223-230.
- Chen X. (2010). Small RNAs - secrets and surprises of the genome. *Plant J.*, **61**(6), 941-958.
- Chen H.M., Chen L.T., Patel K., Li Y.H., Baulcombe D.C y Wu S.H. (2010). 22-nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**:15269-15274.
- Chiu M.H., Chen I.H., Baulcombe D.C. y Tsai C.H. (2010). The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology*, **11**(5), 641-649.
- Citovsky V., Knorr D., Schuster G. y Zambryski P. (1990). The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell*, **60**(4), 637-647.
- Citovsky V., Knorr D. y Zambryski P. (1991). Gene I, a potential cell-to-cell movement locus of cauliflower mosaic virus, encodes an RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **88**(6), 2476-2480.
- Citovsky V., McLean B.G., Zupan J.R. y Zambryski P. (1993). Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev.*, **7**(5), 904-910.
- Citovsky V., Zaltsman A., Kozlovsky S.V., Gafni Y. y Krichevsky A. (2009). Proteasomal degradation in plant-pathogen interactions. *Semin Cell Dev Biol.*, **20**(9), 1048-1054.
- Coaker G.L., Willard B., Kinter M., Stockinger E.J. y Francis D.M. (2004). Proteomic analysis of resistance mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. *Mol Plant Microbe Interaction*, **17**, 1019–1028.
- Cowan G. H., Lioliopoulou F., Ziegler A. y Torrance L. (2002). Subcellular localisation, protein interactions, and RNA binding of Potato mop-top virus triple gene block proteins. *Virology*, **298**, 106-115.
- Craig A., Ewan R., Mesmar J., Gudipati V. y Sadanandom A. (2009). E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J Exp Bot.*, **60**(4), 1123-1132.
- Csorba T., Lozsa R., Hutvagner G. y Burgyan J. (2010). Ploverovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J.*, **62**, 463–472.
- Czech B. y Hannon G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet.*, **12**(1), 19-31.

- Dalmay T., Horsefield R., Braunstein T.H. and Baulcombe D.C. (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, **20**, 2069-2078.
- Davies C., Hills G. y Baulcombe D.C. (1993). Sub-cellular localization of the 25-kDa protein encoded in the triple gene block of potato virus X. *Virology*, **197**(1), 166-175.
- Dennis M.D., Person M.D. y Browning K.S. (2009). Phosphorylation of plant translation initiation factors by CK2 enhances the in vitro interaction of multifactor complex components. *J Biol Chem.*, **284**(31), 20615-20628.
- Dennis M.D. y Browning K.S. (2009). Differential phosphorylation of plant translation initiation factors by Arabidopsis thaliana CK2 holoenzymes. *J Biol Chem.*, **284**(31), 20602-20614.
- Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D.X., Khounloham M., Boucher C., Somssich I., Genin S. y Marco Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8024–8029.
- DeVries T.A., Neville M.C. y Reyland M.E. (2002). Nuclear import of PKCdelta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence. *EMBO J.*, **21**(22), 6050–6060.
- Diaz-Pendon J.A., Li F., Li W.X. y Ding S.W. (2007). Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell*, **19**, 2053–2063.
- Dielen A.S., Badaoui S., Candresse T. y German-Retana S. (2010). The ubiquitin/26S proteasome system in plant–pathogen interactions: A never-ending hide-and-see game. *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 293–308.
- Ding B., Haudenschild J.S., Hull R.J., Wolf S., Beachy R.N. y Lucas W.J. (1992). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, **4**(8), 915-928.
- Dobrowolska G., Meggio F., Szczegieliak 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.
- Dohmen R.J., Stappen R., McGrath J.P., Forrová H., Kolarov J., Goffeau A. y Varshavsky A. (1995). An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem.*, **270**(30), 18099-18109.
- Donaire L., Barajas D., Martínez-García B., Martínez-Priego L., Pagán I., Llave C. (2008). Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J Virol.*, **82**(11), 5167-5177.
- Doronin S.V. y Hemenway C. (1996). Synthesis of potato virus X RNAs by membrane-containing extracts. *J Virology*, **70**(7), 4795-4799.
- Dreher K. y Callis J. (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annals of Botany*, **99**(5), 787-822.
- Drugeon G. y Jupin I. (2002). Stability in vitro of the 69K movement protein of Turnip yellow mosaic virus is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. *J Gen Virol.*, **83**, 3187-3197.

- Dunoyer P., Himber C. y Voinnet O. (2005). DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics*, **37**(12), 1356-1360.
- Dunoyer P., Schott G., Himber C., Meyer D., Takeda A., Carrington J.C., Voinnet O. (2010). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, **328**, 912-916.
- Dunoyer P., Brosnan C.A., Schott G., Wang Y., Jay F., Alioua A., Himber C. y Voinnet O. (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J.*, **29**, 1699–1712.
- Ehlers K. y Kollmann R. (2001). Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin and functioning. *Protoplasma*, **216**, 1–30.
- Elbashir S.M, Lendeckel W. and Tuschl T. (2001). RNA interference is mediated 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, **15**(2), 188-200.
- Epel B. L. (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**, 1074-1081.
- Erhardt M., Stussi-Garaud C., Guilley H., Richards K.E., Jonard G. y Bouzoubaa S. (1999). The first triple gene block protein of peanut clump virus localizes to the plasmodesmata during virus infection. *Virology*, **264**(1), 220-229.
- Erhardt M., Morant M., Ritzenthaler C., Stussi-Garaud C., Guilley H., Richards K., Jonard G., Bouzoubaa S., y Gilmer D. (2000). P42 movement protein of *Beet necrotic yellow vein virus* is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Mol. Plant-Microbe Interaction*, **13**, 520-528.
- Erhardt M., Vetter G., Gilmer D., Bouzoubaa S., Richards K., Jonard G. y Guilley H. (2005). Subcellular localization of the Triple Gene Block movement proteins of Beet necrotic yellow vein virus by electron microscopy. *Virology*, **340**(1), 155-166.
- Espunya MC. and Martinez MC. (1997). Identification of two different molecular forms of Arabidopsis thaliana casein kinase II. *Plant Sci.* **124**, 131–42
- Eulalio A., Huntzinger E. y Izaurralde E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, **132**(1), 9-14.
- Farmer E.E., Pearce G. y Ryan C.A. (1989). In vitro phosphorylation of plant plasma membrane proteins in response to the proteinase inhibitor inducing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86**(5), 1539-1542.
- Fagard M., Boutet S., Morel J., Bellini C. y Vaucheret H. (2000). AGO1, QDE-2 and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11650–11654.
- Fairman-Williams M.E, Guenther U.P. y Jankowsky E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol.*, **20**(3), 313-324.
- Fedorkin O., Solovyev A., Yelina N., Zamyatnin A., Zinovkin R., Makinen K., Schiemann J. y Morozov SY. (2001). Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein. *J Gen Virol.*, **82**, 449-458.
- Fleming J.V. y Wang T. (2000). Amino- and Carboxy-Terminal PEST Domains Mediate Gastrin Stabilization of Rat I-Histidine Decarboxylase Isoforms. *Mol Cell Biol.*, **20**(13), 4932–4947.

- Forster R.L, Beck D.L, Guilford P.J, Voot D.M., Van Dolleweerd C.J. y Andersen M.T. (1992). The coat protein of white clover mosaic potyvirus has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. *Virology*, **191**(1), 480-484.
- Fridborg I., Grainger J., Page A., Coleman M., Findlay K. y Angell S. (2003). TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of *Potato virus X*. *Mol. Plant-Microbe Interaction*, **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.
- Gao G. y Luo H. (2006). The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Can J Physiol Pharmacol.*, **84**(1), 5-14.
- García-Alai M.M., Gallo M., Salame M., Wetzler D.E., McBride A.A., Paci M., Cicero D.O. y de Prat-Gay G. (2006). Molecular basis for phosphorylation-dependent, PEST-mediated protein turnover. *Structure*, **14**(2), 309-319.
- Garcia-Ruiz H., Takeda A., Chapman E.J., Sullivan C.M., Fahlgren N., Brempelis K.J. y Carrington J.C. (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell*, **22**(2), 481-496.
- Gillespie T., Boevink P., Haupt S., Roberts A.G., Toth R., Valentine T., Chapman S. y Oparka K.J. (2002). Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *Plant Cell*, **14**(6), 1207-1222.
- 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.
- Glickman M.H. y Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.*, **82**(2), 373-428.
- Gorbalenya A. E. y Koonin E. V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Cell Bio.*, **3**, 419-429.
- Goto K., Kobori T., Kosaka Y., Natsuaki T., y Masuta C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA binding abilities. *Plant Cell Physiol.*, **48**, 1050-1060.
- Haley A., Hunter T., Kiberstis P. y Zimmern D. (1995). Multiple serine phosphorylation sites on the 30 kDa TMV cell-to-cell movement protein synthesized in tobacco protoplasts. *Plant J.*, **8**(5), 715-724.
- Hamera S., Song X., Su L., Chen X. y Fang R. (2012). Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J.*, **69**(1), 104-115.
- Hamilton A.J. y Baulcombe D.C. (1999). A novel species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **286**, 950-952.
- Hamilton A.J., Voinnet O., Chappel L. y Baulcombe D.C. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO Journal*, **21**(17), 4671-4679.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**(4), 557-580.
- Hansen C.G. y Nichols B.J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biology*, **20**(4), 177-186.

- Harries P.A., Park J.W., Sasaki N., Ballard K.D., Maule A.J. y Nelson R.S. (2009). Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**(41), 17594-17599.
- Harvey J.J., Lewsey M.G., Patel K., Westwood J., Heimstadt S., Carr J.P. y Baulcombe D.C. (2011). An Antiviral Defense Role of AGO2 in Plants. *PLoS One*, **6**, e14639.
- Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C. y Hodge S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2122–2127.
- Haupt S., Cowan G. H., Ziegler A., Roberts A. G., Oparka K. J. y Torrance L. (2005). Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell*, **17**, 164-181.
- Havecker E.R., Wallbridge L.M., Hardcastle T.J., Bush M.S., Kelly K.A., Dunn R.M., Schwach F., Doonan J.H. y Baulcombe D.C. (2010). The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell*, **22**(2), 321-334.
- Havelda Z., Várallyay E., Válóczy A. y Burgyán J. (2008). Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *Plant Journal*, **55**, 278–288.
- Hidalgo P., Garreto V., Berríos CG., Ojeda H., Jordana X. y 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.
- Humber C., Dunoyer P., Moissiard G., Ritzenthaler C. y Voinnet O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO Journal*, **22**(17), 4523-4533.
- Howard A. R., Heppler M. L., Ju H. J., Krishnamurthy K., Payton M. E. y Verchot-Lubicz J. (2004). Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology*, **328**, 185-197.
- Howitt R.L., Beever R.E., Pearson M.N. y Forster R.L. (2001). Genome characterization of Botrytis virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant 'potex-like' viruses. *Journal of General Virology*, **82**(Pt 1), 67-78.
- Hsu T.H., Chou Y.L., Tseng Y.H., Lin Y. H., Lin T., Lin N.S., Hsu Y.H. Chang B.Y. (2008). Topological properties of the triple gene block protein 2 of Bamboo mosaic virus. *Virology*, **379**(1), 1-9.
- Hunter T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell.*, **28**(5), 730-738.
- Isaacson M.K. y Ploegh H.L. (2009). Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection. *Cell Host Microbe.*, **5**(6), 559-570.
- ICTVdB Management. 2011. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. Ed), Columbia University, New York, USA [<http://ictvonline.org/>].
- Ivanov K.I., Puustinen P., Grabenaite R., Vihinen H., Rönstrand L., Valmu L., Kalkkinen N. y Mäkinen K. (2003). Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell*, **15**, 2124-2139.
- Jackson A. O., Lim H. S., Bragg J., Ganesan U. y Lee M. Y. (2009). Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**, 385-422.

- Jadhav T. y Wooten M.W. (2009). Defining an Embedded Code for Protein Ubiquitination. *J Proteomics Bioinform.*, **24**, 316.
- Jankowsky E. y Fairman ME. (2007). RNA helicases – one fold for many functions. *Curr Op Struct Biol*, **17**, 316-324.
- Jakubiec A., Tournier V., Drugeon G., Pflieger S., Camborde L. Vinh J., Hericourt F., Redeker V. y Jupin I. (2006). Phosphorylation of viral RNA-dependent RNA polymerase and its role in replication of a plus-strand RNA virus. *J. Biol. Chem.*, **281**, 21236–21249.
- Jarsch I.K. y Ott T. (2011). Perspectives on remorin proteins, membrane rafts, and their role during plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact*, **24**(1), 7-12.
- Jaubert M., Bhattacharjee S., Mello A.F., Perry K.L. y Moffett P. (2011). ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against Potato virus X in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **156**(3), 1556-1564.
- Johnson LN. 1993. The effects of phosphorylation on the structures and function of proteins. *Annu Rev Biochem Biomol Struct*, **22**, 199-232.
- Ju H. J., Samuels T. D., Wang Y. S. Blancaflor E., Payton M., Mitra R., Krishnamurthy K., Nelson R. S. y 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.
- Ju H. J., Brown J. E., Ye C. M. y Verchot-Lubicz, J. (2007). Mutations in the central domain of *Potato virus X* TGBp2 eliminate granular vesicles and virus cell-to-cell trafficking. *J. Virology*, **81**, 1899-1911.
- Ju H. J., Ye C. M. y Verchot-Lubicz J. (2008). Mutational analysis of *Potato virus X* TGBp3 links subcellular accumulation to protein turnover during virus infection. *Virology*, **375**, 103-117.
- Kadaré G. y Haenni A. L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*, **71**, 2583- 2509.
- Kalinina N.O., Rakitina D.V., Solovyev A.G., Schiemann J. y 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.
- Kamiri M., De Meyer B. y Wilson P. (2005). Modular cloning and expression of tagged fluorescent protein in plant cells. *Trends in Plant Sciences*, **10**(3), 103-105.
- Kang HG y Klessig DF. (2005). Salicylic acid-inducible Arabidopsis CK2-like activity phosphorylates TGA2. *Plant Mol Biol.*, **57**, 541-57.
- Karger E.M., Frolova O.Y., Fedorova N.V., Baratova L.A., Ovchinnikova T.V., Susi P., Makinen K., Ronnstrand L., Dorokhov Y.L. y Atabekov J.G. (2003) Dysfunctionality of a tobacco mosaic virus movement protein mutant mimicking threonine 104 phosphorylation. *J. Gen. Virol.*, **84**, 727–732.
- Karsies A., Hohn T. y Leclerc D. (2001). Degradation signals within both terminal domains of the cauliflower mosaic virus capsid protein precursor. *Plant Journal*, **27**(4), 335-343.
- Karimi M., Inze D. y Depicker A. (2002). Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Science*, **5**, 193-195.
- Karpova O.V., Rodionova N.P., Ivanov K.I., Kozlovsky S.V., Dorokhov Y.L. y Atabekov J.G. (1999). Phosphorylation of tobacco mosaic virus movement protein abolishes its translation repressing ability. *Virology*, **261**(1), 20-24.

- Karsies A., Hohn T. y Leclerc D. (2011). Degradation signals within both terminal domains of the cauliflower mosaic virus capsid protein precursor. *Plant Journal*, **27**(4), 335-343.
- Kasschau K.D. y Carrington J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **95**(4), 461-470.
- Kawakami S., Padgett H.S., Hosokawa D., Okada Y., Beachy R.N. y 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. *Journal of Virology*, **73**(8), 6831-6840.
- Kim K. H. y Hemenway C. (1996). The 59 nontranslated region of potato virus X RNA affects both genomic and subgenomic RNA synthesis. *Journal of Virology*, **70**, 5533-5540.
- Kim S.H., Palukaitis P. y Park, Y.I. (2002) Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *EMBO J.*, **21**, 2292-2300.
- Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Karpova O.V., Rodionova N.P., Kozlovsky S.V., Arkhipenko M.V. y Atabekov J.G. (2003). AFM study of potato virus X disassembly induced by movement protein. *Journal of Molecular Biology*, **332**(2), 321-325.
- Kleinow T., Nischang M., Beck A., Kratzer U., Tanwir F., Preiss W., Kepp G. y Holger J. (2009). Three C-terminal phosphorylation sites in the Abutilon mosaic virus movement protein affect symptom development and viral DNA accumulation. *Virology*, **390**, 89-101.
- Korolev S., Hsieh J., Gauss G. H., Lohman T. M. y 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.
- Kreuze J. F., Savenkov E. I., Cuellar W., Li X. y Valkonen J. P. T. (2005). Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *Journal of Virology*, **79**, 7227-7238.
- Krishnamurthy K., Heppler M., Mitra R., Blancaflor E., Payton M.E., Nelson R.S. y 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.
- Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E.J., Carrington J.C., Liu Y.P., Dolja V.V., Calvino L.F., Lopez-Moya J.J. y Burgyan J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO Journal*, **25**(12), 2768-2780.
- Lakatos L., Szittyá G., Silhavy D. y Burgyan J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO Journal*, **23**(4), 876-884.
- Laliberté J.F. y Sanfaçon H. (2010). Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu Rev Phytopathology*, **48**, 69-91.
- Laliberte J.P., McGinnes L.W., Peeples M.E. y Morrison T.G. (2006). Integrity of membrane lipid rafts is necessary for the ordered assembly and release of infectious Newcastle disease virus particles. *J Virology.*, **80**(21), 10652-10662.
- Lanet E., Delannoy E., Sormani R., Floris M., Brodersen P., Crété P., Voinnet O. y Robaglia C. (2009). Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs. *Plant Cell*, **21**(6), 1762-1768.
- Lawrence D.M. y Jackson A.O. (2001). Interactions of the TGB1 protein during cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus. *J Virology*, **75**, 8712-8723.

- Lee J.Y. y Lucas W.J. (2001). Phosphorylation of viral movement proteins--regulation of cell-to-cell trafficking. *Trends Microbiology*, **9**(1), 5-8.
- Lee S.C., Wu C.H. y Wang, C.W. (2010). Traffic of a viral movement protein complex to the highly curved tubules of the cortical endoplasmic reticulum. *Traffic*, **11**, 912-930.
- Lee J.Y., Taoka K., Yoo B.C., Ben-Nissan G., Kim D.J. y Lucas W.J. (2005). Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and Arabidopsis recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell*, **17**(10), 2817-2831.
- Lefebvre B., Timmers T., Mbengue M., Moreau S., Hervé C., Tóth K., Bittencourt-Silvestre J., Klaus D., Deslandes L., Godiard L., Murray J.D., Udvardi M.K., Raffaele S., Mongrand S., Cullimore J., Gamas P., Niebel A. y Ott T. (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **107**(5), 2343-2348.
- Leshchiner A. D., Solovyev A. G., Morozov S. Yu., y Kalinina N. O. (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.
- Leshchiner A.D., Minina E.A., Rakitina D.V., Vishnichenko V.K., Solovyev A.G., Morozov S.Y. y Kalinina N.O. (2008). Oligomerization of the potato virus X 25-kD movement protein. *Biochemistry (Mosc)*, **73**(1), 50-55.
- Lin R, Beauparlant P, Makris C, Meloche S y Hiscott J. (1996). Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Molecular Cell Biol*, **16**(4), 1401-1409.
- Li J., Yang Z., Yu B., Liu J. y Chen X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biology*, **15**(16), 1501-1507.
- Lindbo J.A., Silva-Rosales L., Proebsting W.M. y Dougherty W.G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell*, **5**(12), 1749-1759.
- Link K., Vogel F. y Sonnewald U. (2011). PD trafficking of Potato leaf roll virus movement protein in Arabidopsis depends on site-specific protein phosphorylation. *Front. Plant Sci.*, **2**, 18-28.
- Liu J., Carmell M.A., Rivas F.V., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L. y Hannon G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1409-1410.
- Llave C., Kasschau K.D., Rector M.A. y Carrington J.C. (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, **14**, 1605-1619.
- Llave C. (2010). Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.*, **15**(12), 701-707.
- Longstaff M., Brigneti G. Boccard F., Chapman S. y Baulcombe D. (1993). Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO J*, **12**(2), 379-386.
- Lough T.J., Netzler N.E., Emerson S.J., Sutherland P., Carr F., Beck D.L., Lucas W.J. y 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. y 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 T., Emerson S.J., Lucas W.J. y Forster R.L.S. (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.
- Lózsza R., Csorba T., Lakatos L. y Burgyán J. (2008). Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing suppressor proteins. *Nucleic Acids Res.*, **36**(12), 4099-4107.
- Lucy A.P., Guo H.S., Li W.X. y Ding S.W. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.*, **19**(7), 1672-1680.
- Mackintosh S.G. y Raney K.D. (2006). DNA unwinding and protein displacement by superfamily 1 and superfamily 2 helicases. *Nuc Acid Res.*, **34**, 4145-4159.
- Makeyev E.V. y Bamford D.H. (2001). Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Molecular Cell*, **10**(6), 1417-1427.
- Makarov V., Rybakova E., Efimov A., Dobrov E., Serebryakova M., Solovyev A., Yaminsky I., Taliansky M., Morozov S. y Kalinina N. (2009). Domain organization of the N-terminal portion of hordeivirus movement protein TGBp1. *J. Gen. Virol*, **90**, 3022-3032.
- Mallory A.C., Reinhart B.J., Bartel D., Vance V.B. y Bowman L.H. (2002). A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(23), 15228-15233.
- Mallory A.C. y Vaucheret H. (2009). ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO*, **10**(5), 521-526.
- Mallory A. y Vaucheret H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell*, **22**(12), 3879-3889.
- Mañes S., del Real G., Lacalle R.A., Lucas P., Gómez-Moutón C., Sánchez-Palomino S., Delgado R., Alcamí J., Mira E. y Martínez C. (2000). Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO*, **1**(2), 190-196.
- Martelli G.P., Adams M.J., Kreuze J.F. y Dolja V.V. (2007). Family Flexiviridae: A case study in virion and genome plasticity. *Annu Rev Phytopathol*, **45**, 73-100.
- Martinez L.O., Agerholm-Larsen B., Wang N., Chen W. y Tall A.R. (2003). Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J Biol Chem*, **278**(39), 37368-37374.
- Matsushita Y., Yoshioka K., Shigyo T., Takahashi H. y Nyunoy H. (2002). Phosphorylation of the movement protein of cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Virus Genes*, **24**(3), 231-234.
- McGeachy K.D y Barker H. (2000). Potato mop-top virus RNA can move long distance in the absence of coat protein: evidence from resistant, transgenic plants. *Mol Plant Microbe Interact.*, **13**(1), 125-128.
- Melnyk C.W., Molnar A., Bassett A. y Baulcombe D.C. (2011). Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of Arabidopsis thaliana. *Curr Biology*, 2011 Oct **21**(19), 1678-1683. (a)

- Melnyk C.W., Molnar A., Baulcombe D.C. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.*, **30**(17), 3553-3563. (b)
- Milne RG. (1988). The Plant Viruses. Vol. 4: The Filamentous Plant Viruses. New York: Plenum. 423 pp.
- Mitra R., Krishnamurthy K., Blancaflor E., Payton M., Nelson R.S. y 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**(1), 35-48.
- Módena N. A., Zelada A. M., Conte F. y Mentaberry, A. (2008). Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of *Potato virus X* by a *Nicotiana tabacum* CK2-like activity. *Virus Res.* **137**, 16-23.
- Módena N.A. (2011). Estudios sobre la fosforilación de la proteína de movimiento TGBp1 del *Potato Virus X*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Molnar A., Melnyk C. y Baulcombe D.C. (2011). Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biol.*, **12**(1), 215.
- Mongrand S., Stanislas T., Bayer E.M., Lherminier J. y Simon-Plas F. (2010). Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci.*, **15**(12), 656-663.
- Morel J.B., Gordon C., Mourrain P., Beclin C., Boutet S., Feuerbach F., Proux F. y Vaucheret H. (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, **14**, 629–639.
- Morozov S., Miroshnichenko N.A., Solovyev A.G., Fedorkin O.N., Zelenina D.A., Lukasheva L.I., Karasev A.V., Dolja V.V. y Atabekov J.G. (1991). Expression strategy of the potato virus X triple gene block. *Journal of General Virology*, **72**, 2039 - 2042.
- Morozov S., Fedorkin O.N., Jüttner G., Schiemann J., Baulcombe D.C. y 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**(8), 2077-2083.
- Morozov S.Y., Solovyev A.G., Kalinina N.O., Fedorkin O.N., Samuilova O.V., Schiemann J. y Atabekov J.G. (1999) Evidence for two nonoverlapping functional domains in the potato virus X 25K movement protein. *Virology*, **260**, **1**, 55-63.
- Morozov S.Y. y Solovyev A.G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology*, **84**, 1351-1366.
- Mukhamedzhanova A., Smirnov A., Arkhipenko M., Ivanov P., Chirkov S., Rodionova N., Karpova O. y Atabekov J. (2011). Characterization of *Alternanthera mosaic virus* and its Coat Protein. *The Open Virology Journal*, **5**, 136-140.
- Ono A, y Freed E.O. (2005). Role of lipid rafts in virus replication. *Adv Virus Res*, **64**, 311-58.
- Oparka K.J., Roberts A.G., Roberts I.M., Prior D.A.M. y 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.
- Oparka K.J., Roberts A.G., Boevink P., Santa Cruz S., Roberts I., Pradel K.S., Imlau A., Kotlizky G., Sauer N. y Epel B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell*, **97**(6), 743-754.

- Orman B.E., Celnik R.M., Mandel A.M, Torres H.N., y Mentaberry A.N. (1990). Complete cDNA sequence of a South American isolate of potato virus X. *Virus Research*, **16**, 293-306.
- Overall R.L. y Blackman L.M. (1996). A model of the macro-molecular structure of plasmodesmata. *Trends Plant Sci.*, **1**, 307–311.
- Price M. (1993). Multipartite Nature of Potato Virus X. *Journal of Virology*, **67**, 596-600.
- Palauqui J.C., Elmayan T., Pollien J.M. y Vaucheret H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO Journal*, **16**, 4738-4745.
- Palmer E. y Freeman T. (2004). Investigation Into the use of C- and N-terminal GFP Fusion Proteins for Subcellular Localization Studies Using Reverse Transfection Microarrays. *Comp Funct Genomics*, **5**(4), 342–353.
- Park H.J., Ding L., Dai M., Lin R. y Wang H. (2008). Multisite phosphorylation of Arabidopsis HFR1 by casein kinase II and a plausible role in regulating its degradation rate. *J Biol Chem.*, **283**(34), 23264-23273.
- Parthiban V., Gromiha M.M y Schomburg D. (2006). CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Research*, **34**, 239-242.
- Pawson T. y Scott JD. (2005). Protein phosphorylation in signaling 50 years and counting. *Trends Biochem Sci.*, **30**, 286-290.
- Pazhouhandeh M., Dieterle M., Marrocco K., Lechner E., Berry B., Brault V., Hemmer O., Kretsch T., Richards K.E., Genschik P y Ziegler-Graff V. (2006). F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103**(6), 1994-1999.
- Pruss G., Ge X., Shi X.M., Carrington J.C. y Bowman Vance V. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, **9**(6), 859-868.
- Qi X., Bao F.S. y Xie Z. (2009). Small RNA deep sequencing reveals role for Arabidopsis thaliana RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS One*, **4**(3), e4971.
- Qiu W., Park J.W. y Scholthof H.B. (2002). Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Molecular Plant Microbe Interaction*, **15**(3), 269-280.
- Qu F. y Morris T.J. (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Molecular Plant Microbe Interaction*, **15**(3), 193-202.
- Qu F., Ye X. y Morris T.J. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105**(38), 14732-14737.
- Raffaele S., Mongrand S., Gamas P., Niebel A., Ott T. (2007). Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: evolutionary and functional perspective. *Plant Physiol.*, **145**(3), 593-600.
- Raffaele S., Bayer E., Lafarge D., Cluzet S., German Retana S., Boubekeur T., Leborgne-Castel N., Carde J.P., Lherminier J., Noirot E., Satiat-Jeunemaître B., Laroche-Traineau J., Moreau P., Ott T., Maule A.J., Reymond P., Simon-Plas F., Farmer E.E., Bessoule J.J. y Mongrand S. (2009). Remorin, a

- solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell*, **21**, 1541-1555.
- Rajendran L. y Simons K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science*, **118**(6), 1099-1102.
 - Rashid F., Khalid S., Ahmad I. y Mughal S.M. (1989). Potato virus X (PVX) resistance in tomato cultivars. *Tropical Pest Management*, **35**(4), 357-358.
 - Ravid T. y Hochstrasser M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **9**(9), 679-690.
 - Rebelo A.R., Niewiadomski S., Prosser S.W., Krell P. y Meng B (2008). Subcellular localization of the triple gene block proteins encoded by a Foveavirus infecting grapevines. *Virus Res.*, **138**(1-2), 57-69.
 - Rechsteiner M. (1990). PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin Cell Biol.*, **1**(6), 433-440.
 - Rechsteiner M. (1991). Natural substrates of the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell*, **66**(4), 615-618.
 - Rechsteiner M. y Rogers S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Science*, **21**, 267–271.
 - Reichel C. y Beachy R.N. (1998). Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**(19), 11169-11174.
 - Reichel C. y Beachy R.N. (2000). Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J Virol.*, **74**(7), 3330-3337.
 - Reymond P., Kunz B., Paul-Pletzer K., Grimm R., Eckerskorn C. y Farmer E.E. (1996). Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant Cell.*, **8**(12), 2265-2276.
 - Riera M., Peracchia G. y 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.
 - Rietz S. y Parker J. E. (2007). Plant Disease and Defence. In: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [DOI: 10.1002/9780470015902.a.0004036]
 - Rocco M., Corrado G., Arena S., D'Ambrosio C., Tortiglione C., Sellaroli S., Marra M., Rao R. y Scaloni A. (2008). The expression of tomato prosystemin gene in tobacco plants highly affects host proteomic repertoire. *J Proteomics*, **71**, 176–185.
 - Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V. y Atabekov JG. (2003).
 - Rogers S., Wells R. y Rechsteiner M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**(4774), 364-368.
 - Rouleau M., Smith R.J., Bancroft J.B. y Mackie G.A. (1994). Purification, properties, and subcellular localization of foxtail mosaic potexvirus 26-kDa protein. *Virology*, **204**, 254–265.

- Ruiz-Ferrer V. y Voinnet O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol.*, **60**, 485-510.
- Ruiz M.T., Voinnet O. y Baulcombe D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, **10**(6), 937-946.
- 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.
- Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory manual, 2nd edition. Ed: Nolan, C. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuel B.U, Mohandas N., Harrison T., McManus H., Rosse W., Reid M. y Haldar K (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyterfts in regulating raft protein content and malarial infection. *J Biol Chem.*, **276**(31), 29319-29329.
- Samuels T.D., Ju H.J., Ye C.M., Motes C.M., Blancaflor E.B. y Verchot-Lubicz J. (2007). Subcellular targeting and interactions among the Potato virus X TGB proteins. *Virology*, **367**(2), 375-389.
- Santa Cruz S., Chapman S., Roberts A.G., Roberts I.M., Prior D.A. y Oparka K.J. (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *PNAS*, **93**, 6286-6290.
- Santa Cruz S., Roberts A.G., Prior D.A.M., Chapman S. y Oparka K.J. (1998). Cell to Cell and Phloem-Mediated Transport of *Potato Virus X*: The Role of Virions. *Plant Cell*, **10**, 495–510.
- Schauer S.E., Jacobsen S.E., Meinke D.W. y Ray A. (2003). DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends in Plant Science*, **7**(11), 487-491.
- Shemyakina E.A., Solovyev A.G., Leonova O.G., Popenko V.I., Schiemann J. y Morozov S.Y. (2011). The Role of Microtubule Association in Plasmodesmal Targeting of Potato mop-top virus Movement Protein TGBp1. *Open Virol J.*, **5**, 1-11.
- Schepetilnikov M.V., Manske U., Solovyev A.G., Zamyatnin A.A. Jr., Schiemann J. y Morozov S.Y. (2005). The hydrophobic segment of *Potato virus X* TGBp3 is a major determinant of the protein intracellular trafficking. *J. Gen. Virol.* **86**, 2379-2391.
- Schob H., Kunz C. y Meins F. Jr. (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Molecular and General Genetics*, **256**(5), 581-585.
- Schoelz J.E., Harries P.A. y Nelson R.S. (2011). Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Molecular Plant*, **4**(5), 813-831.
- Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C. y Foster G.D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, **12**(9), 938-954.
- Scholthof H.B., Alvarado V.Y., Vega-Arreguin J.C., Ciomperlik J., Odokonyero D., Brosseau C., Jaubert M., Zamora A. y Moffett P. (2011). Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*, **156**(3), 1548-1555.
- Schwach F., Vaistij F.E., Jones L. y Baulcombe D.C. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.*, **138**, 1842–1852.

- Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N. y Zamore P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.*, **115**(2), 199-208.
- Semashko M.A., Rakitina D.V., González I., Canto T., Kalinina N.O. y Taliansky ME. (2012). Movement protein of hordeivirus interacts in vitro and in vivo with coilin, a major structural protein of Cajal bodies. *Dokl Biochem Biophys.*, **442**, 57-60.
- Senshu H., Ozeki J., Komatsu K., Hashimoto M., Hatada K., Aoyama M., Kagiwada S., Yamaji Y. y Namba S. (2009). Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *Journal of General Virology*, **4**, 1014-1024.
- Séron K., Bernasconi L., Allet B. y Haenni A.L. (1996). Expression of the 69K movement protein of turnip yellow mosaic virus in insect cells. *Virology*, **219**(1), 274-278.
- Shimura H. y Pantaleo V. (2011). Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochim Biophys Acta*, **1809**(11-12), 601-612.
- Siejn T. y Kooter J.M. (2000). Post-Transcriptional Gene-Silencing: RNAs on The Attack Or On The Defense?. *Bioassays*, **22**, 520-531.
- Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittyá G., Hornyik C., Tavazza M. y Burgyan J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal*, **21**(12), 3070-3080.
- Smith K.M. (1931). Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group as revealed by the use of plant indicator. *Proc. R. Soc. Lond.*, **109**, 251-226.
- Sokolova M., Pruffer D., Tacke E. y Rohde W. (1997). The Potato leaf roll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Letters*, **400**, 201-205.
- Song J.J., Liu J., Tolia N.H., Schneiderman J., Smith S.K., Martienssen R.A., Hannon G.J. y Joshua-Tor L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structural Biology*, **10**(12), 1026-1032.
- Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J. y Joshua-Tor L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**, 1434-1437.
- Sonenberg N., Shatkin A.J., Ricciardi R.P., Rubin M. y Goodman R.M (1978). Analysis of terminal structures of RNA from potato virus X. *Nucleic Acids Res.*, **5**(7), 2501-2512.
- Spallek T., Robatzek S. y Gohre V. (2009). How microbes utilize host ubiquitination. *Cell. Microbiol.*, **11**, 1425-1434.
- Subramanya H. S., Bird L. E., Brannigan J. A. y Wigley D. B. (1996). Crystal structure of a Dexe box DNA helicase. *Nature*, **384**, 379-383.
- Sullivan J.A, Shirasu K. y Deng X.W. (2003). The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat Rev Genet.*, **4**(12), 948-958.
- Takeda A., Iwasaki S., Watanabe T., Utsumi M. y Watanabe Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol*, **49**, 493-500.

- Takizawa M., Goto A. y Watanabe Y (2005). The tobacco ubiquitin-activating enzymes NtE1A and NtE1B are induced by tobacco mosaic virus, wounding and stress hormones. *Mol Cells.*, **19**(2), 228-31.
- Tamai A. y 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 Interaction*, **4**, 1158-1167.
- Temprana S. (2010). La proteína supresora del silenciamiento génico postranscripcional TGBp1 del *Potato virus X* interfiere con la biogénesis de microRNAs. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires.
- Tilsner J., Linnik O., Christensen N. M., Bell K., Roberts I. M., Lacomme C. y Oparka K. J. (2009). Live-cell imaging of viral RNA genomes using a Pumilio-based reporter. *Plant J.* **57**, 758-770.
- Tilsner J., Amari K. y Torrance L. (2010). Plasmodesmata viewed as specialised membrane adhesion sites. *Protoplasma*, **248**(1), 39-60.
- Tilsner J., Linnik O., Wright K.M., Bell K., Roberts A.G., Lacomme C., Santa Cruz S., y Oparka K.J. (2012). The TGB1 movement protein of Potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. *Plant Physiol.*, **158**(3), 1359-1370.
- Tornavaca O., Sarró E., Pascual G., Bardaji B., Montero M.A., Salcedo M.T., Plana M., López-Hellin J., Itarte E. y Meseguer A. (2011). KAP degradation by calpain is associated with CK2 phosphorylation and provides a novel mechanism for cyclosporine A-induced proximal tubule injury. *PLoS One*, **6**(9), e25746.
- Tremblay M.H., Majeau N., Gagné M.E., Lecours K., Morin H., Duvignaud J.B., Bolduc M., Chouinard N., Paré C., Gagné S. y Leclerc D. (2006). Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *FEBS J*, **273**(1), 14-25.
- Trujillo M. y Shirasu K. (2010). Ubiquitination in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**, 1-7.
- Trutnyeva K., Bachmaier R. y Waigmann E. (2005). Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus movement protein. *Virology*, **332**(2), 563-577.
- Ueki S., Spektor R., Natale D.M. y Citovsky V. (2010). ANK, a host cytoplasmic receptor for the tobacco mosaic virus cell to cell movement protein, facilitates intercellular transport through plasmodesmata. *PLoS Path.*, **6**, e1001201. doi:10.1371.
- Vaistij F.E. y Jones L. (2009). Compromised virus-induced gene silencing in RDR6-deficient plants. *Plant Physiol.*, **149**, 1399-1407.
- Vanitharani R., Chellappan P. y Fauquet C.M. (2005). Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Sci.*, **10**(3), 144-151.
- Várallyay E., Válóczy A., Agyi A., Burgyán J. y Havelda Z. (2010). Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation *EMBO Journal*, **29**(20), 3507-3519.
- Vaucheret H., Vazquez F., Crété P. y Bartel D.P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Development*, **18**(10), 1187-1197.

- Vaucheret H., Mallory A.C y Bartel D.P. (2006). AGO1 Homeostasis Entails Coexpression of MIR168 and AGO1 and Preferential Stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular Cell*, **22**, 129–136.
- Vazquez F., Legrand S. y Windels D. (2010). The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends Plant Sci.*, **15**(6), 337-345.
- Verchot J., Angell S. M. y Baulcombe D. C. (1998). In Vivo Translation of the Triple Gene Block of Potato Virus X Requires Two Subgenomic mRNAs. *Journal of Virology*, **72**, 8316-8320.
- Verchot-Lubicz J. (2005). A New Cell-to-Cell Transport Model for Potexvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 283-290.
- Verchot-Lubicz J., Ye C.M. y Bamunusinghe D. (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, **88**, 1643-1655.
- Verchot-Lubicz J., Torrance L., Solovyev AG., Morozov SY., Jackson AO. y Gilmer D. (2010). Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. *Mol Plant Microbe Interact*, **23**, 1231-1247.
- Vierstra R.D. (1996). Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*, **32**(1-2), 275-302.
- Vierstra R.D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **10**(6), 385-397.
- Vijayapalani P., Chen J.C., Liou M.R., Chen H.C., Hsu Y.H. y Lin N.S. (2012). Phosphorylation of bamboo mosaic virus satellite RNA (satBaMV)-encoded protein P20 downregulates the formation of satBaMV-P20 ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.*, **40**(2), 638-649.
- Vogel F., Hofius D. y Sonnewald U. (2007). Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic Arabidopsis. *Traffic*, **8**(9), 1205-1214.
- Voinnet O. (2008). Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr Opin Plant Biol.*, **11**(4), 464-470.
- Voinnet O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, **136**, 669-687.
- Voinnet O. y Baulcombe D.C. (1997). Systemic signaling in gene silencing. *Nature*, **389**, 854.
- Voinnet O., Lederer C. y Baulcombe D.C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, **10**, 157-167.
- Voinnet O., Pinto Y.M. y Baulcombe D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(24), 14147-14152.
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P. y Baulcombe D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, **33**, 949–956.
- Voinnet O., Pinto Y.M. y Baulcombe D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (24), 14147-14152.
- Waigmann E., Chen M.H., Bachmaier R., Ghoshroy S. y Citovsky V. (2000). Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J.*, **19**(18), 4875-4884.

- Waigmann E., Ueki S., Trutnyeva K. y 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.
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J. y Gay N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal*, **1**, 945-51.
- Wang Y., Tzfira T., Gaba V., Citovsky V., Palukaitis P. y Gal-On A. (2004). Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein: pathogenicity and nuclear localization. *J Gen Virol.*, **85**(10), 3135-3147.
- Wang X.B., Wu Q., Ito T., Cillo F., Li W.X., Chen X., Yu J.L. y Ding S.W. (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **107**(1), 484-489.
- Wassenegger M. y Krczal G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.*, **11**(3), 142-151.
- Widjaja I., Naumann K., Roth U., Wolf N., Mackey D., Dangl J.L., Scheel D. y Lee J. (2009). Combining subproteome enrichment and Rubisco depletion enables identification of low abundance proteins differentially regulated during plant defense. *Proteomics*, **9**, 138-147.
- Wilson TM. (1984). Cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus in vitro. *Virology*, **137**(2), 255-265.
- Wroblewski T., Tomczak A. y Michelmore R. (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, **3**, 259-273.
- Wung C.H., Hsu Y.H., Liou D.Y., Huang W.C., Lin N.S. y Chang B.Y. (1999). Identification of the RNA-binding sites of the triple gene block protein 1 of bamboo mosaic potexvirus. *Journal of General Virology*, **80**, 1119-26.
- Xie Z., Allen E., Fahlgren N., Calamar A., Givan S.A. y Carrington J.C. (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol.*, **138**, 2145-2154.
- Xie Z., Johansen L.K., Gustafson A.M., Kasschau K.D., Lellis A.D., Zilberman D., Jacobsen S.E. y Carrington J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, **2**(5), 642-652.
- Xu C., Kim N.G. y Gumbiner B.M. (2009). Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle*, **8**(24), 4032-4039.
- Yang Y., Ding B., Baulcombe D. C., y Verchot J. (2000). Cell-to-cell movement of the 25K protein of Potato virus X is regulated by three other viral proteins. *Molecular Plant-Microbe Interacion*, **13**, 599-605.
- Yu D., Fan B., MacFarlane S.A. y Chen Z. (2003). Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **16**(3), 206-16.
- Zamyatnin A.A., Solovyev A.G., Savenkov E.I., Germundsson A., Sandgren, M., Valkonen J.P.T. y 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.

- Zhang X., Yuan Y.R., Pei Y., Lin S.S., Tuschl T., Patel D.J. y Chua N.H. (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.*, **20**(23), 3255-3268.
- Zayakina O., Arkhipenko M., Kozlovsky S., Nikitin N., Smirnov A., Susi P., Rodionova N., Karpova O. y Atabekov J. (2008). Mutagenic analysis of potato virus X movement protein (TGBp1) and the coat protein (CP): in vitro TGBp1-CP binding and viral RNA translation activation. *Mol Plant Pathol.*, **9**(1), 37-44.
- Zelada A.M., Calamante G., de la Paz Santangelo M., Bigi F., Verna F., Mentaberry A. y Cataldi A. (2006). Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector. *Tuberculosis*, **86**, 263-267.
- Zeng L.R., Vega-Sánchez M.E., Zhu T. y Wang G.L. (2006). Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Research*, **16**(5), 413-426.