

Tesis Doctoral

Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre plantas y el virus de Mal de Río Cuarto (MRCV)

Llauger, Gabriela

2015

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:

Llauger, Gabriela. (2015). Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre plantas y el virus de Mal de Río Cuarto (MRCV). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5767_Llauger

Cita tipo Chicago:

Llauger, Gabriela. "Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre plantas y el virus de Mal de Río Cuarto (MRCV)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5767_Llauger

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de la interacción hospedante- patógeno entre plantas y el virus de Mal de Río Cuarto (MRCV)

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

Lic. Gabriela Llauger

Directora de Tesis: Dra. Mariana del Vas

Consejero de Estudios: Dr. Horacio Esteban Hopp

Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y
Agrícolas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Castelar).

Abril 2015

Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre plantas y el virus de Mal de Río Cuarto (MRCV)

Resumen

El virus del Mal de Río Cuarto (MRCV, *Fijivirus*, *Reoviridae*) causa la principal enfermedad del maíz en nuestro país provocando grandes pérdidas económicas. El virus es transmitido por chicharritas de la familia *Delphacidae* e infecta además diversas gramíneas como trigo, cebada, avena y sorgo, dando lugar a síntomas severos. El genoma del MRCV está formado por diez segmentos de ARN doble cadena (ARNdc) que codifican para trece proteínas. Durante el ciclo de infección, el MRCV replica en cuerpos de inclusión citoplasmáticos virales denominados viroplasma, y nuestro grupo demostró que están compuestos principalmente por la proteína no estructural P9-1 (Maroniche, 2011). Para otros reovirus se ha demostrado que los viroplasma contienen además ARN viral y proteínas virales minoritarias junto con componentes celulares del hospedante.

Con el fin de avanzar en la comprensión de las bases moleculares de la enfermedad en primer lugar se analizaron las interacciones de las proteínas del MRCV entre sí utilizando la técnica de doble híbrido de levaduras (Y2H). Se identificaron cuatro interacciones positivas: P6 con P6 y con P9-1, P9-1 con P9-1, y P9-2 con P9-2. Se definieron además las regiones de P6 y de P9-1 involucradas en las interacciones utilizando mutantes de delección y se encontró que la región central de P6 con un posible dominio “coiled-coil” es necesaria para la interacción consigo misma y con P9-1, mientras que los últimos 24 residuos de P9-1 intervienen en la formación de dímeros de P9-1. Estos resultados, junto con resultados previos del grupo (Maroniche, 2011), permitieron postular a P6 como componente minoritario del viroplasma e indicaron que la región C-terminal de P9-1 sería necesaria para la formación del viroplasma.

Adicionalmente se evaluó la interacción de las proteínas virales P6, P7-2, P9-1, P9-2 y P10 con proteínas celulares que son candidatas a cumplir roles relevantes en la interacción MRCV-hospedante. Entre otros resultados, se encontró que P7-2 interactúa con la proteína SKP1 (*S-Phase Kinase Associated Protein 1*) componente del complejo E3 ligasa del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Estos resultados son de gran relevancia ya que sugieren que P7-2 tiene la capacidad de interferir con el UPS.

Para continuar con la caracterización de las proteínas virales P9-1 y P6 e identificar posibles componentes celulares asociados con los viroplasma, se realizaron relevamientos de una

biblioteca de ADN copia (ADNc) de hoja de trigo por Y2H. Se encontró que P9-1 es capaz de interactuar con una proteína con posible función de aldosa 1-epimerasa y otra con posible función de aciltransferasa. Por su parte, P6 mostró interacción con una posible tioredoxina. Dado que las proteínas identificadas intervienen en el metabolismo de la planta, se postula que su interacción con proteínas virales podría estar asociada con la generación de síntomas.

Finalmente se determinó que tanto P6 como P9-1 contienen potenciales motivos PEST de degradación vía proteasoma. Se construyeron mutantes sin estos motivos y se observó un incremento en los niveles de acumulación de P6 y P9-1 mutadas en plantas, sugiriendo que los PEST serían funcionales.

Si bien aún resta comprender los mecanismos precisos que subyacen a las interacciones proteína-proteína encontradas en este trabajo de Tesis y sus consecuencias biológicas, estos resultados significan un importante avance en el conocimiento de la función y rol de las proteínas codificadas por el MRCV, en especial de P6 y P9-1.

Palabras clave: *Mal de Río Cuarto virus*, reovirus, viroplasma, monocotiledóneas, proteasoma.

Study on the plant-pathogen interaction between plants and *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV)

Abstract

Mal de Río Cuarto virus (MRCV, *Fijivirus*, *Reoviridae*) causes the most important maize disease in Argentina leading to great economic losses. The virus is transmitted by planthoppers from the *Delphacidae* family and also infects other grasses like wheat, rye, oat and sorghum, causing severe symptoms. The MRCV genome is composed of ten double stranded RNA (dsRNA) segments that code for thirteen proteins. During its infection cycle, MRCV replicates in cytoplasmic inclusion bodies called viroplasms, and our group has found that are mainly composed by the viral non-structural protein P9-1 (Maroniche, 2011). In other reovirus, the viroplasms also contain viral RNA and minor viral proteins as well as cellular components of the host.

To gain insight into the molecular basis of the disease, MRCV protein-protein interactions were analyzed using the yeast two-hybrid (Y2H) technique. Four positive interactions were found: P6 with itself and with P9-1, P9-1 with P9-1, and P9-2 with P9-2. The regions of P6 and P9-1 involved in such interactions were also identified by using deletion mutants. Through these analyses, it was established that the central region of P6 containing a possible coiled-coil domain is necessary for P6/P6 and P6/P9-1 interactions, whereas the last 24 residues of P9-1 are involved in P9-1 dimer formation. These results, together with previous results of our group (Maroniche, 2011), allowed us to postulate P6 as a minor viroplasm component and they also suggest that P9-1 C-terminal region is necessary for viroplasm assembly.

Additionally, the interactions of viral proteins P6, P7-2, P9-1, P9-2 and P10 with cellular proteins that are proposed to have important roles in MRCV-host interaction were analyzed. Among other results, it was found that P7-2 interacts with SKP1 (*S-Phase Kinase Associated Protein 1*), component of E3 ligase complex of the ubiquitin-proteasome system (UPS). These results are relevant because they suggest that P7-2 is able to interfere with the UPS.

To further characterize P6 and P9-1 and to identify possible cellular components of the viroplasms, Y2H screenings of a wheat copy DNA (cDNA) library were carried out. These assays showed that P9-1 interacts with a putative aldose 1-epimerase and with a putative acyltransferase. In addition, P6 interacts with a protein with a predicted thioredoxin activity.

Given that the identified proteins are involved in the plant metabolism, their interaction with viral proteins might be associated with symptom development.

Finally, it was identified that P6 and P9-1 contain potential PEST motives for degradation through the UPS. P6 and P9-1 mutants without these motives showed increased protein accumulation in plants, suggesting that their PEST motives are functional.

Although the mechanisms underlying the protein-protein interactions found in this Thesis, as well as their biological consequences remain unknown, this study broadens the current knowledge of the function and role of MRCV encoded proteins, in particular those of P6 and P9-1.

Keywords: *Mal de Río cuarto virus*, reovirus, viroplasm, monocotyledonous, proteasome.

Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y a la Facultad de Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular Profesor Héctor Maldonado por la darne el espacio para realizar este trabajo de Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y al INTA por otorgarme las becas que han permitido la realización de esta Tesis.

Al Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) y a su directora, Dra. Elisa Carrillo. Al Instituto de Biotecnología (IB) y su directora Dra. Ruth Heinz por permitirme realizar este trabajo en el Instituto plenamente a gusto y con total libertad. A toda la gente del IB, porque hacen que sea un lugar de trabajo alegre, distendido, solidario, y a la vez exigente y de gran calidad académica.

Especialmente a mi directora de Tesis Mariana, por guiarme, acompañarme, aconsejarme, y ayudarme incondicionalmente durante todos estos años. A mis otros “jefes”, Ceci, Oscar, Sebastián y Fernando, por estar siempre dispuestos a aconsejarme y atender todas mis inquietudes. Al Dr. Esteban Hopp, por su profunda influencia y estímulo científico y docente.

A Vane, Guille, Luis, la Polaca y Naty, ¡por todo! Por su ayuda, consejos, charlas, risas (¡muchas!) y compañía. Y a Luisa, Martín, Pilar, Gabriela, Vero, Yami, Sole, Vale B., Lucila, y todos los becarios del IB, por las discusiones sobre experimentos y resultados, los almuerzos, los mates, los viajes en auto a puro chisme, las salidas y porque siempre hay una buena excusa para festejar. A Victoria y Andrea P., por su enorme ayuda y consejos con las Sf9, los báculos y los rota. A Vero Lía por su infinita paciencia para explicarme genética. A Laura Ramos y a las chicas TEM, por su ayuda y su arduo trabajo con las transgénicas. A los chicos de los invernáculos, especialmente a Matías, por cuidar de mis plantitas.

A mis amigas exactas Flor, Silcho, Roxi, Euge y Lau, por las catarsis, las fondues, las charlas que nunca podemos terminar, gracias acompañarme todos estos años! A todos mis amigos, gracias por dejarme compartir con ustedes anécdotas, alegrías y camino.

Finalmente, esta Tesis está dedicada a mi mamá, mi papá, mi hermana y mi Pájaro, porque nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. ¡Gracias!

Índice de Contenidos

Publicaciones derivadas de este trabajo	13
Abreviaturas y acrónimos	14
INTRODUCCIÓN	17
El Mal de Río Cuarto y su impacto en el cultivo del maíz en Argentina	19
La familia <i>Reoviridae</i>	24
Los reovirus vegetales	26
El género <i>Fijivirus</i>	28
El virus de Mal de Río Cuarto	31
Alteraciones citopáticas y fisiológicas producidas por el MRCV en plantas	36
El trigo como modelo experimental para el estudio del MRCV	38
El ciclo replicativo de los reovirus	39
Génesis y función del viroplasma en el ciclo infeccioso de <i>Reovirus</i>	44
Interacción hospedante-virus	50
Interacción con el citoesqueleto celular y el sistema de endomembranas	51
Interacción con la maquinaria de síntesis proteica	52
Interacción con el sistema ubiquitina-proteasoma	53
La técnica de doble híbrido de levaduras como herramienta para la detección de interacciones proteína-proteína	58
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
Hipótesis general	61

Objetivo general.....	61
Objetivos particulares	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
Técnicas clásicas de biología molecular	65
Análisis bioinformático de proteínas	65
Modelado bioinformático por homología de estructuras de proteínas	66
Construcción de mutantes de MRCV P6, P7-2 y P9-1	66
Obtención de mutantes de delección mediante la técnica de “PCR splicing”	67
Materiales utilizados	68
Extracción de ARN	69
Síntesis de ADNc.....	69
PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de datos	69
Amplificación por PCR de las secuencias codificantes de genes de plantas e insectos.....	70
Construcción de vectores utilizando el sistema de clonado Gateway	70
Técnica de doble híbrido en levaduras	72
Cepas de levaduras utilizadas	73
Vectores de expresión en levaduras para Y2H.....	74
Cultivo de levaduras.....	75
Preparación de células de levaduras competentes y transformación	75
Ensayo de autoactivación de la transcripción en Y2H.....	76
Obtención de cotransformantes y detección de interacciones positivas.....	76

Controles utilizados en los ensayos de Y2H	77
Relevamiento de una biblioteca de ADNc de hoja de trigo en Y2H con proteínas de MRCV .	77
Biblioteca de ADNc de hoja de trigo en levaduras.....	77
Proteínas carnada para los relevamientos de la biblioteca	77
Apareamiento entre la cepa que expresa la biblioteca y la cepa que expresa la carnada .	77
Confirmación de las interacciones positivas en los relevamientos.....	79
Extracción de ADN de levaduras y amplificación de los insertos por PCR	79
Eliminación de clones redundantes	80
Análisis de las secuencias de los clones relevados en la biblioteca de trigo.....	80
Aislamiento de los plásmidos que expresan clones de interés y confirmación del doble híbrido	81
Cepa de <i>Agrobacterium tumafaciens</i> utilizada	81
Construcción de vectores de expresión en <i>Nicotiana benthamiana</i>	81
Agroinfiltración de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	82
Cultivo celular y transfección de líneas celulares de insecto Sf9	82
Construcción de vectores de expresión en la línea celular de insectos Sf9.....	83
Análisis de proteínas	83
Extracción de proteínas a partir de tejidos vegetales.....	83
Extracción de proteínas de Sf9.....	83
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio	83
Detección de proteínas por “Western blot”	84

Anticuerpos utilizados	84
Ensayos de coimmunoprecipitación a partir de material vegetal.....	84
Ensayos de expresión en <i>N. benthamiana</i> con inhibidores del proteosoma.....	85
Cuantificación por imagen de los “Western blot” y análisis estadístico.....	85
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
CAPÍTULO I	89
Análisis de las interacciones de las proteínas de MRCV por doble híbrido de levaduras.....	91
Identificación de las regiones de P6 involucradas en la interacción P6/P6 y P6/P9-1.....	98
Modelado de la estructura tridimensional de MRCV P9-1 por homología.....	102
Rol del brazo C-terminal de MRCV P9-1 en la interacción con P9-1 y P6	103
CAPÍTULO II	109
Análisis de la interacción de proteínas del MRCV con proteínas candidato de plantas e insectos	111
Análisis de la interacción de proteínas de MRCV con componentes del citoesqueleto de insectos	111
Análisis de la interacción de las proteínas del viroplasma P6 y P9-1 con el factor de elongación de la traducción 1 alfa de trigo	113
Análisis de la interacción de P7-2 con SKP1, componente del complejo E3 ligasa tipo SCF.....	114
Análisis de las regiones de MRCV P7-2 que intervienen en la interacción con SKP1	116
CAPÍTULO III	121
Identificación de proteínas de trigo con capacidad de interacción con las proteínas mayoritaria y minoritaria del viroplasma de MRCV.....	123
Identificación de proteínas de trigo con capacidad de interactuar con MRCV P9-1 por Y2H	123

Análisis de secuencias de los clones seleccionados	126
Aislamiento de los plásmidos que expresan los clones de interés y confirmación de la interacción con P9-1 por doble híbrido	129
Caracterización de la proteína con posible función de aciltransferasa	131
Caracterización de la proteína con posible función de aldosa 1-epimerasa	140
Identificación de proteínas de trigo con capacidad de interacción con MRCV P6 por Y2H.....	146
Caracterización de la proteína con posible función de tiorredoxinas.....	151
CAPÍTULO IV	157
Análisis de la estabilidad de P6 y P9-1	159
Búsqueda e identificación de señales de degradación en las proteínas codificadas por el MRCV.	159
Análisis de la conservación de los potenciales motivos PEST en fijivirus	160
Análisis de la acumulación de mutantes de P6 que carecen del motivo PEST en plantas.....	165
Análisis de la contribución del motivo PEST predicho en la estabilidad de P6	167
Análisis de estabilidad de P6 y P6 Δ PEST en células de insecto	171
Rol del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) en la estabilidad de P6 en plantas	175
Análisis de la contribución del motivo PEST predicho en la estabilidad de P9-1 de MRCV en plantas.....	177
Análisis de la contribución del motivo PEST predicho en la estabilidad de P9-1 de MRCV en insectos	180
CONCLUSIONES GENERALES	183
Perspectivas futuras.....	189
Bibliografía	191

Publicaciones derivadas de este trabajo

MARONICHE, G. A.; MONGELLI, V. C.; **LLAUGER, G.**; ALFONSO, M. V.; TABOGA, O. A.; DEL VAS, M. *In vivo* subcellular localization of *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) non structural proteins in insect cells reveals their putative functions. *VIROLOGY*. ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE. 2012 vol. 430. p 81 - 89. ISSN 0042-6822.

MARONICHE, G. A.; MONGELLI, V. C.; ALFONSO, M. V.; **LLAUGER, G.**; TABOGA, O. A.; DEL VAS, M. Development of a novel set of Gateway-compatible vectors for live imaging in insect cells. *INSECT MOLECULAR BIOLOGY*. Londres WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC. 2011 vol. 20. p 675 - 685. ISSN 0962-1075.

MARONICHE, G. A.; MONGELLI, V. C.; PERALTA, A. V.; DISTÉFANO, A. J.; **LLAUGER, G.**; TABOGA, O. A.; HOPP, H. E.; DEL VAS, M. Functional and biochemical properties of *Mal de Río Cuarto virus* (*Fijivirus*, *Reoviridae*) P9-1 viroplasm protein show further similarities to animal reovirus counterparts. *VIRUS RESEARCH*. ELSEVIER SCIENCE BV. 2010 vol. 152 n° 1-2. p 96 - 103. ISSN 0168-1702.

Abreviaturas y acrónimos

aa: Aminoácido.
AD: Dominio de activación de la transcripción.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia.
ARN: Ácido ribonucleico.
ARNdc: Ácido ribonucleico de doble cadena.
ARNm: ARN mensajero.
ARNsc: ARN de simple cadena.
BD: Dominio de unión al ADN.
BiFC: Complementación bimolecular de la fluorescencia.
BTV: *Bluetongue virus*.
CMV: *Cucumber mosaic virus*.
CaMV: *Cauliflower mosaic virus*.
coIP: coinmunoprecipitación.
d.pa.: días posagroinfiltración.
d.pi.: días posinfección.
FDV: *Fiji disease virus*.
GFP: Proteína verde fluorescente.
hs: horas.
kDa: kilo Dalton.
L: litro.
M: Molar.
min: minuto.
ml: Mililitro.
MRCV: *Mal de Río Cuarto virus*.
MRDV: *Maize rough dwarf virus*.
ng: Nanogramo.
nm: Nanometro.
nM: Nanomolar.
NLRV: *Nilaparvata lugens reovirus*.
nt: Nucleótido.
OD^{600nm}: Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.
ORF: Marco abierto de lectura.
p35S: Promotor 35S del CaMV.
pb: Pares de bases.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PM: Peso molecular.
PMRCV: Proteína codificada por el MRCV.
PnS: Proteína no estructural.
PTGS: Silenciamiento génico postranscripcional.
PVX : Virus X de la papa, *Potato virus X*.
RdRp: ARN polimerasa ARN dependiente.
RE: Retículo endoplasmático.
RBSDV: *Rice black streaked dwarf virus*.
RDV: *Rice dwarf virus*.
RGDV: *Rice gall dwarf virus*.
r.p.m.: Revoluciones por minuto.
RV: *Rotavirus*.
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.

Sf9: línea celular de *Spodoptera frugiperda*.
SRBSDV: Southern rice black streaked dwarf virus.
TBSV: *Tomato bushy stunt virus*.
TILLING: Lesiones locales dirigidas e inducidas en genomas.
TMV: *Tobacco mosaic virus*.
UA: Unidades arbitrarias.
UPS: Sistema de ubiquitina-proteasoma.
UTR: Región no traducida.
VIB: Cuerpo de inclusión viral.
VIGS: Silenciamiento génico inducido por virus.
Y2H: Doble híbrido de levaduras.
µg: Microgramo.
µl: Microlitro.
µm: Micrometro.
µM: Micromolar.

INTRODUCCIÓN

El Mal de Río Cuarto y su impacto en el cultivo del maíz en Argentina

El Mal de Río Cuarto constituye la enfermedad más importante del maíz (*Zea mays*) en nuestro país (Lenardón y col., 1998; Nome y col., 1981). Esta enfermedad es causada por un virus denominado *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) que pertenece al género *Fijivirus* de la familia *Reoviridae* (Distéfano y col., 2002; Distéfano y col., 2003; Distéfano y col., 2005; Guzmán y col., 2007) y que es transmitido por diversas especies de chicharritas de la familia *Delphacidae*, principalmente *D. kuscheli* Fennah, en donde el virus también es capaz de infectar y replicar (Mattio y col., 2008; Remes Lenicov y col., 1985; Velazquez y col., 2003; Velazquez y col., 2006). El MRCV presenta un amplio rango de hospedantes naturales, ya que además del maíz, se lo ha encontrado en gramíneas silvestres, muchas de ellas malezas, que no sólo constituyen un reservorio natural del virus sino que favorecen el desarrollo poblacional del insecto vector. Asimismo, el MRCV infecta naturalmente a otras gramíneas cultivadas, como trigo (*Triticum aestivum* L., Rodríguez Pardina y col., 1998; Rodríguez Pardina y col., 1994), avena (*Avena sativa* L., Truol y col., 2001), sorgo (*Sorghum bicolor*, Giorda y col., 1993), centeno (*Secale cereale*, Truol y col., 2001), cebada (*Hordeum vulgare*, Giménez Pecci y col., 1997), grama rhodes (*Chloris gayana*), y alpiste (*Phalaris canariensis*, Truol y col., 2001).

Una vez que la planta de maíz es infectada, los síntomas aparecen luego de aproximadamente 30 días y dependen fundamentalmente del estado de desarrollo de la planta en el momento de la infección. Se considera que la presencia de proliferaciones de tejido vascular (enaciones) en forma de verruga en las nervaduras del envés de la hoja es el síntoma distintivo de la enfermedad (Figura 1.1 E, Lenardón y col., 1985). Cuando la infección ocurre en los primeros estadios de desarrollo (etapa de plántula), los síntomas son más severos y consisten en un marcado enanismo (plantas de 20-60 cm de altura, Figura 1.1 A), espigas malformadas, acortamiento de entrenudos con tallos achatados (Figura 1.1 B), hojas recortadas o reducidas, panojas atrofiadas y mazorcas múltiples (Figura 1.1 C) con pocos o sin granos (Figura 1.1 D). Si la infección se produce en los estadios más avanzados de desarrollo, los síntomas pueden ser muy leves: las plantas presentan enaciones y son ligeramente enanas. Además del estado de desarrollo de la planta, el tipo y la severidad de los síntomas dependen de otros factores como la susceptibilidad del híbrido de maíz infectado y las condiciones ambientales en que se desarrolla el cultivo (Pérez Fernández y Lejarraga, 2005).

El modo de transmisión del MRCV por la chicharrita vectora (Figura 1.1 F) es propagativo y persistente (Nault y Ammar, 1989). Es propagativo porque el virus es capaz de moverse dentro

de y entre los órganos del vector: es adquirido por la chicharrita al alimentarse de la savia de una planta enferma, atraviesa la pared del epitelio intestinal hacia la hemolinfa y finalmente pasa a las glándulas salivales, desde donde es inoculado nuevamente (Milne y Lovisolo, 1977). Además el modo de transmisión es persistente ya que el virus es capaz de replicar en el insecto vector estableciendo una infección sistémica, y luego de un período de latencia de unos 17 días, el insecto permanece infectivo durante toda su vida. La infección por MRCV en las chicharritas es asintomática y no afecta su longevidad (Arneodo y col., 2002a).

El primer reporte de plantas de maíz con síntomas de la enfermedad fue realizado en el año 1967 por miembros de la Agencia de Extensión Rural del INTA-Río Cuarto, Córdoba. Sin embargo, el Mal de Río Cuarto adquirió por primera vez características de epifitía durante la campaña agrícola 1976/77, extendiéndose gradualmente, hasta que en la campaña 1981/82 causó la pérdida de 55.000 de las 360.000 hectáreas de maíz en la localidad de Río Cuarto, Córdoba. En la campaña agrícola 1996/97, la enfermedad causó pérdidas de un 28,50% en la producción total de maíz, registrándose pérdidas del 32,47% en la provincia de Córdoba y del 22,62% en la provincia de Buenos Aires. En el año 2004 el Mal de Río Cuarto ya se había extendido en toda la zona maicera de Argentina, en donde afectó el 22,27% de la superficie cultivada.



Figura 1.1: Sintomatología del Mal de Río Cuarto en maíz e insecto vector. Algunos de los síntomas consisten en plantas de tamaño severamente reducido (**A**), tallos engrosados y chatos (**B**), plantas con espigas múltiples y pequeñas (**C**), mazorcas con deficiencia en la formación de granos (**D**) y enaciones sobre la nervadura en el envés de las hojas (**E**). Fotografía de una chicharrita *Delphacodes kuscheli* Fennah, vector del MRCV (**F**).

Desde el punto de vista epidemiológico, la zona endémica establecida inicialmente cubre una extensa área del sur de la Provincia de Córdoba. Esta área de distribución se incrementó después de la severa epidemia de la campaña 1996/97 (Lenardón y col., 1998) ya que los cambios climáticos producidos en los años siguientes fueron propicios para el desarrollo del insecto vector en otras zonas productoras de maíz del país (Laguna, 2003, 1999; Laguna y col., 2002). Un relevamiento del avance de las zonas de incidencia de la enfermedad realizado en el Instituto de Fisiología y Fitopatología Vegetal (IFFIVE) del INTA del año 2004 demostró que el Mal de Río Cuarto causó la pérdida total de la cosecha en zonas del centro-oeste de la provincia de Buenos Aires (Trenque Lauquen, Bolívar y General Villegas) y pérdidas severas en

el norte de La Pampa, en el sur de Santa Fe y en el este-sudeste de la provincia de Córdoba (Figura 1.2). También fue detectada la presencia del virus en lotes de maíz de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Formosa, Corrientes, Misiones y San Luis (Laguna y col., 2002).

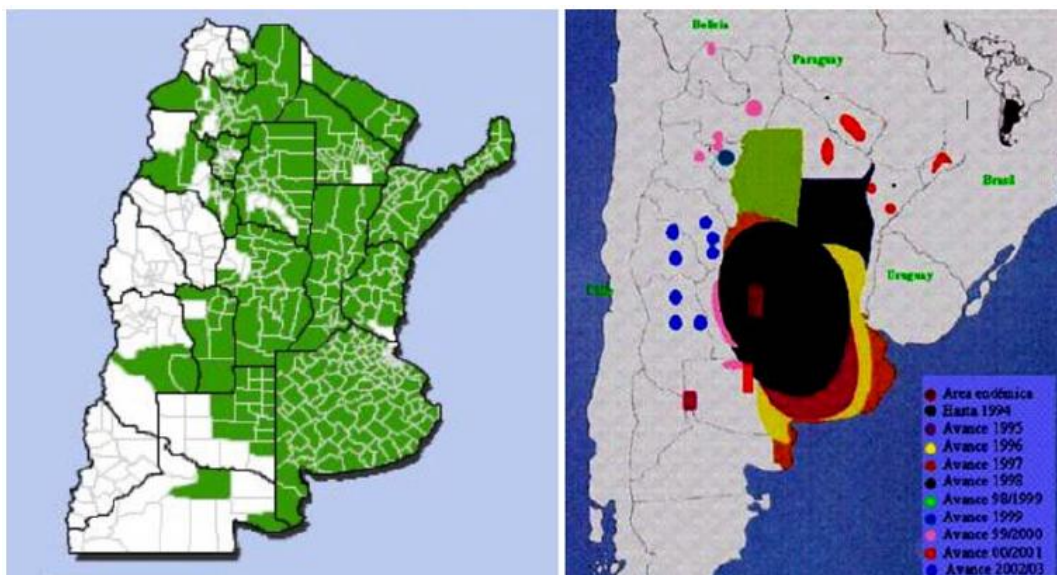


Figura 1.2: Zona de producción de maíz y distribución del Mal de Río Cuarto. Se muestra la distribución geográfica de la zona productora de maíz en la Argentina (izquierda, verde) según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, y el avance anual del Mal de RíoCuarto desde 1994 y hasta la campaña agrícola 2002/2003 (Laguna, 2003).

Finalmente, a pesar de que en las siguientes campañas la incidencia disminuyó hasta circunscribirse sólo a la zona endémica de Río Cuarto en donde se detectaron altos niveles de ataque en las siembras de noviembre de 2005 (Avila, 2005), durante la campaña 2006/07 la enfermedad se volvió a expandir a casi todas las zonas maiceras (Giménez Pecci, 2008a, b; March, 2008).

Debido a que el MRCV (y los fijivirus) no se transmiten por semillas (Harpaz, 1972; Lenardón, 1998), es probable que el virus haya estado presente en nuestro país, siendo algunas malezas e insectos reservorios naturales del mismo y que la enfermedad haya adquirido carácter epidémico cuando se dieron las condiciones favorables para su desarrollo debido, entre otros factores, a la presencia de híbridos que reemplazaron las variedades tradicionales (Lenardon y March, 1983) y al cambio en el tipo de labranza que incorporó el desmalezado de los cultivos. El MRCV es introducido regularmente en los campos de maíz por delfácidos, que cuando se

encuentran en hábitats inestables, migran y son capaces de explorar nuevas áreas. La composición de la población de chicharritas (macrópteros, branquípteros, hembras o machos) está relacionada con la inestabilidad del hábitat (Denno, 1978): los macrópteros son más exitosos en moverse desde vegetación de baja calidad a vegetación de alta calidad. Por lo tanto es posible que la combinación entre el deterioro en la calidad de la avena y trigo, gramíneas que constituyen su hábitat natural en la época invernal (Dagoberto y col., 1985), las altas temperaturas y las condiciones de alta densidad, acelere la producción de formas extremadamente activas (de alas largas) aumentando la población de las formas migratorias (Ornaghi y col., 1993). Cuando los vectores se expanden en la etapa temprana y vulnerable del crecimiento del maíz causan severas epidemias del Mal de Río Cuarto (Conti, 1984; Harpaz, 1972; Ornaghi y col., 1993).

La fecha de siembra del maíz resulta un factor clave ya que su elección puede definir importantes diferencias en el rendimiento final. La fecha de siembra óptima para alcanzar un rendimiento potencial es durante los primeros días de octubre (Forján, 2013). Sin embargo, esta época coincide con el ataque del Mal de Río Cuarto, que se produce normalmente entre mediados de octubre (siembra normal) y noviembre (siembra tardía) siendo el cultivo más susceptible durante los primeros 15 días desde la emergencia de las plántulas.

Al tratarse de una enfermedad cuya importancia depende de la llegada de los vectores portadores del virus al cultivo de maíz desde afuera del lote, su manejo debe basarse en disminuir el inóculo inicial, la tasa o velocidad de incremento de la enfermedad y el tiempo de exposición del cultivo al patógeno. Como la cantidad de inóculo se relaciona directamente con la población de *Delphacodes kuscheli*, las técnicas de control químico (insecticidas de cobertura total o curasemillas) del insecto vector apuntan a disminuir el inóculo inicial (Pérez Fernández y Lejarraga, 2005). Además, para reducir el impacto de la enfermedad se han desarrollado técnicas de manejo del cultivo que están basadas en el conocimiento de los factores que influyen en la incidencia y severidad. La incidencia depende especialmente de la superposición entre el período de existencia de chicharritas de formas migratorias, la densidad de la población del vector y el estadio de crecimiento de las plantas de maíz, que es más susceptible durante las tres primeras semanas del cultivo (plántula recién emergida, Lenardón y col., 1985; Ornaghi y col., 1993). Una de las estrategias más utilizadas consiste en realizar una siembra temprana (primera quincena de octubre) para evitar que los picos poblacionales del insecto vector coincidan con la etapa de mayor susceptibilidad del cultivo (Lenardón y col., 1985; Lenardón y col., 1985; March y col., 1995). De manera complementaria, se han

desarrollado híbridos de maíz que exhiben diferentes grados de tolerancia al Mal de Río Cuarto y líneas endocriadas recombinantes (RILs) que permitieron el mapeo de QTLs de tolerancia (Bonamico, 2012; Di Renzo, 2004). Sin embargo, a pesar de que la incidencia de la enfermedad puede ser disminuida empleando estos cultivares, los mismos son ocasionalmente infectados y la tolerancia se ve ampliamente sobrepasada cuando la presión de inóculo es alta (Giménez Pecci, 2012). Por otra parte, la utilización de estos híbridos produce pérdidas indirectas en la producción debido a que no siempre los híbridos tolerantes son los de mayor rendimiento para una zona geográfica dada.

Argentina es actualmente el cuarto exportador mundial de maíz y a nivel nacional la producción de este cultivo se ubica en segundo lugar por debajo de la soja (Ghida Daza, 2013; N.C.G.A., 2014). Por lo tanto, el impacto económico de la enfermedad es muy importante. La producción mundial de este cultivo ha tenido en los últimos diez años un crecimiento del 50% que se debe principalmente a la adopción de nuevas tecnologías más que al incremento del área sembrada (Doménech, 2007). Por otra parte, la producción de fuentes de energía alternativas al petróleo como el bioetanol, el cual se produce fundamentalmente a partir de caña de azúcar y maíz, se encuentra en constante crecimiento (FAO, 2007). La necesidad de desarrollar nuevas estrategias que permitan un mayor rendimiento en la producción del maíz sin aumento del área sembrada es evidente. En este contexto, el estudio y conocimiento de la enfermedad causada por el MRCV, la comprensión de las interacciones entre el virus y el hospedante que llevan al establecimiento de la infección y al desarrollo de los síntomas que dan lugar a pérdidas en la producción resultan de gran importancia para identificar posibles blancos específicos que permitan el control de la infección viral por métodos biotecnológicos.

La familia *Reoviridae*

De acuerdo al Noveno Reporte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), la familia *Reoviridae* está compuesta por dos subfamilias que comprenden 15 géneros (ICTV, 2012). Los virus pertenecientes a esta familia afectan a un amplio rango de hospedantes que incluye protozoos, hongos, insectos, plantas y vertebrados (Tabla 1.1). Sus miembros comparten características biológicas en el ciclo infectivo general y a menudo las proteínas virales de miembros de los distintos géneros de esta familia presentan equivalencias funcionales, a pesar de no poseer (salvo contadas excepciones) homologías detectables a nivel aminoacídico. Los virus pertenecientes a los géneros *Oryzavirus*, *Fijivirus* y *Phytoreovirus* son capaces de infectar tanto plantas como insectos.

El grado de avance del estudio de los reovirus que infectan animales es mucho mayor que el de los reovirus vegetales, siendo el género *Rotavirus* que incluye a especies que causan la diarrea infantil el más ampliamente estudiado.

Familia	Subfamilia	Género	Especie tipo	Hospedante
R e o v i r i d e	Spinareovirinae	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Mammalian orthoreovirus</i>	Vertebrados
		<i>Aquareovirus</i>	<i>Aquareovirus A</i>	Insectos, Vertebrados
		<i>Oryzavirus</i>	<i>Rice ragged stunt virus</i>	Insectos, Plantas
		<i>Fijivirus</i>	<i>Fiji disease virus</i>	Insectos, Plantas
		<i>Mycoreovirus</i>	<i>Mycoreovirus 1</i>	Hongos
		<i>Cypovirus</i>	<i>Cypovirus 1</i>	Insectos
		<i>Idnoreovirus</i>	<i>Idnoreovirus 1</i>	Insectos
		<i>Dinovemavirus</i>	<i>Aedes pseudoscutellaris reovirus</i>	Insectos
	Sedoreovirinae	<i>Coltivirus</i>	<i>Colorado tick fever virus</i>	Insectos, Vertebrados
		<i>Orbivirus</i>	<i>Bluetongue virus</i>	Insectos, Vertebrados
		<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus A</i>	Vertebrados
		<i>Seadomavirus</i>	<i>Banna virus</i>	Insectos, Vertebrados
		<i>Phytoreovirus</i>	<i>Wound tumor virus</i>	Insectos, Plantas
		<i>Cardoreovirus</i>	<i>Eriocheir sinensis reovirus</i>	Insectos
		<i>Mimoreovirus</i>	<i>Micromonas pusilla reovirus</i>	Protozoos

Tabla 1.1: Subfamilias y géneros pertenecientes a la familia *Reoviridae*. Se muestran las especies tipo para cada género y su rango de hospedantes. En verde se resaltan los tres géneros que infectan plantas (ICTV, 2012).

En cuanto a las características morfológicas de los virus pertenecientes a la familia *Reoviridae*, las partículas virales tienen simetría icosaédrica y un diámetro de 60-80 nm. Según el género, poseen una, dos o tres cápsides proteicas concéntricas que rodean a los segmentos de ARNdc lineales que constituyen el genoma viral. La familia está dividida en dos subfamilias que se diferencian por la presencia (subfamilia *Spinareovirinae*) o ausencia (subfamilia *Sedoreovirinae*) de proyecciones proteicas o “torretas” en los vértices del núcleo o “core” viral. La capa más interna de las partículas virales o “core” tiene un diámetro interno de aproximadamente 50-60 nm y rodea un número variable de segmentos genómicos de ARNdc. En la subfamilia *Sedoreovirinae*, al menos tres proteínas enzimáticamente activas están unidas a la superficie interna del virión por los vértices. Estas enzimas están involucradas en la síntesis de ARN y el “capping” de mensajeros, incluyendo una polimerasa de ARN dependiente de ARN conservada (RdRp por sus siglas en inglés) con funciones de transcriptasa (para la síntesis de ARN de cadena positiva utilizando como templado ARNdc) y de replicasa (para la síntesis de ARN de cadena negativa sobre un templado de ARNsc), una guanilil transferasa que realiza el “capping” del ARNm viral; y una helicasa que abre la doble cadena de ARN. Las espículas en los

vértices de la partícula viral actuarían como conductos a través de los cuales el ARNm recién sintetizado por las enzimas asociadas al “core” sale hacia el exterior (ICTV, 2012).

Respecto a las características de los ácidos nucleicos de la familia, los reovirus pueden contener 9, 10, 11, o 12 segmentos genómicos de ARNdc lineal, dependiendo del género. La cadena positiva (codificante) de cada segmento contiene una estructura tipo “cap” en su extremo 5’ (7mGpppN2’OmpNp...), y es probable que en algunos casos el extremo 5’ terminal de la cadena negativa (no codificante) se encuentre fosforilado. Ambas cadenas de ARN tienen un grupo –OH en el extremo 3’ y los ARNm virales carecen de cola de poli A. De las dos cadenas del ARNdc de cada segmento genómico, solo una es codificante y en general los segmentos son monocistrónicos, aunque hay excepciones. Los segmentos de ARNdc contienen extremos 5’ y 3’ no codificantes (NC) que están conservados dentro de cada género seguidos por secuencias únicas para cada segmento genómico de cada especie viral que actuarían como señales de empaquetamiento en el virión. Los extremos 5’ y 3’ NC conservados de los ARNm de los reovirus (cadena positiva) presentan regiones no continuas de bases complementarias que tienen la capacidad de formar estructuras secundarias. Estas estructuras secundarias del ARNm de los reovirus forman un mango de sartén o “panhandle” a partir de las secuencias complementarias, seguida por una horquilla o “stem loop” y una cola en el extremo 3’ NC a partir de las secuencias no complementarias. La distribución y organización de las estructuras secundarias mencionadas intervienen en distintos aspectos de la regulación de la función del ARNm, como la traducción, la replicación y el empaquetamiento durante el ciclo de replicación viral. Los distintos segmentos de ARNdc están igualmente representados en las partículas virales, con una copia de cada uno de ellos por virión. En algunos géneros los viriones contienen además cantidades significativas de pequeños oligonucleótidos de ARN de simple cadena (ARNsc, ICTV, 2012).

Los reovirus vegetales

Dentro de la familia *Reoviridae*, los géneros *Fijivirus*, *Phytoreovirus* y *Oryzavirus* son capaces de infectar plantas e insectos hemípteros que actúan como vectores. En la Tabla 1.2 se describen algunas características distintivas de cada uno de los tres géneros de reovirus vegetales. Los reovirus vegetales son particularmente relevantes debido a que infectan especies de cultivos económicamente importantes como el maíz y el arroz, causando pérdidas de producción sustanciales en los principales países productores. Por otro lado, estos virus también son

interesantes desde el punto de vista básico dado que presentan las siguientes características biológicas:

- tienen la capacidad de replicar tanto en su hospedante vegetal como en su insecto vector y, con excepción de 2 casos en 13 especies totales, se encuentran limitados al floema de las plantas que infectan;
- exceptuando una única especie, su rango de hospedantes está limitado exclusivamente a monocotiledóneas; y
- la infección de los reovirus vegetales produce severos síntomas en sus hospedantes vegetales y es sin embargo asintomática en los insectos vectores, en donde además no presenta tropismo de tejido: se los encuentra en el sistema digestivo y nervioso, como así también en la musculatura y en el cuerpo graso (Chen y col., 1989; Hirumi y col., 1967).

La infección de plantas e insectos con reovirus vegetales da lugar a la formación de inclusiones citoplasmáticas morfológicamente similares en las células de ambos hospedantes (Francki, 1985). La más importante de estas inclusiones es el viroplasma, que consiste en una región sin estructura definida formada por fibrillas y material amorfo, siendo este el sitio donde el virus se multiplica y ensambla (ICTV 2012). Las características estructurales y funcionales de los viroplasmas se desarrollarán más adelante.

Reovirus vegetales							
Género (Nº segmentos)	Especie (acrónimo)	Localización geográfica	Hospedante vegetal	Tejido en que replica	Insecto vector		
<i>Phytoreovirus</i> (12)	<i>Wound tumor virus</i> (WTV)	N. América	Dicotiledóneas	Floema	Cotorritas ("leafhoppers")		
	<i>Rice dwarf virus</i> (RDV)	S. E. Asiático		Todos			
	<i>Rice gall dwarf virus</i> (RGDV)	S. E. Asiático					
<i>Fijivirus</i> (10)	<i>Fiji disease virus</i> (FDV)	Oceanía	Monocotiledóneas (gramíneas)	Floema	Chicharritas ("planthoppers")		
	<i>Maize rough dwarf virus</i> (MRDV)	Europa					
	<i>Mal de Río Cuarto virus</i> (MRCV)	S. América					
	<i>Oat sterile dwarf virus</i> (ORDV)	N. y centro de Europa					
	<i>Pangola stunt virus</i> (PSTV)	Centroamérica y Australia					
	<i>Rice black streaked dwarf virus</i> (RBSDV)	N. E. Asiático					
	<i>Southern rice black streaked dwarf virus</i> (SRBSDV)	S. E. Asiático					
	<i>Garlic dwarf virus</i> (GDV)	Europa	Monocotiledóneas (liliáceas)				
<i>Oryzavirus</i> (10)	<i>Rice ragged stunt virus</i> (RRSV)	S. E. Asiático	Monocotiledóneas (gramíneas)				
	<i>Echinochloa ragged stunt virus</i> (EGSV)	S. E. Asiático					

Tabla 1.2: Géneros, especies y características biológicas generales de los reovirus vegetales.

El género *Fijivirus*

Los miembros del género *Fijivirus* poseen genomas compuestos por 10 segmentos de ARNdc, viriones con doble capa proteica de simetría icosaédrica, un rango de hospedantes vegetales que abarca exclusivamente monocotiledóneas y son transmitidos por chicharritas o "planthoppers" de la familia *Delphacidae*.

Hasta el momento este género contiene 9 especies: *Fiji disease virus* (FDV, especie tipo), *Maize rough dwarf virus* (MRDV), *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV), *Oat sterile dwarf virus* (OSDV), *Pangola stunt virus* (PaSV), *Rice black streaked dwarf virus* (RBSDV), *Garlic dwarf virus* (GDV) y *Nilaparvata lugens reovirus* (NLRV). El Southern rice black streaked dwarf virus (SRBSDV) ha sido propuesto como una nueva especie del género (ICTV, 2012). Los miembros de este género causan enfermedades económicamente relevantes en caña de azúcar (FDV en Australia), arroz (RBSDV y SRBSDV en China) y maíz (MRCV en Argentina y MRDV en España, Italia, Grecia e Israel, Achon y Alonso-Duenas, 2009; Dovas y col., 2004; Jiang y col., 2008; Lenardón, 1998; Zhang y col., 2008b; Zhou y col., 2008). La mayoría de los fijivirus replican en células del floema de plantas de la familia *Gramineae* (también llamada *Poaceae*; FDV, MRDV, MRCV, OSDV,

PaSV, RBSDV y SRBSDV) ó *Liliaceae* (GDV). Estos virus producen hipertrofia en los tejidos floemáticos (que incluye expansión y multiplicación celular) que da lugar a la formación de un síntoma característico denominado enación en la cara abaxial de las hojas. Además en general producen enanismo y supresión de la floración y de la formación de semillas. Por otro lado, el NLRV replica únicamente en el insecto *Nilaparvata lugens* (de donde fue aislado originalmente) produciendo una infección asintomática, aunque el virus es también capaz de permanecer y circular por los tejidos vasculares de plantas de arroz. Estas plantas virulíferas actúan como el reservorio natural del NLRV ya que el virus se transmite a las chicharritas *N. lugens* sanas que se alimentan de sus fluidos floemáticos y xilemáticos.

Existen diversas evidencias que han llevado a proponer que los reovirus de plantas se originaron a partir de un virus de insectos ancestral y que luego adquirieron la capacidad de multiplicar en plantas (Nault, 1994). Las mismas son:

1. La replicación viral en plantas causa síntomas severos mientras que es asintomática en insectos;
2. Se conocen al menos dos reovirus: NLRV (*Fijivirus*) y *Leafhopper A virus* (LAV, reovirus no clasificado) que no pueden multiplicar en plantas pero son sin embargo transmitidos horizontalmente desde un insecto infectado hacia otro sano que se alimenta de una misma planta (Francki, 1985; Nakashima y Noda, 1995);
3. Para el *Rice dwarf virus* (RDV, *Phytoreovirus*) se ha demostrado que existen dos genes virales que no se requieren para su replicación en plantas mientras que no se encontraron genes virales dispensables para la replicación en insectos (Pu y col., 2011);
4. Los fijivirus que infectan plantas poseen un ORF o marco abierto de lectura (ORF 2 del S7 para el MRCV) que no está presente en el NLRV que no puede multiplicar en plantas (Attoui y col., 2011).

El genoma de los fijivirus está compuesto por 10 segmentos de ARNdc que se denominan S1 a S10 según su movilidad electroforética. Actualmente los genomas del MRCV (Distéfano y col., 2002; Distéfano y col., 2003; Distéfano y col., 2005; Guzmán y col., 2007), del FDV (Harding y col., 2006; McQualter y col., 2004; McQualter y col., 2003; Soo y col., 1998), del RBSDV (Wang y col., 2003; Zhang y col., 2001a; Zhang y col., 2001b), del SRBSDV (Wang, 2010; Zhang y col., 2008b; Zhou y col., 2008) y del NLRV (Nakashima y col., 1996) están completamente secuenciados. Además, se dispone de secuencias parciales de los genomas del OSDV y del

MRDV (Isogai y col., 1998b; Marzachi y col., 1996; Marzachi y col., 1991). Todos los fijivirus secuenciados comparten 3 segmentos genómicos bistrónicos (S5, S7 y S9 en el caso del MRCV), con excepción del NLRV que sólo posee dos segmentos bistrónicos. Dos de estos segmentos (MRCV S7 y S9) poseen dos ORFs no superpuestos separados por una región intergénica. Se desconoce el mecanismo de expresión de los segundos ORF de estos dos segmentos y hasta la fecha existe solo un reporte donde se detectó P7-2 en planas infectadas por un *Fijivirus* (MRCV) mediante el uso de antisueros policlonales (Saavedra Pons, 2012). El tercer segmento bistrónico (MRCV S5) contiene un ORF principal y un segundo ORF más pequeño ubicado en el extremo 3' del segmento y parcialmente solapado con el primero pero en un marco de lectura diferente.

Las partículas virales de los fijivirus son icosaédricas y están compuestas por un núcleo o "core" de 51-55 nm de diámetro y una cápside externa de 65-75 nm de diámetro. La cápside del "core" está compuesta por una proteína mayoritaria y por otra minoritaria que se encuentra en los vértices del icosaedro formando espículas de tipo B, mientras que la cápside externa está formada por una proteína mayoritaria y por una minoritaria que conforma las espículas de tipo A ubicadas en los vértices del virión. Los estudios funcionales de las proteínas de los fijivirus se han centrado principalmente en las proteínas estructurales y, dado que es posible detectar homología entre las proteínas codificadas por los diferentes segmentos genómicos de las especies de fijivirus, en muchos casos se han asignado funciones a las proteínas comparándolas con sus homólogas de otra especie del género.

En la Figura 1.3 se muestra un árbol filogenético para los *Fijivirus* construido en base a la proteína de la cápside externa P10 en donde se observa que los virus más relacionados al MRCV son el RBSDV seguido por el SRBSDV y el MRDV. Más alejados filogenéticamente se encuentran el FDV, el OSDV y el NLRV.

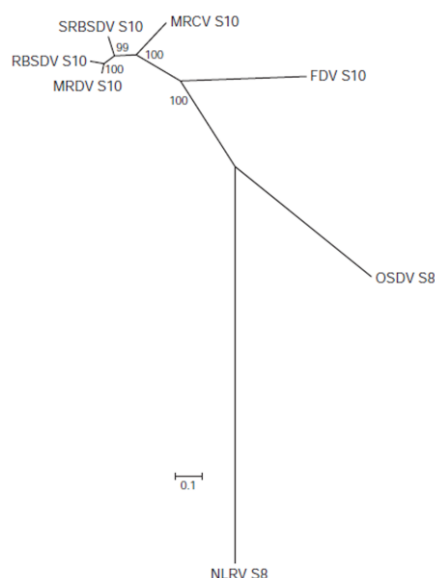


Figura 1.3: Árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor-joining a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de cápside de los fijivirus. {*Fiji disease virus*, FDV (S10) [AY297694]; *Maize rough dwarf virus*, MRDV (S10) [L76560]; *Rice black streaked dwarf virus*, RBSDV (S10) [D00606]; *Oat sterile dwarf virus*, OSDV (S8) [AB011025]; *Nilaparvata lugens reovirus*, NLRV (S8) [D26127]; *Mal de Río Cuarto virus*, MRCV (S10) [AY607586]; Southern rice black streaked dwarf virus, SRBSDV (S10) [EU784840]}. Las secuencias se alinearon con ClustalX y el árbol se construyó con el programa MEGA4 (método de distancias de Dayhoff y 10,000 réplicas de bootstrap). Tomado de (ICTV, 2012).

El virus de Mal de Río Cuarto

Nuestro grupo demostró que el MRCV constituye una especie independiente dentro del género *Fijivirus* y que su genoma está compuesto por 10 segmentos de ARNdc (S1 a S10) que codifican para un total de 13 proteínas (P1, P2, P3, P4, P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P8, P9-1, P9-2 y P10), debido a que tres de los segmentos son bicistrónicos (S5, S7 y S9; Tabla 1.3, Distéfano, 2004; Distéfano y col., 2002; Distéfano y col., 2003; Distéfano y col., 2005; Firth y Atkins, 2009; Guzmán y col., 2007).

El estudio de las proteínas que componen las partículas virales demostró que el MRCV codifica para al menos 5 proteínas estructurales: P1, P3, P4, P8 y P10 (Distéfano, 2004). El análisis de sus secuencias indicó que **P1** es la RpRd viral (Distéfano y col., 2003), **P3** es la proteína mayoritaria de cápside interna ó “core” (Distéfano y col., 2003; Distéfano y col., 2009), **P4** sería una proteína minoritaria de cápside interna, probablemente la espícula de “tipo B” y además presenta un motivo típico de las guanilil transferasas (Distéfano, 2004; Supyani y col., 2007), **P8** podría tener función de helicasa (Distéfano y col., 2002) y **P10** constituye la proteína mayoritaria de cápside externa (Distéfano y col., 2005). La identidad de la P3 como

constituyente mayoritario de proteína de cápside interna o “core” ha sido comprobada experimentalmente en ensayos de inmunolocalización en plantas infectadas (Distéfano y col., 2009). También en este tipo de ensayos histoquímicos se pudo identificar a P4 ubicada en los vértices de partículas de tipo “core” de plantas de maíz infectadas (Distéfano, 2004). Mediante ensayos de “far-Western blot” se observó que P3 es capaz de interactuar con ella misma, con P1 y con P4 (Distéfano, 2004).

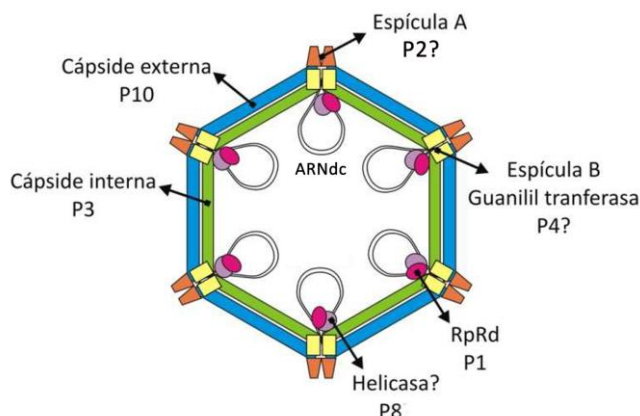


Figura 1.4: Partícula viral, genoma y proteínas estructurales del MRCV. Esquema hipotético de la partícula viral del MRCV con la distribución teórica de las proteínas estructurales y el genoma viral según lo descrito para reovirus animales. (Datos tomados de la Tesis Doctoral de Vanesa Mongelli.)

La proteína **P2** ha sido inmunodetectada en extractos de plantas infectadas como una proteína de 90 kDa (lo que indica que sufriría un clivaje postraducciona dado que su PM teórico es 134,4 kDa) e inmunolocalizada en viroplasma de células de plantas infectadas. Esto, sumado a que el antisuero no reacciona contra proteínas de partículas virales, ha llevado a proponer que P2 sería una proteína no estructural (Distéfano, 2004). Sin embargo, dado que las partículas virales purificadas son muy inestables y normalmente pierden casi completamente la cápside externa, no se debe descartar la posibilidad de que P2 sea estructural y constituya la espícula “tipo A” del virión.

Si bien el conocimiento de la función de las proteínas no estructurales del MRCV es escaso, en los últimos años nuestro grupo llevó a cabo estudios funcionales y de localización de las proteínas de MRCV en plantas e insectos y determinó que las proteínas P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P9-1 y P9-2 son no estructurales (NSPs, Distéfano, 2004) y que su expresión es fundamental para el ciclo viral en hospedantes vegetales y de insectos (Maroniche, 2011; Mongelli, 2010). En estos estudios demostramos que:

P5-1 presenta un motivo TKF en el extremo carboxilo terminal que podría funcionar como una señal no canónica de importación a peroxisomas. Cuando es fusionada a GFP y expresada en células de epidermis de cebolla se distribuye formando estructuras punteadas. La eliminación del TKF provoca una pérdida de este patrón, implicando que dicho motivo es funcional y responsable del algún tipo de direccionamiento subcelular (Mongelli, 2010). En células de insecto, la fusión GFP:P5-1 se localiza en el citoplasma con un patrón granuloso fino que sin embargo no colocaliza con peroxisomas (Maroniche, 2011).

P5-2 es una proteína no estructural codificada por el segundo ORF del segmento S5. El análisis bioinformático de las secuencias disponibles de segmentos S5 de *Fijivirus* sugiere que el segundo ORF de dicho segmento es codificante y que se inicia a 365 nucleótidos río arriba del final del primer ORF (Maroniche, 2011). Si bien no existen evidencias experimentales de la expresión de P5-2 en células infectadas, se postula que el posible mecanismo de traducción de esta proteína estaría regulado por el motivo UCU_UUU_CG[A/U] y ocurriría mediante el corrimiento del marco de lectura en la posición +1 (“+1 frameshift”; Tesis Doctoral en curso L. de Haro; Firth y Atkins, 2009; Maroniche, 2011) que daría lugar a una proteína de fusión P5-1/P5-2 de aproximadamente 120 kDa.

P6 es una proteína no estructural de 90 kDa codificada por el segmento S6. Mediante análisis bioinformáticos se identificó la presencia de un extenso motivo “coiled-coil” con cierta similitud a la cola de la miosina o al brazo de las proteínas de segregación cromosómica (SMC, Mongelli, 2010). Al ser expresada en células de insecto Sf9, la fusión GFP:P6 se concentra en grandes estructuras perinucleares irregulares que no colocalizan con el aparato de Golgi, con el retículo endoplásmico ni con el citoesqueleto de actina, pero sí colocalizan parcialmente con tubulina (Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2012).

En ensayos de expresión transitoria en células de insecto Sf9, la proteína **P7-1** se encuentra distribuida homogéneamente tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células transfectadas (Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2012).

Por su parte, la expresión de **P7-2** a partir de un vector PVX recombinante da lugar a síntomas más severos que los producidos por el virus salvaje en *N. benthamiana*, y su expresión es capaz de alterar los niveles de ARNm de transgenes expresados transitoriamente en plantas de *N. benthamiana*, mediante mecanismos postranscripcionales. Estos resultados proponen a P7-2 como un determinante de síntomas (Mongelli, 2010). Además, considerando que esta proteína no está presente en NLRV, el único *Fijivirus* que no multiplica en plantas, nos condujeron a

postular que P7-2 juega un rol importante en la multiplicación de MRCV en plantas (Mongelli, 2010). Hasta la fecha existe un único reporte en donde se ha logrado inmunodetectar por “Western blot” a la proteína P7-2 de un *Fijivirus* a partir de extractos proteicos crudos de hoja y raíz de maíces infectados con MRCV utilizando un anticuerpo policlonal obtenido por inmunización de conejos con la proteína recombinante (Saavedra Pons, 2012). En este trabajo se encontró que P7-2 se acumula en mayor cantidad en hojas respecto de raíz. Además, en estudios de expresión transitoria en protoplastos de trigo se encontró que P7-2 fusionada a GFP se localiza en citoplasma y núcleo, independientemente de si la fusión a GFP es amino o carboxiterminal (Saavedra Pons, 2012). Estos resultados concuerdan con nuestros hallazgos previos que indicaban que cuando P7-2 es expresada en células de insecto Sf9 fusionada a GFP, se localiza en citoplasma y en ocasiones la fusión P7-2:GFP se encuentra en el núcleo. La expresión de dicha fusión es dificultosa y las células que la expresan presentan un fenotipo ligeramente alterado (Maroniche, 2011).

Estudios bioquímicos y de expresión transitoria en células de insecto Sf9 demostraron que **P9-1** es capaz de autointeractuar, tiene actividad ATPasa y capacidad de unir a ácidos nucleicos *in vitro* y da lugar a inclusiones citoplasmáticas cuando se la expresa transitoriamente en células de insecto. Estas características nos condujeron a proponer que P9-1 es el componente mayoritario del viroplasma (Maroniche y col., 2010). Su rol como componente de viroplasma fue confirmado mediante estudios de inmunohistoquímica en trigos y chicharritas infectados que demostraron que P9-1 se localiza en los viroplasmas de células de floema de trigo y en células de glándulas salivales de chicharritas (Guzmán y col., 2010).

P9-2 es una glicoproteína de membrana capaz de inducir la formación de filopodios que colocalizan con actina cuando es expresada en células de insecto, sugiriendo que esta proteína codificada por el segundo ORF del S9 juega un rol en el transporte y/o movimiento viral de célula a célula en el insecto (Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2012).

En la Tabla 1.3 se muestra una comparación entre los segmentos homólogos de MRCV, RBSDV, SRBSDV, MRDV, FDV (especie tipo) y NLRV (fijivirus de insectos) y las proteínas para las que codifican.

	Segmento	MRCV				RBSDV			SRBSDV			FDV			NLRV		
		Tamaño del inserto (pb)	ORFs	Tamaño de la proteína (kDa)	Función	Segmento equivalente	% Ident.	Función	Segmento equivalente	% Ident. ⁹	Función	Segmento equivalente	% Ident.	Función	Segmento equivalente	% Ident.	Función ²⁷
	MRCV S1	4501	38-4432	168,4	RpRd ¹	RBSDV S1	77,9	RdRp ¹⁷	SRBSDV S1	78,6	RdRp ¹⁴	FDV S1	64,2	RdRp ²⁴	NLRV S1	32,3	RdRP
	MRCV S2	3617	34-3549	134,4	Componente de viroplasma ²	RBSDV S4	56,8	Espícula "tipo B" ¹⁷	SRBSDV S4	72,9	Espícula "tipo B" ¹⁴	FDV S2	40,3	Mayoritaria de cápside interna ²⁴	NLRV S2	20,4	Espícula "tipo B"
	MRCV S3	3826	47-3727	141,7	Mayoritaria de cápside interna ^{1,3}	RBSDV S2	84,5	Mayoritaria de cápside interna ¹⁷	SRBSDV S2	83,1	Mayoritaria de cápside interna ⁹	FDV S3	57,6	Espícula "tipo B" ²⁴	NLRV S3	22,4	Mayoritaria de cápside interna
	MRCV S4	3566	16-3453	131,7	Espícula de "tipo B", guanilil transferasa ⁴	RBSDV S3	72,6	Guanilil transferasa ²⁸	SRBSDV S3	56,8	Guanilil transferasa ¹⁴	FDV S4	56	FD	NLRV S4	23	FD
 	MRCV S5	16-2814	107	FD	RBSDV S5	62,8	NS, componente de viroplasma ²⁹	SRBSDV S5	59,1	Componente de viroplasma ^{11,12}	FDV S5	35,7	FD	NLRV S5	23	FD	
		2366-3133	28,8	FD		56,4	FD		50,5	FD		29,2	FD		21,4	FD	
	MRCV S6	2638	80-2446	90	FD	RBSDV S6	44,8	Supresor PTGS ¹⁸ , componente de viroplasma ¹¹	SRBSDV S6	42,5	Supresor PTGS ¹⁴ , componente de viroplasma ^{11, 12,13}	FDV S6	27,4	FD	NLRV S6	ND	FD
 	MRCV S7	41-1126	41,5	FD	RBSDV S7	61,3	Estructuras tubulares ¹⁵ , ¿MP? ²²	SRBSDV S7	61,7	Estructuras tubulares ¹⁰	FDV S7	53,17	FD	NLRV S10	23,6	Estructuras tubulares?	
		1176-2105	36,8	FD		45,2	FD		42,3	FD		27,69	FD		Este segmento no tiene 2do ORF		
	MRCV S8	1931	25-1800	68,3	¿Helicasa? ² , unión NTP ⁴	RBSDV S8	53	Represor transcripcional ¹⁹ , unión NTP ¹⁷ , proteína del "core" ¹⁷	SRBSDV S8	55,4	Proteína del "core" ¹⁴	FDV S8	38	FD, unión NTP ²²	NLRV S7	22	FD, unión NTP
 	MRCV S9	52-1065	39	Mayoritaria de viroplasma ⁶	RBSDV S9	64,5	Mayoritaria de viroplasma ^{15,20}	SRBSDV S9	67,1	Mayoritaria de viroplasma ^{11,13}	FDV S9	37,3	Proteína estructural ²³	NLRV S9	ND	Mayoritaria de viroplasma	
		1130-1756	24,7	¿MP en insectos? ⁷		60,5	FD		61,6	FD		35,3	Proteína no estructural ²³		26,2	FD	
	MRCV S10	1870	52-1065	39	Mayoritaria de cápside externa ³	RBSDV S10	72,4	Mayoritaria de cápside externa ^{17,18}	SRBSDV S10	71,9	Mayoritaria de cápside externa ¹⁴	FDV S10	49	Mayoritaria de cápside externa ²⁵	NLRV S8	21,7	Mayoritaria de cápside externa

Tabla 1.3: Comparación entre los segmentos homólogos de MRCV, RBSDV, SRBSDV, FDV (miembro tipo) y NLRV (fijivirus de insectos) y las proteínas para las que codifican. % ident: porcentaje de identidad a nivel aminoacídico entre la proteína de MRCV y su homóloga correspondiente; FD: falta determinar. ND: No detectado. MP: proteína de movimiento. En amarillo se indican los segmentos que codifican para proteínas no estructurales y en verde aquellos que codifican para proteínas estructurales. 1: Distéfano y col., 2003; 2: Distéfano, 2004; 3: Distéfano y col., 2009; 4: Mongelli, 2010; 5: Distéfano y col., 2002; 6: Maroniche y col., 2010; 7: Maroniche, 2011; 8: Distéfano y col., 2005; 9: Wang, 2010; 10: Liu y col., 2011; 11: Mao y col., 2013; 12: Li y col., 2013; 13: Li y col., 2014; 14: Wang, 2010; 15: Isogai y col., 1998a; 16: Zhang y col., 2005; 17: Zhang y col., 2001a; 18: Liu y col., 2007b; 19: Liu y col., 2007a; 20: Zhang y col., 2008a; 21: Wang y col., 2011; 22: Sun y col., 2013b; 23: Soo y col., 1998; 24: McQualter y col., 2003; 25: McQualter y col., 2004; 26: Harding y col., 2006; 27: Nakashima y col., 1996; 28: Supyani y col., 2007; y 29: Yang y col., 2014.

Alteraciones citopáticas y fisiológicas producidas por el MRCV en plantas

El virus se encuentra en muy bajas concentraciones en la planta ya que en estudios de microscopía electrónica de transmisión de secciones de hojas de maíz, trigo y cebada infectadas con MRCV, se observó que las partículas virales se encuentran restringidas en células del floema y únicamente se las encuentra en la región aérea de la planta fuera del floema en las enaciones de las hojas que se forman en las células de la vaina que rodean la región vascular (Arneodo y col., 2002b). La citopatología producida por el MRCV es similar a la de otros fijivirus (Francki, 1985) y consiste en la presencia de viriones en el citoplasma de células floemáticas, la formación de viroplasmas y ocasionalmente la aparición de arreglos cristalinos o estructuras tubulares que contienen partículas virales (Brunt, 1996). Asimismo, se ha demostrado que los cloroplastos son las organelas más afectadas por la infección a nivel celular (Arneodo y col., 2002b): en células de parénquima de floema, los cloroplastos presentan alteraciones con una marcada desorganización del sistema de membranas de tilacoides, mientras que en células de parénquima de la vaina y de floema de maíz, los cloroplastos que contienen gránulos de almidón son deformes y se encuentran curvados rodeando en ocasiones porciones de citoplasma con partículas virales (Figura 1.5 C; Arneodo y col., 2002b).

Además, la desorganización de los cloroplastos da lugar a un aumento en las especies reactivas del oxígeno (Di Feo, 2010; Hull, 2002). Estas organelas son la fuente más importante de especies reactivas del oxígeno y por ende, las más susceptibles a ellas frente a situaciones de estrés (Casano, 1992; Di Feo, 2010; Palatnik, 2002).

El MRCV se acumula en mayor título en raíces (Giménez Pecci y col., 1997; Truol y col., 2001), produciendo alteraciones severas en el cilindro central, lignificación de dicha estructura y la endodermis y raíces laterales anormales con presencia de raíces abortivas (Tordable y col., 1991). A su vez, el MRCV altera el metabolismo de giberelinas en plantas enfermas. Dado que uno de los principales síntomas del Mal de Río Cuarto es el acortamiento de entrenudos (enanismo) y la reducción del sistema radicular, el MRCV podría afectar la regulación hormonal durante el crecimiento, alterando la síntesis, el metabolismo y/o el transporte hormonal. El acortamiento de entrenudos, el retraso en el crecimiento y las hojas pequeñas son característicos de la falta de ácido giberélico, y también son síntomas en plantas infectadas con MRCV (Tordable y col., 1991).

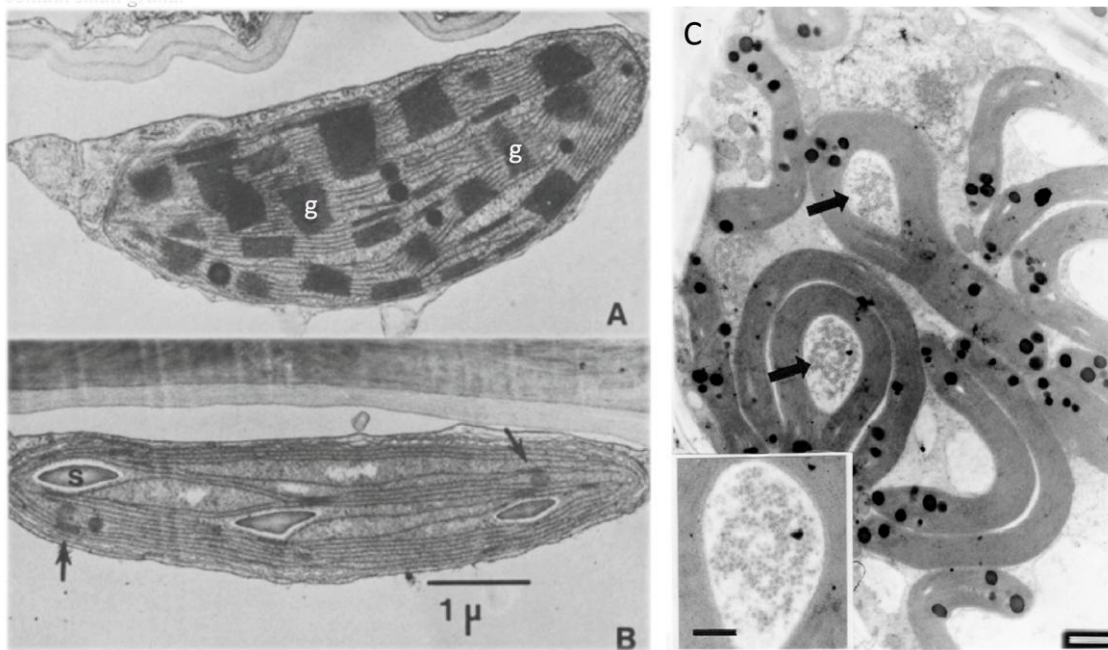


Figura 1.5: Alteraciones citopatológicas causadas por el MRCV en enaciones de hoja de maíz. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de cloroplastos de células de mesófilo (**A**) y de células de la vaina (**B**) de maíz sano. g: grana, s: gránulo de almidón. Las flechas indican áreas en el cloroplasto de la vaina que parece contener granas pequeñas. **C.** Cloroplastos de una célula de la vaina de maíz infectado por MRCV. Los cloroplastos están agrandados, desorganizados y plegados, incluyendo en ocasiones porciones citoplasmáticas con partículas virales (flechas). En esta imagen los gránulos de almidón son de color negro oscuro (Barra= 1 µm, barra detalle= 500 nm). **A y B:** Imágenes tomadas de Smillie, 1971. Imagen **C** tomada de Arneodo y col., 2002b.

Por otra parte, un trabajo del año 2002 de Vigliocco y col., demostró que las hojas y las raíces de maíces infectados por MRCV presentan mayores niveles de ácido jasmónico (JA) respecto de las de maíces sanos (60 d.pi.). En particular, el aumento de JA endógeno coincide con la aparición de las enaciones en la hoja. Asimismo, al tratar exógenamente las plantas con ácido salicílico (SA), las plantas infectadas por MRCV no desarrollaron enanismo (Vigliocco y col., 2002).

A su vez, un trabajo del año 2010 demostró que las plantas de trigo infectadas presentan un contenido de azúcares solubles superior al de plantas sanas (picadas por chicharritas no virulíferas), y presentan un aumento en la concentración de almidón en tejidos foliares (Di Feo, 2010).

El trigo como modelo experimental para el estudio del MRCV

Si bien el Mal de Río Cuarto no causa importantes pérdidas económicas para el cultivo del trigo, este cereal constituye un importante eslabón en la cadena epidemiológica de la enfermedad (Ornaghi y col., 1993; Remes Lenicov y col., 1985), ya que además de servir como reservorio del MRCV, resulta propicio para la cría, alimentación y oviposición de la chicharrita que transmite el virus, que luego migra hacia plantas de maíz en sus primeros estadios de crecimiento. Los síntomas en plántulas de trigo afectadas bajo condiciones de campo aparecen a las 3-4 semanas a partir de la infección y son similares a los que ocurren en maíz: acortamiento de entrenudos y apariencia achaparrada, hojas cortas, erectas, de consistencia coriácea, nervaduras engrosadas y bordes recortados. Algunas hojas se enrollan en forma de tirabuzón (Di Feo, 2001). En la Figura 1.6 se muestran los síntomas del MRCV en dos plantas de trigo a los 21 días posinfección (Tesis Doctoral en curso de Luis de Haro).

El trigo constituye en este momento el mejor modelo experimental para el estudio de la enfermedad debido a que su tasa de transmisión experimental es mayor con respecto al maíz (52% contra 14%; Truol y col., 2001). Además el virus alcanza mayores concentraciones y el manejo en invernáculo es más sencillo por tratarse de una especie de menor porte (Arneodo y col., 2002a). Por otra parte, tanto el mapeo físico como la secuenciación del genoma de trigo están avanzando con rapidez y a cargo de un consorcio internacional (<http://www.wheatgenome.org>). Adicionalmente, en trigo existen herramientas como el TILLING que permite identificar mutaciones generadas sobre la secuencia de un gen específico en individuos de una población mutagenizada (Slade y col., 2005). También está disponible la técnica de VIGS (silenciamiento génico inducido por virus) que permite el estudio funcional de genes por genética reversa (Godge y col., 2008; Scofield y col., 2005; Varallyay y col., 2012). Finalmente, la transformación genética y el manejo posterior del material es más sencillo que en maíz (Dra. Dalia Lewi, comunicación personal).



Figura 1.6: Síntomas producidos por el MRCV en trigo a los 21 d.pi. Se observan plantas con marcada disminución del crecimiento, entrenudos acortados, hojas recortadas y enrolladas en forma de tirabuzón. Imágenes tomadas por L. de Haro.

El ciclo replicativo de los reovirus

Los virus con genoma de ARN constituyen más del 80% de los virus vegetales e independientemente del grupo o familia a la que pertenezcan, todos codifican para al menos tres proteínas que son absolutamente esenciales para el desarrollo del ciclo infectivo: una proteína de cápside (CP) que permite el empaquetamiento del genoma viral; una RpRd viral que interviene en la replicación del genoma viral y la transcripción del ARNm; y una proteína de movimiento (MP) que permite la dispersión del virus más allá de la célula inicialmente infectada. En muchas especies virales las funciones de movimiento intercelular y la dispersión sistémica del virus en la planta son cumplidas por la acción conjunta de la MP y la CP. En general el ciclo replicativo de los virus de genoma de ARN ocurre en el citoplasma de las células hospedantes, en sitios subcelulares específicos y siempre en asociación con estructuras de origen viral que se forman en estadios tempranos de la infección. La capacidad de multiplicación de un virus en determinado organismo requiere de interacciones exitosas entre el patógeno y el hospedante e involucra una serie de eventos o etapas, que constituyen el ciclo replicativo viral. Estas etapas pueden superponerse temporalmente y están altamente reguladas. Pueden resumirse en: 1) ingreso del virus a la célula hospedante, 2) desencapsidación, 3) transcripción del ARNm viral en el caso de los virus de genomas ARNsc(-)

o ARNdc, 4) traducción de las proteínas virales, 5) replicación del genoma viral, 6) ensamblado y maduración de las partículas virales y finalmente 7) egreso de la célula inicialmente infectada y dispersión sistémica en la planta.

Como se mencionó, en los reovirus el ciclo de replicación viral ocurre en el citoplasma y comienza con el ingreso del virus a las células hospedantes mediante mecanismos que varían según el género y que son específicos según los distintos hospedantes. En plantas, los fijivirus son inyectados directamente en el citoplasma de las células del floema durante la alimentación de chicharritas infectadas. En insectos, se demostró para el *Rice dwarf virus* (RDV, *Phytoreovirus*) que la entrada a las células intestinales ocurre por endocitosis mediada por clatrina. Una vez internalizadas, las partículas virales son secuestradas en endosomas ácidos tempranos, en donde perderían la cápside externa (sensible al bajo pH) y se liberarían al citoplasma luego de la fusión de los endosomas que las contienen con vesículas endocíticas (Wei y col., 2007).

Luego de la entrada a la célula, los componentes de la cápside externa se desprenden del virión dando lugar a “cores” transcripcionalmente activos que inmediatamente comienzan a sintetizar los ARNm virales e incorporarles la estructura del “cap” a medida que son expulsados a través de canales presentes en los vértices de la partícula viral. Estos canales a su vez posibilitan la entrada de nucleótidos y demás sustratos requeridos por la maquinaria transcripcional del virus. Un trabajo reciente postula que los ARNm virales de *Rotavirus* son liberados de las partículas virales transcripcionalmente activas de manera específica a través de los canales, es decir que por cada canal de la partícula viral se expulsaría solo un transcripto correspondiente a un segmento específico (Periz y col., 2013).

Luego de esta etapa de transcripción y traducción primaria, las proteínas virales producidas forman macroestructuras citoplasmáticas granulares de apariencia electrodensa, denominadas viroplasmas o cuerpos de inclusión virales (“viral inclusion bodies” o VIBs) que funcionan como fábricas virales donde ocurre la replicación genómica y el ensamblado de nuevas partículas virales. En la siguiente Sección se detallarán en profundidad las características de los viroplasmas ya que son relevantes para este trabajo de Tesis. La mayor parte de los trabajos describiendo estas etapas se realizaron sobre reovirus de los géneros *Rotavirus* y *Orthoreovirus*. Sin embargo, estudios pioneros de microscopía electrónica sobre células de plantas e insectos infectados con diferentes *Fijivirus* han demostrado que su citopatología es similar a la del resto de los reovirus (Arneodo, 2003; Arneodo y col., 2002b; Bassi, 1972; Favali y col., 1974; Francki, 1972; Giannotti, 1977; Shikata, 1977; Vidano, 1970). Se ha detallado para

el *Bluetongue virus* (BTV, *Orbivirus*) que el empaquetamiento de los segmentos genómicos en las nuevas partículas virales ocurre de manera ordenada y secuencial, de forma tal que cada partícula viral contiene una única copia de cada uno de los segmentos genómicos (Sung y Roy, 2014).

Una vez producida la progenie viral, existen mecanismos específicos del hospedante para permitir el movimiento de los viriones que son explotados por los virus. En el caso de hospedantes vegetales, el virus se traslada a las células adyacentes (movimiento célula a célula) a través de los plasmodesmos y posteriormente a toda la planta por los tubos cribosos del sistema vascular floemático (Lucas, 2006; Scholthof, 2005). Los plasmodesmos son estructuras especializadas en forma de canales que comunican el citoplasma y el retículo endoplasmático de células contiguas, permitiendo el pasaje de moléculas de forma altamente regulada (Matthews y col., 2002). Los virus vegetales utilizan dos estrategias básicas de movimiento de célula a célula. Existen MP virales con capacidad de unión inespecífica al ARN/ADN viral que forman complejos nucleoproteicos que pueden atravesar los plasmodesmos. Por otro lado, hay MPs que inducen la formación de estructuras tubulares que atraviesan los plasmodesmos y que son utilizadas para el pasaje de las partículas virales completas (Waigmann y col., 2004). Estos mecanismos dependen de la interacción de las MPs con distintas proteínas del hospedante que auxilian el transporte intracelular de los complejos virales (explotando el citoesqueleto de la célula) hacia los plasmodesmos, causan el aumento del diámetro de los mismos y finalmente asisten en el pasaje del virus a la célula vecina (Nelson y col., 2010; Nelson y Citovsky, 2005; Scholthof, 2005). Si bien se han identificado MPs en los *Phytoreovirus* (Li y col., 2004) y *Oryzavirus* (Wu y col., 2010b) y se ha descrito que P7-1 de RBSDV se localiza en plasmodesmos (Sun y col., 2013b) aún se desconocen los mecanismos de movimiento específicos de los reovirus vegetales en las plantas.

En cuanto al movimiento viral en células animales, éste depende de otros mecanismos. Los reovirus de animales como los miembros de los géneros *Rotavirus*, los *Orthoreovirus* y los *Orbivirus* ingresan a las células del epitelio intestinal del hospedante por endocitosis luego de la unión a un receptor de membrana y, una vez cumplido el ciclo replicativo, el egreso ocurre por lisis celular (Guglielmi y col., 2006; Gutiérrez y col., 2010; Roy, 2008). En *Rotavirus* se ha descrito además un mecanismo de egreso no lítico de las células intestinales polarizadas que aún no es completamente comprendido e involucra a la proteína de la espícula externa VP4 (Chwetzoff y Trugnan, 2006). En cuanto a los *Orbivirus*, que a diferencia de los otros dos géneros (y tal como ocurre con los reovirus vegetales) son transmitidos por insectos, existe un

mecanismo de egreso lítico en células de mamífero y otro no lítico en las células del mosquito vector. Este último requiere la acción de la proteína viral NS3/NS3A, una glicoproteína integral de membrana plasmática que es capaz de interactuar específicamente con proteínas involucradas en el tráfico y direccionamiento de vesículas en el sistema secretor, que se une a la proteína de cápside externa VP2 y facilita el transporte de los viriones hacia la membrana plasmática y su egreso por brotación (Roy, 2008).

El movimiento de célula a célula en el insecto ha sido también caracterizado en el género *Phytoreovirus* mediante el uso de monocapas de células de insecto vector. Se propuso que el movimiento del RDV en el insecto, es llevado a cabo a través de estructuras tubulares que contienen viriones maduros en su interior y que se observan durante la infección. La proteína Pns10 es el componente mayoritario de dichas estructuras y es capaz de formarlas espontáneamente al ser expresada en células de insecto no hospedante. Los túbulos se ubican radialmente en el citoplasma y protruyen de la superficie celular asociados a filopodios de actina que hacen contacto con células vecinas y permiten la dispersión del virus (Wei y col., 2006a). La formación de estas estructuras requiere de la asociación de Pns10 al sistema de endomembranas, mientras que su normal funcionamiento en la dispersión viral utiliza la capacidad de elongación de los filamentos de actina y su movimiento a través de motores de miosina (Wei y col., 2008). Llamativamente, la red de microtúbulos no está involucrada en dicho proceso a pesar de que se observó que los mismos median el transporte y liberación de los viriones del RGDV (otro *Phytoreovirus*) en células de insecto (Wei y col., 2009b). Las partículas virales de RDV son liberadas de las células del insecto vector infectadas a través de la vía de secreción de exosomas. Las partículas virales ensambladas en la periferia de los viroplasmas son incorporadas en compartimientos multivesiculares que se mueven hacia la periferia de las células donde se fusionan con la membrana plasmática y liberan las partículas virales (Wei y col., 2009a). El RDV es ingerido por la cotorrita vector *Nephotettix cincticeps* al alimentarse de una planta de arroz enferma e inicialmente se acumula en la cámara de filtro y en el intestino medio anterior y luego se dispersa hacia el sistema nervioso. Posteriormente se expande hacia el esófago, intestino posterior, tubos de Malpighi así como hacia los nervios que inervan las glándulas salivales, a las cuales finalmente también alcanza. El proceso desde la ingestión hasta la llegada a las glándulas salivales demora aproximadamente 12 días (Chen y col., 2011).

En cuanto a los *Fijivirus*, recientemente se demostró que la proteína no estructural P7-1 del SRBSDV forma estructuras tubulares con partículas virales en su interior, y que estos túbulos se

extienden atravesando la lámina basal desde el epitelio del intestino medio infectado inicialmente, hacia el tejido de la musculatura visceral del intestino en el insecto vector (Jia y col., 2014). A modo de resumen se muestra en la Figura 1.7 el esquema del ciclo de replicación de un reovirus animal, *Bluetongue virus* (BTV, *Orbivirus*, tomado de Mohl y Roy, 2014).

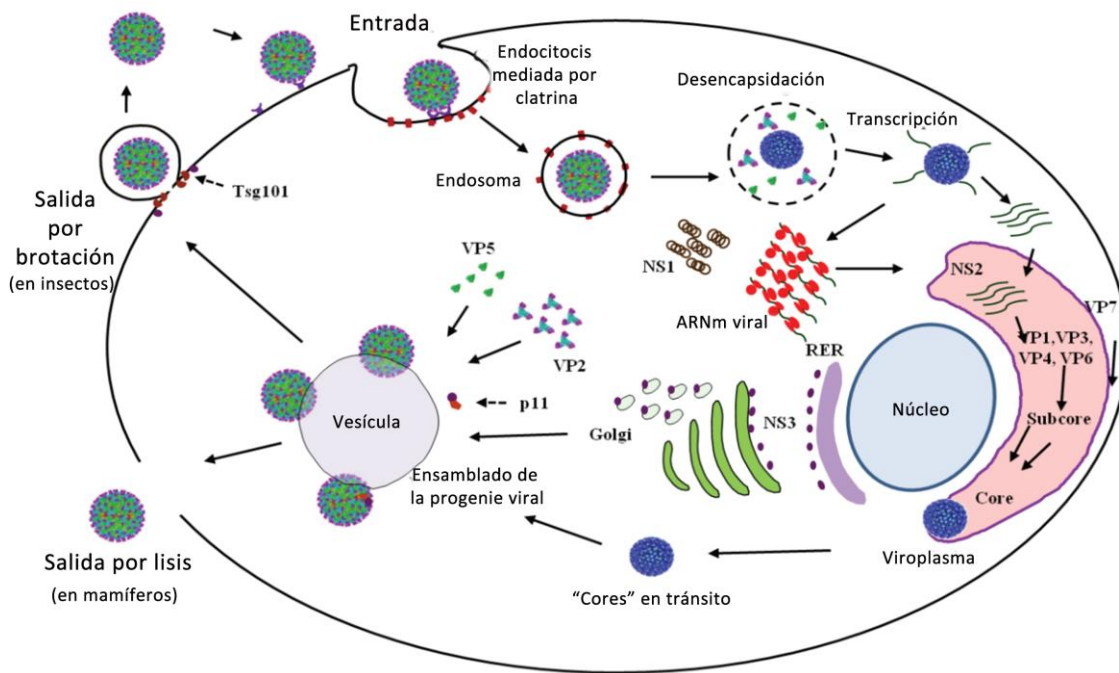


Figura 1.7: Esquema del ciclo de replicación de BTV. La entrada del virión es facilitada por la unión de la proteína de cápside externa VP2 con ácido siálico previo a la endocitosis mediada por clatrina. El virión es internalizado y transportado por endosomas donde el pH ácido facilita la permeabilización de la membrana mediada por VP5. Esto resulta en la desencapsidación y la liberación de los “cores” transcripcionalmente activos en el citoplasma, los cuales sintetizan los ARNm virales que son extrudados desde los “cores” hacia el citoplasma donde son traducidos, dando lugar a la síntesis de proteínas no estructurales tempranas. NS1 promueve la traducción de ARNsc de BTV y luego se forman estructuras tubulares en el citosol. NS2 constituye los cuerpos de inclusión virales o viroplasmos que concentran las proteínas virales así como los ARNsc nacientes para el ensamblado de los “cores”. Luego del egreso de los “cores” incompletos de los viroplasmos, estos son transportados a través de vesículas endocíticas gracias a la acción conjunta de NS3 con anexina/calpactina. La maduración de los viriones comienza con la asociación del “core” con VP5 para formar partículas completas. La salida del virus en etapas tempranas de la infección es no lítica vía interacción de NS3 con Tsg101 y luego ocurre por lisis celular. Tomado de Mohl y Roy, 2014.

Génesis y función del viroplasma en el ciclo infectivo de *Reovirus*

En los reovirus, la replicación y el ensamblado de nuevas partículas virales ocurren en estructuras citoplasmáticas específicas y definidas, llamadas viroplasmas. Se postula que estas estructuras proveen una plataforma física que concentra los genomas recién sintetizados y las proteínas involucradas en la replicación y el ensamblado de nuevas partículas virales. La formación de sitios especializados para la replicación requiere de una extensa reorganización del citoesqueleto celular y de los compartimentos membranosos, hecho que podría ser responsable del efecto citopático en las células. Los viroplasmas son estructuras altamente dinámicas y están compuestas por una o dos proteínas virales no estructurales mayoritarias, ARN viral y otras proteínas virales minoritarias (estructurales y no estructurales) que formarán parte de la progenie (Antczak y Joklik, 1992; Brookes y col., 1993) así como proteínas del citoesqueleto celular (Cabral-Romero y Padilla-Noriega, 2006; Eaton y col., 1987; Parker y col., 2002). Además, los virus requieren de proteínas del hospedante para facilitar la replicación y existen evidencias de que las proteínas celulares son activamente reclutadas hacia los viroplasmas a través de la unión específica a proteínas virales (Netherton y col., 2007).

Si bien las proteínas mayoritarias que componen los viroplasmas de los diferentes géneros de reovirus animales no muestran identidad de secuencia a nivel aminoacídico, sí comparten algunas propiedades funcionales. Por ejemplo, muchas forman homomultímeros mediante una fuerte autointeracción, son fosforiladas, poseen la capacidad de unirse con alta afinidad a ácidos nucleicos de simple o doble cadena generalmente de forma independiente de la secuencia nucleotídica, hidrolizan nucleósidos trifosfato (NTP), y en algunos casos también muestran actividad de desplazamiento de hebras en ácidos nucleicos de doble cadena (Taraporewala y Patton, 2004).

Durante una infección por MRCV en plantas, los viroplasmas se observan como grandes estructuras amorfas no delimitadas por membranas, en los citoplasmas de las células del parénquima de floema en trigo y cebada, y también en las células acompañantes de floema en maíz. Además presentan áreas electrodensas oscuras y áreas claras (Figura 1.8 A), las últimas a menudo incluidas dentro de las primeras. Los viroplasmas contienen partículas virales maduras completas (es decir con ARN_{dc}) e incompletas (vacías; Figura 1.8 A), y también estructuras fibrilares de función y naturaleza desconocidas, que en ocasiones rodean a pequeños grupos de partículas virales (Figura 1.8 B). Las partículas virales maduras se pueden agregar formando estructuras cristalinas y se ubican por fuera de los viroplasmas (Arneodo y col., 2002b).

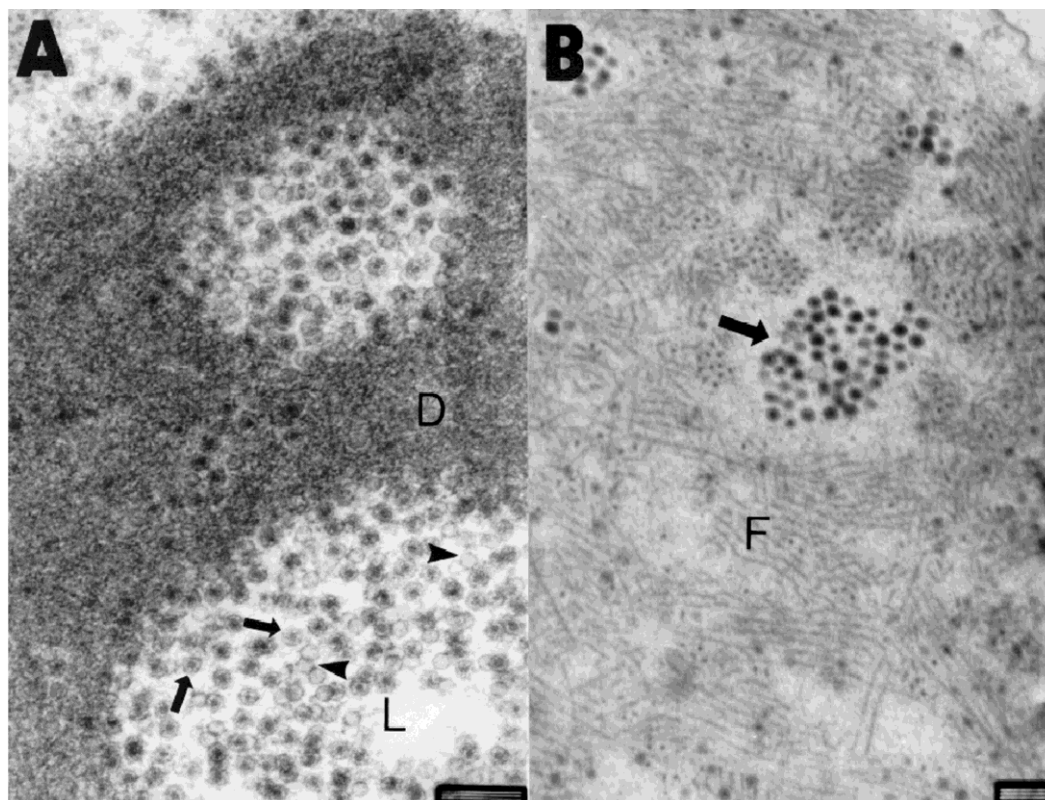


Figura 1.8: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas de células de parénquima de floema de hojas de trigo y cebada infectados por MRCV. **A.** Porción de viroplasma, con áreas oscuras (D, “dark”) y claras (L, “light”) en una célula de cebada. Se observan partículas virales completas con un centro electrodens de ARNdc (flechas) e incompletas (cabezas de flechas). **B.** Material fibrilar (F) y partículas agregadas (flechas) en un viroplasma de una célula de trigo infectada por MRCV. Barra= 200 nm. Imagen tomada de Arneodo y col., 2002b.

En el año 2010, luego de comenzada esta Tesis, nuestro grupo demostró que la proteína codificada por el primer ORF del segmento bicistrónico 9 (P9-1) es la proteína mayoritaria del viroplasma. Expresada de manera aislada en células Sf9 de insectos, P9-1 forma inclusiones citoplasmáticas semejantes a los viroplasmas que se forman durante la infección de MRCV. Se demostró además que P9-1 posee capacidad de autointeractuar *in vitro* e *in vivo* para formar complejos de alto peso molecular (multímeros) y que tiene capacidad de unión a ARNsc y actividad ATPasa. La capacidad de formación de estructuras semejantes a VIBs fue mapeada en el extremo carboxiterminal de la P9-1 de MRCV (Maroniche y col., 2010). Este fue el primer trabajo en donde se reportaron las actividades de unión a ARN y ATPasa para una proteína mayoritaria de viroplasma del género *Fijivirus*. En el mismo año de nuestra publicación, Guzmán y col. publicaron su trabajo en donde produjeron antisueros contra P9-1, y mediante inmunodetección en plantas de trigo y chicharritas infectadas por MRCV, determinaron que P9-1 se localiza exclusivamente en los viroplasmas de células infectadas (Guzmán y col., 2010).

Posteriormente, en un trabajo publicado en el año 2012, nuestro grupo determinó mediante estudios de colocalización por microscopía confocal en expresiones transitorias en células de insecto Sf9, que P6 forma cuerpos de inclusión citoplasmáticos perinucleares. Los mismos son reducidos en número (2 o 3 por célula) pero de gran tamaño. Estas inclusiones colocalizan con tubulina pero no con actina. Al coexpresar P6 con P9-1, P6 se relocaliza a los cuerpos de inclusión citoplasmáticos formados por P9-1, de menor tamaño pero mayor número, dispersos en todo el citoplasma. Además, P6 colocaliza con la proteína de cápside externa P10 y parcialmente con la proteína no estructural P7-2 y con tubulina. A su vez, P10 colocaliza completamente con tubulina y con el RE. Este trabajo propone a P6 como componente minoritario de viroplasma, que es reclutado hacia las inclusiones formadas por P9-1, y que a su vez podría reclutar otras proteínas virales (P7-2 y P10) y celulares (tubulina) hacia los VIBs. Por su parte, la proteína de cápside externa podría utilizar la red de microtúbulos y el sistema de membranas del retículo endoplásmico para el movimiento de partículas virales en la célula (Maroniche y col., 2012).

Para los reovirus vegetales, tanto los estudios sobre el ciclo de infección como sobre la formación de los viroplasmas han sido mejor descriptos para el RDV (género *Phytoreovirus*). En un trabajo de Wei y col. del año 2006, se demostró que la proteína no estructural Pns12 es esencial para la formación de los viroplasmas y de los complejos de ensamblado virales (Wei y col., 2006b). Mediante estudios inmunohistoquímicos en células del insecto vector en cultivo se determinó la aparición de viroplasmas a las 6 horas posinfección. Los mismos contienen las proteínas no estructurales Pns6 (proteína de movimiento, con actividad ATPasa y capacidad de unión a ácidos nucleicos), Pns11 (con capacidad de unión a ácidos nucleicos) y Pns12 (fosforilable), siendo esta última capaz de formar estructuras tipo VIBs al ser expresada en células sin infectar. En la región interna de los viroplasmas se identificaron las proteínas del “core” P1 (RdRp), P3 (mayoritaria del “core”), P5 (posible guanilil transferasa) y P7 (con capacidad de unión a ácidos nucleicos). En contraste, en la periferia de los viroplasmas se ubican las proteínas P2 (proteína fusogénica involucrada en la transmisión entre células del insecto vector), P8 (proteína mayoritaria de cápside externa) y P9 (proteína minoritaria de cápside externa), así como partículas virales completas. A partir de estos resultados se postuló que las partículas virales se comienzan a producir en el interior de los viroplasmas mientras que el ensamblado ocurre en la periferia. Además, los viroplasmas son los sitios de síntesis de ARN viral, y el número de viroplasmas disminuye a lo largo del curso de la infección aumentando su tamaño, indicando que los mismos se fusionarían. Los resultados descriptos

para RDV están en concordancia con el modelo de morfogénesis descrito para reovirus animales (Wei y col., 2006b).

En cuanto a los virus pertenecientes al género *Fijivirus*, al comienzo de este trabajo de Tesis se había identificado por inmunodetección la presencia de la proteína P9-1 de RBSDV en los viroplasmas de plantas e insectos (Isogai y col., 1998a). En el año 2008 se determinó que esta proteína posee capacidad intrínseca de autointeractuar y formar homodímeros *in vivo* e *in vitro*, y que forma inclusiones tipo VIBs en protoplastos de *Arabidopsis* en ausencia del resto de las proteínas de RBSDV (Zhang y col., 2008a). De manera importante en el año 2012, durante el curso de esta Tesis, se resolvió la estructura cristalográfica de P9-1 de RBSDV. En dicho trabajo se determinó que P9-1 forma dímeros y que posee una región carboxiterminal tipo “brazo” (o “C-arm”) a través de la cual los dímeros se unen entre sí, formando tetrámeros que dejan un poro central y que se unen con otro tetrámero por interacciones hidrofóbicas laterales dando lugar a la formación de octámeros cilíndricos (Akita y col., 2012). Se encontró que el “C-arm” es necesario para la formación de inclusiones tipo viroplasmas, ya que al expresar una versión de P9-1 que carece del brazo (P9-1ΔC) no se detectó formación de dichas estructuras. Además, dicha mutante de delección es capaz de formar dímeros pero no octámeros. Los octámeros de P9-1 de RBSDV son cilindros verticalmente elongados, estructuralmente similares a los formados por NSP2 de rotavirus, a pesar de que no existen similitudes en las estructuras primarias y secundarias de ambas proteínas (Akita y col., 2012). Los estudios sobre P9-1 de RBSDV continuaron y en el año 2013 se determinó que P9-1 tiene la capacidad de unir preferentemente y de manera inespecífica ácidos nucleicos de simple cadena. P9-1 une ARNsc mayoritariamente cuando se encuentra en la forma octamérica, y en menor medida, como tetrámero y dímero. Al no formar octámeros, la mutante P9-1ΔC presenta una afinidad disminuida por ácidos nucleicos. En este trabajo además se mapeó la región responsable de la unión a ARNsc entre los aminoácidos electropositivos de ubicados entre los residuos 25 a 44 de la secuencia aminoacídica. Esta región se ubica en el centro del cilindro formado por los octámeros de P9-1 de RBSDV (Wu y col., 2013). Paralelamente, Wang y col. encontraron que P6 de RBSDV es capaz de autointeractuar *in vivo* por doble híbrido de levaduras (Y2H) y por complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) en células de epidermis de *Nicotiana benthamiana*. Además, P6 es capaz de inducir la formación de cuerpos de inclusión tipo viroplasma cuando es expresada sola en epidermis de cebolla. Por otra parte, encontraron que P6 interactúa con P9-1 por Y2H. Sin embargo, en un resultado contrastante con los observados por Zhang y col., 2008a, los resultados de Wang y col. muestran que P9-1 no forma cuerpos de inclusión tipo viroplasmas cuando es expresada en epidermis de cebolla,

mientras que en presencia de P6, P9-1 es redirigida a los cuerpos de inclusión de P6, hecho que los llevó a proponer a P6 como proteína mayoritaria de viroplasma (Wang y col., 2011). Posteriormente, en un trabajo de Sun y col. donde analizan las posibles interacciones de P9-1 con el resto de las proteínas no estructurales de RBSDV por coinmunoprecipitación, encontraron que solo P6 interactúa con P9-1, y que ambas proteínas localizan en las inclusiones tipo VIBs. A diferencia de los resultados de Wang y col., en expresiones transitorias en células de insecto Sf9, P6 se distribuye difusamente en el citoplasma, y es relocada hacia las inclusiones tipo VIBs cuando se coexpresa con P9-1, sugiriendo que P9-1 es la proteína mayoritaria de viroplasma y que P6 es reclutada como un componente minoritario. Finalmente, en ese trabajo encontraron que P6 interactúa con P5 (sin aclarar si se trata de P5-1 o de una posible fusión P5-1/P5-2), y se localiza en las inclusiones tipo VIBs de P9-1 solo cuando es coexpresada con P6, sugiriendo que P5 es reclutada a los viroplasmas por P6 (Sun y col., 2013a).

El SRBSDV fue descubierto como una nueva especie viral en el año 2008 y su genoma se terminó de secuenciar por completo en el año 2010; por lo tanto toda la bibliografía disponible sobre la génesis y maduración de los viroplasmas en este fijivirus es posterior al inicio de esta Tesis y fue publicada principalmente por el grupo de Tayiun Wei. Este grupo publicó en el año 2012 un trabajo realizado en infecciones en células del insecto vector en cultivo, en el cual demostró que la proteína no estructural P9-1 es la proteína mayoritaria de los viroplasmas, ya que es capaz de formar inclusiones tipo VIBs cuando es expresada sola en Sf9. Además, el bloqueo de la expresión de P9-1 mediante ARNs pequeños interferentes inhibe la formación de viroplasmas y la infección viral por SRBSDV. En cultivos de células del insecto vector infectados por SRBSDV, los viroplasmas contienen a P9-1, ARN viral, P10 (proteína de cápside externa) así como partículas virales (Jia y col., 2012a). Posteriormente, se determinó mediante microscopía confocal y electrónica que los viroplasmas de SRBSDV consisten en una región granular en donde se acumula ARN viral y las proteínas no estructurales P9-1 y P6, y en una región filamentosa, en donde se acumula ARN viral, partículas virales incompletas y completas, así como P6 y la proteína no estructural P5 (sin aclarar si se trata de P5-1 o una proteína de fusión P5-1/P5-2; Mao y col., 2013). En ausencia de una infección, P5 forma inclusiones filamentosas, y P9-1 forma inclusiones granulares, sugiriendo que el viroplasma filamentoso está compuesto principalmente por P5 mientras que el granular está compuesto mayoritariamente por P9-1 (Mao y col., 2013). Por su parte, P6 es capaz de autointeractuar y sería reclutada hacia la matriz del viroplasma mediante interacción directa con P9-1 y P5 (Li y col., 2013; Li y col., 2014; Mao y col., 2013).

Debido a la importancia de los reovirus animales en la salud humana y del ganado y a la disponibilidad de modelos experimentales más consolidados, el nivel de conocimiento de los componentes y la dinámica de los viroplasmas es mayor y ha servido como base teórica para el avance en los estudios de otros virus de la familia. En el género *Orthoreovirus*, los viroplasmas presentan una estructura electrodensa filamentosa o globular, que se debe al grado de estabilización de la red de microtúbulos, y que varía según la cepa debido a un cambio aminoacídico de una serina por una prolina en la proteína del “core” $\mu 2$ (Parker y col., 2002). En los virus que forman viroplasmas filamentosos, la red de microtúbulos es más estable que en los globulares por acción de $\mu 2$, y la despolimerización de microtúbulos por acción del inhibidor nocodazol convierte a los viroplasmas “filamentosos” en “globulares”. La proteína no estructural μNS es capaz de inducir la formación de estructuras tipo viroplasmas cuando es expresada en ausencia de otras proteínas del virus, y su apariencia puede ser alterada de globular a filamentosa cuando se coexpresa también $\mu 2$ de un virus “filamentoso” (Broering y col., 2002). Además, se ha observado que la mayoría de las proteínas virales localizan completa o parcialmente con los viroplasmas. Por otra parte, en los viroplasmas también se encuentran partículas virales, ARN viral, así como ubiquitina y los componentes de citoesqueleto microtúbulos y vimentina asociados a estas estructuras (Becker y col., 2001; Becker y col., 2003; Broering y col., 2004; Cashdollar, 1994; Dales y col., 1965; Miller y col., 2004; Sharpe y col., 1982; Silverstein y Schur, 1970).

Los viroplasmas producidos por *Rotavirus* (RV) forman una estructura electrodensa que a menudo se localiza en proximidad con el sistema membranoso del RE (Altenburg y col., 1980). La expresión conjunta de las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 es requerida para la formación de viroplasmas y por lo tanto para la replicación viral (Fabbretti y col., 1999). A su vez, el bloqueo en la expresión de dichas proteínas mediante silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) por ARNs pequeños interferentes (siARNs), “intrabodies” o el uso de mutantes de NSP2 o NSP5, previene completamente la formación de los viroplasmas, la morfogénesis de RV, y la producción de progenie viral infectiva (Campagna y col., 2005; Silvestri y col., 2004; Vascotto y col., 2004). NSP2 y NSP5 coordinan el ensamblado de los viroplasmas y reclutan proteínas virales estructurales como la proteína de “core” interno VP2 y la polimerasa VP1. Los viroplasmas también contienen partículas virales incompletas (con dos de las tres capas de proteína de cápside, llamadas DLPs por “double-layered particles”) que se ubican en la periferia (Altenburg y col., 1980), mientras que se encuentran partículas virales completas (con las tres cápsides, TLPs por “triple-layered particles”) en las membranas del RE asociadas (Petrie y col., 1984). Durante el curso de una infección, los viroplasmas aumentan en

tamaño y disminuyen en número mediante la fusión entre viroplasma cercanos (Eichwald y col., 2004). Además, los viroplasma parecen tener una estructura interna (Altenburg y col., 1980), ya que en el centro se ubica NSP2 y ocasionalmente se observa más claro que la periferia, donde se ubican NSP5 y la proteína de cápside media VP6 (Eichwald y col., 2004; Gonzalez y col., 2000). Esta localización diferencial en el viroplasma podría tener relevancia funcional ya que VP6 se une a la proteína no estructural NSP4, que localiza en el RE y que está implicada en la brotación de las DLPs a las membranas del RE asociadas a los viroplasma (Silvestri y col., 2005). Por lo tanto, la ubicación de VP6 en el exterior de los viroplasma podría reflejar una organización en la maduración del virus desde el interior de los viroplasma hacia el exterior. Sin embargo, esto aún no se ha dilucidado por completo ya que VP6 también forma complejos con ARN viral y NSP2, que como se mencionó antes, se ubican en el centro de los viroplasma (Aponte y col., 1996). NSP2 forma octámeros y tiene actividades de nucleósido trifosfatasa (NTPasa), helicasa, y quinasa de nucleósidos difosfato (Jiang y col., 2006; Taraporewala y col., 1999; Taraporewala y Patton, 2001, 2004). Dentro de los canales que forman los octámeros de NSP2, se encuentran sitios de unión por los cuales compiten NSP5 y ARNsc, regulando posiblemente el balance entre la traducción y la replicación de ARN (Jiang y col., 2006). NSP5 es una proteína que forma oligómeros (Torres-Vega y col., 2000) y tendría un rol central en el ensamblado estructural de los viroplasma así como en el reclutamiento de las proteínas de viroplasma (Contin y col., 2010).

Interacción hospedante-virus

Debido a que los virus son parásitos obligados, el establecimiento de una infección exitosa implica necesariamente la utilización y la interacción con factores y recursos de la célula hospedante. Los virus desarrollaron la capacidad de utilizar la maquinaria de expresión génica de la célula hospedante para producir sus propios ácidos nucleicos y proteínas. Estas interacciones son las que determinan el desarrollo sintomático. Cualquier molécula viral tiene la capacidad potencial de interactuar con algún factor del hospedante y de esta manera interferir con su normal función y por lo tanto producir modificaciones que resulten en el desarrollo sintomático.

En lo que respecta al establecimiento y desarrollo de la infección en plantas, pueden ocurrir dos posibles situaciones en las interacciones entre las plantas y el patógeno viral: en un extremo puede suceder que la planta sea completamente susceptible; en el otro que la planta sea completamente resistente, la acumulación viral es indetectable y no es posible observar

ningún tipo de respuesta en el sitio de infección (Moffett, 2008). Sin embargo, en la mayoría de los casos en que se establece la infección, la situación es intermedia. En esta situación intermedia generalmente se desencadena una respuesta de defensa en la célula que no es suficiente como para detener la replicación del virus y el consecuente establecimiento de la infección. El desenlace de la interacción depende de diversos factores como por ejemplo la eficiencia en el reconocimiento del sistema de defensa vegetal de la molécula viral que desencadena la respuesta, la efectividad de la señal que generalmente se produce en consecuencia y la capacidad replicativa y de dispersión del virus (Moffett, 2008). Entonces, durante el desarrollo de las infecciones virales se establecen diversas interacciones entre el patógeno y el hospedante que inciden positiva o negativamente en el establecimiento de la enfermedad.

Para un virus que es capaz de ingresar, replicar, y moverse de célula a célula en dos hospedantes tan disímiles como las plantas y los insectos, es necesario que su estructura y genoma compactos sean versátiles y multifuncionales para poder adaptarse a cada hospedador. A su vez, cada etapa del ciclo infectivo se encuentra altamente regulada para maximizar la eficiencia del ciclo replicativo. A continuación se detallarán ejemplos específicos de la interacción entre proteínas de reovirus y diversos componentes celulares del hospedante que son necesarios y/o que contribuyen al establecimiento de la infección.

Interacción con el citoesqueleto celular y el sistema de endomembranas

Si bien es posible que el movimiento intracelular de los virus pueda ocurrir mediante difusión controlada a través del citoplasma, las investigaciones sobre el movimiento de virus animales y de plantas se han enfocado en el sistema de membranas y el citoesqueleto del hospedante, ya que estos componentes celulares juegan roles clave en el transporte de vesículas, organelas y macromoléculas dentro de las células. El citoesqueleto del hospedante representa un importante blanco para el éxito de una infección, ya que provee al patógeno de los medios para moverse dentro de la célula, y adaptarse a la morfología, funcionamiento y dinámica celular (Gardet y col., 2006). En el caso de los virus animales, está ampliamente demostrado que tanto la red de microtúbulos como el citoesqueleto de actina están involucrados en el transporte activo durante varias etapas del ciclo infectivo, incluyendo el reconocimiento de los viriones a los receptores para la entrada, la internalización, el movimiento hacia el núcleo, la replicación del genoma viral, el ensamblado de nuevas partículas virales y la salida de la célula (Greber y Way, 2006; Pollard y Cooper, 2009; Radtke y col., 2006). Por su parte, la asociación

entre los virus animales y el sistema de endomembranas está vinculada con la replicación viral y en los últimos años se ha descubierto que esta asociación también está involucrada con el movimiento intracelular (Burckhardt y Greber, 2009; Pierini y col., 2009). Además, existe un número creciente de evidencias del uso de los componentes de citoesqueleto y membranas por parte de virus vegetales (Harries y col., 2010).

Respecto de los reovirus, se encontró que en el curso de una infección por *Rotavirus*, los viroplasmata aumentan en tamaño y van disminuyendo en número, condensándose en la zona perinuclear de la célula. Este proceso involucra a la proteína VP2 para el movimiento y NSP2 para la fusión entre los viroplasmata. Por su parte, la dinámica de movimiento de los viroplasmata requiere de la red de microtúbulos estabilizados por acetilación y de un motor de kinesina, que modula la dinámica y la función de los microtúbulos (Eichwald y col., 2012). Además, se ha demostrado que en una infección por RV, NSP2 induce la despolimerización de la red de microtúbulos en la zona perinuclear, se produce la aparición de gránulos de tubulina que colocalizan con los viroplasmata mediante interacción directa con NSP2 pero no con NSP5. Es posible que la despolimerización de los microtúbulos cause el redireccionamiento de la maquinaria celular inhibiendo el transporte y las funciones potencialmente involucradas en la defensa celular (Martin y col., 2010).

En los reovirus vegetales, se determinó que la red de microtúbulos es necesaria para el transporte y la liberación de partículas virales del RGDV (*Phytoreovirus*) hacia el exterior de la célula del insecto vector (Wei y col., 2009b). Por su parte, y como se mencionó anteriormente, la proteína Pns10 del RDV forma estructuras tubulares que contienen partículas virales e interactúa con la actina celular de las microvellosidades del intestino, formando protrusiones hacia las células vecinas y posiblemente permitiendo el movimiento de célula a célula en el insecto (Chen y col., 2014; Wei y col., 2006a). Como se mencionó previamente, el fijivirus SRBSDV atraviesa la lámina basal del epitelio intestinal hacia los tejidos de musculatura visceral utilizando túbulos compuestos por la proteína no estructural P7-1. Estos túbulos se extienden a lo largo de la musculatura visceral mediante la interacción directa entre P7-1 y actina (Jia y col., 2014).

Interacción con la maquinaria de síntesis proteica

Los virus dependen enteramente de la maquinaria de síntesis proteica celular, y reclutan los ribosomas del hospedante para traducir ARNm virales, de modo que utilizan proteínas virales

que controlan los factores de traducción y las vías de señalización que regulan la actividad de los mismos. Esto no solo asegura la producción de proteínas virales sino que a menudo bloquea la respuesta de defensa del hospedante. Prácticamente cada etapa del proceso de traducción puede ser blanco de proteínas virales (Walsh y Mohr, 2011). A modo de ejemplo, un estudio de transcriptómica de delfácidos infectados por el fijivirus SRBSDV mostró que la infección provoca la inhibición de la síntesis proteica y del metabolismo de aminoácidos (Xu y col., 2012).

Existen numerosos reportes de virus vegetales y animales que utilizan el factor de elongación de la traducción 1 alfa (eEF1A) del hospedante, una de las proteínas más abundantes en los eucariotas (Mateyak y Kinzy, 2010). Sin embargo, no se conoce el rol exacto que cumple eEF1A en la replicación viral ya que puede variar dependiendo del virus. En un trabajo reciente se demostró que una proteína de arroz homóloga al factor de elongación eucariótico 1 α (OseEF-1A) es capaz de interactuar con las proteínas no estructurales Pns6 y Pns10 del *Rice ragged stunt virus* (RRSV, *Oryzavirus*), mediante las técnicas de Y2H y BiFC (Songbai y col., 2013). Pns6 tendría dos posibles funciones: proteína de movimiento (Wu y col., 2010b) y supresora del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS; Wu y col., 2010a). Por su parte, Pns10 sería el componente mayoritario de viroplasma, y cuando se la coexpresa con Pns6 en Sf9, Pns10 recluta a Pns6 hacia las estructuras tipo viroplasma, de manera que Pns6 sería un componente minoritario de viroplasma (Jia y col., 2012b). En el trabajo de Songbai y col. se demostró además que OseEF-1A interactúa con la proteína de viroplasma de SRBSDV P6, y que si bien no presenta interacción directa con P9-1, en presencia de P6, OseEF-1A colocaliza con P9-1. A pesar de que se desconoce la función biológica precisa del eEF1a en el ciclo infectivo de RRSV y SRBSDV, resulta claro que en ambos reovirus el eEF1a es reclutado hacia los viroplasmas donde posiblemente intervenga en la traducción de proteínas virales.

Interacción con el sistema ubiquitina-proteasoma

La degradación de proteínas juega un importante rol en el mantenimiento de la homeostasis celular y determina la vida media y la estabilidad de las proteínas. En este proceso, las proteínas son hidrolizadas y los aminoácidos resultantes son reutilizados para sintetizar nuevas proteínas. Existen diversos mecanismos de degradación de proteínas que se encuentran finamente regulados y cuyos blancos son altamente específicos (Lecker y col., 2006). El mecanismo más ampliamente utilizado es la degradación por el sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS, por sus siglas en inglés). La vía del UPS consiste en acciones concertadas de

enzimas que unen covalentemente cadenas de ubiquitina (Ub) a proteínas, marcándolas para su degradación (Glickman y Ciechanover, 2002; Pickart, 2004). Este proceso de “etiquetado” hace que las proteínas sean reconocidas por el proteasoma 26S, un gran complejo multicatalítico que corta las proteínas poliubiquitinadas en pequeños péptidos (Baumeister y col., 1998). Ub es una proteína de 76 aminoácidos que se encuentra altamente conservada en eucariotas. El proceso de unión covalente de Ub a una proteína, conocido como ubiquitinación, está involucrado en la degradación de proteínas y también en muchas otras vías de señalización importantes para la homeostasis celular (Glickman y Ciechanover, 2002). Este proceso está controlado por tres clases de enzimas que regulan los tres pasos principales (Figura 1.9): 1) activación de Ub a través de la enzima E1, donde Ub es transferida a E1; 2) transferencia de Ub desde la enzima E1 a la enzima E2 que conjuga Ub; y 3) transferencia de Ub desde la enzima E2 hacia la proteína sustrato, proceso en el cual participa el complejo E3 ligasa, que coordina la ubiquitinación actuando como plataforma para las E2 y sus sustratos específicos. El tipo de unión covalente en la cadena de poliubiquitina determina el destino de la proteína sustrato. Las E3 ligasas forman una gran familia de proteínas, y su diversidad es clave ya que determina la especificidad de sustrato para la ubiquitinación. Por lo tanto, constituyen un blanco importante para los patógenos virales (Alcaide-Loridan y Jupin, 2012).

Existen numerosos tipos de E3 ligasas, según la composición de sus subunidades y su modo de acción (Lechner y col., 2006). Las E3 ligasas se pueden clasificar en dos grupos según el tipo de dominio, HECT o RING, y cada uno utiliza distintos mecanismos para transferir la Ub a su sustrato. En particular, las E3 de dominio RING transfieren la Ub directamente a su sustrato desde la E2 (Cardozo y Pagano, 2004). Uno de los complejos mejor caracterizados entre las E3 ligasas tipo RING, es el SCF (SKP1-CUL1-FBP). Esta ligasa posee una subunidad de culina-1 (“cullin-1” en inglés, CUL1), que actúa como una plataforma que interactúa simultáneamente por su extremo amino con el adaptador SKP1 (proteína quinasa 1 asociada a la fase S, o “S-phase-kinase-associated protein-1”) y por su extremo carboxilo con la proteína de RING-finger (RBX1). RBX1 es la subunidad que reconoce a la enzima E2 conjugada con Ub, mientras que SKP1 se une a las proteínas F-box, quienes confieren la especificidad de sustrato a través de un dominio adicional para la interacción con el mismo (Figura 1.9; Gagne y col., 2002; Lechner y col., 2006). El potencial de diversificación de los sustratos blanco de ubiquitinación queda demostrado en el hecho de que el genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para cerca de 700 proteínas F-box (Devoto y col., 2003; Gagne y col., 2002), mientras que en arroz se han identificado unas 680 potenciales proteínas F-box (Jain y col., 2007).

Las proteínas F-box se definen como tales por la presencia de un motivo F-box de unos 40-50 aminoácidos en la región amino terminal, a través del cual interactúan con el adaptador SKP1 del complejo SCF (Cardozo y Pagano, 2004). La región carboxiterminal de las proteínas F-box usualmente presenta dominios de unión al sustrato de diversos tipos, como las repeticiones de Trp-Asp (WD) y las repeticiones de residuos ricos en leucina (LRR) que se unen a sustratos fosforilados (Ho y col., 2006).

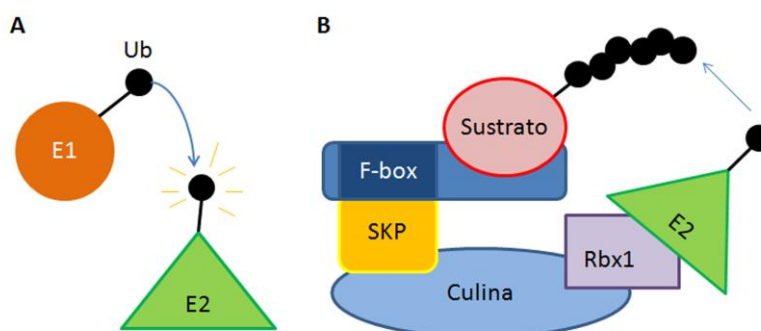


Figura 1.9: Esquema de la ubiquitinación de una proteína sustrato. **A.** La enzima E1 activa la Ub y la transfiere a E2. **B.** La Ub activada es transferida a la proteína sustrato mediante unión a través del complejo E3 ligasa, en este caso SCF, compuesto por una Rbx1 que une a la enzima E2 con la Ub activada, culina, SKP y la proteína F-box que se une con SKP a través de su motivo F-box y con la proteína sustrato.

Muchos virus de plantas explotan el UPS utilizando diversos mecanismos, muy probablemente en su propio beneficio. Se ha reportado que los virus tienen la capacidad de inducir, inhibir, o modificar la especificidad de las enzimas relacionadas con la Ub, en particular las E3 ligasas. Adicionalmente, muchos virus codifican para proteínas que imitan la función de las enzimas de la vía del UPS. Como resultado, se produciría un entorno celular más favorable a la infección viral o bien se inhibiría la respuesta de defensa del hospedante (Alcaide-Loridan y Jupin, 2012).

Un caso particular del uso de la maquinaria del UPS por un *Polerovirus* es la proteína P0. Esta proteína es un supresor del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) y es además una proteína F-box ya que tiene la capacidad de interactuar con SKP1 a través de un pequeño motivo F-box. Al anular este motivo, no solo se bloquea la interacción P0-SKP1 sino que también se reduce la patogenicidad del virus, y se inhibe la actividad supresora del PTGS de P0. El silenciamiento génico inducido por VIGS de SKP1 en *Nicotiana benthamiana* confiere resistencia al virus (Pazhouhandeh y col., 2006).

Recientemente se demostró que la proteína no estructural P7-2 de RBSDV es capaz de interactuar con SKP1 de maíz por Y2H. Asimismo encontraron que esta proteína viral interactúa con las SKP1 de *Arabidopsis thaliana*, *N. benthamiana*, *Oryza sativa* y *Saccharum sinense* (caña; Wang y col., 2013). Este trabajo determinó además que la región α -hélice (H) carboxiterminal de 24 residuos en RBSDV P7-2 es necesaria para la interacción con SKP1. Se desconocen las implicancias biológicas de dicha interacción.

Un estudio de transcriptómica de chicharritas infectadas con SRBSDV mostró que la expresión de los genes que intervienen en la vía del UPS se encuentra disminuida ante la infección (Xu y col., 2012). De forma complementaria en un estudio reciente de los perfiles de microARNs en plantas de arroz infectadas por SRBSDV se observó el aumento de un microARN que tiene como blanco a un ARNm que codifica para la subunidad alfa tipo 1 del proteasoma. El aumento de este microARN no ocurre en tiempos tempranos de infección (3, 9, y 15 d.pi.), pero sí a los 20 d.pi. (Xu y col., 2014).

Es interesante destacar también que se ha demostrado que la proteína de viroplasma $\mu 2$ de los *Orthoreovirus* se encuentra ubiquitinada, y que el grado de ubiquitinación es mayor en los virus que forman viroplasmos globulares respecto de los filamentosos (Miller y col., 2004). Sin embargo, en este trabajo no se determinó el tipo de ubiquitinación, de manera que se desconoce si la ubiquitinación de la proteína de viroplasma actúa como señal para la degradación vía proteasoma o está involucrada en otro mecanismo. Por otra parte, se ha reportado en los últimos años que el proteasoma es esencial para la formación de viroplasmos y la replicación de rotavirus y reovirus aviar. El tratamiento con el inhibidor de proteasoma MG132 en células infectadas con estos virus afecta la síntesis de proteínas virales, la formación de viroplasmos y la replicación del genoma viral. El efecto de inhibición del proteasoma es más marcado en tiempos tempranos de infección, posteriores a la entrada del virus y a la pérdida de la cápside externa (Contin y col., 2011; Chen y col., 2008; López y col., 2011).

Se han identificado diversos motivos peptídicos que actúan como señales para la degradación de proteínas. Entre ellos se encuentran los motivos PEST (Rechsteiner y Rogers, 1996). Estos motivos son secuencias lineales de una proteína ricas en residuos prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T). La existencia de estos motivos, que están presentes en muchas proteínas celulares con una vida media corta, fue reportada por primera vez en el año 1986 (Rogers y col., 1986). Desde entonces se ha demostrado que las proteínas que contienen motivos PEST son de alguna forma reconocidas para ser ubiquitinadas y degradadas vía proteasoma (Rechsteiner y Rogers, 1996). Algunos motivos PEST son constitutivos, aunque

muchos de ellos son señales condicionales cuya activación se encuentra regulada por diversos factores como la exposición a luz, la unión a ligandos específicos como el AMP cíclico, o bien por fosforilación de las serinas y treoninas dentro del motivo, cambios que pueden modificar la estructura de la proteína exponiendo al motivo PEST para que sea reconocido (Rechsteiner y Rogers, 1996).

Los virus no solo manipulan la maquinaria de degradación celular para degradar proteínas celulares, sino que en ocasiones son las propias proteínas virales las que se degradan vía proteasoma. La capacidad de adaptación a su hospedante por parte de los virus es tan versátil que incluso ciertas proteínas virales que se degradan vía el UPS pueden ser reguladas por la presencia de los motivos PEST. Se ha demostrado que la proteína E2 del papilomavirus, componente clave que regula la transcripción viral, la replicación y el mantenimiento de su genoma episomal, posee una señal PEST regulable mediante la fosforilación de dos serinas dentro del motivo (Penrose y McBride, 2000). En ese trabajo se demostró que E2 es ubiquitinada y degradada por el proteasoma. Adicionalmente, mutaciones en los sitios de fosforilación previenen la degradación y provocan un marcado aumento en el número de copias del genoma viral. Se ha propuesto que la activación del motivo PEST ocurre no por reconocimiento de los residuos fosforilados sino por un cambio en la estructura de la proteína debido a la fosforilación de las serinas dentro del PEST que causa la exposición del mismo (García-Alai y col., 2006).

La presencia de motivos PEST en proteínas de virus de plantas fue reportada para los virus *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) y *Potato virus X* (PVX; Héricourt y col., 2000; Karsies y col., 2001; Binaghi, 2012). La polimerasa 66K del TYMV se acumula transitoriamente en células infectadas, y en tiempos tardíos de infección es ubiquitinada y degradada por el UPS, a través de la presencia de un motivo PEST activable por fosforilación (Drugeon y Jupin, 2002; Héricourt y col., 2000). La degradación de esta polimerasa sería un factor limitante durante la infección, y es posible que tanto su ubiquitinación como su degradación por el proteasoma sean importantes para regular la replicación viral (Camborde y col., 2010).

Hasta la fecha, no hay publicaciones disponibles que reporten la presencia de motivos PEST en proteínas de los virus de la familia *Reoviridae*.

La técnica de doble híbrido de levaduras como herramienta para la detección de interacciones proteína-proteína

El doble híbrido de levaduras (Y2H) ha sido ampliamente utilizado para la detección de interacciones entre proteínas virales y ha permitido la identificación de interacciones relevantes para el ciclo de infección (Brückner y col., 2009; Fields y Song, 1989; MacFarlane y Uhrig, 2008), posibilitando por ejemplo la identificación de interacciones entre proteínas que intervienen en la replicación viral y resultan críticas para la formación de complejos de replicación (Goregaoker y col., 2001; Nagy, 2008; Rajendran y Nagy, 2004; Van Der Heijden y col., 2001). Además, esta técnica ha permitido la identificación de autointeracción de proteínas virales que ayudaron a comprender sus funciones biológicas, tales como facilitar la transmisión mediada por un áfido vector (Urcuqui-Inchima y col., 1999), la capacidad de formar las estructuras de los viroplasmos (Li y col., 2014; Maroniche y col., 2010; Wang y col., 2011) o las cápsides virales (Liu y col., 2007), o la habilidad de formar túbulos involucrados en el movimiento célula a célula (Liu y col., 2011; Wei y col., 2006a; Wei y col., 2008), entre algunos ejemplos.

La técnica de Y2H ha sido también muy utilizada para la identificación de interacciones entre proteínas virales y del hospedante (MacFarlane y Uhrig, 2008). Por ejemplo, mediante Y2H y coimmunoprecipitación se demostró que la proteína de cápside externa P2 del RDV interactúa con la proteína de arroz *ent*-Kaurene oxidasa lo que da lugar a una reducción en la biosíntesis de giberelinas que a su vez da lugar a los síntomas de enanismo típicos producidos por este virus (Zhu y col., 2005). Otros ejemplos son las interacciones ya mencionadas entre proteínas de viroplasma de SRBSDV y EF1A (Songbai y col., 2013), o entre RBSDV P7-2 y SKP1 (Wang y col., 2013).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis general

El estudio de las interacciones entre las proteínas del virus de Mal de Río Cuarto entre sí y con proteínas de sus hospedantes, así como la caracterización de los componentes de los viroplasma, nos permitirá identificar interacciones relevantes para el desarrollo de una infección por MRCV, y diseñar en el futuro estrategias biotecnológicas para el control de la enfermedad.

Objetivo general

Avanzar en la comprensión de las bases moleculares del Mal de Río Cuarto, en particular de las interacciones de las proteínas del MRCV entre sí y con proteínas del hospedante que puedan conducir al establecimiento de la infección, al desarrollo de la enfermedad y/o a la aparición de síntomas.

Objetivos particulares

1. Analizar las interacciones de las proteínas de MRCV entre sí y determinar las regiones involucradas.
2. Identificar proteínas virales con capacidad de interactuar con proteínas candidato de plantas e insectos.
3. Identificar proteínas de trigo con capacidad de interactuar con las proteínas virales componentes del viroplasma P6 y P9-1.
4. Analizar la estabilidad de P6 y P9-1 en plantas e insectos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas clásicas de biología molecular

Las técnicas de extracción de ADN plasmídico, digestión con enzimas de restricción, ligación de ADN, obtención de células *Escherichia coli* o *Agrobacterium tumefaciens* químicamente competentes o electrocompetentes y su transformación, electroforesis de ADN en geles de agarosa y de PCR se realizaron según protocolos clásicos (Ausubel, 1999; Sambrook y Russell, 2001). Todas las enzimas de restricción y modificantes fueron obtenidas de New England Biolabs (Estados Unidos) a menos que se indique lo contrario, y se utilizaron según las especificaciones del fabricante. Los reactivos y enzimas para PCR fueron obtenidos en Invitrogen (Estados Unidos). La purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen, Alemania) y las purificaciones de ADN plasmídico de alta calidad para secuenciación o transfección se realizaron con columnas del kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania).

Para el clonado de vectores por métodos tradicionales se emplearon las cepas de *E. coli* DH5 α químicamente competentes o XLI blue electrocompetentes, según el caso. Todos los cultivos bacterianos fueron realizados en medio “lysogeny broth” (LB) líquido (Bertani, 1951) adicionado con el antibiótico de selección adecuado (ampicilina 100 mg/lit, cloranfenicol 25 mg/lit, kanamicina 50 mg/lit ó espectinomicina 100 mg/lit). El medio LB sólido se preparó agregando agar (1,5 g/100 ml).

Previo a la obtención de cada una de las construcciones (vectores de entrada, recombinaciones, mutantes, etc.) y plásmidos utilizados en esta Tesis, los mismos fueron contruados *in silico* con el software Vector NTI 11 Advance (Invitrogen) para comprobar que los productos a obtener y sus marcos de lectura resultantes fueran los deseados.

Análisis bioinformático de proteínas

Las predicciones de las regiones “coiled-coil” y potencialmente desordenadas fueron realizadas con el paquete de herramientas computacionales ELM, el cual comprende los servidores GlobProt e IUPRED (desorden), y el servidor SMART/PFAM (dominios; Dinkel y col., 2012). El desorden predicho dentro de P6 de MRCV también fue analizado con los servidores PSIPRED y DisEMBL (Buchan y col., 2010; Linding y col., 2003a). La predicción de sitios de unión a ARN en una secuencia aminoacídica se realizó con el servidor BindN (<http://bioinfo.ggc.org/>). Las predicciones de localización subcelular de las proteínas fueron realizadas con el servidor

TargetP 1.1 (Emanuelsson y col., 2000) y ChloroP 1.1 (Emanuelsson y col., 1999). La predicción de sitios de puentes disulfuro potenciales se llevó a cabo con el servidor DIANNA (Ferre y Clote, 2005). El análisis de las secuencias de las PMRCVs para la predicción de los motivos PEST fue realizada utilizando el servidor Pestfind (<http://www.es.embnnet.org/Services/EMBnetAT/htdoc/pestfind/>). La predicción de residuos lisina que pueden ser potencialmente ubiquitinados de las proteínas P6 y P9-1 se llevó a cabo con el servidor “UbPred: predictor of protein ubiquitination sites” (Radivojac y col., 2010). El análisis bioinformático para la detección de residuos serina y treonina potencialmente fosforilables dentro de los motivos PEST se realizó con el servidor NetPhos 2.0 (Blom y col., 1999).

Modelado bioinformático por homología de estructuras de proteínas

El modelado por homología para la predicción de la estructura tridimensional de proteínas se realizó utilizando el servidor Phyre²: Protein Homology/analogY Recognition Engine (Kelley y Sternberg, 2009).

Construcción de mutantes de MRCV P6, P7-2 y P9-1

Los vectores de entrada que contienen las secuencias codificantes para las versiones mutantes de P6, P7-2 y P9-1 sin ATG o sin STOP fueron obtenidos por PCR utilizando las versiones salvajes o “wild type” (“wt”) respectivas como templado y oligonucleótidos específicos como iniciadores. Los productos de amplificación fueron purificados y clonados en pCR8/GW/TOPO. Las construcciones mutantes obtenidas de P6, P7-2 y P9-1 y los oligonucleótidos utilizados para las PCRs respectivas se muestran en la Tabla 2.1. Todos los insertos fueron secuenciados y chequeados antes de ser utilizados. La mutante P7-2ΔH fue realizada por Luis de Haro (Tesis Doctoral en curso).

Mutante de	Nombre	Secuencia de iniciadores (de 5' a 3')	Tamaño	Conserva los residuos
MRCV P6	P6RD sin ATG	FW: 5' TCCACCAATTTGACCAACATC 3' RV: 5' TAAGTTTGAATAGCTGACAG 3'	315 pb	1 a 105
	P6ΔDR sin ATG	FW: 5' TCCACCAATTTGACCAACATC 3' RV: 5' CTAAGTTTGAATAGCTGACAG 3'	2051 pb	106 a 788
	P6 C-term sin ATG	FW: 5' GATGTAGAAGATAATTCTCTT 3' RV: 5' TTAGTACGCTTATTCAAGGC 3'	1014 pb	450 a 788
	P6ΔCC sin ATG	FW: 5' TCCACCAATTTGACCAACATC 3' RV: 5' CTATACATTTTCAAAAGCATC 3'	1350 pb	1 a 450
	P6ΔPEST sin ATG	FW: 5' CCAACTCCGATGAAACGTTTT 3' RV: 5' TTAGTACGCTTATTCAAGGC 3'	2220 pb	50 a 788
	P6ΔPEST sin STOP	FW: 5' ATGCCAATCCGATGAAACGT 3' RV: 5' TTCAAGGCTTAACTCCAGAA 3'	2220 pb	50 a 788
MRCV P7-2	P7-2 ¹²⁵⁻¹⁵² sin ATG	FW: 5' GATAGTGAGCGCCACTATGAA 3' RV: 5' AACATCGTCTGCAGCTTGAAA 3'	453 pb	1 a 152
	P7-2 ¹²⁵⁻³⁰⁹ sin ATG	FW: 5' AATATTACTAATTATTGGCGT 3' RV: 5' TCAGAAATTCAGTACTGATT 3'	474 pb	153 a 309
	P7-2ΔH sin ATG	FW: 5' GATAGTGAGCGCCACTATGAA 3' RV: 5' TACATTATACCAGAAATCGAC 3'	855 pb	1 a 287
MRCV P9-1	P9-1ΔCarm sin ATG	FW: 5' GCAGACCTAGAACGGAGAAC 3' RV: 5' TTGCGATATCTTTTCAAATT 3'	936 pb	1 a 313

Tabla 2.1: Mutantes de P6, P7-2 y P9-1 contruidos en este trabajo de Tesis. Se indican la región de aminoácidos que conserva la proteína mutante así como características de los oligonucleótidos empleados (FW: “forward” y RV: “reverse”) para su amplificación y tamaño del amplicón esperado. RD: región desordenada. C-term: región carboxiterminal. CC: dominio “coiled-coil”. Carm: “brazo” C-terminal.

Obtención de mutantes de delección mediante la técnica de “PCR splicing”

Para la obtención de la mutante **P9-1ΔPEST sin ATG** que carece de los aminoácidos 142 a 153 de P9-1 se utilizó la técnica de “PCR splicing” (Heckman y Pease, 2007). Esta técnica permite mutagenizar de manera específica de sitio mediante la extensión de segmentos génicos solapados por PCR. En un paso inicial de PCR se producen dos productos de amplificación solapados de una secuencia (A y B, Figura 2.1), los cuales se usan mezclados como templado para un nuevo paso de PCR. El esquema de trabajo se indica en la Figura 2.1. En un paso inicial se obtuvieron dos productos de amplificación utilizando los iniciadores “Forward A” (5' GCAGACCTAGAACGGAGAAC 3') y “Reverse A” (5' TAGTTCACGAACGATGTTTCTTCTTGTTT 3') por un lado, y por otro “Forward B” (5' GAACAAGAAGAAAACATCGTTCGTGAACTA 3') junto con “Reverse B” (5' TTAAAGGATTTAATGTCAGC 3'). **P9-1ΔPEST sin STOP** se obtuvo utilizando P9-

1ΔPEST sin ATG como templado pero con los iniciadores “Forward A con ATG” (5’ AATGGCAGACCTAGAACGGA 3’) y “Reverse B sin STOP” (5’ AACGTCTAATTTCAAAGAAGA 3’).

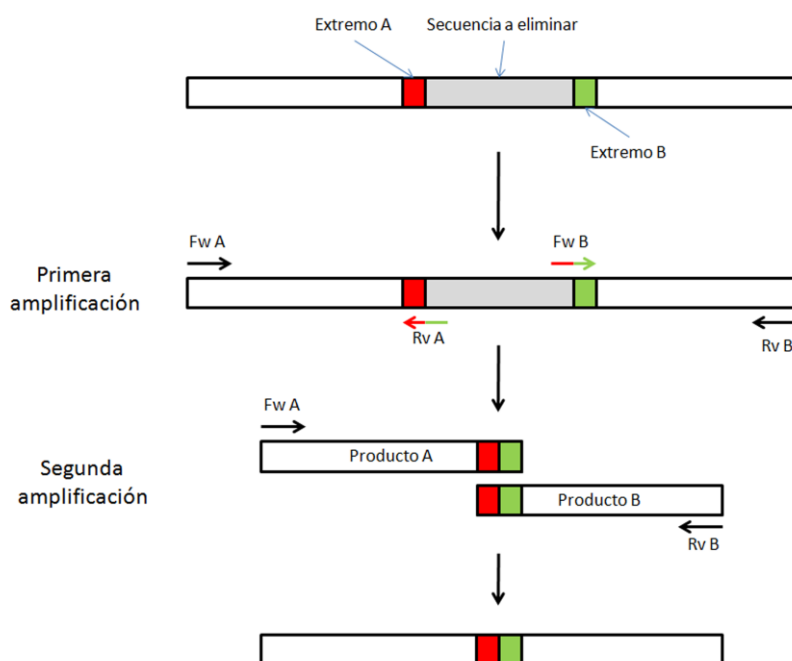


Figura 2.1: Esquema de la técnica “PCR Splicing”. Se diseñan oligonucleótidos específicos en base a las secuencias que están en los extremos de la región a eliminar (extremos A y B). En una primera ronda de amplificación, se realizan dos PCR independientes, una con los oligonucleótidos “Forward A” (Fw A) y “Reverse A” (Rv A), y otra con Fw B y Rv B, para obtener los productos de amplificación A y B. En una segunda ronda de amplificación, se mezclan cantidades equimolares de A y B con los oligonucleótidos Fw A y Rv B, para obtener el producto final que carece de la región que se deseaba eliminar.

Materiales utilizados

Las moscas *Drosophila melanogaster* fueron gentilmente cedidas por la Dra. Fernanda Ceriani, (Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires).

Las hojas de cebada fueron provistas por el grupo dirigido por el Ing. Alberto Prina (Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF), CICVyA, INTA-Castelar, Buenos Aires). Las hojas de trigo de la variedad Buck poncho fueron provistas por el grupo dirigido por el Ing. Antonio Díaz Paleo (IGEAF, CICVyA, INTA-Castelar, Buenos Aires).

Para los ensayos de agroinfiltración se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* de unas 4 semanas de edad, que fueron mantenidas en condiciones estándar de invernadero a 24-26 °C, con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad.

Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó con el reactivo Trizol (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, utilizando como material de partida 100 mg de tejido molido con N₂. El ARN purificado fue resuspendido en 50 µl de agua libre de ARNasas y sometido a un paso extra de purificación, mediante precipitación con 150 µl de una solución de cloruro de litio en una proporción 1:3. La concentración y pureza del ARN fue examinada con un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Estados Unidos) y su integridad fue controlada por electroforesis en gel de agarosa 1,5%.

Síntesis de ADNc

Se partió de 1 µg de ARN que fue tratado con DNasa I para eliminar contaminantes de ADN y utilizados para sintetizar ADNc usando la enzima Superscript III y oligodT, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen).

PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de datos

Las reacciones de RT-qPCR fueron realizadas usando el kit comercial QuantiTec SYBR Green PCR kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y corridas en un sistema ABI7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Estados Unidos) con un programa de temperaturas estándar (1 min. de elongación a 60 °C). Para cuantificar el ARNm de P6 de MRCV se emplearon los oligonucleótidos “P6 qPCR Fw” (5’ TGGAACAGACGCGAACTTTGGT 3’) y “P6 qPCR Rv” (5’ TGGGCAACACAAACCATAAGCG 3’) a una concentración de 200 nM y una dilución 1:20 del ADNc como templado en un volumen final de reacción de 25 µl. A las reacciones del control negativo no se le agregó templado. Como gen de referencia o “housekeeping” para utilización como control interno se utilizó actina y para cuantificar su ARNm se utilizaron los oligonucleótidos ACT Fw (5’ ACGCCAGTGGCCGTACAACA 3’) y ACT Rv (5’ ATCGCGGACAATTTCCCGTTC 3’). Los resultados fueron exportados como datos crudos e introducidos en el software LinReg (Ruijter y col., 2009) para realizar una corrección de línea de base y calcular la eficiencia de amplificación para cada par de oligonucleótidos. La

significancia estadística de las diferencias de Ct entre tratamientos fue calculada usando el test T de Mann-Whitney incluido en el software Graphpad Prism 5.

Amplificación por PCR de las secuencias codificantes de genes de plantas e insectos

Para la obtención de las secuencias codificantes completas para las proteínas de trigo, cebada y *D. melanogaster* candidatas a interactuar con proteínas del MRCV, se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de las secuencias depositadas en GenBank, y se amplificaron por PCR a partir de ADNc de hoja de trigo, cebada, y de mosca completa de *D. melanogaster*. En la Tabla 2.2 se muestran los oligonucleótidos utilizados y los números de acceso GenBank para cada gen. En todos los casos se obtuvieron las secuencias sin ATG y con STOP.

Nombre	Especie	Abreviatura	GenBank	Secuencia de iniciadores (de 5' a 3')	Tamaño
Factor de elongación 1- α	<i>T. aestivum</i>	EF1- α	WHTTEF1X	FW: 5' GGTAAGGAGAAGACTCACATC 3' RV: 5' TCATTCTCTTGATGGCAGC 3'	1341 pb
Aciltransferasa 3	<i>T. aestivum</i>	acT3	AM749044.1	FW: TCGACCACAGAAGCCCAGAGC RV*: TCATGGCAGGTCTCCTTCAT	1305 pb
Aciltransferasa 4	<i>T. aestivum</i>	acT4	AM749045.1	FW: GCGTCGTCGAGCTTCAAGGTG RV*: TCATGGCAGGTCTCCTTCAT	1260 pb
Aldosa 1-epimerasa	<i>T. aestivum</i>	AEP	AK331159	FW: GCGGCTTCTGCACGCTCACC RV: TCAGATAAGTTCAATTTCTG	954 pb
Posible proteína del cinetocoro	<i>H. vulgare</i>	SKP1	AJ277096	FW: 5' GCGGCCGCTGGAGACGCCGGC 3' RV: 5' CTACTCAAAGGCCCACTGGT 3'	528 pb
Proteína A asociada a la quinasa de fase S, variante H	<i>D. melanogaster</i>	SKPA	NM_001038729.3	FW: 5' CCCAGCATCAAGTTGCAATC 3' RV: 5' TTACTTCTCCTCGCACTACT 3'	486 pb

Tabla 2.2. Genes de plantas e insectos seleccionados, características de los oligonucleótidos “forward” (FW) y “reverse” (RV) empleados para su amplificación y tamaño esperado del producto amplificado.

Construcción de vectores utilizando el sistema de clonado Gateway

El sistema de clonado que utiliza la tecnología Gateway (Invitrogen) se basa en la recombinación sitio específica LR del bacteriófago lambda (λ) tal como se indica en la Figura 2.2.

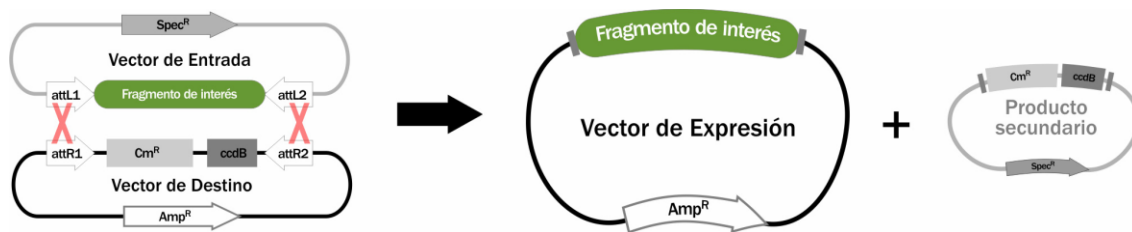


Figura 2.2: Esquema de clonado utilizando la tecnología Gateway. Tomado de Maroniche, 2011.

En este sistema, attL y attR son sitios de recombinación, CmR es un gen de resistencia a cloranfenicol, ccdB es el gen que codifica para la proteína CcdB que inhibe el crecimiento de *E. coli* por interferencia con la ADN girasa, AmpR es un gen de resistencia a ampicilina y SpecR es un gen de resistencia a espectinomicina (estas últimas dos resistencias varían dependiendo del par de vectores de Entrada/Destino que se usen). Mediante este procedimiento, cualquier segmento de ADN clonado en un vector de entrada puede ser transferido de forma rápida y sencilla a uno o más vectores de destino mediante recombinación homóloga entre los sitios attL y attR por acción de las enzimas integrasa (Int), factor de Integración del hospedante (IHF) y escisionasa (Xis), provistas en el kit “LR Clonase II enzyme mix” (Invitrogen). Luego de la reacción, se transforman células de *E. coli* DH5α (o equivalentes) y se seleccionan las bacterias resistentes al antibiótico cuyo gen de resistencia se encuentra en el vector de destino (en el caso del esquema es ampicilina). De esta manera, se obtienen clones que llevan el vector de expresión con el fragmento de interés integrado de manera precisa en el esqueleto del vector de destino (las bacterias transformadas con el vector de destino original no crecen debido a la presencia del gen ccdB; las transformadas con el vector de entrada no crecen debido a la falta de resistencia al antibiótico empleado y las transformadas con el producto residual de la recombinación no crecen por los dos motivos anteriores). Dado que el proceso de recombinación es sumamente preciso, es posible utilizar este sistema para construir fusiones de proteínas siempre que se tenga en cuenta el marco de lectura resultante luego de la recombinación.

Todas las secuencias de genes de interés de plantas e insectos, así como las versiones mutantes de las proteínas del MRCV obtenidas en esta Tesis fueron clonadas en el vector de entrada Gateway pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, y su correcta orientación fue verificada mediante cortes con enzimas de restricción. Los clones seleccionados fueron secuenciados y analizados.

Al inicio de este trabajo de Tesis, el laboratorio contaba con una colección de vectores de entrada pCR8/GW/TOPO que llevan como inserto de interés los marcos abiertos de lectura que codifican para las proteínas no estructurales de MRCV P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P9-1, P9-2 y las estructurales P4, P8 y P10 (Mongelli, 2010). Los mismos fueron desarrollados con codón de iniciación (ATG) y sin codón de terminación (STOP), o sin ATG y con STOP, para ser recombinados de acuerdo al vector de destino utilizado en cada caso.

Para emplear este sistema de clonado, los vectores de destino fueron propagados en bacterias *E. coli* de la cepa DB3.1, las cuales son resistentes a los efectos de la proteína CcdB, y los vectores de entrada fueron construidos amplificando el fragmento de interés por PCR y clonándolo entre los sitios attL1 y attL2 del vector pCR8/TOPO/GW que lleva el gen de resistencia a espectinomicina.

Luego, se llevaron a cabo las reacciones de recombinación mezclando 5-10 ng del vector de destino, 20-50 ng del vector de entrada de interés, 1 µl del reactivo LR Clonase II y completando con buffer TE (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5) hasta un volumen final de 6 µl. Luego de incubar a 25 °C por 5-12 horas, se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5α con 1 µl de la reacción de recombinación.

Técnica de doble híbrido en levaduras

El ensayo de doble híbrido de levaduras (Y2H, por las siglas en inglés para “Yeast Two Hybrid”) es una técnica de biología molecular ampliamente utilizada para detectar interacciones proteína-proteína. Está basada en la activación de uno o varios genes reporteros que dependen de la reconstitución del factor de transcripción de levaduras GAL4. En este sistema, el dominio de activación de la transcripción (AD, por las siglas en inglés de “Activation Domain”) y el dominio de unión al ADN (BD, por las siglas en inglés de “Binding Domain”) de GAL4 se expresan por separado como fusión a las dos proteínas de interés, que se denominan presa (o “prey”) si está fusionada al AD, o carnada (o “bait”) si está fusionada al BD. Si las proteínas de interés son capaces de interactuar, los dos dominios de GAL4 se aproximan físicamente permitiendo la reconstitución del factor de transcripción, el cual a su vez activa la expresión de los genes reporteros. En la Figura 2.3 se muestra un esquema del sistema de doble híbrido “Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System” (Clontech, Estados Unidos) empleado en este trabajo de Tesis Doctoral.

Cepas de levaduras utilizadas

El sistema de Y2H Matchmaker permite la coexpresión de las proteínas de interés mediante el apareamiento de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* haploides y compatibles: la cepa **Y187**, con el tipo sexual MAT α y la cepa **Y2HGold**, de tipo MATa. Ambas cepas crecen en medio rico YPDA (por sus siglas en inglés para “yeast, peptone, dextrose y adenine”; extracto de bactolevadura 10 g/L, bactopectona 20 g/L, sacarosa 20 g/L, hemisulfato de adenina 120 μ g/ml, pH 6).

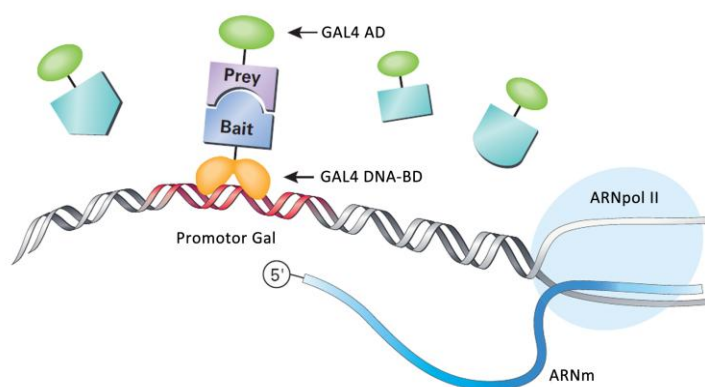


Figura 2.3: Esquema del sistema de doble híbrido de levaduras. Se expresan dos proteínas, una fusionada al dominio BD de unión al ADN del factor de transcripción Gal4 (carnada o “bait”) y la otra fusionada al dominio de activación de la transcripción de Gal4 AD (presa o “prey”). La activación de los genes reporteros ocurre únicamente si las dos proteínas interactúan y acercan físicamente los dominios AD y BD de manera que se restituye la actividad de Gal4. Tomado de Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual (Clontech, 2010).

El sistema consta de cuatro genes reporteros independientes: AUR1-C, ADE2, HIS3, y MEL1, todos regulados por promotores de respuesta a GAL4 (Figura 2.4). El gen reportero **AUR1-C** es una versión mutada dominante del gen AUR1 que codifica para la enzima inositol fosforil ceramida sintasa. Este gen se expresa en la cepa de levaduras Y2HGold en respuesta a las interacciones proteína-proteína que aproximan físicamente a los dominios AD y BD de GAL4. En *S. cerevisiae*, su expresión confiere resistencia a Aureobasidina A (AbA o A), droga que de otra forma resulta altamente tóxica para levaduras. La ventaja de un reportero con resistencia a antibióticos con respecto a un reportero nutricional es que presenta menos actividad basal, facilitando la selección de interacciones positivas. El gen **HIS3** permite a la cepa Y2HGold crecer en un medio sin histidina (His o H) ya que la misma no sintetiza este aminoácido esencial. Cuando carnada y presa interactúan, se activa la expresión del gen His3 en respuesta

a GAL4, permitiendo a la cepa crecer en medio mínimo -His. Y2HGold tampoco tiene la capacidad de crecer en medio mínimo sin adenina (Ade o A). De la misma forma que con HIS3, cuando dos proteínas interactúan, se activa la expresión del reportero **ADE2** y la cepa puede crecer en medio mínimo -Ade. **MEL-1** codifica para una α -galactosidasa, común en muchas cepas de levaduras. Como resultado de las interacciones de Y2H, esta enzima es expresada y secretada al medio, lo que permite la detección de colonias que expresan Mel1 ya que en presencia de un sustrato cromogénico como X- α -Gal las mismas se tornan azules.

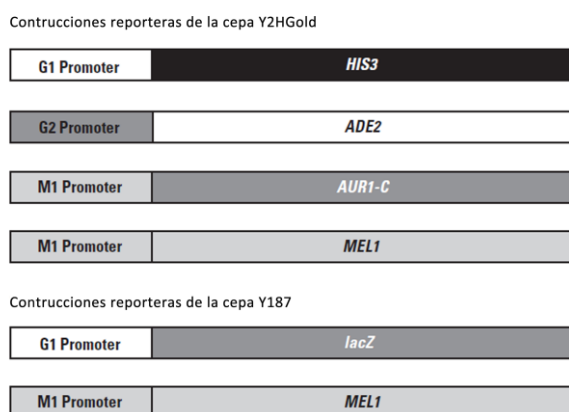


Figura 2.4: Construcciones de los genes reporteros utilizados en las cepas del sistema Matchmaker. En la cepa Y2HGold, los genes reporteros HIS3, ADE2 y MEL1/AUR1-C se encuentran bajo el control de tres elementos promotores de respuesta a Gal4 distintos: G1, G2 y M1, respectivamente. En la cepa Y187 los genes lacZ y MEL1 están bajo el control de los promotores G1 y M1, respectivamente. Los sitios de unión de Gal4 en los promotores difieren entre ellos. Tomado de Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual (Clontech, 2010).

Vectores de expresión en levaduras para Y2H

Las cepas mencionadas fueron transformadas con vectores de destino compatibles con la tecnología Gateway, contruidos por el grupo de Richard Micheltore (Universidad de California, Davis, Estados Unidos) a partir de los vectores pGBKT7 y pGADT7. Los vectores fueron amablemente cedidos por el Dr. Jorge Dubcovsky (Universidad de California, Davis, Estados Unidos). Los mismos son:

pLAW11 (AD, para la cepa Y187): Expresa la proteína de interés (presa) fusionada al extremo carboxiterminal del dominio de activación de la transcripción de GAL4 (AD), resultando la construcción AD:presa. El plásmido posee resistencia a ampicilina (AmpR) para el clonado y

selección en *E. coli*, y el gen LEU2 de la vía de síntesis de leucina (Leu), complementando la auxotrofia de las levaduras por este aminoácido y permitiendo su selección en medio mínimo sin Leu.

pLAW10 (BD, para la cepa Y2HGold): Expresa la proteína de interés (carnada) fusionada al extremo carboxiterminal del dominio de unión al ADN de GAL4 (BD), obteniéndose así la construcción BD:carnada. El plásmido posee resistencia a kanamicina (KanR) para el clonado y selección en *E. coli*, y el gen TRP1 de la vía de síntesis de triptófano (Trp), complementando la auxotrofia de las levaduras por este aminoácido y permitiendo su selección en medio mínimo sin Trp. La coexpresión de los plásmidos se obtiene por apareamiento de las dos cepas haploides, dando como resultado células diploides seleccionables en medio mínimo -Leu-Trp.

Cultivo de levaduras

El manejo de levaduras fue llevado a cabo en condiciones de esterilidad dentro de una cabina de flujo laminar vertical. Los cultivos líquidos de levaduras se incubaron a 28-30 °C con 200 r.p.m. de agitación por 16-20 hs. Los cultivos en placa se incubaron a 28-30 °C por 3 a 5 días, o hasta 13 días para la detección de interacciones. Los medios sintéticamente definidos (SD) son comerciales (Clontech) y la preparación de los mismos se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Preparación de células de levaduras competentes y transformación

Para transformar las levaduras con los plásmidos arriba mencionados, se utilizó el método a pequeña escala de polietilenglicol/acetato de litio (PEG/AcLi), con modificaciones. Una colonia fresca de levaduras (2-3 mm de diámetro) se inoculó en 1 ml de medio YPDA y se incubó entre 16 y 20 horas a 30 °C y 200 r.p.m. de agitación. Luego, se agregó al cultivo 4 ml de medio YPDA fresco y se continuó con la incubación por aproximadamente 4 horas más.

Las levaduras competentes obtenidas en el paso anterior se centrifugaron a temperatura ambiente y 3000 r.p.m. por 4 min, se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 4 ml de agua estéril, se resuspendió el mismo en no más de 700 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) con AcLi 1X (AcLi 0,1 M) y se incubó por 20 min a 30 °C. Por cada transformación se utilizaron 100 µl de la suspensión de células, que fueron alicuotadas en Eppendorfs de 1,5 ml. Se bajaron las células y se resuspendieron en 180 µl de solución PEG/AcLi (PEG 3350 40%, LiAc 1X, 100 µg/ml de ADN de espermatozoos de salmón como "carrier", y 400 ng de plásmido). La

suspensión se vortexeó y se incubó a 42 °C por 40 min. Al cabo de ese tiempo, se centrifugaron las células, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 µl de buffer TE para plaquear. La cepa Y187 transformada con AD:presa se plaqueó en medio SD -Leu-Trp suplementado con triptófano, mientras que la cepa Y2HGold (BD:carnada) se plaqueó en medio SD suplementado con leucina. El medio contiene fuentes de carbono y nitrógeno y todos los aminoácidos esenciales excepto Leu y Trp, que deben ser suplementados de acuerdo a la cepa que se esté seleccionando. También se lo denomina DDO por sus siglas en inglés para “double drop out”. Las levaduras se incubaron a 28 °C.

Ensayo de autoactivación de la transcripción en Y2H

Para descartar falsos positivos, las levaduras de la cepa Y2HGold que expresan las PMRCVs fusionadas al BD fueron plaqueadas e incubadas por 3-5 días a 28 °C en los siguientes medios:

- SD -Trp + X-α-Gal 40 µg/ml
- SD -Trp + X-α-Gal 40 µg/ml + AbA 125 ng/ml

Obtención de cotransformantes y detección de interacciones positivas

La obtención de levaduras diploides que expresan los plásmidos AD:presa y BD:carnada se logró por apareamiento de las cepas haploides que portaban cada plásmido. Para ello, se coinoculó (utilizando un tip estéril) en un Eppendorf de 1,5 ml con 500 µl de medio rico YPD 2X una colonia de Y187 y una de Y2H Gold, expresando las fusiones de interés. Se vortexeó levemente, y se incubó durante aproximadamente 16 hs (“overnight” u O.N.) a 30 °C y con leve agitación (30-50 r.p.m.). Luego se centrifugaron 4 min a 3000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 µl agua estéril o buffer TE. Las levaduras diploides resultantes fueron plaqueadas en forma de gotas de 5 µl y seleccionadas en medio SD-Leu-Trp.

Para seleccionar interacciones positivas, las levaduras diploides obtenidas fueron plaqueadas (también en forma de gotas de 5 µl) en medio SD -Leu-Trp-His-Ade y su crecimiento fue evaluado al cabo de 3-7 días de incubación a 28-30 °C. Este medio mínimo utilizado posee todos los aminoácidos esenciales excepto leucina, triptófano, histidina y adenina (-LWHA). Se utiliza para seleccionar interacciones proteicas positivas ya que permite detectar la expresión de los genes reporteros del sistema Y2H. Para regular el nivel de astringencia de la selección y detectar expresión de solo alguno de los reporteros, se puede suplementar con His o Ade, o

bien aumentar la astringencia agregando Aureobasidina A (60 ó 125 ng/ml) o X- α -Gal (X, 40 μ g/ml). Este medio también es denominado QDO por sus siglas en inglés para “quadruple drop out”.

Controles utilizados en los ensayos de Y2H

Se utilizó el control positivo del kit: pGADT7-T (AD:SV40 T, que expresa el antígeno grande T del *Simian virus 40*) y pGBKT7-53 (BD:p53), mientras que para el control negativo se utilizó el vector AD:T junto con pLAW10 vacío (BD). Además, por cada par de interacción se usó como control negativo los pares AD:presa/BD vacío y AD vacío/BD:carnada.

Relevamiento de una biblioteca de ADNc de hoja de trigo en Y2H con proteínas de MRCV

Biblioteca de ADNc de hoja de trigo en levaduras

La biblioteca de ADNc fue construida y amablemente cedida por el grupo del Dr. Jorge Dubcovsky. La misma se realizó a partir de ARN extraído de hojas de trigo tetraploide *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* cv. Langdon. El ADNc fue obtenido por síntesis con oligo dT, y clonado en el vector pGADT7-Rec, que se utilizó para transformar levaduras de la cepa Y187.

Proteínas carnada para los relevamientos de la biblioteca

La obtención y posterior relevamiento por Y2H de la biblioteca de ADNc utilizando como carnadas BD:P9-1 o BD:P6 se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del fabricante del sistema Matchmaker. Se utilizaron las cepas de Y2H Gold (MATa) que expresan las fusiones BD:P6 y BD:P9-1 previamente obtenidas en la sección Resultados del Capítulo I, utilizando el protocolo ya descrito.

Apareamiento entre la cepa que expresa la biblioteca y la cepa que expresa la carnada

Se procedió con la preparación de un cultivo concentrado de la cepa carnada Y2HGold (BD:P9-1 o BD:P6). Para ello, se inoculó una colonia fresca y grande (2-3 mm) de BD:carnada en 50 ml SD +Leu-Trp, se incubó con agitación (250-270 r.p.m.) a 30 °C hasta alcanzar una $OD^{600} = 0,8$

(16-20hs). Las células fueron centrifugadas a 1000 g por 5 min, se descartó el sobrenadante, y se resuspendieron a una concentración final $>10^8$ céls/ml en SD +Leu -Trp (4-5 ml). Nota: $OD^{600} = 1$ equivale aproximadamente a 3×10^7 céls de levaduras.

A continuación, se combinó la cepa “biblioteca” con la cepa “carnada”. Para ello, se descongeló 1 ml de la cepa “biblioteca” en un baño a temperatura ambiente. Se colocaron 45 ml de medio YPDA 2X + 50 µg/ml kanamicina en un frasco Erlenmeyer de 2 L estéril y se agregaron los 4-5 ml de la cepa “carnada”. La alícuota de la biblioteca fue centrifugada a 1000 g por 5 min, se lavó dos veces con 1 ml de YPDA 2X y se agregó al Erlenmeyer de 2 L. Luego se procedió a incubar a 30 °C por 20-24 hs, agitando suavemente (30-50 r.p.m.), y al cabo de 20 hs se observaron las células al microscopio óptico para buscar aquellas que se hubieran apareado (cigotas), de apariencia trilobulada.

Las levaduras se pasaron a dos Falcons de 50 ml y se centrifugaron por 10 min a 1000 g, mientras que para recuperar las células que hubieran quedado en la pared del frasco de 2 L, se lavó dos veces con 50 ml de YPDA 0,5 X/Kana y se usó ese medio para resuspender el pellet de los Falcons.

Las células se centrifugaron a 1000 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 10 ml de YPDA 0,5 X/Kana. El cultivo fue plaqueado de a 200 µl por cada placa de 150 mm (un total de 55-60 placas) en medio selectivo: para el relevamiento con BD:P9-1 como carnada se plaqueó en medio SD -Leu -Trp + 40 µg/ml X-α-Gal + 125 ng/ml AbA (SD-LW/X/125 ng/ml AbA), mientras que para el caso de BD:P6, el cultivo se plaqueó en medio SD -Leu -Trp -His + 60 ng/ml Aureobasidin A (SD-LWH/60 ng/ml AbA). La Figura 2.5 resume el esquema de trabajo para llevado a cabo para relevar una biblioteca de ADNc por Y2H.

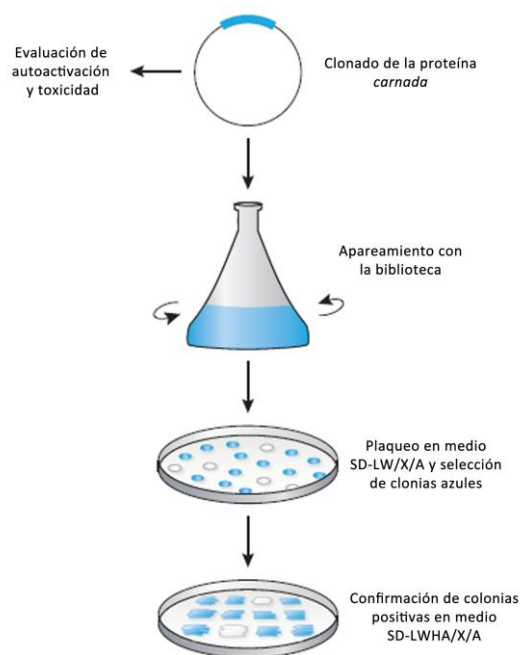


Figura 2.5: Relevamiento de una biblioteca por Y2H. La cepa Y2HGold expresa la fusión BD:carnada, mientras que la cepa Y187 expresa las fusiones AD:ADNc de la biblioteca. Cuando ambas cepas se incuban de manera conjunta, se aparean dando como resultado levaduras diploides que contienen cuatro genes reporteros: HIS3, ADE2, MEL1, y AUR1-C, los cuales son activados en respuesta a las interacciones de doble híbrido. Tomado de Matchmaker™Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual, Clontech.

Confirmación de las interacciones positivas en los relevamientos

Para detectar la mayor cantidad de interacciones positivas posible, primero se plaqueó la biblioteca en un medio de menor astringencia y posteriormente las colonias que crecieron fueron repicadas en otro de mayor astringencia. Para el relevamiento con BD:P9-1 se plaqueó inicialmente en SD-LW/40 µg/ml X-α-Gal/125 ng/ml AbA, y al cabo de 5 días de incubación se repicaron las colonias azules medio SD –LWHA/X/125 ng/ml AbA. Para el relevamiento con BD:P6 se plaqueó primero en SD-LWH/60 ng/ml AbA y se picaron colonias en medio SD –LWHA/60 ng/ml AbA a los 4, 6, 7, 11, 12 y 13 días.

Extracción de ADN de levaduras y amplificación de los insertos por PCR

Se partió de levaduras que fueron estriadas en forma de césped, tomadas con un tip estéril de una superficie de aproximadamente 0,5 cm² (no más de 10 mg de células) y resuspendidas cada una en 100 µl de buffer TE/NaOH 0,02 N, hervidas durante 10 minutos y reservadas en

hielo para la reacción de PCR. Por cada reacción se utilizaron 5 µl de muestra en un volumen final de 50 µl con el programa de ciclado detallado a continuación:

94 °C	10 min	
94 °C	1 min	} x 35 ciclos
50 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

Los oligonucleótidos utilizados en la reacción son los indicados por el fabricante:

Matchmaker 5' AD LD-Insert Screening Amplimer: 5' CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACC 3'

Matchmaker 3' AD LD-insert Screening Amplimer: 5' GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT 3'

Eliminación de clones redundantes

Del volumen total de la reacción de PCR, 5 µl se utilizaron para chequear la presencia y tamaño de banda de cada amplicón en geles de agarosa 0,8%, 15 µl se utilizaron posteriormente en las reacciones de restricción con AluI. Los clones fueron clasificados de acuerdo al patrón de restricción y se descartaron clones de los patrones que estuvieran muy representados, conservando algunos clones de cada patrón. De aquellos clones que fueron seleccionados para secuenciación, el volumen restante de la reacción de PCR (30 µl) fue purificado usando QIAEX II Gel Extraction Kit y secuenciado automáticamente utilizando el iniciador T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGGC 3') que anilla sobre el promotor T7 ubicado río arriba del inserto dentro de la región amplificada, por el Servicio de Secuenciación de ADN por Electroforesis Capilar de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del CICVyA del INTA-Castelar.

Análisis de las secuencias de los clones relevados en la biblioteca de trigo

Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas utilizando la base de datos pública del NCBI (ncbi.nlm.nih.gov), con la herramienta BLASTN mientras que las secuencias aminoácidas deducidas de las nucleotídicas se analizaron por BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias también fueron analizadas por BLASTN de la base de datos de EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org/>) contra el genoma de trigo hexaploide *Triticum aestivum*.

Los alineamientos múltiples de secuencias y construcciones de árboles filogenéticos fueron realizados con los programas AlignX y ContigExpress del paquete VectorNTI de Invitrogen, y con el programa MEGA6 (Tamura y col., 2013).

Aislamiento de los plásmidos que expresan clones de interés y confirmación del doble híbrido

Para la extracción de ADN plasmídico de levaduras se utilizó el protocolo de lisis alcalina que se utiliza para la extracción a partir de *E. coli*, con modificaciones. Se partió de < 10 mg de levaduras (aproximadamente 0,5 cm² de células en placa), se hizo un lavado en 100 µl de agua, y se resuspendió en 200 µl de Buffer Liticasa o Zimoliasa (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, liticasa 60 U/ml, pH 7,5). Se incubó a 30 °C con agitación suave durante 1 hora, y luego se procedió con la lisis alcalina tal como se utiliza para la extracción de ADN plasmídico a partir de *E. coli*. Los plásmidos aislados fueron utilizados para transformar *E. coli*, se extrajo ADN plasmídico de las bacterias y éstos fueron utilizados para reintroducirlos por transformación en la cepa Y187. Luego se evaluó la capacidad de autoactivación de los clones en medio SD -Leu + X-α-Gal 40 µg/ml y SD -Leu + X-α-Gal 40 µg/ml + AbA 125 ng/ml, y se evaluaron las interacciones con BD:P9-1 o BD:P6.

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada

Se utilizó la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, que posee resistencia genómica a rifampicina (100 µg/ml) y a gentamicina (100 µg/ml) conferida por el plásmido pTiC58.

Construcción de vectores de expresión en *Nicotiana benthamiana*

Para los ensayos de expresión por agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*, se recombinaron los vectores de entrada pCR8/GW/TOPO conteniendo P6, P9-1 y sus versiones mutadas P6ΔPEST, P9-1ΔPEST así como TaAEP2C con el vector de destino binario pEarleyGate203, dando como resultado las proteínas de interés fusionadas al epítopo comercial cMyc en el extremo aminoterminal (cMyc:X, Earley y col., 2006). Las construcciones fueron utilizadas para transformar agrobacterias de la cepa GV3101. El vector pEarleyGate203 confiere resistencia a kanamicina (50 µg/ml) para la selección de transformantes.

Agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*

Los cultivos se realizaron en medio LB suplementado con los antibióticos antes mencionados más el correspondiente para cada plásmido utilizado en las transformaciones. Una colonia fresca (incubada en placa por 48 hs) de GV3101 transformada con las diferentes construcciones fue inoculada en 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes e incubada a 28 °C por (16-20 hs), luego se tomaron 10 µl del cultivo, se inocularon en 10 ml de medio fresco y se incubó por unas 20 horas más. Al cabo de ese tiempo, las células se centrifugaron por 15 min a 4000 r.p.m. y 4 °C, y el pellet se resuspendió a una OD^{600nm} de 0,8 en solución MES (MgCl₂ 10 mM; MES 10 mM y acetosiringona 100 µM). Las agrobacterias fueron incubadas a temperatura ambiente por al menos 2 horas previo a la infiltración de la cara abaxial de las hojas de *N. benthamiana*, que se realizó utilizando una jeringa sin aguja.

En los casos de coagroinfiltración, se utilizaron mezclas con partes iguales de los distintos cultivos, de manera que si el cultivo tenía una OD^{600nm} inicial de 0,8, luego de la mezcla la OD^{600nm} final fue de 0,4. Para los casos de agroinfiltración con construcciones que expresan P19, los cultivos se resuspendieron en MES a una OD^{600nm} = 0,4, de manera que luego de las mezclas la OD^{600nm} resultante fue 0,2.

Cultivo celular y transfección de líneas celulares de insecto Sf9

Se sembraron células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (IPLBSF21-AE aislamiento clonal 9) en placas de 6 pocillos (MatTek Corporation, Estados Unidos) usando medio Excell (Sigma-Aldrich, Alemania) suplementado con suero fetal bovino al 2% (GIBCO, Estados Unidos) y los antibióticos estreptomicina (10000 µg/ml), penicilina (10000 U/ml) y anfotericina B (25 µg/ml), e incubadas a 27 °C hasta una confluencia del 60-70%. Las células fueron entonces transfectadas con 1 µg de plásmido purificado con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) usando los reactivos de transfección Cellfectina II (Invitrogen) o X-tremeGENE HP (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez transfectadas, las células fueron incubadas a 27 °C hasta su utilización.

Construcción de vectores de expresión en la línea celular de insectos Sf9

Para expresar proteínas transitoriamente en la línea celular Sf9, las secuencias codificantes para P6 y P9-1 así como para sus mutantes Δ PEST se clonaron en el vector de destino pIB-V5/His-DEST (Invitrogen). Las construcciones resultantes expresan las proteínas de interés fusionadas al epítopo comercial V5/6xHis en el extremo carboxiterminal (X:V5/6xHis).

Análisis de proteínas

Extracción de proteínas a partir de tejidos vegetales

La extracción de proteínas se realizó en base al protocolo de Isogai y col., 1998a. Para ello, se molieron 100 mg de cada de las muestras de tejido de *N. benthamiana* con N₂ en mortero, hasta obtener un fino polvo, y se los resuspendió en 200 μ l de buffer de extracción (KCl 10 mM; MgCl₂ 5 mM; sacarosa 400 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8; glicerol 10%; β -Mercaptoetanol 10 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo o PMSF 2 mM). La mezcla se incubó en hielo durante 10 a 30 minutos y se centrifugó 12000 r.p.m. durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio y se conservó a -80 °C hasta su utilización.

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el reactivo de Bradford (Biorad, Estados Unidos), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Extracción de proteínas de Sf9

Al momento de cosechar las células Sf9 transfectadas, se retiró el medio de cultivo que cubre la monocapa, y la misma fue levantada suavemente por pipeteo con 1 ml de buffer PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,68 mM, NaHPO₂ 16,56 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 6,2). Se centrifugó durante 10 minutos a 10 r.p.m. y 4 °C, se descartó el sobrenadante, y el pellet de células fue resuspendido directamente en 30 μ l de buffer de carga SDS-PAGE 2X, hervido durante 5 minutos y conservado en hielo para su siembra en geles de SDS-PAGE 10%.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

Para detectar la expresión de las proteínas recombinantes, las muestras previamente obtenidas se sembraron en geles desnaturizantes de poliacrilamida (acrilamida 10%) y

separaron por electroforesis. Luego las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond N (Ge Healthcare, Reino Unido) para su detección por “Western blot”. La correcta transferencia de las proteínas a las membranas fue corroborada mediante tinción con rojo Ponceau (Rojo Ponceau 650 mM, ácido acético 1%).

Detección de proteínas por “Western blot”

Las membranas con proteínas fueron incubadas con solución de bloqueo TBS-leche (Tris 25 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5, leche descremada 5%) por 1 hora a temperatura ambiente, y luego incubadas por 16-20 hs con el anticuerpo primario diluido en TBS-leche, luego de tres lavados de 10 min con TBS-Tween20 0,05% (TBST) se incubaron por 2 hs a temperatura ambiente con una dilución en TBS-leche del anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. Luego de 3 lavados de 10 min con TBS se equilibró la membrana en buffer fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM) y para el revelado se incubó con los sustratos BCIP y NBT (Promega, Estados Unidos) en buffer fosfatasa a una concentración final de 0,56 mM y 0,45 mM, respectivamente.

Anticuerpos utilizados

A continuación se detallan los anticuerpos primarios y secundarios utilizados con las diluciones de uso:

- IgG monoclonal de ratón anti-cMyc (Invitrogen). Dilución de uso 1/500.
- IgG monoclonal de ratón anti-V5 (Invitrogen). Dilución de uso 1/500.
- IgG monoclonal de ratón anti-Xpress (Invitrogen). Dilución de uso 1/3000.
- Anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (AP). Dilución de uso 1/5000.
- Anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (AP). Dilución de uso 1/5000.

Ensayos de coimmunoprecipitación a partir de material vegetal

El tejido muestreado fue molido en N₂ y se extrajeron proteínas totales en buffer de extracción coIP [Tris-HCl 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10%, ditiotretol (DTT) 5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas para plantas 1 ml stock/ 100 ml final; Sigma-Aldrich), polivinilpolipirrolidona (PVPP) 2%] en la proporción de 2 g de tejido cada 5 ml de buffer. El extracto se incubó por 10 minutos en hielo y luego se centrifugó por 20 min a 12000 r.p.m. y 4

°C. Se colectó el sobrenadante filtrándolo con gasa. Se cuantificaron proteínas totales por Bradford. El volumen total de la extracción de proteínas (3,5 ml aproximadamente) fue suplementado con Nonidet P-40 0,15%, se agregaron 50 µl de anti-IgG de conejo conjugado con agarosa (Sigma-Aldrich) previamente equilibrada con 3 lavados de buffer fosfato salino (PBS, pH 7,5) y se incubó a 4 °C por 30 min en un agitador orbital. Luego se centrifugó por 15 min a 3000 r.p.m. y 4 °C, y el sobrenadante fue incubado con 50 µl de de IgG de conejo anti-cMyc conjugado con agarosa (Sigma-Aldrich), previamente equilibrado con 3 lavados de PBS y un lavado con buffer de extracción. Al cabo de 30 min de incubación se agregó al extracto 50 ng de proteína His/Xpress:P9-1 purificada de *E. coli* (Maroniche y col., 2010) y se continuó la incubación por 3 hs. Concluido el tiempo de incubación se centrifugó la muestra por 15 min a 3000 r.p.m. y 4 °C, se lavó la agarosa 3 veces con PBS, se resuspendió en 150 µl de buffer de carga SDS-PAGE 2X y se calentó durante 3 min a 100 °C.

Ensayos de expresión en *N. benthamiana* con inhibidores del proteosoma

El inhibidor de proteasoma MG132 (Sigma) fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y coinfiltrado junto con agrobacterias de la cepa GV3101 transformadas con las distintas construcciones a una concentración final de 100 µM. Como control se coinfiltró con DMSO 0,1%.

Cuantificación por imagen de los “Western blot” y análisis estadístico

Las membranas reveladas fueron escaneadas y su imagen digital fue analizada con el programa ImageJ del NIH (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Para la detección de diferencias significativas con el paquete estadístico Infostat, se utilizó la prueba de estadística no paramétrica Kruskal-Wallis con comparación de a pares y se consideraron diferencias significativas cuando el valor p fuera menor a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

Análisis de las interacciones de las proteínas de MRCV

Análisis de las interacciones de las proteínas de MRCV por doble híbrido de levaduras

Con el fin de profundizar en la caracterización funcional de las proteínas virales e identificar posibles interacciones proteicas que puedan ser relevantes durante el ciclo de replicación viral, se evaluaron las posibles interacciones entre diez de las trece proteínas codificadas por el MRCV (PMRCVs), utilizando el sistema de doble híbrido de levaduras (Y2H).

Para obtener las fusiones de las PMRCVs a los dominios de activación (AD) o de unión al ADN (BD) del factor de transcripción Gal4, se recombinaron vectores de entrada Gateway pCR8/GW/TOPO, que contienen las secuencias codificantes de las proteínas no estructurales (NSPs) P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P9-1 y P9-2 de MRCV y las proteínas estructurales (SPs) P4, P8 y P10 sin ATG disponibles en el laboratorio, con el vector pLAW11 para obtener las fusiones al AD y con el vector pLAW10 para lograr las fusiones al BD. Las construcciones obtenidas se denominaron AD:X o BD:Y siendo X e Y las distintas proteínas de MRCV en estudio. Se excluyó del estudio a las proteínas P1, P2 y P3 debido a que el laboratorio no dispone de los ORFs respectivos clonados (Mongelli, 2010).

Con las construcciones AD:X y BD:Y obtenidas se transformaron levaduras de la cepa Y187 (con las construcciones AD:X) y Y2HGold (con las construcciones BD:Y), y las transformantes fueron seleccionadas en medio SD -Trp y SD -Leu respectivamente, e incubadas por 3 días a 28 °C.

Con el fin de descartar posibles falsos positivos, es importante evaluar si las proteínas en estudio son capaces de activar la transcripción de los genes reporteros del sistema Y2H en ausencia de su par de interacción, es decir si por sí mismas se comportan como dominio de activación de la transcripción cuando están fusionadas al BD. Si este fuese el caso, las proteínas deben ser descartadas para los ensayos de Y2H. Cuando una proteína de interés no presenta autoactivación, las levaduras crecen en medio SD -Trp + 40 µg/ml X-α-Gal (SD-W/X) sin dar coloración azul, mientras que no son capaces de crecer en medio SD -Trp + 40 µg/ml X-α-Gal + 125ng/ml AbA (SD-W/X/A). En cambio, si la fusión al BD activa genes reporteros por sí misma las levaduras crecen también en medio SD-W/X/A, dando coloración azul en ambas condiciones. Se evaluó entonces si las fusiones de las PMRCVs al BD eran capaces de conferir activación de la transcripción de los genes reporteros por sí solas. Para esto, se plaquearon las levaduras Y2HGold que expresan las PRMCVs fusionadas al BD y se incubaron a 28 °C por 3-5 días en medio SD-W/X y SD-W/X/A. Se encontró que las levaduras transformadas con las construcciones BD:P4, BD:P5-1, BD:P5-2, BD:P6, BD:P7-1, BD:P8, BD:P9-1, BD:P9-2 y BD:P10 crecieron en medio SD-W/X sin dar coloración azul y fueron incapaces de crecer en SD-W/X/A,

indicando que no tienen capacidad de autoactivación y que pueden por lo tanto ser utilizadas para el estudio de las interacciones proteína-proteína por Y2H. Por el contrario, las levaduras transformadas con la construcción BD:P7-2 presentaron autoactivación ya que fueron capaces de crecer en el medio SD-W/X/A con una fuerte coloración azul. Por lo tanto, esta fusión debió ser descartada de los análisis posteriores de Y2H.

A continuación se propuso determinar qué región de P7-2 contiene la capacidad de conferir autoactivación. Para ello se construyeron dos versiones mutantes de P7-2 conteniendo los primeros 152 residuos (P7-2¹⁻¹⁵²) o los últimos 157 residuos (P7-2¹⁵³⁻³⁰⁹), y se las evaluó para autoactivación. Como se muestra en la Figura 3.1, se determinó que la región responsable de activar la transcripción de los genes reporteros en el sistema Y2H se encuentra en los primeros 152 residuos de P7-2. Por esta razón, los análisis posteriores de interacción entre P7-2 y el resto de las proteínas virales se realizaron utilizando la fusión AD:P7-2 y BD:P7-2¹⁵³⁻³⁰⁹.

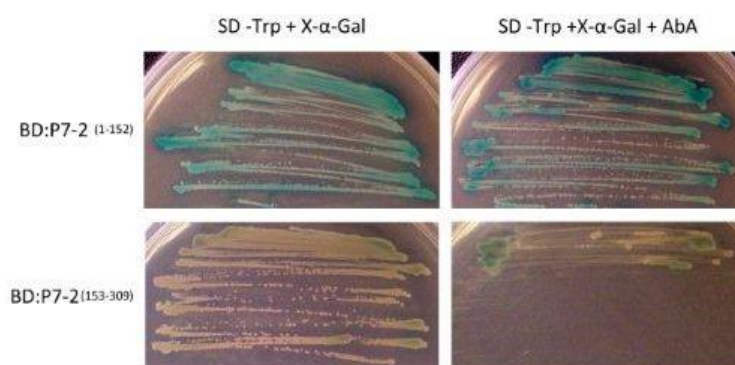


Figura 3.1: Análisis de la autoactivación de MRCV P7-2 en Y2H. La mitad aminoterminal de P7-2 es responsable de la autoactivación. Las cepas de Y2HGold que expresan las fusiones a BD de las mutantes de P7-2¹⁻¹⁵² o P7-2¹⁵³⁻³⁰⁹ fueron evaluadas en medio SD -Trp con X-α-Gal y en presencia o ausencia del antibiótico aureobasidina (125 ng/ml AbA), para detectar la activación de los genes reporteros AUR1-C y MEL1 en ausencia del par de interacción fusionado al AD.

El hecho de que P7-2 mostrara capacidad de autoactivación al estar fusionada al BD por su extremo N-terminal, sugiere que P7-2 por sí misma actúa como un dominio de activación de la transcripción en el contexto de la infección viral. Esta hipótesis es también apoyada por los resultados de nuestro grupo que indican que P7-2 se localiza ocasionalmente en el núcleo de células de insecto Sf9 cuando es expresada con el extremo N-terminal libre (P7-2:GFP, Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2012). En concordancia con estos resultados, recientemente se demostró que tanto GFP:P7-2 como P7-2:GFP se localizan en núcleo y

citoplasma de protoplastos de trigo, y en ocasiones la localización es exclusivamente nuclear (Saavedra Pons, 2012).

Muchos virus codifican para proteínas de localización nuclear que regulan la transcripción y que juegan roles importantes en el ciclo infectivo. Casi todas estas proteínas poseen actividad intrínseca como activadores o represores transcripcionales y están involucradas en la regulación de la expresión del genoma viral y/o de genes celulares lo que resulta en la facilitación de la replicación viral y/o en un impedimento total o parcial de la respuesta celular antiviral. Para los retrovirus y varios virus de ADN tal como los herpesvirus y adenovirus, se han identificado proteínas nucleares que actúan como reguladores de la transcripción virales; algunos no solo regulan la expresión temporal del genoma viral sino que también pueden modificar y/o dirigir la maquinaria transcripcional de la célula en beneficio del virus (Cann, 2005; Webster y col., 1988; Weissman y col., 1998). Por otra parte, muchos virus de ARN cuya replicación ocurre en el citoplasma de la célula también codifican para proteínas nucleares reguladoras de la transcripción y que pueden interferir con la transcripción celular (Hiscox, 2003). En el caso del fijivirus RBSDV, se ha demostrado que la proteína minoritaria del “core” P8 es un represor transcripcional y forma homodímeros, como muchos factores de transcripción (Liu y col., 2007a).

De manera complementaria a los ensayos de localización celular en Sf9, nuestro grupo demostró que la expresión de P7-2 a partir de un vector viral recombinante provoca un aumento de síntomas en plantas de *N. benthamiana*. Este aumento en la patogenicidad no se debe a un aumento en el título viral ya que en la infección por el vector viral recombinante con P7-2 el título viral fue menor respecto del vector vacío (Mongelli, 2010). Los determinantes de patogenicidad son aquellas moléculas de un patógeno involucradas directamente en el establecimiento y/o desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Es posible especular entonces que el rol de P7-2 como determinante de patogenicidad podría residir en su capacidad de actuar como dominio de activación de la transcripción, alterando la normal regulación de genes celulares o reprimiendo la respuesta de genes de defensa de la planta. Será necesario continuar con los estudios sobre P7-2, su posible función en el núcleo celular así como determinar si tiene actividad reguladora de la transcripción en sistemas vegetales o de insectos para poder confirmar esta hipótesis.

Se prosiguió luego a analizar la interacción de las distintas proteínas virales entre sí y consigo mismas por Y2H, evaluando todas las posibles combinaciones de pares de las proteínas de MRCV seleccionadas por Y2H. Para ello, se aparearon las distintas cepas haploides Y187

transformadas con AD:X con las cepas haploides Y2HGold transformadas con BD:Y y se seleccionaron levaduras diploides que coexpresan las distintas combinaciones en medio SD -Leu-Trp. En paralelo se evaluaron las interacciones creciendo las levaduras diploides en el medio selectivo de interacción SD -Leu-Trp-His. Los cultivos fueron incubados a 28 °C por 5 a 10 días para la detección de interacciones. Como control positivo de interacción se utilizó el par AD:T/BD:p53, mientras que como controles negativos se utilizó el par AD:T/BD así como cada proteína de MRCV fusionada al AD o BD sin su correspondiente par de interacción (AD:X/BD o AD/BD:Y).

Tal como se indica en la Figura 3.2, de las cien combinaciones posibles, solo se encontró interacción evidenciada por el crecimiento de las levaduras en medio SD -Leu-Trp-His para las combinaciones P6/P6, P6/P9-1, P9-1/P9-1 y P9-2/P9-2. No se observó crecimiento en AD:T/BD ni en los casos con AD o BD vacíos. Todos los ensayos de Y2H fueron repetidos al menos tres veces, y para todos los casos (exceptuando el control positivo) siempre se observó mayor crecimiento de las levaduras que expresan el par AD:P9-1/BD:P9-1, sugiriendo que la unión de P9-1 consigo misma es más estable o más fuerte que el resto de las interacciones detectadas, o bien que las fusiones de P9-1 al AD o BD se expresan más abundantemente.

Estos resultados de Y2H demostraron que P9-1 interactúa consigo misma *in vivo*, y forman parte de un trabajo de nuestro grupo publicado en el año 2010 en donde se demostró que P9-1 es la proteína mayoritaria del viroplasma (Maroniche y col., 2010).

Por su parte, las interacciones encontradas por Y2H entre P6 consigo misma y con P9-1 están en concordancia con resultados de nuestro grupo que mostraron que cuando se expresa P6 fusionada a GFP en células de insecto Sf9 forma inclusiones perinucleares (para las que se requeriría autointeracción) y es redirigida hacia los cuerpos de inclusión formados por la proteína mayoritaria de viroplasma P9-1 (para lo cual se requeriría de la interacción P6/P9-1), y sugieren que dichas colocalizaciones son resultado de interacciones directas proteína-proteína. En conjunto, estos resultados nos permitieron postular que P6 es un componente minoritario de los viroplasmas de MRCV que reclutaría otras proteínas virales y del hospedante a los sitios de replicación y ensamblado viral (Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2010).

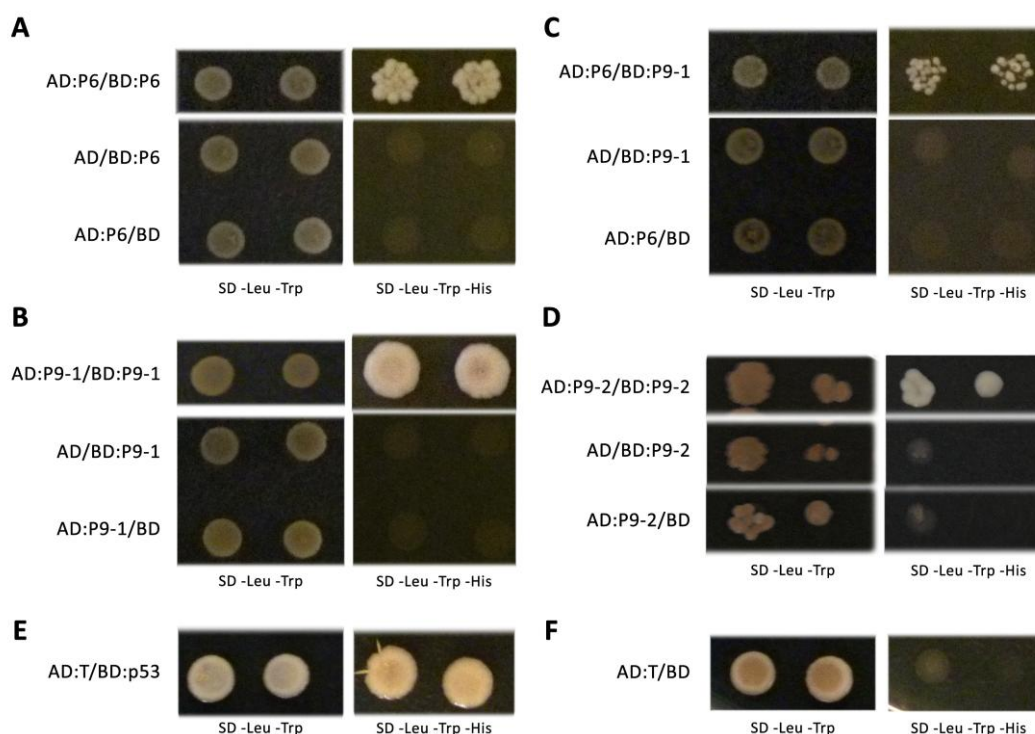


Figura 3.2: Interacciones positivas detectadas entre las PMRCVs evaluadas. Las levaduras doble transformantes se seleccionaron en medio SD -Leu-Trp, y las interacciones fueron evaluadas creciendo a las levaduras en medio SD -Leu-Trp-His a 28 °C por 5 a 10 días. Como control negativo se utilizó cada proteína fusionada al AD o BD sin su correspondiente par de interacción. P6 interactúa consigo misma (A) y con P9-1 (B). P9-1 (C) y P9-2 (D) interactúan consigo mismas. E. Control positivo. F. control negativo.

La capacidad de P9-1 de autointeractuar *in vitro* e *in vivo* y de formar dímeros ya había sido reportada para la contraparte del RBSDV (Zhang y col., 2008a). Posteriormente, en el año 2012 se publicó la estructura tridimensional de P9-1 de RBSDV obtenida por cristalografía, y se determinó que esta proteína forma dímeros que se ensamblan con otros dímeros formando estructuras octaméricas (Akita y col., 2012). Durante el curso de este trabajo de Tesis y en concordancia con nuestros resultados se demostró además que la proteína P9-1 del SRBSDV es el constituyente mayoritario de los viroplasmata ya que forma estructuras citoplasmáticas tipo viroplasmata en ausencia de otras proteínas virales, y que su expresión es necesaria para el establecimiento de una infección (Jia y col., 2012a). En el año 2014 fue demostrada su capacidad de autointeractuar *in vivo* por Y2H (Li y col., 2014).

Respecto de las interacciones P6/P6 y P6/P9-1, al momento de realizados los ensayos para este trabajo de Tesis, no existían publicaciones de nuestro conocimiento que reportaran dichas interacciones en otros fijivirus. Sin embargo, posteriormente fue reportado para los virus

RBSDV y SRBSDV que sus P6 también son capaces de interactuar consigo mismas y formar cúmulos citoplasmáticos cuando son expresadas solas, así como también se mostró que P6 es un componente minoritario de los viroplasma ya que interactúa con P9-1 y en su presencia es relocalizada hacia las inclusiones tipo viroplasma de P9-1 (Mao y col., 2013; Sun y col., 2013a; Wang y col., 2011).

Finalmente, los resultados de Y2H muestran que P9-2 es capaz de interactuar consigo misma *in vivo*. El estudio de esta proteína fue continuado y nuestro grupo demostró que P9-2 es una proteína de membrana *N*-glicosilada y que cuando es expresada de forma transitoria en células de insecto altera la morfología de la membrana plasmática, causando la aparición de numerosas extensiones membranosas que colocalizan con actina, sugiriendo que podría estar involucrada en el movimiento célula a célula en el insecto vector (Maroniche y col., 2012). El trabajo de esta Tesis constituye el primer reporte de nuestro conocimiento en donde la proteína codificada por el segundo ORF del S9 de un *Fijivirus* es capaz de interactuar consigo misma.

Como se mencionó en la Introducción, los viroplasma son los sitios de replicación y ensamblado de nuevas partículas virales, y en ellos se encuentran proteínas virales estructurales y no estructurales, además de ARN viral y componentes celulares del hospedante. Por eso, al evaluar los resultados obtenidos por Y2H de las interacciones de las proteínas estructurales P4, P8 y P10 así como de las proteínas no estructurales P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P9-1 y P9-2, se esperaba detectar más interacciones. Por ejemplo, antecedentes de nuestro grupo muestran que P6 colocaliza con la proteína de cápside externa P10 y con la proteína no estructural P7-2 (además de hacerlo con P9-1 como ya se mencionó) en células Sf9 (Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2012). Sin embargo, no se encontraron interacciones entre P6 y P10 o P7-2 utilizando la técnica de Y2H. Esto podría deberse a que la colocalización depende de proteínas del hospedante, a que los niveles de expresión de P10 o P7-2 en levaduras no fueron suficientes para evidenciar la interacción, a que se trata de una interacción débil que no pudo ser detectada por medio de esta técnica, o a que efectivamente estas proteínas no interactúan por Y2H a pesar de que colocalizan *in vivo*. En SRBSDV, la proteína de cápside externa P10 colocaliza con el viroplasma fibrilar formado por P5-1, que a su vez colocaliza con P6 (Mao y col., 2013). En concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, en el caso de RBSDV no se encontró interacción entre P6 y P10 mediante ensayos de BiFC en Sf9 (Sun y col., 2013a). Por otra parte, en los últimos años se demostró que la proteína no estructural P5-1 de RBSDV y SRBSDV (en ocasiones llamada también P5) es un

componente de los viroplasmas, y es capaz de interactuar con P6 por Y2H y BiFC en *N. benthamiana* y Sf9 (Li y col., 2013; Mao y col., 2013; Sun y col., 2013a). Si bien es factible que P5-1 de MRCV interactúe con P6 durante una infección, esto aún no ha podido ser demostrado ya que no se encontró interacción entre P5-1 y P6 utilizando la técnica de Y2H en este trabajo de Tesis. Cabe señalar que las diferencias en cuanto a la interacción de P5-1 con P6 por Y2H (que es positiva para SRBSDV y RBSDV y negativa para MRCV) podrían deberse a diferencias en la estructura y actividad de P6 que es la proteína más variable del genoma viral. Como se mencionó en la Introducción (Tabla 1.3) la identidad entre P6 de MRCV y RBSDV, el fijivirus más cercano evolutivamente, es de tan solo 44,8%. Por su parte la identidad entre P5-1 de MRCV y RBSDV es de 62,8%.

Otra interacción que se hubiera esperado encontrar es la de P7-1 consigo misma ya que esta proteína forma estructuras tubulares en el citoplasma de células de insecto infectadas por RBSDV o SRBSDV. Dichas estructuras contienen partículas virales completas y estarían involucradas en la dispersión del virus en el insecto (Isogai y col., 1998a; Jia y col., 2014). Para el caso de SRBSDV se encontró por Y2H que los túbulos se forman por interacción directa de P7-1 consigo misma (Liu y col., 2011). Si bien se desconoce la composición de las estructuras tubulares observadas en infecciones por MRCV (Arneodo, 2003), no se puede descartar que estén formadas por autointeracción de P7-1, proteína que presenta un 61,3% y 61,7% de identidad con sus contrapartes de RBSDV y SRBSDV, respectivamente.

En el presente trabajo también se esperaba encontrar autointeracciones de proteínas estructurales como la cápside externa P10 o la proteína minoritaria del “core” P8. Si bien se desconoce el mecanismo por el cual las partículas virales del MRCV ensamblan la cápside externa, es esperable que P10 que tenga la capacidad de multimerizar, siendo además que para el RBSDV se ha reportado que la proteína homóloga es capaz de interactuar consigo misma por Y2H y de formar trímeros *in vitro* (Liu y col., 2007b) y se trata de una proteína relativamente conservada: la identidad entre P10 de MRCV y RBSDV es del 72,4%. Respecto de P8, es una proteína estructural que posee motivos de unión a nucleósidos trifosfato, y que al ser expresada como fusión P8:GFP en Sf9 localiza tanto en citoplasma como en el núcleo celular, mientras que no se ha podido detectar la expresión de la fusión GFP:P8 (Maroniche, 2011). Es interesante notar que P8 posee una señal monopartita débil de localización nuclear presente entre los aminoácidos 34 y 42 (NKLLKKQKIT) que podría ser responsable de la localización en Sf9, y es posible que en la fusión GFP:P8 dicha señal pueda encontrarse bloqueada. Por su parte la proteína homóloga del RBSDV P8 también tiene localización

nuclear, y actúa como un represor transcripcional, para lo cual es capaz de formar dímeros (Liu y col., 2007a). De acuerdo con esto, en el mismo trabajo se reportó que el dominio responsable de la localización nuclear de P8 de RBSDV también se encuentra en los primeros 40 aminoácidos de la proteína, donde se encuentra una señal de localización nuclear similar a la de una nucleoplasmina. Si bien P8 de MRCV solo comparte un 53% de identidad a nivel de secuencia aminoacídica con su contraparte de RBSDV, no se puede descartar que también posea la capacidad de autointeractuar y de formar dímeros a pesar de que no hayamos detectado dicha autointeracción por Y2H.

Es importante considerar que la ausencia de interacción detectable por Y2H no indica necesariamente que no ocurre interacción. El doble híbrido de levaduras, así como cualquier otro sistema heterólogo de expresión, posee diversas limitaciones a la hora de identificar interacciones positivas: 1) a nivel fisicoquímico, el entorno celular dado por la levadura quizás no es el apropiado para detectar la interacción, 2) presenta baja sensibilidad por lo tanto tiende a detectar solo interacciones de mayor afinidad, 3) se encuentra restringido para estudiar interacciones con proteínas de membrana o con reguladores de la transcripción (como P7-2). En este punto es interesante notar que a pesar de que P9-2 es una proteína de membrana, se pudo detectar interacción consigo misma. 4) El Y2H implica la translocación de la fusión AD:X o BD:Y al núcleo donde queda restringida la interacción; 5) algunas interacciones pueden depender de modificaciones postraduccionales que quizá no ocurren en levaduras; 6) puede haber interacciones que estén mediadas por componentes celulares específicos ausentes en levaduras; 7) el uso de una fusión al AD o BD puede resultar en una proteína truncada o con un plegamiento alterado (Brückner y col., 2009). Por estos motivos resulta necesario complementar los resultados obtenidos en este trabajo con otras metodologías.

A continuación se propuso analizar en profundidad las regiones de las proteínas P6 y P9-1 del MRCV involucradas en las interacciones encontradas en esta Sección.

Identificación de las regiones de P6 involucradas en la interacción P6/P6 y P6/P9-1

P6 es una proteína de 90 kDa de 788 residuos aminoacídicos (Distéfano y col., 2003) con un extenso dominio “coiled-coil” predicho entre los residuos 450 a 650 (Mongelli, 2010). Con el objetivo de profundizar en la caracterización de P6 y detectar regiones que puedan ser relevantes para su interacción consigo misma y con P9-1, se realizaron análisis de predicción de motivos conservados a partir de la secuencia aminoacídica de esta proteína utilizando los

predictores GlobPlot y IUPRED (búsqueda de regiones desordenadas), y el servidor SMART/PFAM (búsqueda de dominios), todos del paquete de herramientas bioinformáticas ELM. Las predicciones indicaron que P6 contiene una posible región desordenada (RD) en el extremo N-terminal que abarca los residuos 1 a 105. Las regiones desordenadas en una proteína se caracterizan por no adoptar una conformación estable en el espacio y a menudo pueden contener motivos lineales funcionales (Linding y col., 2003b).

Para determinar qué regiones de P6 participan en las interacciones entre P6/P6 y P6/P9-1, se obtuvo una serie de versiones mutadas de P6, y se analizó su capacidad de interactuar con P6 y con P9-1 por Y2H. Como se esquematiza en la Figura 3.3, la mutante **P6RD** (“Región Desordenada”) solo contiene la posible región desordenada (aminoácidos 1 a 105) de P6; **P6ΔRD** (“Δ (delta) Región Desordenada”) carece de la región desordenada y conserva los residuos 106 a 788; **P6C-term** conserva la porción C-terminal de P6 con los residuos 450 a 788 dentro de la cual se encuentra el dominio “coiled-coil” predicho y **P6ΔCC** (“Δ (delta) Coiled-Coil”) carece de la región C-terminal que incluye el “coiled-coil” predicho y contiene los residuos 1 a 449 de P6.

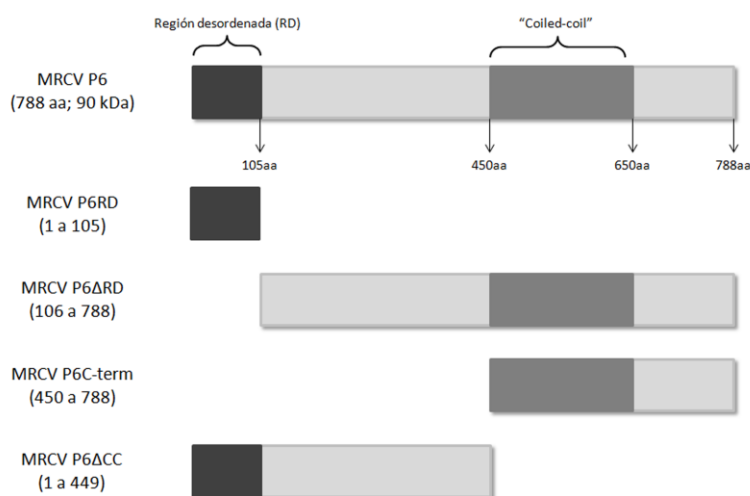


Figura 3.3: Esquema de la proteína MRCV P6 y las versiones mutantes construidas.

Los resultados de Y2H indicaron que la interacción de P6 consigo misma y con P9-1 no depende de la región desordenada ya que la mutante P6RD no fue capaz de interactuar ni con P6 ni con ninguna de sus versiones mutadas, así como tampoco con P9-1 (Figura 3.4 A). Por su parte, P6ΔRD interactuó consigo misma, con P6C-term, con P6 completa y con P9-1 (Figura 3.4

B). De igual manera, P6C-term también fue capaz de interactuar con P9-1, P6, P6ΔRD y consigo misma (Figura 3.4 C).

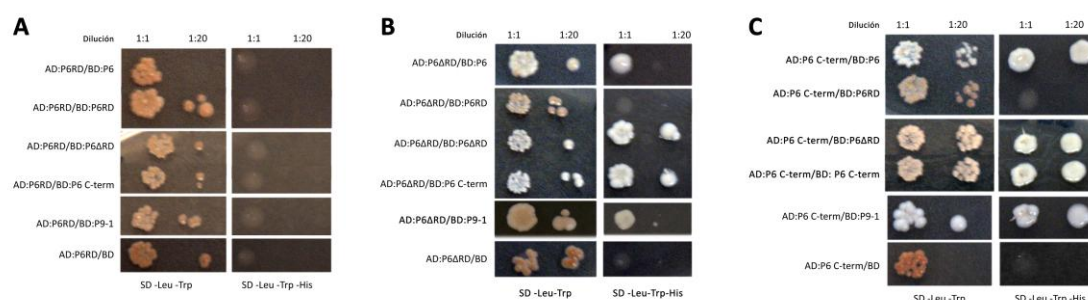


Figura 3.4: Análisis de la interacción de P6 y sus mutantes de delección entre sí y con P9-1 por Y2H. **A.** P6RD no interactúa con P6 ni sus mutantes y tampoco con P9-1. **B.** P6ΔRD interactúa con P6 y sus mutantes excepto P6RD, y con P9-1. **C.** P6C-term interactúa con P6 y sus mutantes excepto P6RD, y con P9-1. Las levaduras doble transformantes se seleccionaron en medio SD -Leu-Trp, y las interacciones fueron evaluadas creciendo a las levaduras en medio SD -Leu-Trp-His a 28 °C por 5 a 10 días. Se plaquearon dos diluciones (1:1 y 1:20). Como control negativo se utilizó cada proteína fusionada al AD con BD vacío.

De manera complementaria, se propuso evaluar la capacidad de P6 para interactuar consigo misma y con P9-1 utilizando la mutante P6ΔCC. Se evaluó entonces su capacidad de interacción consigo misma, con P6 o con P9-1 por Y2H. Se encontró que la mutante P6ΔCC no es capaz de interactuar con P6, con P9-1 ni consigo misma (Figura 3.5). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el dominio “coiled-coil” de P6 es responsable de la capacidad de P6 de autointeractuar y de interactuar con P9-1.

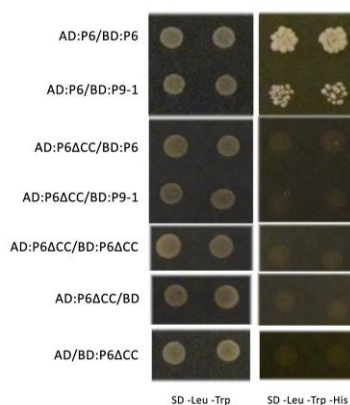


Figura 3.5: Análisis de interacción de P6ΔCC con P6, P9-1 y consigo misma. P6 completa es capaz de interactuar consigo misma y con P9-1 pero la mutante P6ΔCC no presenta interacción con P6, P9-1 ni

consigo misma. Las levaduras doble transformantes se seleccionaron en medio SD -Leu-Trp, y las interacciones fueron evaluadas creciendo a las levaduras en medio SD -Leu-Trp-His a 28 °C por 6 días. Como control negativo se utilizó P6ΔCC fusionada al AD o BD sin su correspondiente par de interacción.

En conjunto estos resultados sugieren que la porción C-terminal de P6 que posee los residuos 450 a 788 es necesaria y suficiente para que ocurra interacción entre P6/P6 y P6/P9-1, probablemente mediada por el dominio “coiled-coil” predicho. De manera complementaria, la ausencia de dicha región anula por completo la interacción con P6 y con P9-1. Por otra parte, la región predicha como desordenada (RD) no parece ser necesaria para la interacción de P6 consigo misma ni con P9-1, ni parece alterar la estructura general de P6 ya que su ausencia no impide las interacciones, mientras que la mutante que solo posee la RD no es capaz de interactuar ni con P6 ni con ninguna de las otras versiones mutadas.

La proteína P6 del RBSDV también posee capacidad de interactuar consigo misma y con P9-1, y en un trabajo publicado en el año 2011 se mapearon las regiones involucradas en dichas interacciones (Wang y col., 2011). En dicho trabajo se demostró que la región central de P6 comprendida entre los aminoácidos 395 a 659 es necesaria para la interacción consigo misma y que abarca una región entre los residuos 400 a 675 con baja similitud al dominio ATPasa del mantenimiento estructural de proteínas cromosomales (SMCs). Se decidió analizar la secuencia de la P6 de RBSDV utilizada en ese trabajo con el predictor de dominios SMART (Letunic y col., 2015) y se encontró, de manera análoga a lo encontrado para MRCV, que la región 549-669 de P6 de RBSDV tiene predicho un dominio “coiled-coil”. Por lo tanto es posible que tanto P6 de MRCV como de RBSDV interactúen entre sí y con P9-1 a través de sus motivos “coiled-coil”. A pesar de que solo comparten un 44,8% de identidad aminoacídica, estos resultados avalan la hipótesis de que las estructuras y funciones de las proteínas homólogas entre estos dos fijivirus se encuentran conservadas.

Los dominios “coiled-coil” constituyen uno de los principales motivos de oligomerización de proteínas y su característica distintiva es la presencia de un patrón de repeticiones de héptadas de residuos no polares que constituyen la interfase de unión con otras proteínas (Burkhard y col., 2001). Los virus también utilizan estos dominios para mediar homooligomerizaciones así como interacciones con otras proteínas. Por ejemplo, la proteína asociada al virión VAP del *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) interactúa con la proteína de movimiento de este virus a través de su “coiled-coil” (Stavolone y col., 2005) y la proteína yb

del *Barley stripe mosaic virus* (BSMV), que es un determinante de patogenicidad viral, autointeractúa a través de su “coiled-coil” (Bragg y Jackson, 2004).

Luego de identificada la región de P6 necesaria para las interacciones encontradas, se realizó un análisis similar con la proteína P9-1.

Modelado de la estructura tridimensional de MRCV P9-1 por homología

Como se mencionó en la Introducción, en un trabajo publicado en el año 2012 se obtuvo la estructura de la proteína P9-1 de RBSDV por análisis cristalográfico. Se determinó que, al igual que MRCV P9-1, esta proteína forma dímeros y que además posee una región carboxiterminal de 24 aminoácidos tipo “brazo” (“C-arm”, residuos 345 a 368) que se extiende hacia el dímero vecino, permitiendo la unión de grupos de cuatro dímeros mediante interacciones hidrofóbicas laterales que resultan en la formación de octámeros cilíndricos con un poro central. De manera interesante, la delección de este “C-arm” resulta en la ausencia de inclusiones tipo viroplasma (Akita y col., 2012).

Nuestro grupo había mapeado la región de P9-1 necesaria para la formación de los cuerpos de inclusión tipo viroplasmas (“VIB-like”) en la mitad carboxiterminal de la proteína (residuos 155 a 337; Maroniche y col., 2010). Para refinar este resultado y determinar si MRCV P9-1 también posee un “C-arm” equivalente en su función al de RBSDV, se comenzó por realizar un modelado por homología de MRCV P9-1 utilizando el servidor Phyre². A partir de la secuencia aminoacídica de MRCV P9-1 (número de acceso GenBank ADD71691) se obtuvo un modelo completo tridimensional basado en la homología con RBSDV P9-1 [Número de acceso a la Base de Datos de proteínas (PDB): c3vjjA], que se muestra en la Figura 3.6. El 85% de los residuos de la secuencia de MRCV P9-1 pudieron ser modelados con un grado de confianza mayor al 90%, incluyendo la región “C-arm” que se puede observar claramente separada del resto de la proteína. Cabe recordar que la identidad entre ambas proteínas es del 64,5%.

Los octámeros de P9-1 de RBSDV son capaces de unir ARN en mayor medida que los dímeros y los residuos que intervienen en la unión a ARN se sitúan en la superficie del poro central del cilindro del octámero. Al prevenir la formación de octámeros, la delección del “C-arm” da lugar a una menor afinidad de unión a ARNsc. A su vez, los residuos 25 a 44 de P9-1 presentan un motivo de unión a ARN, que se ubica en la región interior central de los cilindros formados por los octámeros. Mutaciones en los aminoácidos 25 a 44 anulan por completo la capacidad de unión a ARN (Wu y col., 2013). Utilizando el servidor BindN que predice sitios de unión a ARN

en una secuencia aminoacídica, se encontró que P9-1 de MRCV también presenta motivos de unión a ARN entre los residuos 25 a 32 y 41 a 44. Es posible entonces que la capacidad de P9-1 de unir ácidos nucleicos descrita originalmente por nuestro grupo (Maroniche y col., 2010) resida en dicha región.

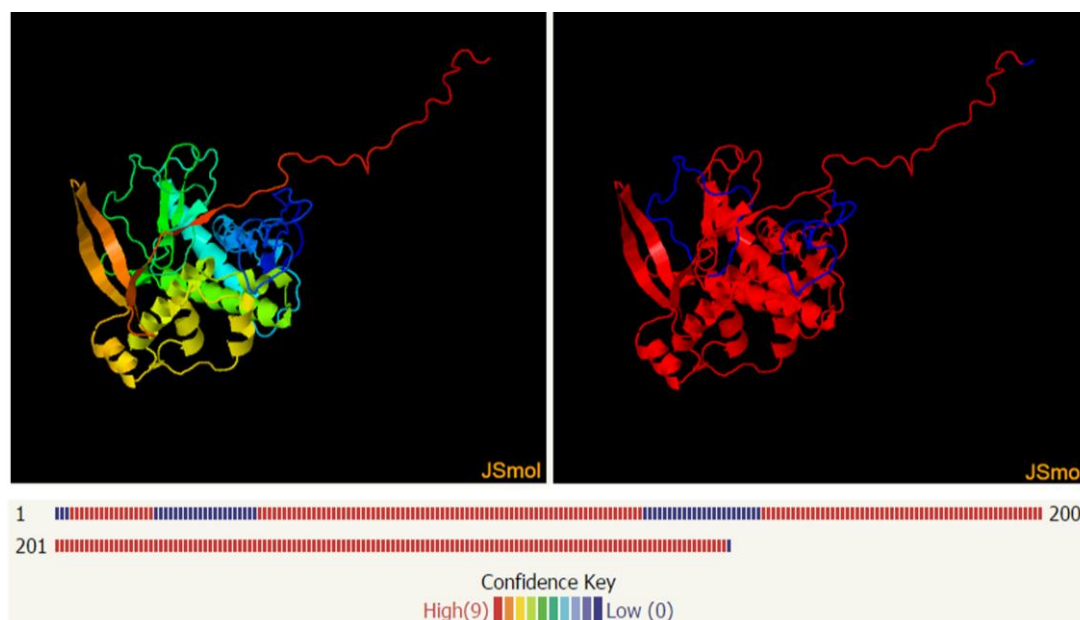


Figura 3.6: Modelado por homología de MRCV P9-1 con el servidor Phyre². En el panel izquierdo superior se muestra la estructura predicha de P9-1 de MRCV con los colores del arco iris indicando el extremo N-terminal en color azul y el C-terminal en rojo. En el panel superior derecho se muestra la estructura con el color rojo indicando el grado máximo de confianza de predicción y en azul los residuos cuya estructura no fue predicha con confianza. La estructura del “C-arm” fue predicha con el nivel máximo de confianza. En el panel inferior se esquematiza el nivel de confianza para cada residuo de la secuencia lineal.

Rol del brazo C-terminal de MRCV P9-1 en la interacción con P9-1 y P6

Para determinar si el brazo ubicado en el extremo carboxilo de MRCV P9-1 interviene en la formación de dímeros, se construyó la mutante P9-1ΔC-arm (residuos 1 a 313) que carece de los últimos 24 aminoácidos que conforman el brazo C-terminal, y se evaluó por Y2H su interacción con P9-1, con P6 y con sus versiones mutantes. Los resultados mostraron que P9-1ΔC-arm fue capaz de interactuar con P6 y con las mutantes P6ΔRD y P6C-term, pero no con P6RD (Figura 3.7 A), indicando una vez más que la interacción entre P9-1 y P6 ocurre siempre que la porción C-terminal de P6 con el “coiled-coil” está presente, y que el brazo C-terminal de P9-1 no interviene en la interacción P6-P9-1.

Por otra parte, se detectó interacción entre P9-1ΔC-arm y P9-1, pero no entre P9-1ΔC-arm consigo misma, lo que sugiere que para que se formen dímeros de MRCV P9-1 al menos uno de los dos monómeros debe contener un “C-arm” (Figura 3.7 B).

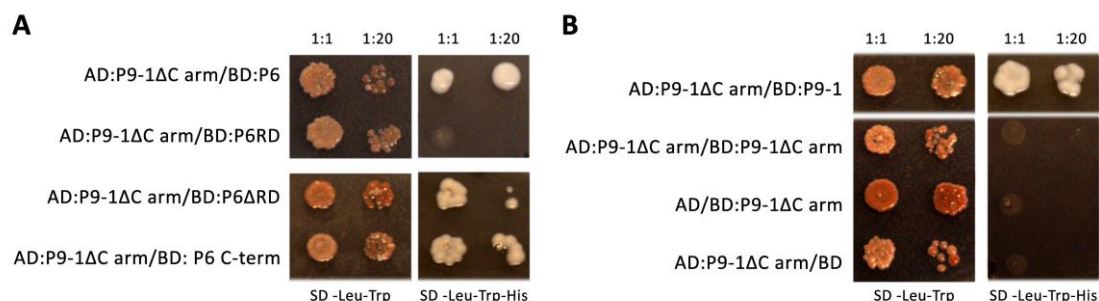


Figura 3.7: Análisis de la rol del brazo C-terminal de P9-1 en la interacción con P6 y con P9-1. **A.** El brazo C-terminal de P9-1 no interviene en la interacción con P6. La mutante P9-1ΔC-arm interactúa con P6 y con las mutantes de P6 que poseen el dominio “coiled-coil”. **B.** Para la interacción de P9-1 consigo misma, al menos una de las dos moléculas interactuantes debe contener un brazo C-terminal. P9-1ΔC-arm interactúa con P9-1 pero no consigo misma.

Los resultados de Y2H obtenidos en este trabajo de Tesis indican que P9-1ΔC-arm es capaz de interactuar con P6 así como con las mutantes de P6 que conservan el “coiled-coil”, indicando que el “C-arm” no está involucrado en la interacción con P6. Por otra parte, si bien P9-1ΔC-arm no pierde la capacidad de interactuar con P9-1 *in vivo*, para que la formación de dímeros ocurra al menos uno de los monómeros debe tener el “C-arm”. Estos resultados coinciden parcialmente con los reportados para RBSDV por Akita y col. 2012, ya que estos autores encontraron que RBSDV P9-1ΔC es capaz de formar dímeros pero no octámeros *in vitro* utilizando proteína recombinante purificada y analizada en solución por cromatografía de filtración en gel (Akita y col., 2012). De acuerdo con ese trabajo, los dímeros de RBSDV P9-1 se ubican de manera que cada monómero “rodea” al otro con su “C-arm”, como se esquematiza en la Figura 3.8, tomada de su publicación.

Dada la similitud estructural entre P9-1 de RBSDV y MRCV, P9-1 de MRCV podría establecer la formación de dímeros mediante interacciones hidrofóbicas como se muestra en la Figura 3.8, pero además el “C-arm” de un monómero podría rodear al otro monómero estabilizando la interacción, de manera que la presencia de un solo brazo sea suficiente para establecer la interacción, mientras que la eliminación de los brazos de los dos monómeros anule la interacción. Por otra parte, si bien el rol del “C-arm” no ha sido evaluado en la interacción con

P6 en RBSDV, se ha reportado que la versión completa de P9-1 es necesaria para unir a P6 (Wang y col., 2011).

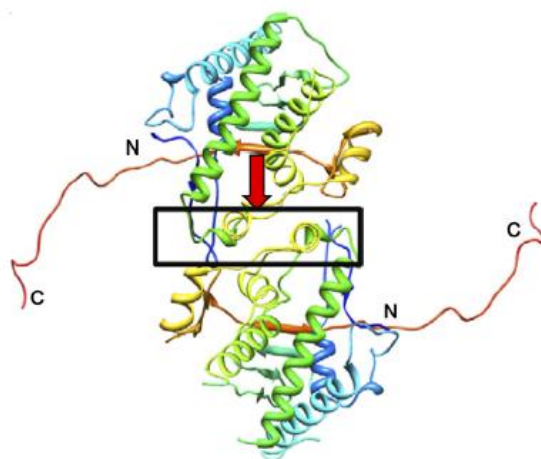


Figura 3.8: Estructura general de un dímero de RBSDV P9-1. La representación muestra la cadena de polipéptidos de RBSDV P9-1 con los colores del arco iris, comenzando en azul desde el extremo N-terminal (N), hasta rojo en el extremo C-terminal (C). El recuadro en negro marca la región donde se establecen las interacciones hidrofóbicas que determinan la formación de dímeros de P9-1. Tomado de Akita y col. 2012.

Respecto del SRBSDV, en un trabajo donde analizan las interacciones *in vivo* por Y2H entre P6/P6, P6/P9-1 y P9-1/P9-1, demuestran que se necesita la proteína P6 completa para la interacción consigo misma, mientras que para la interacción con P9-1 no es necesaria la región entre las posiciones 400 y 675 de P6 que contiene el motivo SMC también predicho para SRBSDV (Li y col., 2014). Al igual que para P6 de RBSDV, hemos detectado que P6 de SRBSDV contiene predicho un motivo “coiled-coil” entre los residuos 581 a 663. Sin embargo, a diferencia de los resultados encontrados en este trabajo de Tesis que indican que la región predicha como “coiled-coil” de MRCV P6 es necesaria para la interacción P6/P6 y P6/P9-1, el “coiled-coil” de SRBSDV P6 no sería necesario para la interacción con P9-1. Por otra parte, la autointeracción de P9-1 de SRBSDV depende de que P9-1 esté completa, mientras que deleciones en los extremos amino o carboxilo (que incluyen el “C-arm”) anulan la capacidad de P9-1 de interactuar con P6 (Li y col., 2014). A su vez, y de manera relevante, la mutante P9-1ΔC de SRBSDV pierde por completo la capacidad de formar inclusiones tipo viroplasma en Sf9 (Jia y col., 2012a).

La capacidad de multimerizar de las proteínas mayoritarias de los viroplasma como P9-1 es sumamente importante para el ciclo infeccioso de un reovirus ya que la formación del

viroplasma es un evento temprano crucial y necesario para el establecimiento de una infección exitosa. Las estructuras octaméricas de las proteínas mayoritarias de viroplasmas se encuentran conservadas en miembros de la familia *Reoviridae* a pesar de que no existe similitud de secuencia o de estructura secundaria evidente. Esta conservación sugiere que la formación de octámeros es clave para el funcionamiento del viroplasma muy posiblemente facilitando la morfogénesis viral (Akita y col., 2012). Además de P9-1 de RBSDV, la capacidad de formar octámeros se encuentra conservada en la proteína NSP2 de virus pertenecientes al género *Rotavirus* (Jayaram y col., 2002), y en P9-1 del *Phytoreovirus* RGDV (Akita y col., 2011).

De manera interesante, las estrategias biotecnológicas dirigidas a impedir o inhibir etapas tempranas del ciclo infectivo previas a la multiplicación viral como las que impiden la expresión de las proteínas mayoritarias de viroplasma, son particularmente efectivas para lograr inmunidad. Por ejemplo en *Rotavirus*, el silenciamiento mediante ARN de interferencia (ARNi) de NSP5 impide la formación de viroplasmas, con consecuencias en el ciclo replicativo: disminución de la síntesis de otras proteínas estructurales y no estructurales del virus, de la síntesis de ARNdc genómico viral y de la producción de nuevas partículas virales (Campagna y col., 2005). Asimismo se ha demostrado que en cultivos de células de insecto infectadas con el fijivirus SRBSDV, el silenciamiento de P9-1 por ARNi inhibe significativamente la formación de viroplasmas y la infección viral (Jia y col., 2012a). En la misma línea, se ha demostrado que las estrategias destinadas a lograr inmunidad en plantas transgénicas son más efectivas cuando se silencian proteínas virales que intervienen tempranamente en el ciclo infectivo como las proteínas mayoritarias del viroplasma, y han logrado conferir resistencia frente a virus de los géneros *Fijivirus* y *Phytoreovirus* (Shimizu y col., 2011a; Shimizu y col., 2012; Shimizu y col., 2011b; Shimizu y col., 2009).

Finalmente, luego de los resultados obtenidos por Y2H se intentó confirmar las interacciones encontradas utilizando el sistema de expresión en plantas de agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*, técnica que ha sido ampliamente utilizada para expresar proteínas en plantas (Kapila y col., 1997). En este sistema, se infiltran agrobacterias que contienen plásmidos capaces de expresar las proteínas de interés en plantas utilizando un promotor constitutivo y fuerte como el 35S del CaMV. Nuestro grupo ha intentado expresar las proteínas del MRCV en la especie modelo *N. benthamiana*, ya sea de manera transitoria (solas, junto con otras proteínas del MRCV o junto con proteínas supresoras del silenciamiento génico) o estable en plantas transgénicas, y los resultados han sido variables pero en general poco satisfactorios: la mayoría de las proteínas codificadas por el MRCV se expresan en niveles muy

bajos o indetectables. En este trabajo de Tesis se ha intentado realizar estos ensayos utilizando distintos vectores Gateway para expresión en *N. benthamiana* de fusiones a lo epitopes cMyc, AcV5 o HA (Earley y col., 2006), a proteínas fluorescentes, y para analizar interacciones proteicas por BiFC (Gehl y col., 2009). Esto ha impedido análisis posteriores, como el estudio de localización subcelular en plantas, la detección de interacciones proteína-proteína, ya sea mediante la técnica BiFC seguida por microscopía confocal, o por coinmunoprecipitación (coIP) seguida por “Western Blot” (resultados no mostrados). Es importante destacar que a diferencia de las dificultades encontradas en este trabajo de Tesis, P6 y P9-1 del SRBSDV pueden ser expresadas en niveles detectables mediante agroinfiltraciones en *N. benthamiana*, de manera que tanto su localización subcelular como las interacciones P6/P6 y P6/P9-1 pudieron ser estudiadas por esta metodología (Li y col., 2014; Songbai y col., 2013). Sin embargo resulta llamativo que en el caso de RBSDV, al analizar las interacciones P6/P6 y P6/P9-1 Wang y col. solo pudieron expresar mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* las versiones mutadas de P6 fusionadas a DsRed, pero no la fusión DsRed:P6 (Wang y col., 2011).

La dificultad para expresar las proteínas del MRCV en *N. benthamiana* se podría deber a que se trata de una especie dicotiledónea, mientras que el MRCV replica exclusivamente en monocotiledóneas. Esta hipótesis está además respaldada por el hecho de que recientemente se ha logrado expresar exitosamente P7-1 y P7-2 de MRCV en protoplastos de trigo (Saavedra Pons, 2012). Sin embargo, el RBSDV y el SRBSDV también replican exclusivamente en monocotiledóneas y esto no ha impedido su correcta expresión en *N. benthamiana*. Cabe aclarar que las diferencias de expresión de proteínas virales en monocotiledóneas y dicotiledóneas no parecen deberse a un uso diferencial de los codones de uso frecuente entre especies hospedantes (Mongelli, 2010; Wang y Roossinck, 2006). Para continuar con los análisis funcionales de las proteínas codificadas por el MRCV resulta necesario entonces poner a punto un sistema modelo apropiado que permita en el futuro confirmar las interacciones encontradas en este trabajo de Tesis.

CAPÍTULO II

Análisis de la interacción de proteínas del MRCV con proteínas candidato de plantas e insectos

Análisis de la interacción de proteínas del MRCV con proteínas candidato de plantas e insectos

En este Capítulo se propuso evaluar posibles interacciones entre proteínas codificadas por el MRCV y proteínas celulares que son candidatas a cumplir importantes roles en la replicación viral, la dinámica de la formación de viroplasmias y el movimiento dentro de la célula, así como proteínas celulares implicadas en la vía de degradación del proteasoma. La relevancia de estos componentes celulares se debe a las funciones que cumplen en infecciones por otros virus vegetales y/o de la familia *Reoviridae* y fue detallada previamente en la Introducción. Se desconocen las proteínas celulares implicadas en el establecimiento de una infección por MRCV. Por lo tanto, se espera que las interacciones proteicas virus-hospedante que se puedan encontrar a lo largo del trabajo presentado en esta Tesis y en este Capítulo en particular, contribuyan a una mejor comprensión de las bases moleculares de la enfermedad de Mal de Río Cuarto, y permitan explorar nuevas líneas de investigación que puedan conducir al desarrollo de herramientas biotecnológicas para su control.

Análisis de la interacción de proteínas de MRCV con componentes del citoesqueleto de insectos

El estudio de localizaciones subcelulares de las proteínas P6, P9-1, P9-2 y P10 fusionadas a GFP en células de insectos (línea celular Sf9 de *Spodoptera frugiperda*) realizado durante la Tesis del Dr. Maroniche (Maroniche, 2011), nos condujo a proponer que dichas proteínas eran candidatas a interactuar con componentes del citoesqueleto. Para comenzar a evaluar esta hipótesis, se decidió analizar la interacción de estas proteínas virales con componentes del citoesqueleto de insectos por Y2H. Para ello, se recombinaron los vectores de entrada pCR8/GW/TOPO con las secuencias codificantes de actina (ACT, HQ008727) y α -1-tubulina (TUB, HQ008728) de *Spodoptera frugiperda* sin el ATG, disponibles en nuestro laboratorio (Maroniche y col., 2011; Maroniche y col., 2012), con el vector de destino de expresión en levaduras pLAW11, para obtener las fusiones al AD de actina (AD:ACT) y tubulina (AD:TUB). Con estas construcciones se transformaron levaduras de la cepa Y187 y las transformantes fueron seleccionadas en SD -Trp luego de incubar a 28 °C por 3 días. Para la obtención de doble transformantes, se aparearon las levaduras Y187 con levaduras Y2HGold transformadas con las construcciones BD:P6, BD:P9-1, BD:P9-2 o BD:P10, que fueron obtenidas previamente en el Capítulo I de este trabajo de Tesis. Las levaduras diploides resultantes del apareamiento fueron seleccionadas en medio SD -Leu-Trp. Las interacciones se evaluaron en medio SD -Leu-

Trp-His luego de 5 a 10 días de incubación a 28 °C. Como se muestra en la Figura 4.1, no se detectaron interacciones entre P6, P9-1, P9-2 y P10 con actina y tubulina de *S. frugiperda* por medio de esta técnica.

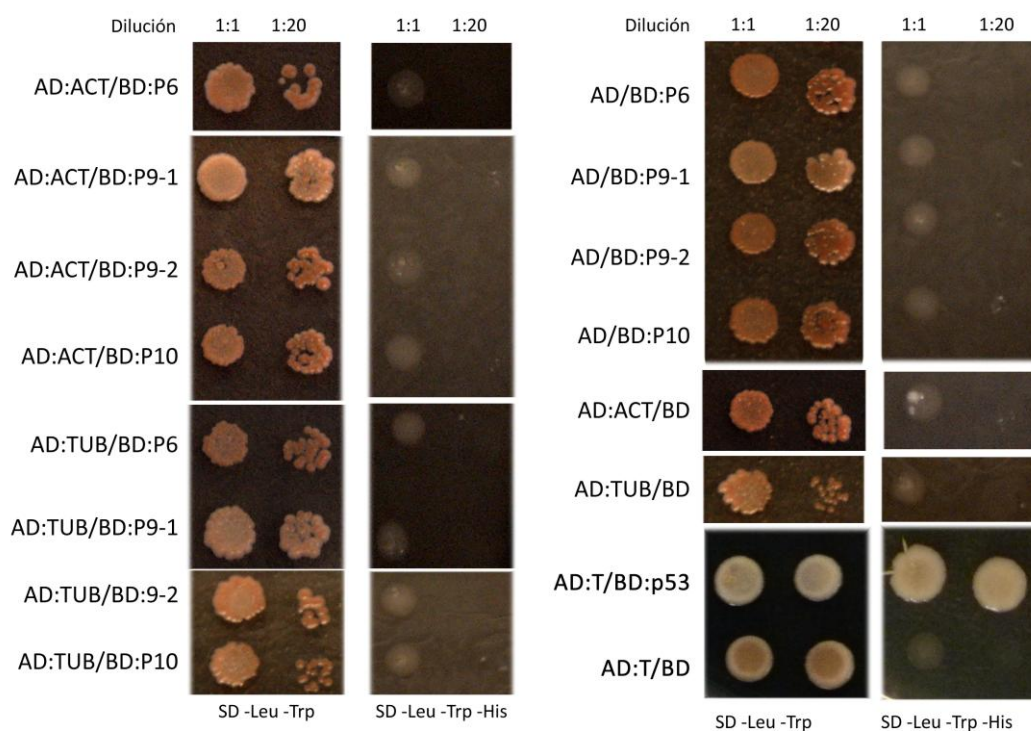


Figura 4.1: Análisis de interacción entre actina (ACT) y α -1-tubulina (TUB) de *S. frugiperda* con las proteínas del MRCV P6, P9-1, P9-2 y P10. Las levaduras doble transformantes se seleccionaron en medio SD -Leu-Trp, y las interacciones fueron evaluadas creciendo a las levaduras en medio SD -Leu-Trp-His a 28 °C por 5 a 10 días, y con dos diluciones (1:1 y 1:20). Control positivo: AD:T/BD:p53. Como control negativo se utilizó AD:T/BD así como cada proteína fusionada al AD o BD sin su correspondiente par de interacción.

A pesar de que estos resultados no fueron los esperados, es posible que las colocalizaciones observadas entre P10 y tubulina, y P9-2 con actina en expresiones transitorias en células de Sf9 (Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2012), no sean producto de interacciones directas y que requieran de otros factores aún no identificados.

Por otra parte, los resultados negativos obtenidos se podrían deber a que la interacción de las proteínas virales con la actina ocurre específicamente con la actina del hospedante y no con actina de otras especies de insectos, aun cuando se trate de una proteína conservada. La actina de *S. frugiperda* comparte un 91% de identidad con una secuencia parcial de actina de *D. kuscheli*, y 91% y 90% de identidad con actina de *Nilaparvata lugens* y *Laodelphax striatellus*

que son las chicharritas vectoras del NLRV y RBSDV, respectivamente. En ese sentido, para el caso del *Phytoreovirus* RDV, se ha demostrado que la proteína Pns10 forma estructuras tubulares e interactúa con la actina celular de las microvellosidades del intestino del insecto vector, formando protrusiones hacia las células vecinas y posiblemente permitiendo el movimiento célula a célula en el insecto (Chen y col., 2014; Wei y col., 2006a). En particular, esta interacción entre Pns10 con actina es altamente específica: en un trabajo del año 2014 se demostró que Pns10 interactúa con la actina citoplasmática de *Nephotettix cincticeps*, el insecto transmisor del RDV y sin embargo no interactúa con actina de *Recilia dorsalis*, una chicharrita cercanamente relacionada que no transmite el virus. De manera interesante, estos resultados condujeron a los autores a postular que la interacción Pns10 de RDV con la actina citoplasmática puede ser responsable de la especificidad de insecto hospedante (Chen y col., 2014). Dado que los ensayos de Y2H realizados en este trabajo fueron llevados a cabo utilizando la actina y tubulina de un insecto no hospedante del MRCV, es factible que en la interacción virus-insecto las proteínas del MRCV solo interactúen con los componentes del citoesqueleto celular de *Delphacodes kuscheli*, y que si bien colocalizan con actina y tubulina de *S. frugiperda* en las células Sf9, no interactúen directamente.

Análisis de la interacción de las proteínas del viroplasma P6 y P9-1 con el factor de elongación de la traducción 1 alfa de trigo

En base a los antecedentes detallados en la Introducción, se propuso analizar la posible interacción entre el factor de elongación de la traducción 1 alfa de trigo (TEF1) con las proteínas de viroplasma P6 y P9-1 de MRCV. Para ello, se amplificó la secuencia codificante de TEF1 de trigo (WHTTEF1X) por RT-PCR a partir de ADNc de *T. aestivum* Buck Poncho. La misma se clonó en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO, y se analizó su secuencia. Se determinó que el producto de amplificación clonado codifica para una proteína con un 96% de identidad con OseEF-1A (Os03g0177400, BAF11059.1), indicando que estas proteínas son muy conservadas en la familia *Poaceae*. Luego se obtuvo la fusión AD:TEF1 por recombinación y se evaluó su capacidad de interacción con las proteínas de viroplasma P6 y P9-1 fusionadas al BD por Y2H. Los resultados indicaron que TEF1 y P6 o P9-1 no interactúan directamente por Y2H (Figura 4.2). Por su parte, el control negativo con levaduras cotransformadas con AD:TEF1/BD presentó un leve crecimiento en medio SD -Trp-Leu-His, hecho que se podría deber a algún tipo de crecimiento inespecífico o a un escape a la selección. Sin embargo esto no fue observado en los casos AD:TEF1/BD:P6 ni AD:TEF1/BD:P9-1.

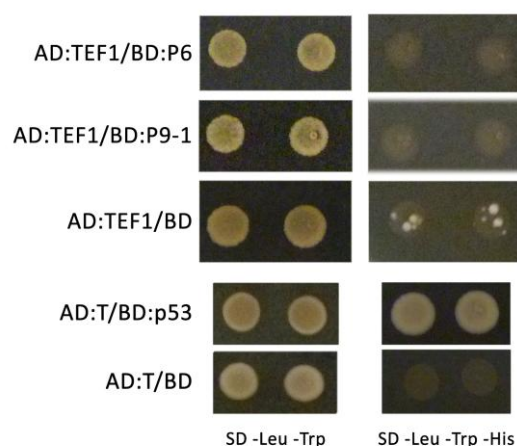


Figura 4.2: Análisis de la interacción entre TEF1 de trigo con las proteínas del viroplasma de MRCV P6 y P9-1 por Y2H. Las levaduras doble transformantes se seleccionaron en medio SD -Leu-Trp, y las interacciones fueron evaluadas creciendo a las levaduras en medio SD -Leu-Trp-His a 28 °C por 6 días. Control positivo: AD:T/BD:p53. Como control negativo se utilizó AD:T/BD así como TEF1 fusionado al AD sin su correspondiente par de interacción.

Los resultados negativos obtenidos se podrían deber al bajo porcentaje de identidad entre P6 de MRCV y sus contrapartes de otros *Fijivirus*. Como fue mencionado anteriormente, P6 es la proteína más variable de MRCV, y posee un 42,5% de identidad con P6 de SRBSDV (Tabla 3.1), mientras que P6 y P9-1 de MRCV no presentan identidad detectable con ninguna proteína de RRSV. Sin embargo, como también se mencionó, si bien muchas de las proteínas mayoritarias que componen los viroplasmata de los diferentes géneros de reovirus animales no muestran identidad de secuencia a nivel aminoacídico, sí comparten propiedades funcionales (Maroniche y col., 2010). Será necesario continuar estudiando el rol del EF1A en infecciones por MRCV ya que llamativamente la expresión de este gen se ve significativamente aumentada en chicharritas infectadas (Maroniche, 2011).

Análisis de la interacción de P7-2 con SKP1, componente del complejo E3 ligasa tipo SCF

Teniendo en cuenta el rol del sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS) en etapas tempranas de la infección con rotavirus (Contin y col., 2011; López y col., 2011) y reovirus aviar (Chen y col., 2008), y que la proteína P7-2 de RBSDV es capaz de interactuar con SKP1 de *Arabidopsis*, *N. benthamiana*, arroz y caña de azúcar (Wang y col., 2013), ambos aspectos desarrollados en la Introducción, se propuso analizar si MRCV P7-2 tiene capacidad de interactuar con la proteína SKP1 componente del complejo E3 ligasa SCF. Para ello se amplificaron las regiones

codificantes de SKP1 de *Hordeum vulgare* (AJ277096.1) y de SKPA de *Drosophila melanogaster* (NM_001038729.3) por RT-PCR a partir de ADNc de hoja de cebada y de moscas enteras. Las secuencias amplificadas fueron clonadas en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO y analizadas por secuenciación.

Se analizaron las secuencias de las SKPs de cebada y mosca, así como también de la SKP1 de maíz utilizada en el trabajo de Wang y col. 2013 y se determinaron los porcentajes de identidad obtenidos utilizando la herramienta BLASTP del NCBI (Figura 4.3 A). El gráfico de similitud se realizó a partir de un alineamiento múltiple de secuencia por ClustalW con el programa AlignX (Figura 4.3 B). La región carboxilo terminal de las SKPs parece estar más conservada, ya que el grado de similitud es mayor que en la región aminoterminal (Figura 4.3 B).

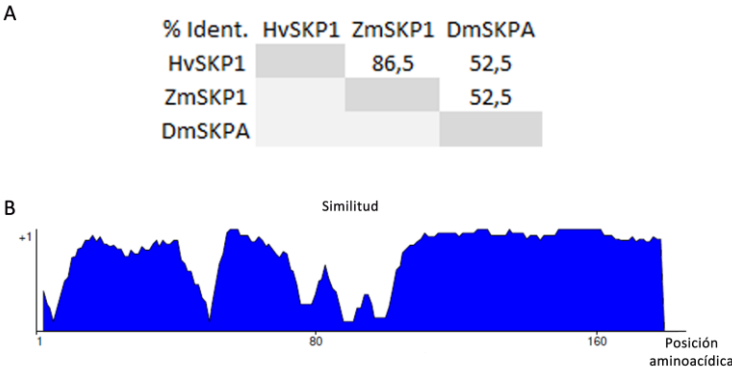


Figura 4.3: Análisis de las secuencias aminoacídicas de las SKP de *H. vulgare* (CAB85491.1), *Z. mays* (ACG31014.1) y *D. melanogaster* (NP_001033818.1). **A.** Tabla comparativa con los porcentajes de identidad aminoacídica entre las tres SKPs analizadas por BLASTP. % ident.: porcentaje de identidad aminoacídica. **B.** Gráfico de similitud entre las secuencias aminoacídicas.

A continuación, las secuencias codificantes de las SKPs fueron subclonadas en los vectores pLAW10 para obtener las fusiones al dominio BD de levaduras y utilizadas para transformar levaduras de la cepa Y2HGold. Por apareamiento con la cepa Y187 que expresa la fusión AD:P7-2 (obtenida en el Capítulo I), se obtuvieron levaduras diploides que coexpresan cada fusión BD:SKP junto con AD:P7-2. Las interacciones fueron evaluadas en medio SD -Leu-Trp luego de 5 a 10 días de incubación a 28 °C. Cabe recordar que P7-2 solo se pudo utilizar fusionada al AD ya que, como se mostró en el Capítulo I, la fusión BD:P7-2 es capaz de activar la transcripción de los genes reporteros en ausencia de su par de interacción. En la Figura 4.4 se presentan los resultados del Y2H, que muestran que P7-2 fue capaz de interactuar *in vivo* tanto con SKP1 de *H. vulgare* como con SKPA de *D. melanogaster*.

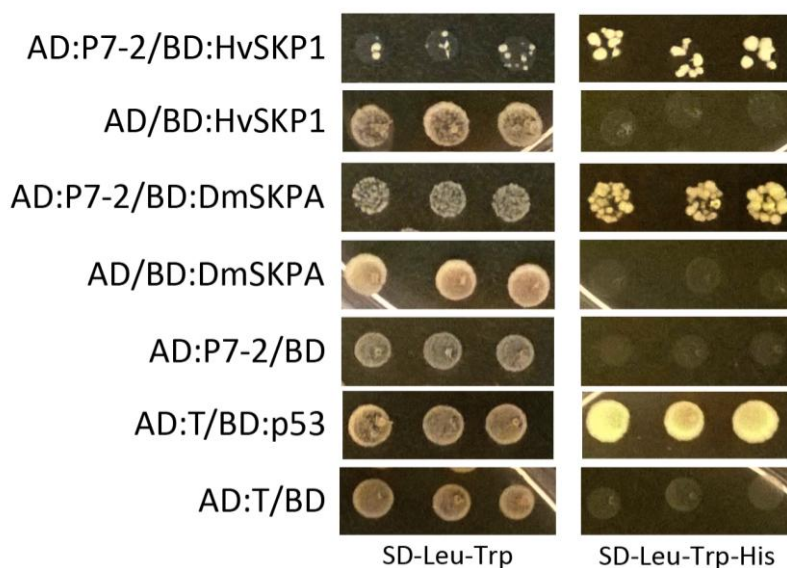


Figura 4.4: Análisis de interacción entre SKP1 de *H. vulgare* y SKPA *D. melanogaster* con MRCV P7-2 por Y2H. Las levaduras que expresan las fusiones AD:P7-2 y BD:SKP1/SKPA de las distintas especies fueron plaqueadas en medio SD -Leu-Trp para su selección y control de viabilidad, mientras que las interacciones fueron evaluadas en medio SD -Leu-Trp-His e incubadas a 28° C por 5 días. Control positivo: AD:T/BD:p53 y control negativo: AD:T/BD.

Estos resultados muestran que la capacidad de MRCV P7-2 de interactuar con SKP es amplia y que involucra no solo proteínas de plantas -como ya había sido demostrado para P7-2 de RBSDV (Wang y col., 2013)-, sino que también es capaz de interactuar con una proteína ortóloga de un insecto no hospedante. Esto es particularmente significativo considerando que P7-2 es la segunda proteína más variable del MRCV luego de P6, con un 45,2% de identidad respecto de su contraparte de RBSDV (Tabla 1.3 de la Introducción).

Como ya se mencionó, estos ensayos de Y2H debieron realizarse con la fusión AD:P7-2 ya que BD:P7-2 de MRCV presenta autoactivación. Sin embargo en el trabajo de Wang y col. 2013, la fusión BD:P7-2 de RBSDV no presentó toxicidad ni autoactivación y pudo ser utilizada como carnada para el relevamiento de la biblioteca de ADNc de maíz en donde identificaron la interacción con SKP1 (Wang y col., 2013).

Análisis de las regiones de MRCV P7-2 que intervienen en la interacción con SKP1

A continuación se propuso determinar cuál es la región de MRCV P7-2 que interviene en la interacción con SKP1. Para ello se utilizaron las mutantes de P7-2 obtenidas en el Capítulo I de

este trabajo de Tesis que contienen la mitad N-terminal (P7-2¹⁻¹⁵²) o C-terminal (P7-2¹⁵³⁻³⁰⁹) y se evaluó su capacidad de interactuar con SKP1 de cebada por Y2H. Como se muestra en la Figura 4.5 A, la mutante que carece de la mitad C-terminal no presentó interacción con HvSKP1 mientras que sí lo hizo la mutante P7-2¹⁵³⁻³⁰⁹, indicando que la capacidad de unir a SKP1 de cebada reside en la mitad C-terminal de P7-2. Por otra parte es interesante notar que la mutante P7-2¹⁻¹⁵² incluso fusionada al AD, confiere una leve autoactivación ya que se observa crecimiento de algunas colonias aisladas en el control AD: P7-2¹⁻¹⁵²/BD.

En el trabajo de Wang y col. 2013 se determinó además que la región C-terminal de RBSDV P7-2 tiene una posible región de α -hélice entre los residuos 283 a 307 facilita la interacción con SKP1 de maíz, ya que una mutante que carece de los últimos 20 aminoácidos que componen dicha región α -hélice no presenta interacción (Wang y col., 2013). Analizando la secuencia de MRCV P7-2 bioinformáticamente, se identificó que también posee una posible α -hélice de 23 residuos en el extremo C-terminal. Por lo tanto se obtuvo una mutante sin estos 23 aminoácidos, que se denominó P7-2 Δ H (Tesis Doctoral en curso de L. de Haro) y se evaluaron sus interacciones con HvSKP1 y DmSKPA por Y2H. Se encontró que, de manera análoga a lo que ocurre en P7-2 de RBSDV, la mutante P7-2 Δ H no es capaz de interactuar con SKP1 de cebada ni con SKPA de *D. melanogaster* (Figura 4.5 B), indicando que la región con una probable α -hélice carboxiterminal en P7-2 de MRCV es necesaria para la interacción ya que su ausencia impide por completo la interacción con SKP1.

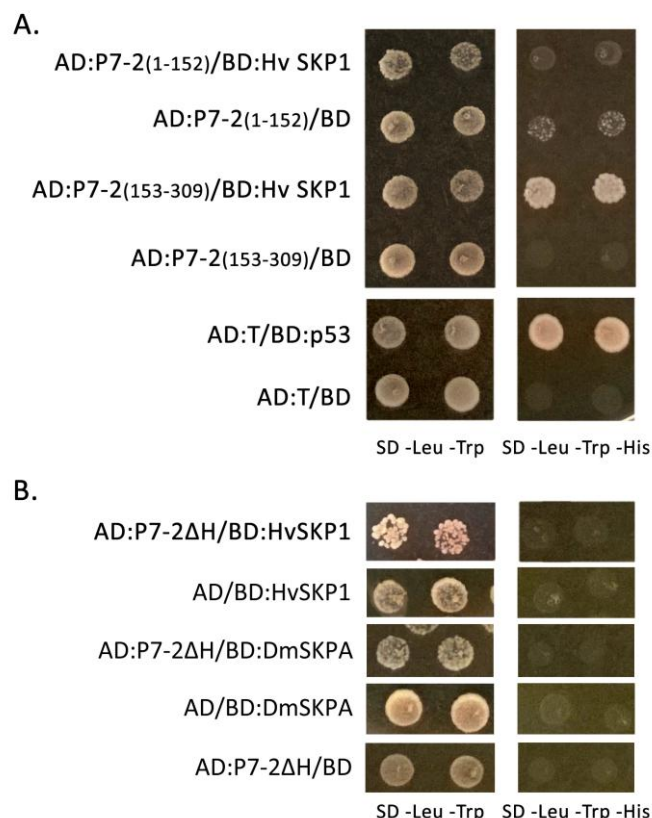


Figura 4.5: Análisis de las regiones de MRCV P7-2 involucradas en la interacción con SKP. **A.** La mitad C-terminal de P7-2 (P7-2¹⁵³⁻³⁰⁹) es necesaria para la interacción con HvSKP1 mientras que la mitad N-terminal (P7-2¹⁻¹⁵²) no presenta interacción con HvSKP1. **B.** La mutante P7-2ΔH que carece de los últimos 23 aminoácidos de P7-2 no presenta interacción con HvSKP1 ni DmSKPA. Las levaduras doble transformantes se seleccionaron en medio SD -Leu-Trp, y las interacciones fueron evaluadas creciendo a las levaduras en medio SD -Leu-Trp-His a 28 °C por 5 a 10 días. Como control positivo se plaqueó AD:T/BD:p53 y como control negativo se utilizó AD:T/BD así como las mutantes de P7-2 fusionadas al AD sin su correspondiente par de interacción.

El hecho de que P7-2 del MRCV tiene capacidad de interactuar con SKP tanto de plantas como de insectos por Y2H, sugiere que esta proteína viral actúa como una proteína de tipo F-box. Al analizar la secuencia aminoacídica de P7-2 se encontró que posee el motivo mínimo característico **LPXXI/L** de proteínas de tipo F-box (Pazhouhandeh y col., 2006) entre los residuos 129 y 134. Se propuso entonces determinar si el motivo F-box de P7-2 de MRCV también se encuentra conservado en las proteínas homólogas de otros *Fijivirus*. Para ello, se analizaron las secuencias de MRCV P7-2 (YP_956852.1), MRDV P6-2 (CAA39228.1), RBSDV P7-2 (AF397894 utilizada en Wang y col., 2013), y SRBSDV P7-2 (CBH31259.1). No se observó la presencia del motivo **LPXXI/L** en ninguna de las contrapartes de MRCV P7-2 analizadas. En la Figura 4.6 se muestra un fragmento del alineamiento de las secuencias y el motivo F-box de

MRCV P7-2 recuadrado en rojo. En las posiciones 130 y 133 se encuentran los únicos residuos conservados del motivo (prolina y leucina, respectivamente), pero las contrapartes de P7-2 de MRCV carecen de la leucina inicial del motivo. De manera interesante, dado que en el motivo LPXXI/L, los residuos L y P son los más conservados, Wang y col. identificaron una posible secuencia F-box (**LPFAELL**, residuos 79–85), que se recuadró en violeta en la Figura 4.6 (Wang y col., 2013). La misma también está presente en MRDV pero no se encuentra en MRCV ni en SRBSDV. Sin embargo la secuencia LPFAELL no sería un motivo F-box ya que sustituciones en los residuos L y P conservados por alaninas no afectaron la capacidad de P7-2 de RBSDV de interactuar con SKP1 de maíz (Wang y col., 2013).



Figura 4.6: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de P7-2 de MRCV (YP_956852.1) y sus contrapartes de otros fijivirus: RBSDV P7-2 (AF397894 utilizada por Wang y col., 2013), SRBSDV P7-2 (CBH31259.1) y MRDV P6-2 (CAA39228.1). El alineamiento fue realizado con el programa AlignX. En rojo se recuadra el motivo F-box presente en P7-2 de MRCV y ausente en el resto, y en violeta se recuadra el posible motivo F-box identificado para RBSDV y presente también en P6-2 de MRDV.

También es interesante notar que en el caso de P7-2 de MRCV, el motivo LPXXL encontrado tampoco parecería ser imprescindible para la interacción con SKP1 de cebada y SKPA de mosca, ya que en los ensayos de Y2H la mutante P7-2¹⁵³⁻³⁰⁹ carece del motivo (que se encuentra en la posición 129-134) y sin embargo interactúa con HvSKP1. Por su parte la mutante P7-2¹⁻¹⁵² contiene el motivo pero no presenta interacción. Específicamente, los resultados aquí obtenidos indican que la única región de P7-2 de MRCV necesaria para la interacción con SKP serían los últimos 23 residuos de la proteína que adquieren una posible confirmación de α -hélice. Además, los resultados para P7-2 de MRCV son similares a los de su contraparte de RBSDV en cuanto a las regiones de P7-2 involucradas en la interacción con SKP. Si bien como ya se mencionó, P7-2 es una de las proteínas menos conservadas a nivel de secuencia aminoacídica, la región carboxiterminal de estas proteínas (que contiene el posible dominio α -hélice) es más conservada que la región aminoterminal (Figura 4.7).

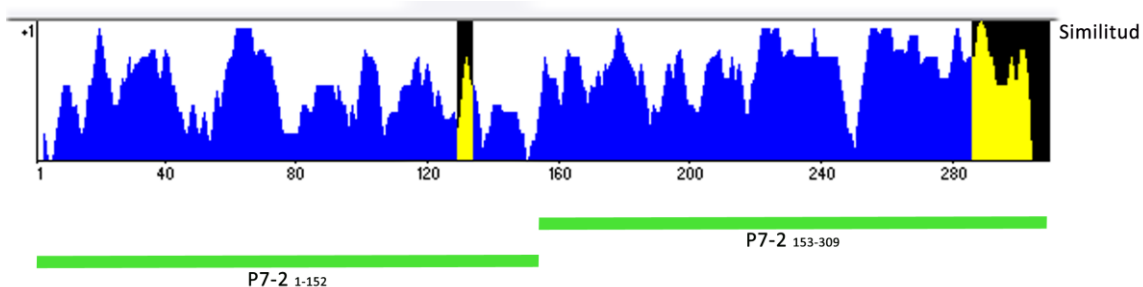


Figura 4.7: Gráfico de similitud de secuencia entre P7-2 de MRCV y RBSDV. El alineamiento fue realizado con el programa AlignX. En amarillo se marcan el motivo F-box de MRCV P7-2 (entre la posición 120-160) y el posible dominio α -hélice (en el carboxiterminal). Las barras verdes indican las regiones contenidas en las mutantes P7-2¹⁻¹⁵² y P7-2¹⁵³⁻³⁰⁹ de MRCV.

Es importante destacar finalmente que es factible que P7-2 interactúe con el componente SKP1 del complejo E3 ligasa formando el complejo SCF^{P7-2} de una forma no canónica, en una estrategia de mímica molecular en la cual el virus “secuestra” proteínas de la vía de degradación del proteasoma. Si bien en este trabajo no se determinó la implicancia biológica de la interacción MRCV P7-2/SKP1, la misma podría modular la vía de degradación del UPS permitiendo el establecimiento de una infección o bien como un mecanismo de contradefensa por parte del virus. La interacción P7-2/SKP1 podría:

- bloquear el complejo SCF impidiendo la degradación de proteínas celulares que regulen negativamente la respuesta de defensa celular, o que sean necesarias para el ciclo infectivo;
- bloquear el complejo SCF impidiendo la degradación de proteínas virales que puedan ser blanco de degradación por parte de la defensa del hospedante;
- modificar el sustrato de poliubiquitinación del complejo SCF para degradar proteínas virales cuya abundancia debe ser regulada durante el ciclo infectivo;
- modificar el sustrato de poliubiquitinación del complejo SCF para degradar proteínas celulares que no suelen ser hidrolizadas vía el UPS y que puedan estar involucradas en la defensa celular.

Sin duda, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis sirven como punto de partida para nuevas líneas de trabajo que permitan explorar el rol de sistema de ubiquitina-proteasoma y caracterizar la función del complejo SCF^{P7-2} en la infección por MRCV en plantas e insectos.

CAPÍTULO III

**Identificación de proteínas de trigo con
capacidad de interacción con las proteínas
mayoritaria y minoritaria del viroplasma de
MRCV**

Identificación de proteínas de trigo con capacidad de interacción con las proteínas mayoritaria y minoritaria del viroplasma de MRCV

Como se desarrolló en la Introducción, la formación de los viroplasmas es un paso crucial en el ciclo de vida de los *Fijivirus* ya que es allí donde el virus replica y se ensambla. Resultados previos de nuestro grupo junto con los obtenidos en el Capítulo I demostraron que las proteínas virales P9-1 y P6 constituyen las proteínas mayoritarias y minoritarias de los viroplasmas (Maroniche y col., 2012; Maroniche y col., 2010). Sin embargo, aún resta comprender cómo se forman secuencialmente los viroplasmas, cuál es su dinámica durante las distintas etapas del ciclo infectivo y qué componentes celulares intervienen en estos procesos. La identificación de proteínas del hospedante involucradas nos proveerá además de blancos adicionales para el diseño de estrategias de control de la enfermedad. En el Capítulo anterior, se empleó un enfoque directo en donde era conocida la identidad de las proteínas candidato a interactuar con proteínas del MRCV. En este Capítulo en cambio, se decidió utilizar un enfoque a gran escala en el que no se conoce *a priori* la identidad de las proteínas que puedan interactuar con las PMRCVs.

Con el fin de identificar componentes celulares que puedan interactuar con las proteínas virales mayoritaria y minoritaria del viroplasma, se realizaron dos relevamientos por Y2H de una biblioteca de ADNc realizada con oligo dT a partir de ARN de hoja de trigo tetraploide *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* cv. Langdon, utilizando como carnada a las fusiones BD:P9-1 y BD:P6. Tal como se mostró en el Capítulo I de este trabajo de Tesis, la realización de estos relevamientos fue posible ya que ninguna de las dos fusiones confirieron autoactivación o evidenciaron toxicidad en el sistema Y2H.

Identificación de proteínas de trigo con capacidad de interactuar con MRCV P9-1 por Y2H

El primer relevamiento se realizó utilizando BD:P9-1 como carnada y la obtención de levaduras diploides se logró mediante el apareamiento de una alícuota de la biblioteca en la cepa Y187 con un título de 10^8 ufc/ml, con la cepa Y2HGold transformada con BD:P9-1. La ocurrencia de apareamiento entre las cepas fue monitoreada por observación de la presencia de levaduras trilobuladas al microscopio óptico (Figura 5.2, marcadas con flechas). Las levaduras resultantes del apareamiento fueron plaqueadas en medio SD -Leu -Trp + X- α -Gal 40 μ g/ml + AbA 125 ng/ml (SD-LW/X/125 ng/ml AbA) e incubadas a 28 °C.

Al cabo de 5 días de incubación, se obtuvieron 420 colonias azules, y para confirmar las interacciones positivas, las mismas fueron picadas y estriadas en un medio de mayor astringencia: SD -Leu -Trp -His -Ade +X- α -Gal 40 μ g/ml +AbA 125 ng/ml (SD-LWHA/X/AbA 125 ng/ml). Se realizaron tres pasajes en ese medio astringente para favorecer la segregación ya que las levaduras pueden incorporar más de un plásmido durante la transformación. Finalmente se obtuvieron 270 clones positivos, a los que se les extrajo ADN que fue utilizado como templado para amplificar los insertos de los plásmidos por PCR. Para ello se pusieron a punto en el laboratorio las técnicas de extracción de ADN de levaduras en cantidad y calidad suficiente para la realización de una PCR posterior. Si bien dichas técnicas son ampliamente utilizadas en levaduras, la pared celular de quitina a menudo dificulta la disrupción de las células y la posterior extracción de ADN (Klis y col., 2006; Szymanski y Kerscher, 2013). Dado que nuestro laboratorio no contaba con experiencia previa a esta Tesis en el manejo de las levaduras, se evaluaron cuatro métodos descritos en la bibliografía. Para ello se partió de levaduras frescas de la cepa Y187 que expresan el control positivo AD:T estriadas en forma de césped, se tomó una superficie de aproximadamente 0,5 cm² (no más de 10 mg de células) con tip y, de acuerdo al protocolo a utilizar, las levaduras se resuspendieron en:

- 80 μ l de buffer liticasa (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, liticasa 60 U/ml, pH 7,5) y se incubaron por 1hr a temperatura ambiente (adaptado de Silver, 2009);
- 100 μ l de buffer TE junto con lisozima 0,2 g/L y se incubaron 1 hr a temperatura ambiente;
- 100 μ l de buffer TE junto con bolitas de vidrio de 1 mm (igual volumen que el buffer), se agitaron con vórtex por 2 min y se incubaron en hielo hasta el momento de ser utilizadas;
- 100 μ l de buffer TE con NaOH 0,02 N, se calentaron 10 min a 99 °C y se incubaron en hielo hasta el momento de ser utilizadas (Blackburn, 2009).

Del extracto obtenido, se utilizaron 5 μ l como templado para la reacción de PCR utilizando las condiciones y los oligonucleótidos que se detallan en la sección de Materiales y Métodos para amplificar el inserto, en este caso el gen SV40T.

Como se observa en la Figura 5.1, el único de los 4 tratamientos ensayados que dio lugar a ADN en cantidad y calidad suficientes para utilizar como templado fue el que utilizaba NaOH e incubación con calor.

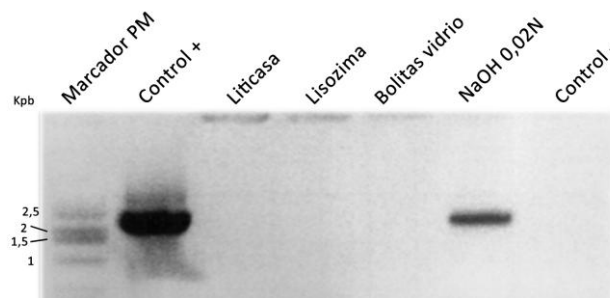


Figura 5.1: Puesta a punto de la reacción de PCR sobre ADN de levaduras. Cada calle corresponde al producto de amplificación por PCR utilizando distintos protocolos de extracción del ADN templado. Como control positivo se utilizó el plásmido pGADT7-T y en el control negativo de la reacción de PCR no se le agregó templado. El tamaño esperado del producto amplificado es de 2124 pb. Las reacciones fueron corridas en un gel de agarosa 0,8%. PM: Peso molecular. Kpb: kilo pares de bases.

La biblioteca utilizada para este trabajo de Tesis no se encontraba normalizada, de manera que se esperaba que muchos clones que hubieran dado interacción positiva correspondiesen a una misma secuencia de ADNc. Para reducir entonces el número de clones redundantes, los productos de amplificación de los insertos de los 270 clones seleccionados se sometieron a restricción con la enzima de corte frecuente AluI y se agruparon de acuerdo a sus patrones de restricción. Finalmente se seleccionaron 48 clones que fueron secuenciados con el iniciador T7 que anilla sobre el promotor T7 ubicado río arriba del inserto dentro de la región amplificada. En la Figura 5.2 se resume el trabajo realizado.

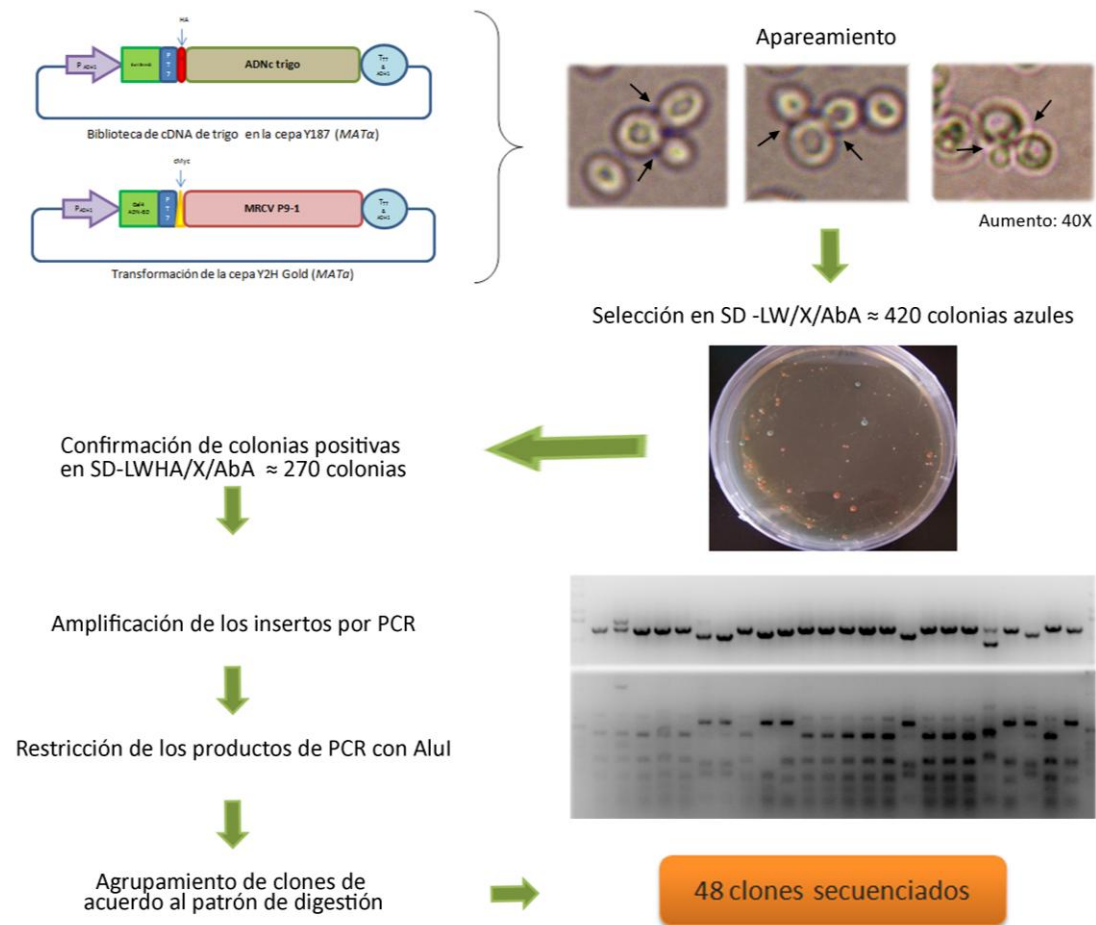


Figura 5.2: Esquema de trabajo llevado a cabo para el relevamiento de la biblioteca de ADNc utilizando P9-1 como carnada.

Análisis de secuencias de los clones seleccionados

Las secuencias de los clones fueron depuradas y analizadas utilizando la herramienta BLASTN de la base de datos pública del NCBI comparando con la colección de secuencias nucleotídicas depositadas en el NCBI (nr/nt). Se realizó este análisis inicial como una primera aproximación para poder agrupar los clones identificados y simplificar los análisis posteriores. En la Tabla 5.1 se indican los resultados obtenidos para los 48 clones secuenciados.

N° Clones secuenciados	Blastn - Similitud con:	GenBank	Identidad	E-valor
35	ARNm de <i>Triticum aestivum</i> para posible aciltransferasa 4 (gen acT4)	AM749044.1	97-99%	0.0
	ARNm de <i>Triticum aestivum</i> para posible aciltransferasa 3 (gen acT3)	AM749045.1	96-97%	0.0
7	clon: SET6_I04, ADNc de <i>Triticum aestivum</i> , cultivar: Chinese Spring	AK331159.1	94-95%	6×10^{-117}
3	Precursor de la proteína de unión a clorofila II a/b WCAB [<i>Triticum aestivum</i>]	U73218.1	87%	3×10^{-74}
3	ARNm para proteína predicha de <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> , clon: NIAHv1027N15 (*)	AK355917.1	86%	2×10^{-68}

Tabla 5.1: Resultados del análisis de las secuencias por BLASTN contra la colección nucleotídica disponible en GenBank. (*) No presentó similitud con secuencias de trigo.

A continuación se realizó una búsqueda de tipo BLASTX, para la que se dedujo la secuencia aminoacídica codificada por los clones interactuantes para buscar similitud con proteínas depositadas en la base de datos del NCBI. Esta herramienta además permite la identificación de dominios característicos, los cuales pueden proveer información sobre la posible función de las proteínas analizadas. Para 35 clones (73% de los 48 secuenciados) se encontró que presentan un dominio **HXXXD** característico de las aciltransferasas (acT), que pertenecen a la familia de las **transferasas** (E-valor $2,06 \times 10^{-05}$). Por su parte, los 7 clones (15%) con similitud de secuencia nucleotídica con el clon SET6_I04 de *T. aestivum* pertenecen a la familia de las **aldosas 1-epimerasas** (AEP) con un E-valor de $2,22 \times 10^{-10}$, y los 3 clones con similitud al precursor de proteína de unión a clorofila II a/b (WCAB), pertenecen a la familia de proteínas de **unión a clorofila a/B del fotosistema II** (CAB, E-valor $3,82 \times 10^{-27}$). Para los 3 clones que presentaron similitud a nivel de secuencia nucleotídica con una secuencia de cebada que codifica para una posible proteína, no se les encontró dominios característicos mediante la búsqueda por BLASTX, pero al analizar la posible proteína de cebada (BAJ87135.1) se encontró que pertenece a la familia de las proteínas TSP9, por **fosfoproteína soluble del tilacoide**, con un E-valor de $1,70 \times 10^{-07}$.

Luego de realizado este primer análisis de las secuencias de los clones seleccionados, y antes de continuar con la caracterización de las proteínas interactuantes detectadas en el relevamiento, se prosiguió con el análisis de los clones y la confirmación de las interacciones encontradas. Para facilitar los análisis, dado que los 48 clones se agruparon en 4 grupos definidos por las similitudes encontradas en el BLASTN y BLASTX, se procedió a analizar cada grupo por separado con el programa AlignX (Vector NTI, Invitrogen), que realiza alineamientos múltiples de secuencia por ClustalW. Para cada alineamiento sólo se tuvieron en cuenta las zonas centrales de las secuencias comunes a todos los clones de cada grupo, sin considerar los

extremos 5' (cuya longitud depende de la reacción de la transcriptasa reversa utilizada para la síntesis del ADNc) o los extremos 3' (cuya extensión depende de la reacción de secuenciación).

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los insertos de los 35 clones que codificaban para proteínas con similitud a aciltransferasa mostró que, si bien la longitud de las secuencias de los clones resultó entre 500 y 880 pb, la región compartida por todos ellos fue solo de 235 pb. A su vez se encontraron dos subgrupos distinguibles por dos mutaciones puntuales y silenciosas a lo largo de la secuencia: un grupo de 13 clones (denominado "subgrupo 1") y otro de 22 clones (denominado "subgrupo 2"). Dentro del subgrupo 2, 8 clones presentan un cambio puntual que no está presente en el resto de los 27 clones (de ambos subgrupos) y que se traducen en un cambio aminoacídico de una prolina (P) en lugar del residuo leucina (L) presente en el resto de los clones.

Al alinear las secuencias de los 7 clones con similitud a las aldosas 1-epimerasas (AEP), se encontró que 6 clones resultaron ser idénticos, mientras que uno mostró dos cambios puntuales a lo largo de las 398 pb comunes a todos los clones que se traducen en cambios en la secuencia aminoacídica: el único clon con los cambios presenta un ácido aspártico (D) en lugar de glicina (G) y un ácido glutámico (E) en lugar de una G.

El resultado del alineamiento para los 3 clones con similitud a las proteínas de unión a clorofila a/b (CAB) indicó que los tres comparten la misma la misma secuencia a lo largo de todo el inserto de 295 pb, hasta la cola de poliA de los ARNm, con excepción de una única mutación puntual y silenciosa en uno de los clones.

Finalmente, el alineamiento para los 3 clones con similitud a una posible fosfoproteína soluble del tilacoide (TSP9) indicó que los tres insertos poseen una longitud de 284 pb, y son idénticos a excepción de un clon con una delección puntual pero que se encuentra río abajo del marco abierto de lectura.

En base a estos alineamientos se decidió seleccionar un clon que mejor represente a cada grupo para continuar con el aislamiento de los plásmidos y la confirmación de las interacciones encontradas. Para el grupo de las aciltransferasas se seleccionó un clon perteneciente al subgrupo 2 debido a que es el más numeroso.

Aislamiento de los plásmidos que expresan los clones de interés y confirmación de la interacción con P9-1 por doble híbrido

Para poder confirmar las interacciones entre las proteínas de trigo candidatas y P9-1, es importante distinguir entre aquellas interacciones positivas de las que son falsos positivos donde la proteína *presa* de trigo activa los genes de respuesta a Gal4 en ausencia de BD:P9-1. Además, dado que las levaduras pueden incorporar más de un plásmido a la vez durante la transformación, resulta necesario aislar los plásmidos de las levaduras que presentaron interacción con P9-1 a fin de identificar inequívocamente la construcción responsable de la interacción positiva encontrada. Para ello se extrajeron los plásmidos de los clones seleccionados de cada grupo por lisis alcalina y se los utilizó para transformar *E. coli* y obtener así un mayor número de copias. A continuación, se extrajo ADN plasmídico de las bacterias y los plásmidos fueron reintroducidos en levaduras de la cepa Y187 por transformación de manera independiente, y en primer lugar se evaluó la capacidad de los clones seleccionados de autoactivar, creciéndolos en medio SD-L/X y SD-L/X/AbA. Si la proteína codificada por el clon recuperado no tiene capacidad de autoactivación se espera que crezcan colonias blancas en SD-L/X, y ninguna colonia en SD-L/X/AbA. Si el clon recuperado tiene capacidad de autoactivación se espera ver crecimiento y coloración azul en ambos medios. Se encontró que ninguno de los cuatro clones seleccionados tiene capacidad de autoactivación (Figura 5.3), de modo que se continuó con los análisis.

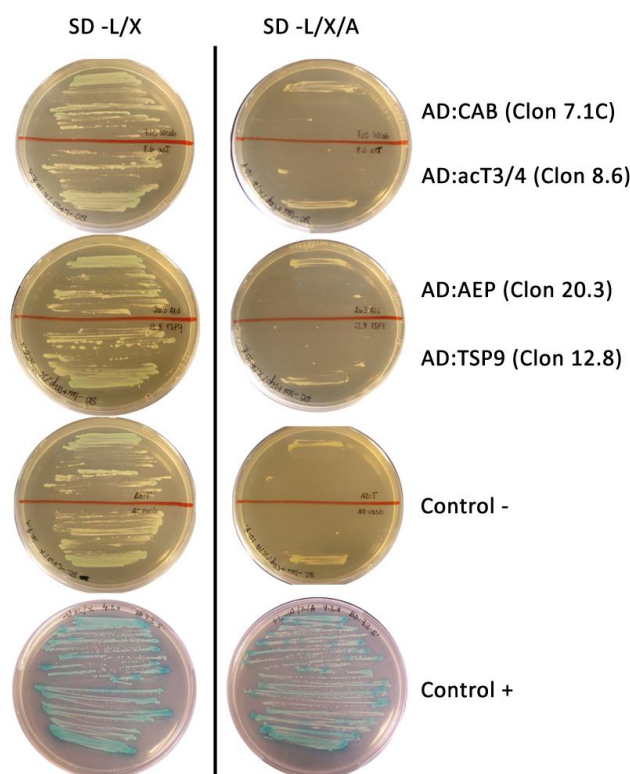


Figura 5.3: Ensayo de autoactivación en el relevamiento de la biblioteca de ADNc de trigo con P9-1. Los clones seleccionados fueron utilizados para transformar *E coli*, aislados, retransformados en la cepa Y187 y finalmente evaluados para autoactivación. Izquierda: se crecieron los clones en medio SD-L/X en donde si no hay autoactivación se espera ver crecimiento sin activación del gen reportero MEL-1 (colonias blancas). Derecha: las mismas levaduras se plaquearon en medio SD-L/X/AbA. Si hay autoactivación, en presencia del antibiótico aureobasidina A se espera ver crecimiento. Como control negativo se utilizaron las cepas AD:T y AD. Como control positivo se utilizó la cepa Y2HGold transformada con BD:P7-2¹⁻¹⁵² y se evaluó en medio SD-W/X y SD-W/X/A.

El siguiente paso fue evaluar nuevamente las interacciones positivas en el relevamiento, y para ello se obtuvieron levaduras coexpresando BD:P9-1 junto con cada uno de los 4 clones AD elegidos. Se seleccionaron las levaduras diploides cotransformantes y las interacciones fueron evaluadas en dos medios selectivos de creciente nivel de astringencia (Figura 5.4). Los resultados indicaron que efectivamente MRCV P9-1 interactúa con los clones que expresan fragmentos de proteínas con similitud a las aciltransferasas 3/4 (clon 8.6) y a la aldosa-1-epimerasa (clon 20.3) por Y2H. Sin embargo, el clon que codifica para la proteína con similitud a TSP9 (clon 12.8) presentó autoactivación en presencia del BD sin fusionar a P9-1, que no había sido detectada en ausencia de BD. Por otra parte, no se pudo confirmar la interacción entre el clon 7.1C que codifica para la proteína con similitud a CAB y P9-1. Por estos motivos tanto TSP9 como CAB fueron descartadas de los análisis posteriores.

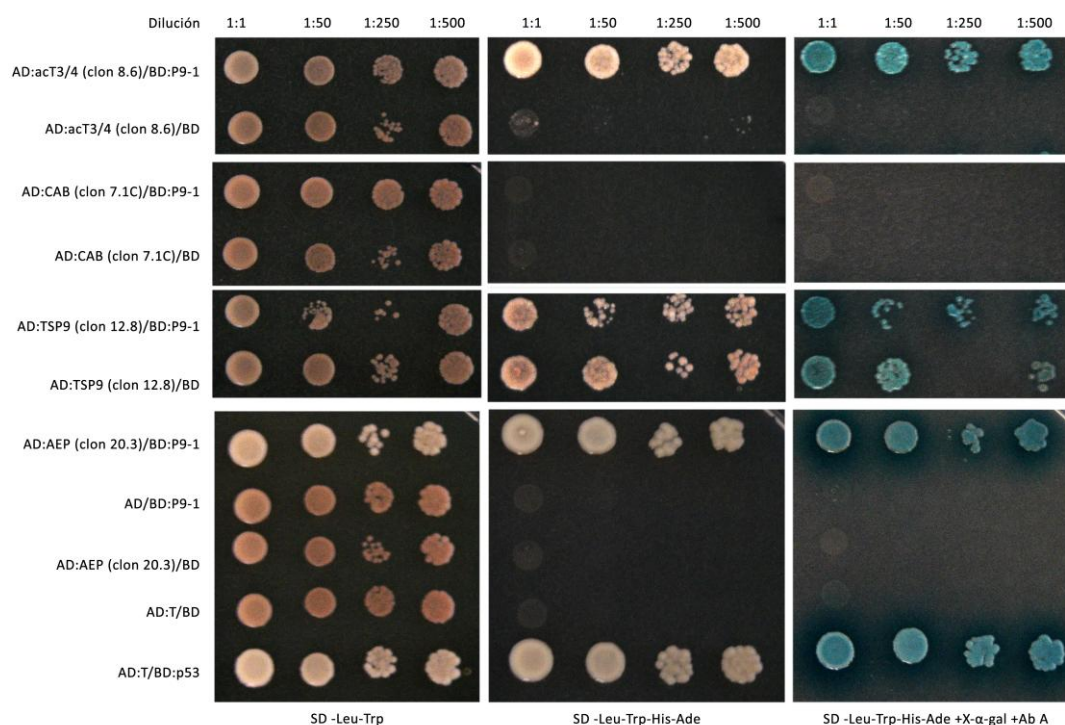


Figura 5.4: Confirmación de las interacciones encontradas en el relevamiento de la biblioteca de ADNc de trigo con P9-1. Se obtuvieron levaduras expresando BD:P9-1 junto con las fusiones del AD al clon 7.1C, el cual presenta similitud de secuencia con el precursor de la proteína de unión a clorofila a/b (CAB), al clon 8.6, con similitud a las aciltransferasas 3 y 4 (acT3/4), al clon 12.8 que codifica para una proteína de función desconocida con homología a la fosfoproteína soluble de tilacoide (TSP9), y al clon 20.3 con similitud a la aldosa-1-epimerasa (AEP). Las transformantes fueron seleccionadas en medio SD -Leu-Trp, y las interacciones fueron evaluadas en dos medios selectivos de creciente nivel de astringencia: SD -Leu-Trp-His-Ade, y SD -Leu-Trp-His-Ade + 40 µg X-α-Gal + 125 ng/ml AbA. Controles negativos: AD/BD:P9-1 y AD:T/BD. Control positivo: AD:T/BD:p53.

Una vez confirmadas las interacciones positivas y descartados los falsos positivos, se seleccionaron los clones que codifican para proteínas con posibles funciones de aciltransferasa (acT) y aldosa 1-epimerasa (AEP).

Caracterización de la proteína con posible función de aciltransferasa

Las aciltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo acilo a un grupo hidroxil, amino o tiol de un sustrato aceptor para dar un derivado acil ester (St-Pierre y De Luca, 2000). Si el sustrato es oxigenado o nitrogenado la acilación resulta en ésteres o amidas, respectivamente, que son modificaciones especialmente comunes en metabolitos secundarios involucrados en diversas vías metabólicas (Tuominen y col., 2011). Los dadores del grupo acilo

activado provienen de fuentes como azúcares acilados, proteínas “carrier” o tioésteres activados con acil coenzima A (acil coA; D'Auria, 2006). Si bien las distintas aciltransferasas caracterizadas desde procariotas a animales no presentan conservación a nivel de secuencia, en plantas y hongos se ha identificado el motivo **HXXXD** que se encuentra conservado en varias familias de aciltransferasas (St-Pierre y De Luca, 2000). En plantas, las aciltransferasas denominadas “BAHD” conforman la familia más grande y mejor caracterizada de estas enzimas. Esta familia recibe su nombre en referencia a los primeros cuatro miembros caracterizados (BEAT o bencilalcohol *O*-acetiltransferasa de *Clarkia breweri*; AHCTs o antocianin *O*-hidroxicinamoiltransferasas de *Petunia*, *Senecio*, *Gentiana*, *Perilla*, y *Lavandula*; HCBT o antranilato *N*-hidroxicinamoil/benzoiltransferasa de *Dianthus caryophyllus*; y DAT o deacetilvindolin 4-*O*-acetiltransferasa de *Catharanthus roseus*; St-Pierre y De Luca, 2000). Las aciltransferasas BAHD utilizan acil coA como dador del grupo acilo, y contienen, como otras aciltransferasas, el sitio catalítico **HXXXD** que utiliza a la histidina (H) en la unión con el acil coA, y se encuentra absolutamente conservado. Además, presentan el motivo **DFGWG**, cuya conservación es alta pero no absoluta, y cumpliría un rol estructural (D'Auria, 2006). Además de esos motivos, un estudio filogenético a gran escala entre todas las posibles proteínas BAHD de *Arabidopsis*, *Medicago*, *Oryza*, *Populus* y *Vitis*, permitió identificar dos nuevos motivos conservados en algunos clados de la familia. En particular, la secuencia consenso **YPLAGR** alrededor de la posición 71-78 se encuentra conservada en las aciltransferasas de los Clados III, Va y Vb. Las aciltransferasas del Clado III están involucradas en la formación de alcaloides, ésteres y flavonoides. Por su parte, los miembros del Clado V utilizan como sustrato desde terpenoides a alcoholes de cadena mediana o ácido quínico (Tuominen y col., 2011).

Al comparar las secuencias de acT3 y acT4 entre sí, se encontraron 23 cambios de pares de bases que se traducen en 8 cambios aminoacídicos distribuidos a lo largo de sus secuencias; la diferencia más evidente entre ambas es que el ORF de acT4 comienza en un ATG que se encuentra 44 pb río abajo del primer ATG que da inicio al ORF de acT3 (ambos en el mismo marco de lectura). Además, se encontró que ambas contienen el motivo **HXXXD** en las posiciones 175-180 de acT3 y 161-165 de acT4 (Figura 5.5, recuadrado en rojo), y si bien no poseen el motivo **DFGWG**, sí presentan la secuencia **YPLAGR** en las posiciones 86-91 de acT3 y 71-76 de acT4 (Figura 5.5 recuadrado en violeta). En base a estos análisis *in silico*, acT3 y acT4 pertenecerían a la familia de aciltransferasas BAHD. Por su parte, el clon 8.6, utilizado para confirmar la interacción con P9-1, no presenta ninguno de los dos motivos debido a que cubre solo el 32,03% de la secuencia aminoacídica de acT3 y el 33,25% de la secuencia de acT4 desde el extremo carboxilo terminal. En la Figura 5.5 se muestra el alineamiento de las secuencias

acT3, acT4 y el clon 8.6, en donde se puede observar que el clon 8.6 posee dos cambios aminoacídicos que no están presentes en acT3 ni acT4.

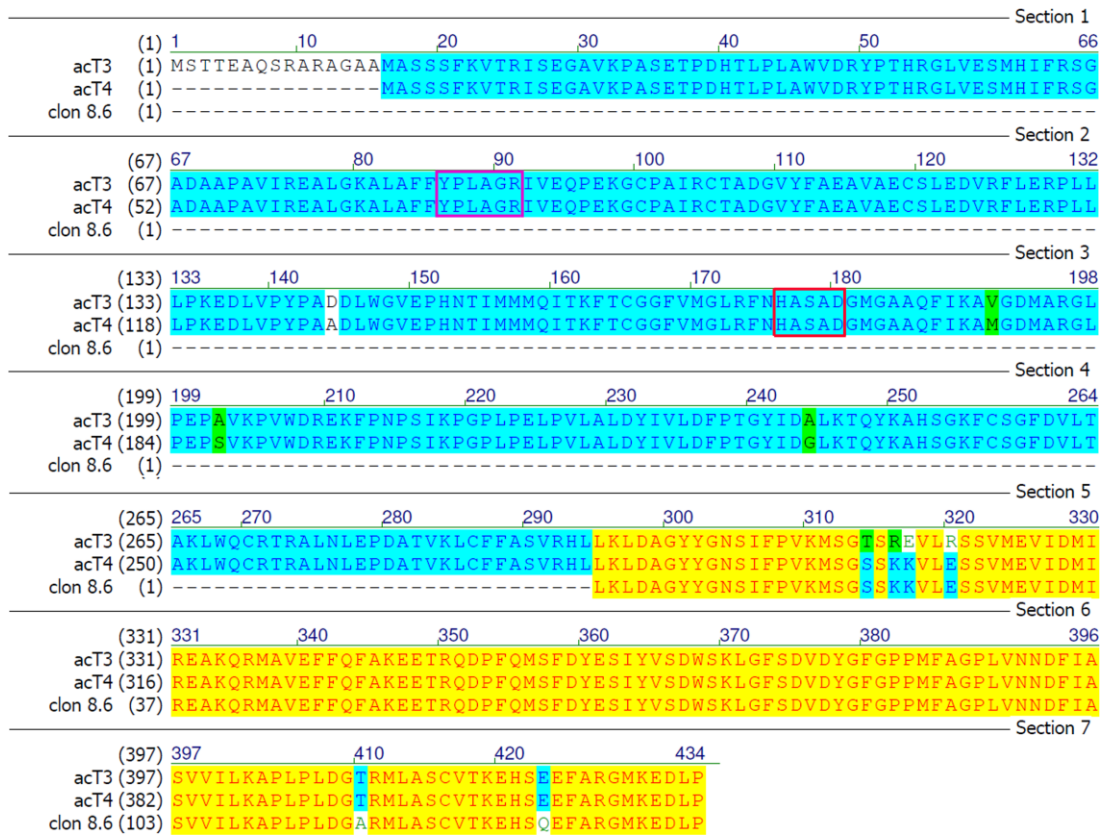


Figura 5.5: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de acT3 (GenBank CAO77314.1), acT4 (CAO77315.1), y el clon 8.6 seleccionado en el relevamiento. El alineamiento múltiple de secuencia (ClustalW) fue realizado con el programa AlignX. En rojo se recuadra el sitio catalítico **HXXXD** y en violeta el motivo **YPLAGR**, conservados en las aciltransferasas BAHD (Clados III, Va y Vb, según Tuominen y col., 2011). Los residuos idénticos se muestran con letra roja y fondo amarillo; los conservados en letra azul y fondo celeste; los que pertenecen a un mismo grupo funcional se muestran en letra negra y fondo verde; los que son débilmente similares se muestran en letra verde y fondo blanco y los que pertenecen a distintos grupos funcionales en letra negra con fondo blanco.

A continuación, se propuso analizar también la ubicación de los genes encontrados en el genoma de trigo hexaploide *T. aestivum* (2n=6x=42, AABBDD). Conocer el sitio donde mapean los genes encontrados representa una herramienta útil para analizar bioinformáticamente poblaciones de mutantes de TILLING disponibles. Nuestro grupo ha establecido una colaboración con el grupo del Dr. Jorge Dubcovsky (UC-Davis, Estados Unidos), que ha desarrollado poblaciones de mutantes de trigo por TILLING y las ha secuenciado. Esto nos permitirá en el futuro identificar aquellas plantas con mutaciones en los genes que codifican

para las proteínas encontradas en este relevamiento y eventualmente realizar estudios de genética reversa. Se utilizó la herramienta BLASTN del servidor EnsemblPlants y se analizaron las secuencias de acT3 y acT4 y del clon 8.6. Se encontró que las tres presentan similitud con la posición 103750193-103751032 que coincide con el gen TRAES3BF096800100CFD_g del cromosoma **3B** (E-valor $6,4 \times 10^{-144}$ para el clon 8.6, $2,6 \times 10^{-262}$ para acT3 y $5,42 \times 10^{-256}$ para acT4, Figura 5.6). Debido a que acT3, acT4 y el clon 8.6 mapean en la misma región de 3B pero difieren en algunos cambios aminoacídicos, se podría suponer que se tratan de variantes alélicas de un mismo locus.

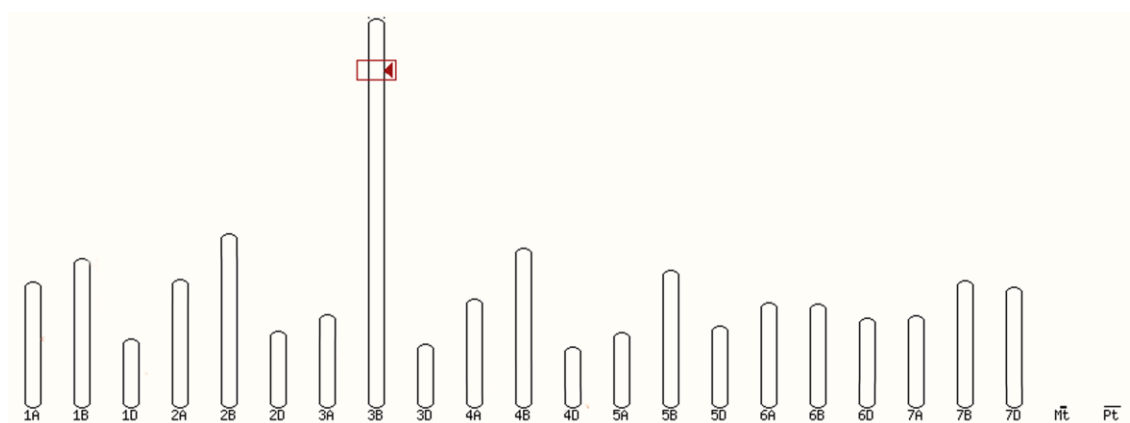


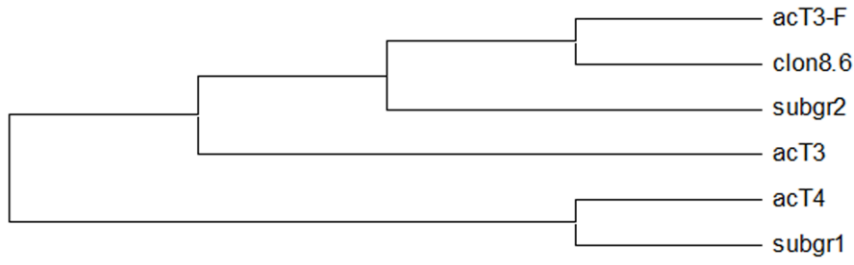
Figura 5.6: Mapeo de las secuencias del clon 8.6 y las secuencias codificantes de los genes acT3 y acT4 en el genoma de *T. aestivum*. El análisis de las secuencias se realizó por BLASTN con el servidor EnsemblPlants. La región recuadrada en rojo marca la ubicación de las secuencias identificadas en el cromosoma 3B.

Para poder obtener las regiones codificantes sin ATG se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar las secuencias de acT3 y acT4 y se utilizó como templado ADNc de hoja de *T. aestivum* variedad Buck Poncho. Luego de reiterados intentos fallidos, se pudo amplificar la región codificante de acT3, agregando a la reacción de PCR 5% de DMSO, y se la denominó “Ta acT3 clon F” (o Ta acT3F). No se logró obtener la secuencia completa de acT4 por lo que los ensayos posteriores fueron realizados con Ta acT3 clon F. Se analizó la secuencia aminoacídica de Ta acT3F amplificada, y se comparó con las acT3 y acT4 depositadas (accesos GenBank CA077314.1 y CA077315.1, respectivamente), con el clon 8.6 utilizado para confirmar la interacción con P9-1, y con las regiones consenso de los dos subgrupos 1 y 2 (de los 35 clones del grupo aciltransferasas). Para eso se realizó un alineamiento múltiple de secuencia por ClustalW y se construyó un árbol filogenético por el método de máxima parsimonia, con una prueba estadística de Bootstrap (número de repeticiones= 1000) utilizando el programa

MEGA6. Como se muestra en la Figura 5.5 A, Ta acT3F también presenta los motivos **HXXXX** e **YPLAGR** de las aciltransferasas BAHD. Por otra parte, Ta acT3F se encuentra más relacionada filogenéticamente con el clon 8.6 (que pertenece al subgrupo 2) y con acT3. Además se encontró que el subgrupo 1 presenta mayor similitud con la acT4. Al analizar el alineamiento, se observa que Ta acT3F presenta unos pocos cambios aminoacídicos que no se encuentran en acT3 ni acT4 pero sí están presentes en el subgrupo 2 de los clones (Figura 5.5 B). Ta acT3F también mapea en la misma posición en el gen **3B** (E-valor $2,3 \times 10^{-266}$ y 98% de identidad), de manera que podría ser una variante alélica de acT3 y acT4 que está presente en *T. aestivum* variedad Buck Poncho (donde se obtuvo Ta acT3 clon F) y *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* cv. Langdon (del que se obtuvo la biblioteca) pero ausente en la variedad Cadenza (a partir de la cual se obtuvieron las secuencias de acT3 y acT4 que están depositadas).

Figura 5.5 (Página siguiente): Análisis de las secuencias aminoacídicas de acT3 (acceso GenBank CAO77314.1), acT4 (CAO77315.1), Ta acT3F (obtenida en este trabajo), el clon 8.6, y los subgrupos 1 y 2 de todos los clones de la biblioteca de trigo que presentaron interacción con P9-1. **A.** Árbol filogenético realizado por el método de máxima parsimonia, con la prueba estadística de Bootstrap (número de repeticiones= 1000). **B.** Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas por ClustalW realizado con el programa AlignX. En rojo se recuadra el sitio catalítico HXXXX y en violeta el motivo YPLAGR, conservados en las aciltransferasas BAHD (Clados III, Va y Vb, según Tuominen y col., 2011). Los residuos idénticos se muestran con letra roja y fondo amarillo; los conservados en letra azul y fondo celeste; los que pertenecen a un mismo grupo funcional se muestran en letra negra y fondo verde; los que son débilmente similares se muestran en letra verde y fondo blanco y los que pertenecen a distintos grupos funcionales en letra negra con fondo blanco.

A



B

											Section 1		
	(1)	1	10	20	30	40	50	66					
acT3	(1)	MSTTEAQS	RRARAGAA	MASSSF	KVTRISEG	AVKPA	SETPDHTL	PLAWVD	RYPTH	RGLVESMHIFRSG			
Ta acT3F	(1)	-STTEAQS	RAKAGAA	MASSSF	KVTRISEG	AVKPA	SETPDHTL	PLAWVD	RYPTH	RGLVESMHIFRSG			
acT4	(1)	-----	-----	MASSSF	KVTRISEG	AVKPA	SETPDHTL	PLAWVD	RYPTH	RGLVESMHIFRSG			
clon 8.6	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
subgr 2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
subgr 1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
											Section 2		
	(67)	67	80	90	100	110	120	132					
acT3	(67)	ADAAPAV	IREALG	KALAFF	YPLAGR	IVEQPE	KGCPA	IRCTAD	GVYFAE	AVAEC	SLDVRF	LERPLL	
Ta acT3F	(66)	ADAAPAV	IREALG	KALAFF	YPLAGR	IVEQPE	KGCPA	IRCTAD	GVYFAE	AVAEC	SLDVRF	LERPLL	
acT4	(52)	ADAAPAV	IREALG	KALAFF	YPLAGR	IVEQPE	KGCPA	IRCTAD	GVYFAE	AVAEC	SLDVRF	LERPLL	
clon 8.6	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
subgr 2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
subgr 1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
											Section 3		
	(133)	133	140	150	160	170	180	198					
acT3	(133)	LPKEDL	VPYPAD	DLWGVE	PHNTIM	MMQITK	FTCGGF	VMGLRF	NHASAD	GMGAAQ	FIKAV	GDMARG	
Ta acT3F	(132)	LPKEDL	VPYPAD	DLWGVE	PHNTIM	MMQITK	FTCGGF	VMGLRF	NHASAD	GMGAAQ	FIKAV	GDMARG	
acT4	(118)	LPKEDL	VPYPAA	DLWGVE	PHNTIM	MMQITK	FTCGGF	VMGLRF	NHASAD	GMGAAQ	FIKAV	GDMARG	
clon 8.6	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
subgr 2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
subgr 1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
											Section 4		
	(199)	199	210	220	230	240	250	264					
acT3	(199)	PEPAVK	PVWDRE	KFPNPS	IKPGPL	PELPVL	ALDYIV	LDFTPT	GYIDAL	LKTQYK	AHSGK	FCSGFD	VLT
Ta acT3F	(198)	PEPAVK	PVWDRE	KFPNPS	IKPGPL	PELPVL	ALDYIV	LDFTPT	GYIDAL	LKTQYK	AHSGK	FCSGFD	VLT
acT4	(184)	PEPSV	KPVWDRE	KFPNPS	IKPGPL	PELPVL	ALDYIV	LDFTPT	GYIDGL	LKTQYK	AHSGK	FCSGFD	VLT
clon 8.6	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
subgr 2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
subgr 1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
											Section 5		
	(265)	265	270	280	290	300	310	320	330				
acT3	(265)	AKLWQC	RTRALN	LEPDAT	VKLCFF	ASVRHL	LKLDAG	YYGNSI	FPVKMS	GSSTRE	EVIRSS	VMEVID	MI
Ta acT3F	(264)	AKLWQC	RTRALN	LEPDAT	VKLCFF	ASVRHL	LKLDAG	YYGNSI	FPVKMS	GSSTRE	EVIRSS	VMEVID	MI
acT4	(250)	AKLWQC	RTRALN	LEPDAT	VKLCFF	ASVRHL	LKLDAG	YYGNSI	FPVKMS	GSSTRE	EVIRSS	VMEVID	MI
clon 8.6	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
subgr 2	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
subgr 1	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
											Section 6		
	(331)	331	340	350	360	370	380	396					
acT3	(331)	REAKQR	MAVEFF	QFAKEE	TRQDPF	QMSFDY	ESIYVS	DWSKLG	FSVDVY	GF	GPPMF	FAGPLV	NNDFIA
Ta acT3F	(330)	REAKQR	MAVEFF	QFAKEE	TRQDPF	QMSFDY	ESIYVS	DWSKLG	FSVDVY	GF	GPPMF	FAGPLV	NNDFIA
acT4	(316)	REAKQR	MAVEFF	QFAKEE	TRQDPF	QMSFDY	ESIYVS	DWSKLG	FSVDVY	GF	GPPMF	FAGPLV	NNDFIA
clon 8.6	(37)	REAKQR	MAVEFF	QFAKEE	TRQDPF	QMSFDY	ESIYVS	DWSKLG	FSVDVY	GF	GPPMF	FAGPLV	NNDFIA
subgr 2	(37)	REAKQR	MAVEFF	QFAKEE	TRQDPF	QMSFDY	ESIYVS	DWSKLG	FSVDVY	GF	GPPMF	FAGPLV	NNDFIA
subgr 1	(18)	REAKQR	MAVEFF	QFAKEE	TRQDPF	QMSFDY	ESIYVS	DWSKLG	FSVDVY	GF	GPPMF	FAGPLV	NNDFIA
											Section 7		
	(397)	397	410	420	434								
acT3	(397)	SVVILK	APLPLD	GT	RMLASC	VTKEHS	EEFARG	MKEDLP					
Ta acT3F	(396)	SVVILK	APLPLD	GT	RMLASC	VTKEHS	EEFARG	MKEDLP					
acT4	(382)	SVVILK	APLPLD	GT	RMLASC	VTKEHS	EEFARG	MKEDLP					
clon 8.6	(103)	SVVILK	APLPLD	GT	RMLASC	VTKEHS	EEFARG	MKEDLP					
subgr 2	(103)	SVVILK	APLPLD	GT	RMLASC	VTKEHS	EEFARG	MKEDLP					
subgr 1	(84)	SVVILK	APLPLD	GT	RMLASC	VTKEHS	EEFARG	MKEDLP					

Una vez obtenida la secuencia completa de Ta acT3F se propuso evaluar su capacidad de interacción con P9-1 por Y2H. Para eso se obtuvo la fusión al AD, se transformaron levaduras de la cepa Y187 y se obtuvieron las diploides con las construcciones AD:Ta acT3F y BD:P9-1. En la Figura 5.6 se presentan los resultados del Y2H, en donde no se identificó interacción entre Ta acT3F y P9-1.

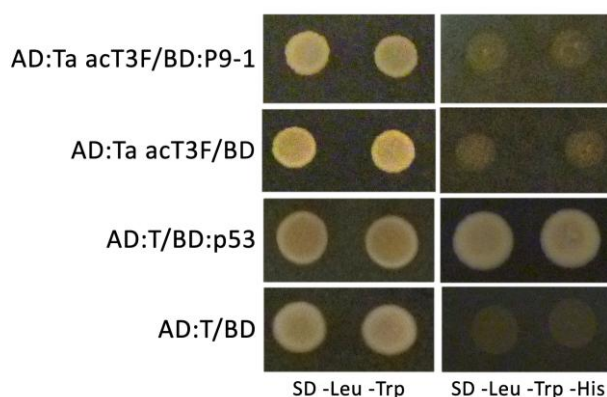


Figura 5.6: Evaluación por Y2H de la interacción entre Ta acT3 clon F y P9-1. Las levaduras que coexpresan las fusiones al AD y BD fueron plaqueadas en medio SD -Leu-Trp (control de viabilidad) y las interacciones evaluadas en medio SD -Leu-Trp-His. Se incubaron a 28 °C por 5 a 10 días. Control positivo: AD:T/BD. Controles negativos: AD:Ta acT3F/BD y AD:T/BD.

Si bien estos resultados no fueron los esperados, existen varios motivos que pueden explicar la ausencia de interacción entre Ta acT3F y P9-1; por ejemplo es posible 1) que las interacciones entre los clones relevados y P9-1 hayan sido falsos positivos debido al tamaño reducido de la porción de proteína que expresaban (aproximadamente un 30% de la región C-terminal de acT3, 140 aa de los 434 aa totales); 2) que la fusión AD:Ta acT3F completa no se localice en el núcleo de las levaduras y por lo tanto no se encuentre con BD:P9-1; 3) que los niveles de expresión de la proteína AD:Ta acT3F completa en levaduras no sean suficientes para evidenciar la interacción, o 4) que Ta acT3F solo interactúe con P9-1 bajo ciertas condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la proteína WKS1 de trigo solo interactúa consigo misma cuando presenta un fosfolípido particular en su dominio START, y además la interacción es más fuerte en ausencia de ese dominio (Jorge Dubcovsky, comunicación personal).

Por otra parte, se analizó la secuencia de Ta acT3F con el servidor Phyre², que pudo modelar más del 95% de su secuencia con un grado de confianza mayor al 90% (Figura 5.7 A y C), en base a las estructuras de otras aciltransferasas de plantas. Una de ellas es la vinorin sintasa de la especie *Rauwolfia serpentina* (*Rauwolfia*), la primer aciltransferasa BAHD para la que se

obtuvo su estructura cristalográfica (Figura 5.7 B, tomada de Ma y col., 2005). En la misma se muestra la ubicación de la molécula de acetil coenzima A (molécula dadora, en negro) y el motivo **HXXXD** en la zona baja-central de la proteína (indicado con una flecha). En la estructura de Ta acT3F también se puede observar el bolsillo central donde se ubicaría el grupo acilo, y la región del motivo **HXXXD**, marcada con una flecha (Figura 5.7 A). De manera interesante, Phyre² predijo la presencia de un paso transmembrana entre los residuos 157 y 181, que incluiría al sitio catalítico **HXXXD** (residuos 175 a 180, Figura 5.7 D). Dicha región no está presente en los clones relevados de la biblioteca, ya que en promedio comienzan cerca de la posición 300, al igual que lo hace el clon 8.6. Por otra parte, el programa no predijo ningún paso transmembrana en acT3 ni en acT4. No se puede descartar entonces que esa región de la proteína impida la llegada a núcleo en levaduras y por esa razón solo se hayan detectado en el relevamiento clones que no contenían dicho paso y que no se haya podido detectar interacción de la proteína completa con P9-1. Es necesario por lo tanto utilizar otras técnicas para evaluar la interacción entre Ta acT3F y MRCV P9-1.

A pesar de no haber podido confirmar la interacción entre la proteína de viroplasma P9-1 y la proteína Ta acT3F con función probable de aciltransferasa BAHD identificada en este trabajo de Tesis, es importante continuar estudiando esta posible interacción y, en el caso en que se pueda confirmar, caracterizar bioquímicamente a Ta acT3 en cuanto a su localización subcelular, su actividad enzimática, a la molécula que actúa como donador del grupo acilo, al tipo de sustratos que es capaz de acilar, y a su funcionalidad biológica en el contexto de una infección por MRCV. Un paso importante en la caracterización de esta aciltransferasa fue la identificación *in silico* del sitio catalítico **HXXXD** y del motivo “no convencional” **YPLAGR**. Debido a que no presentan el motivo **DFGWG**, la identificación de **YPLAGR** permitió clasificar a Ta acT3, identificada en este trabajo de Tesis, y a las proteínas acT3 y acT4 como potenciales miembros de la familia de aciltransferasas BAHD, en particular de los Clados III, Va o Vb (según la clasificación de Tuominen y col., 2011).

La relevancia de una posible interacción entre una proteína viral constituyente del viroplasma y una aciltransferasa reside en la gran diversidad de vías metabólicas en las que estas enzimas pueden participar: síntesis de ésteres, amidas, ácidos grasos, y metabolitos secundarios como alcaloides, terpenoides, ésteres volátiles, antocianinas modificadas, así como de fitoalexinas de defensa, por nombrar algunos ejemplos (D'Auria, 2006; Tuominen y col., 2011). Se ha reportado también que estas enzimas se pueden ubicar en organelas como plástidos, mitocondrias, y retículo endoplásmico (RE; Gidda y col., 2009; Xu y col., 2006;

Zheng y col., 2003). Por ejemplo, algunas aciltransferasas son proteínas de membrana y contribuyen al patrón de ácidos grasos característicos de la organela en donde se encuentran (Hanke y col., 1995).

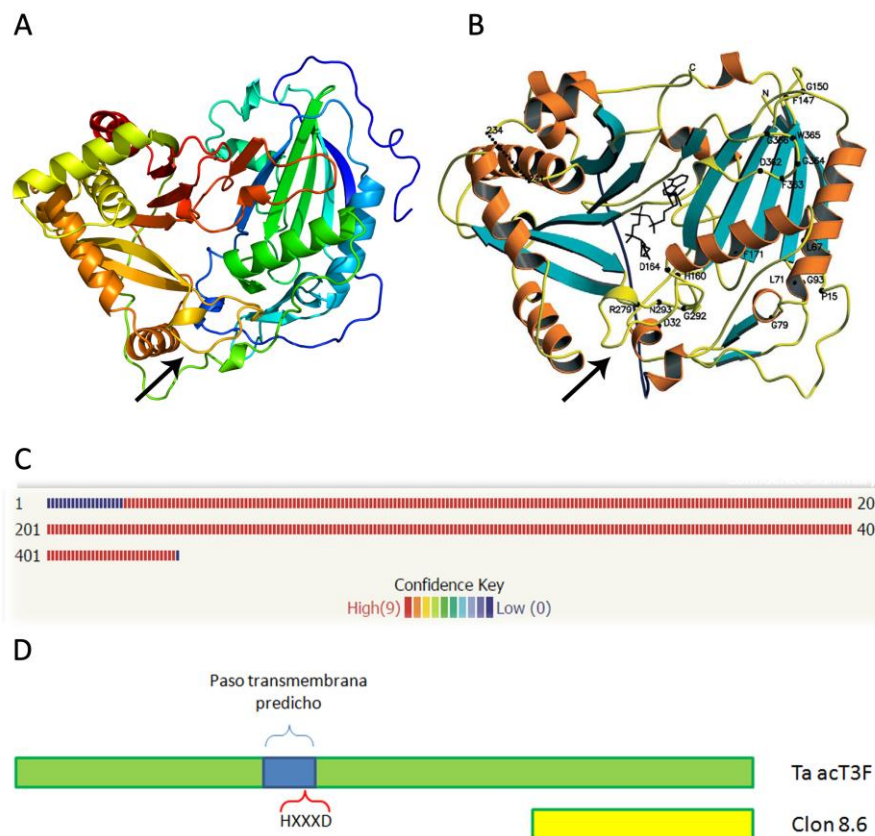


Figura 5.7: Modelado por homología de Ta acT3F con el servidor Phyre². **A.** Estructura predicha para Ta acT3F, con los colores del arco iris indicando el extremo N-terminal en color azul y el C-terminal en rojo. La flecha marca la zona donde se ubica el sitio catalítico **HXXXD**. **B.** Estructura cristalográfica de la aciltransferasa BAHD vinorin sintasa, donde se muestran con una flecha los residuos del sitio catalítico y un acetil coenzima A en el bolsillo interior de la proteína (imagen tomada de Ma y col., 2005). **C.** Gráfico indicando el nivel de confianza para cada residuo de la secuencia lineal de Ta acT3F en la predicción de Phyre². **D.** Esquema de Ta acT3F mostrando la ubicación del paso transmembrana predicho, el motivo **HXXXD** y la región C-terminal que cubre el clon 8.6.

En plantas, las aciltransferasas también intervienen en la defensa frente a patógenos, ya sea porque participan en la síntesis de cutina y ceras que actúan como primera barrera de defensa frente a patógenos (Molina y Kosma, 2014) o porque regulan vías más complejas como la resistencia frente al *Turnip crinkle virus* (TCV) en *Arabidopsis thaliana*, que es modulada negativamente por el ácido oleico y en cuya síntesis interviene una aciltransferasa (Chandra-

Shekara y col., 2007). A su vez, deficiencias en la actividad de una glicerol-3-fosfato aciltransferasa cloroplástica en *A. thaliana* resultan en un bloqueo en la vía de síntesis de lípidos de plástidos y en el arresto de la división de cloroplastos (Kunst y col., 1988; Xu y col., 2006).

Es interesante destacar también que se han demostrado roles importantes para las aciltransferasas en virus animales. En una infección por el virus de la hepatitis C (HCV), la formación de gotas lipídicas (“lipid droplets” o LDs, que sirven como almacenamiento energético y como transporte de vesículas en la célula) en el citoplasma ocurre por acumulación de triglicéridos y colesterol, y es un paso crucial en la organización para el ensamblado y la producción de partículas virales. En particular, la diacilglicerol aciltransferasa-1 (DGAT1), no solo interviene en el paso final de síntesis de triglicéridos necesarios para la formación de LDs, sino que además es capaz de unir proteínas del “core” de HCV, transportándolas desde las membranas del RE hacia las LDs (Herker y col., 2010). Esto resulta especialmente interesante considerando que los viroplasmas de *Rotavirus* reclutan LDs (Crawford, 2013; Cheung y col., 2010) y que la interferencia con la homeostasis de las LD causa una disminución en el número y tamaño de los viroplasmas y por lo tanto en la producción de progenie viral infectiva (Crawford, 2013; Cheung y col., 2010; Gaunt y col., 2013). A su vez, análisis transcriptómicos realizados en delfácidos infectados por SRBSDV mostraron un aumento en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos con respecto a insectos sanos, y los autores proponen que esto favorece a la proliferación de membranas y el movimiento célula a célula del virus (Xu y col., 2012). Por otra parte, en un estudio reciente de los perfiles de microARNs en plantas de arroz infectadas por SRBSDV se encontró un aumento en un microARN que tiene como blanco un ARNm que codifica para una posible 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa. El aumento de este microARN no ocurre en tiempos tempranos de infección (3, 9, y 15 d.pi.), pero sí a los 20 d.pi. (Xu y col., 2014).

Caracterización de la proteína con posible función de aldosa 1-epimerasa

En el análisis de las secuencias de los clones relevados de la biblioteca de trigo que presentaron interacción con MRCV P9-1, se encontró que el segundo candidato más representado había sido la secuencia de ADNc de *T. aestivum* del cultivar Chinese Spring (AK331159.1). Dicha secuencia posee un ORF completo (el cual se denominó “TaAEP”), de modo que se diseñaron oligonucleótidos específicos y se amplificó la secuencia codificante a partir de ADNc de hoja de *T. aestivum* variedad Buck Poncho sin ATG. Se obtuvo una banda

específica correspondiente al tamaño esperado (954 pb), la cual se clonó en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO, se secuenció y se la denominó “Ta AEP clon 2C” (o TaAEP2C).

A partir de las secuencias nucleotídicas se dedujeron las secuencias aminoácidas de: TaAEP, TaAEP2C, del clon 20.3 y de la secuencia consenso de los 7 clones con similitud a las aldosas 1-epimerasas obtenidos en el relevamiento. Al realizar un alineamiento múltiple de secuencia, se observa que la secuencia consenso abarca el 33,65% de la región carboxiterminal de TaAEP y TaAEP2C (Figura 5.8). Por otra parte, TaAEP2C difiere de TaAEP en 5 aminoácidos a lo largo de su secuencia y a su vez, la secuencia consenso difiere en 4 residuos respecto de TaAEP y de TaAEP2C, siendo 5 los residuos distintos respecto de TaAEP2C.

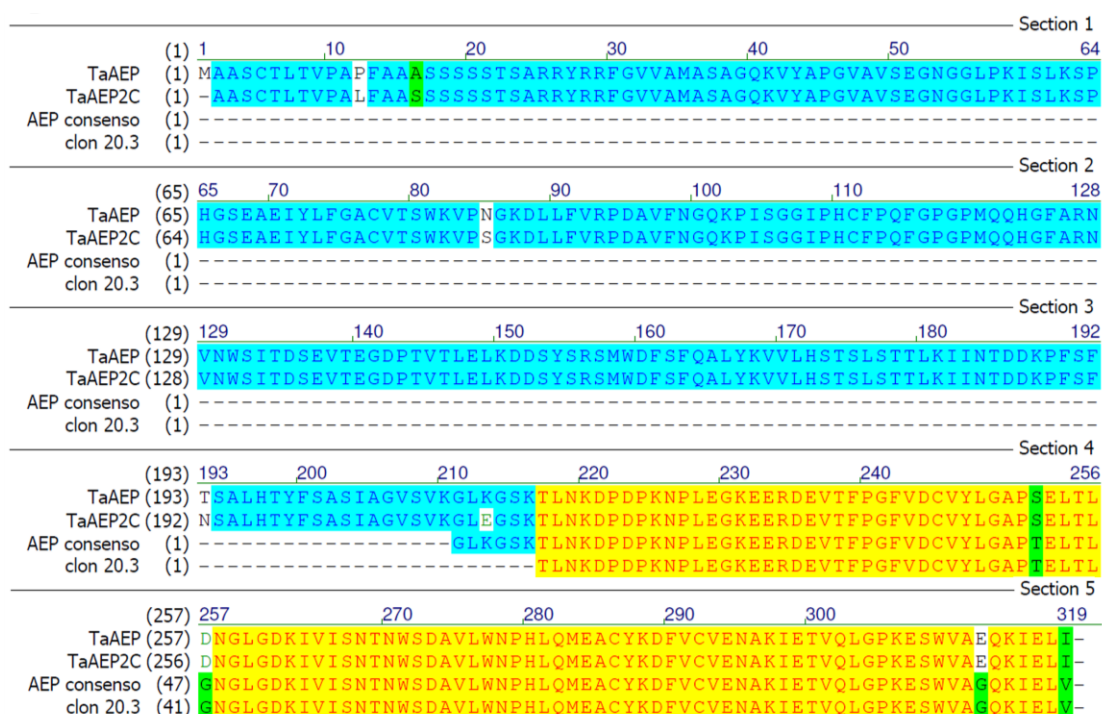


Figura 5.8: Análisis de las secuencias aminoácidas deducida del ORF de “clon: SET6_I04, ADNc de *Triticum aestivum*, cultivar: Chinese Spring” (acceso GenBank AK331159.1) que se denominó “TaAEP”, TaAEP2C (clonada), el clon 20.3 utilizado para confirmar la interacción con P9-1 y la secuencia consenso los 7 clones AEP que presentaron interacción con P9-1 (AEP consenso). Alineamiento múltiple de secuencias por ClustalW realizado con el programa AlignX. Los residuos idénticos se muestran con letra roja y fondo amarillo; los conservados en letra azul y fondo celeste; los que pertenecen a un mismo grupo funcional se muestran en letra negra y fondo verde; los que son débilmente similares se muestran en letra verde y fondo blanco y los que pertenecen a distintos grupos funcionales en letra negra con fondo blanco.

A continuación, se analizó la ubicación en el genoma de *T. aestivum* de TaAEP, TaAEP2C, el clon 20.3 utilizado para confirmar la interacción con P9-1 en el relevamiento y la secuencia consenso, con la herramienta BLASTN del servidor EnsemblPlants (Figura 5.9). Se encontró que TaAEP se encuentra ubicado en el cromosoma **5D**, en la posición 95396670-95396868 donde se ubica el gen Traes_5DL_FAD14F008 (E-valor $4,4 \times 10^{-93}$ y 86% de identidad). Por su parte, TaAEP2C presenta similitud con la posición 163700235-163700451 del cromosoma **5B** (E-valor $3,4 \times 10^{-92}$ y 83% de identidad), donde se encuentra el gen Traes_5BL_65AD61EB7. A su vez, el clon 20.3 presentó similitud con la posición 7042401-7042557 del cromosoma **5A** (con un E-valor de $1,1 \times 10^{-48}$ y 99% de identidad) donde se encuentra el gen Traes_5AL_676D49521. Por último, la secuencia consenso de los 7 clones relevados en la biblioteca, al igual que el clon 20.3, presentó similitud con la posición 7042320-7042557 del cromosoma **5A** (E-valor de $1,6 \times 10^{-70}$ y 99% de identidad). Estos resultados sugieren que las secuencias analizadas corresponderían a genes homeólogos. Es importante recordar que TaAEP (se encontró por BLASTN del NCBI) es de *T. aestivum* Chinese Spring, TaAEP2C fue obtenida a partir de *T. aestivum* Buck Poncho, y que la biblioteca de ADNc se realizó a partir de *T. turgidum* L. ssp. *durum* cv. Langdon.

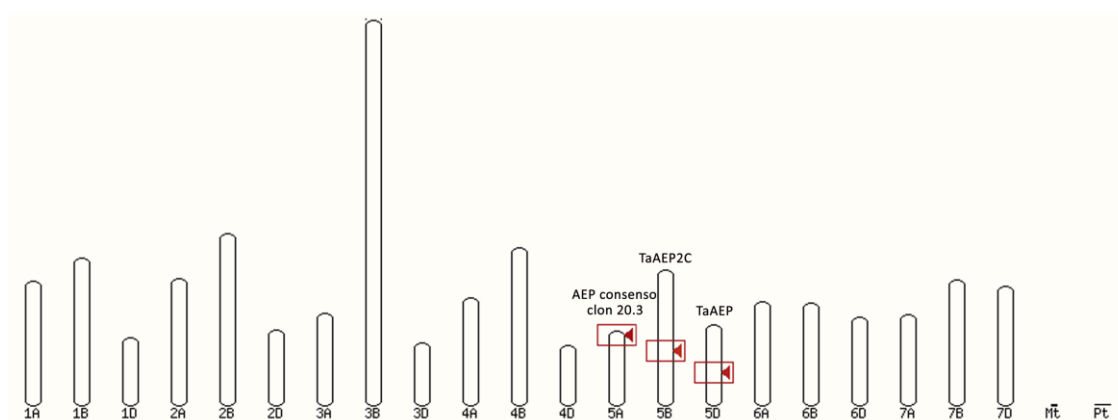


Figura 5.9: Mapeo de las secuencias del clon 20.3 y las regiones codificantes de TaAEP y TaAEP2C en el genoma de *T. aestivum*. El análisis de las secuencias se realizó por BLASTN con el servidor EnsemblPlants. La región recuadrada en rojo marca la ubicación de las secuencias identificadas.

Como se mencionó, la secuencia nucleotídica de TaAEP2C presentó similitud con una región del cromosoma **5B** de *T. aestivum* donde se ubica el gen Traes_5BL_65AD61EB7, mientras que la secuencia de TaAEP presenta similitud con el gen Traes_5DL_FAD14F008 del cromosoma **5D**. El análisis de ontología (anotación GO, “Gene Ontology”), en particular su función molecular, muestra que ambos genes codificarían para un tipo particular de aldosas 1-epimerasas:

glucosa-6-fosfato 1-epimerasa (código InterPro IPR008183). Las aldosas 1-epimerasas (también llamadas mutarasas o aldosas mutarasas, nomenclatura EC 5.1.3.3) son enzimas que realizan la interconversión de las formas α - y β - entre los anómeros de hidratos de carbono como la D-glucosa y otras aldosas como la L-arabinosa, D-xilosa, D-galactosa, maltosa y lactosa (Bailey y col., 1967). En particular, las glucosas-6-fosfato 1-epimerasas catalizan la interconversión de los anómeros α - y β - de al menos tres hexosas: glucosa-6-fosfato (Glc6P) galactosa-6-fosfato (Gal6P) y manosa-6-fosfato (Man6P; Graille y col., 2006).

Por otra parte, se analizó la secuencia aminoacídica de TaAEP2C con el predictor ChloroP v1.1 y se encontró que TaAEP2C tendría una localización cloroplástica, con un grado de confianza de 0,563, siendo 1 la mayor confianza en la predicción y 0 la menor. De acuerdo con la predicción, el péptido señal de tránsito a cloroplastos en TaAEP2C estaría conformado por los primeros 32 residuos.

El siguiente paso fue evaluar la capacidad de interacción de TaAEP2C con P9-1. Para ello se obtuvieron las construcciones que expresan AD:TaAEP2C y BD:P9-1 en levaduras y se evaluó su interacción por Y2H. Utilizando esta técnica no fue posible confirmar la interacción entre P9-1 y TaAEP2C (Figura 5.10). Estos resultados contrastan con los obtenidos por medio de la misma técnica para los clones de menor tamaño obtenidos relevados de la biblioteca.

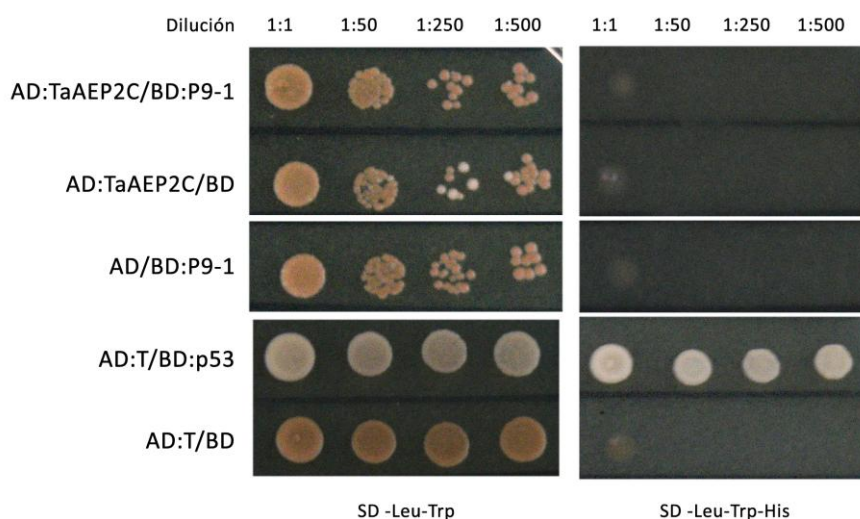


Figura 5.10: Evaluación de la interacción entre TaAEP2C y MRCV P9-1 por Y2H. Las levaduras que coexpresan las fusiones al AD y BD fueron plaqueadas en medio SD -Leu-Trp (control de viabilidad) y las interacciones fueron evaluadas en medio SD -Leu-Trp-His. Se incubaron a 28 °C por 5 a 10 días. Control positivo: AD:T/BD. Controles negativos: AD:TaAEP2C/BD, AD/BD:P9-1 y AD:T/BD.

Se procedió entonces a evaluar esta interacción mediante la técnica de coimmunoprecipitación (coIP) expresando TaAEP2C de manera transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, en primer lugar se subclonó por recombinación Gateway la secuencia codificante de TaAEP2C en el vector de destino pEarleyGate203 que permite su expresión en plantas fusionada al epítopo cMyc a partir del promotor 35S; se transformaron agrobacterias de la cepa GV3101 con dicha construcción y se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con agrobacterias capaces de expresar cMyc:TaAEP2C o cMyc fusionado al gen de la β -glucuronidasa como control negativo de interacción (cMyc:GUS). En todos los casos se coinfiltró con agrobacterias capaces de expresar el supresor de silenciamiento P19. A los 2 días posagroinfiltración (d.pa.) se extrajeron proteínas totales y se incubaron los extractos con 50 ng de His/Xpress:P9-1 purificada de *E. coli*. Finalmente se inmunoprecipitó (IP) con anticuerpo anti-cMyc conjugado con agarosa. Se separaron las proteínas coimmunoprecipitadas por SDS-PAGE 10% y se las analizó por inmunoblot (IB) utilizando antisueros comerciales anti-cMyc (para identificar cMyc:GUS y cMyc:TaAEP2C) y anti-Xpress (para identificar His/Xpress:P9-1). La Figura 5.11 presenta los resultados obtenidos. Cuando His/Xpress:P9-1 fue incubada con cMyc:TaAEP2C, se detectó su presencia en el inmunoprecipitado con anti-cMyc, indicando que His/Xpress:P9-1 es capaz de interactuar físicamente con cMyc:TaAEP2C (Figura 5.11 A). Por el contrario, cuando His/Xpress:P9-1 se incubó con cMyc:GUS, no se detectó His/Xpress:P9-1 en el inmunoprecipitado con anti-cMyc (Figura 5.11 B), indicando que estas dos proteínas no presentaron interacción, y demostrando que la interacción entre P9-1 y TaAEP2C es específica.

Los resultados obtenidos indican que TaAEP2C fue capaz de interactuar con P9-1 por coIP pero no por Y2H, y destacan la necesidad de evaluar interacciones proteicas utilizando distintas técnicas. A su vez, la predicción de que esta aldosa 1-epimerasa se localiza en cloroplastos podría explicar los resultados contrapuestos, ya que podría ocurrir que la señal de tránsito a cloroplasto estuviera afectando la llegada de la fusión AD:TaAEP2C al núcleo de las levaduras.

Las señales de tránsito a cloroplastos se encuentran generalmente en el extremo aminoterminal y tienen aproximadamente 58 residuos de largo. Si bien no presentan una secuencia consenso, la composición de sus aminoácidos es muy similar: en general poseen un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, polares y cargados positivamente, y un bajo porcentaje de residuos acídicos (Bhushan y col., 2006). Al analizar la composición de los primeros 32 residuos de TaAEP2C predichos por el servidor ChloroP como los constituyentes de la señal de tránsito a cloroplastos, se encontró que el 40,63% de los aminoácidos son

hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V), el 40,63% son polares (N, C, Q, S, T, Y), el 12,50% son de carga positiva (arginina R, lisina K, histidina H) mientras que no contiene residuos ácidos (D, E).

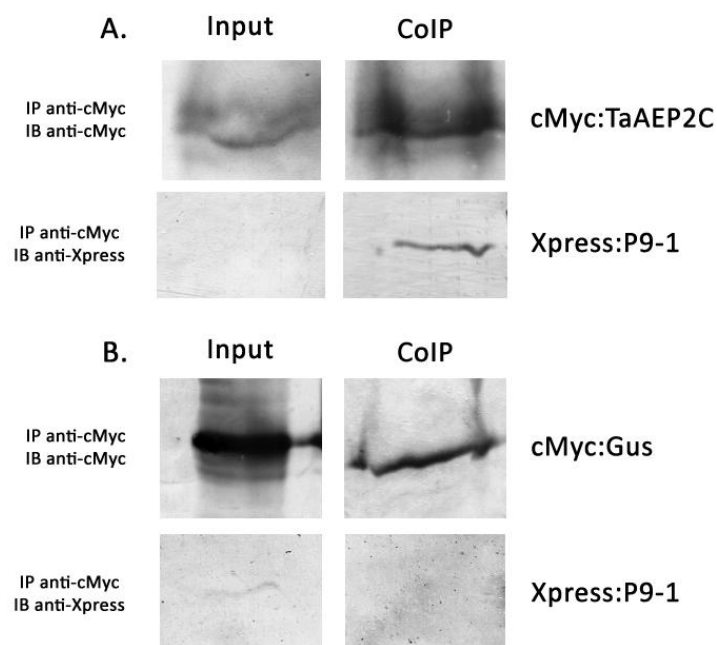


Figura 5.11: La proteína TaAEP2C interactúa con P9-1 en ensayos de coimmunoprecipitación (CoIP). Inmunoprecipitación de las proteínas cMyc:TaAEP2C (38,57 kDa) o cMyc:GUS (69,45 kDa) expresadas transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. Las cepas de agrobacterias llevando las distintas construcciones fueron coinfiltradas con agrobacterias capaces de expresar el supresor de silenciamiento P19. A los 2 días posagroinfiltración se extrajeron proteínas totales, que fueron incubadas con 50 ng de His/Xpress:P9-1 (44,5 kDa) purificada de *E. coli*. Las proteínas fusionadas a cMyc fueron inmunoprecipitadas (IP) con bolitas de agarosa conjugadas con anticuerpo anti-cMyc y los análisis por inmunoblot (IB) fueron realizados con los anticuerpos que se indican en la izquierda del panel. Se detectó la presencia de His/Xpress:P9-1 en el inmunoprecipitado con cMyc:TaAEP2C (**A**) pero no en el de cMyc:GUS (**B**). Input: Carga inicial de proteínas previa a la IP. CoIP: Proteínas que inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-cMyc.

Para confirmar la hipótesis de que los primeros 32 residuos de TaAEP2C constituyen una señal de localización a cloroplasto, será necesario realizar análisis de localización subcelular de TaAEP2C con y sin péptido señal, así como también evaluar su capacidad de interacción por Y2H con P9-1 en ausencia del péptido señal. Respecto de la localización subcelular, durante este trabajo de Tesis se analizó la localización de la fusión TaAEP2C:GFP en agroinfiltraciones de hoja de *N. benthamiana* pero no se obtuvieron resultados satisfactorios ya que se detectó una gran cantidad de GFP libre por “Western blot” (resultados no mostrados), lo que implica

que la proteína de fusión era clivada durante los ensayos, y que por lo tanto es necesario realizar nuevos experimentos para evaluar su expresión.

Las proteínas pertenecientes a la familia de las **aldosas-1-epimerasas** son enzimas del metabolismo central del carbono (Bailey y col., 1967). Se ha observado que infecciones con patógenos a menudo pueden afectar procesos fisiológicos comunes, en particular aquellos relacionados con el metabolismo (Zhang y col., 2011). En un estudio de proteómica comparativa de cloroplastos de células de la vaina y células de mesófilo en maíz, se encontró que la aldosa-1-epimerasa se halla en mayor abundancia en las células de la vaina (Majeran y col., 2005), lo cual es interesante dado que MRCV replica exclusivamente en células de floema (Arneodo y col., 2002b; Nome y col., 1981) y P9-1 es una proteína viral de expresión temprana y abundante. Es importante destacar que se ha reportado que la proteína P6 del RBSDV interactúa con una posible aldosa 1-epimerasa de arroz por Y2H (Winter y col., 2010). En contraposición, en este trabajo de Tesis no se detectó que P6 del MRCV tuviese capacidad de interacción con TaAEP2C ni con el clon 20.3 (que sí presentó interacción con P9-1) por Y2H (resultados no mostrados).

Identificación de proteínas de trigo con capacidad de interacción con MRCV P6 por Y2H

El segundo relevamiento de la biblioteca de trigo se realizó utilizando como carnada la proteína minoritaria de viroplasma P6. En líneas generales se procedió de la misma manera que se detalló para el relevamiento con P9-1, el cual fue realizado estrictamente de acuerdo a las indicaciones del manual, pero en esta ocasión se decidió implementar algunas modificaciones con el fin de aumentar el número de colonias interactuantes y favorecer la detección de interacciones débiles: no se utilizó X- α -Gal para la selección, se disminuyó la concentración del antibiótico aureobasidina A y se picaron todas las colonias (ya que no se diferenciaron por color azul al no usar X- α -Gal) a los 4, 6, 7, 11, 12 y 13 días luego del plaqueo. De esta forma se seleccionaron inicialmente 1877 colonias en medio SD -Leu-Trp-His+Aureobasidina A 60 μ g/ml (SD-LWH/AbA). A continuación, se confirmaron 420 colonias positivas en el medio más selectivo SD-Leu-Trp-His-Ade+AbA (SD-LWHA/AbA), y tras un nuevo repique se seleccionaron 145 clones. Luego se amplificaron los insertos contenidos en estos clones por PCR, y se eliminaron clones redundantes mediante análisis de restricción con Alu I de los amplicones, seleccionándose finalmente 57 clones. A diferencia del relevamiento con

Se procedió entonces a aislar los plásmidos de los clones de levaduras, transformar *E. coli*, reextraer los plásmidos de las bacterias, retransformar con ellos levaduras de la cepa Y187, y obtener diploides por apareamiento con la cepa Y2HGold que expresa la fusión BD:P6. De los 57 clones evaluados, solo se confirmaron 3 interacciones positivas con P6 por Y2H: los clones 4.1.3A, 4.34.5D y 7.48.5. Se encontró que un clon resultó ser un falso positivo (4.41.12). El resto de los clones no presentó interacción con P6 en medio selectivo SD -Leu-Trp-His. En la Figura 5.12 se muestran los resultados obtenidos para algunos de los clones evaluados.

Dilución	1:1	1:20	1:1	1:20	1:1	1:20	1:1	1:20
4.34.1/BD:P6								
4.34.1/BD								
4.34.5D/BD:P6								
4.34.5D/BD								
4.40.1A/BD:P6								
4.40.1A/BD								
4.41.12/BD:P6								
4.41.12/BD								

147

A

B

Section 1

Clon 4.1.3A (1) GAGAGGGGTGAGGGCGGAGGCGGCCTACTTCTGGGACGGCTCGGTGCCCGT GGA GATG GGGCGAG
Clon 4.34.5 D (14) ATCGACAGCAATGGCAAGCTCGACGCCGCGCTCGCTTCCCTCCGCCGAGCAAAACCAGGCCATCA
Clon 7.48.5 (1) ----- GATG GGGCGAG

Section 2

Clon 4.1.3A (65) ATCGACAGCAATGGCAAGCTCGACGCCGCGCTCGCTTCCCTCCGCCGAGCAAAACCAGGCCATCA
Clon 4.34.5 D (142) ATCGACAGCAATGGCAAGCTCGACGCCGCGCTCGCTTCCCTCCGCCGAGCAAAACCAGGCCATCA
Clon 7.48.5 (11) ATCGACAGCAATGGCAAGCTCGACGCCGCGCTCGCTTCCCTCCGCCGAGCAAAACCAGGCCATCA

Section 3

Clon 4.1.3A (129) TCATCGACTGGATGGCAAGCTGGTGCCGGAATGCAATTTACCTCAAGCCCAAGCTGGAGAAGAT
Clon 4.34.5 D (78) TCATCGACTGGATGGCAAGCTGGTGCCGGAATGCAATTTACCTCAAGCCCAAGCTGGAGAAGAT
Clon 7.48.5 (75) TCATCGACTGGATGGCAAGCTGGTGCCGGAATGCAATTTACCTCAAGCCCAAGCTGGAGAAGAT

Section 4

Clon 4.1.3A (193) AGCAGGAGAAATTCAGGAGTCAGGTTTACTTTGTGGATGTCAATAAAGTTCCACAGGCCGTG
Clon 4.34.5 D (142) AGCAGGAGAAATTCAGGAGTCAGGTTTACTTTGTGGATGTCAATAAAGTTCCACAGGCCGTG
Clon 7.48.5 (139) AGCAGGAGAAATTCAGGAGTCAGGTTTACTTTGTGGATGTCAATAAAGTTCCACAGGCCGTG

Section 5

Clon 4.1.3A (257) GAAAAAGAGGGAATATAAGCAAAATGCCCAATTCAGTTGTGGAAGGAGGAGAAATGGAAGG
Clon 4.34.5 D (206) GAAAAAGAGGGAATATAAGCAAAATGCCCAATTCAGTTGTGGAAGGAGGAGAAATGGAAGG
Clon 7.48.5 (203) GAAAAAGAGGGAATATAAGCAAAATGCCCAATTCAGTTGTGGAAGGAGGAGAAATGGAAGG

Section 6

Clon 4.1.3A (321) AGGAAGTGATAGGAGGCCATAAAGCGTGCGTGGTGATGGATGAGGTTAGAGATATGATCCAGAA
Clon 4.34.5 D (320) AGGAAGTGATAGGAGGCCATAAAGCGTGCGTGGTGATGGATGAGGTTAGAGATATGATCCAGAA
Clon 7.48.5 (267) AGGAAGTGATAGGAGGCCATAAAGCGTGCGTGGTGATGGATGAGGTTAGAGATATGATCCAGAA

Section 7

Clon 4.1.3A (385) GTACAAGTGACTGATTACATAAG-----ATACTGTATATAGAGGTTTGAATGATCTCTCCGGA
Clon 4.34.5 D (334) GTACAAGTGACTGATTACATACTTATTTACTGTATATAGAGGTTTGGATGATCTCTCCGGA
Clon 7.48.5 (331) GTACAAGTGACTGATTACATAAG-----ATACTGTATATAGAGGTTTGAATGATCTCTCCGGA

Section 8

Clon 4.1.3A (449) ACTGTAACCCGATCAATAAAACCTATTTCAGCTCCTTAATACGTGCAACAGAGCTGGCCTATG
Clon 4.34.5 D (398) ACTGTAACCCGATCAATAAAACCTATTTCAGCTCCTTAATAC-----GACAGAGCTGGCCTATG
Clon 7.48.5 (391) ACTGTAACCCGATCAATAAAACCTATTTCAGCTCCTTAATACGTGCAACAGAGCTGGCCTATG

Section 9

Clon 4.1.3A (513) CTATTATCTGTTGCAAGATTTCATTGAAATCTTCTGTTCTGTATTGATCTATGGTGCATT
Clon 4.34.5 D (458) CTATTATCTGTTGCAAGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
Clon 7.48.5 (455) CTATTATCTGTTGCAAGATTTCATTGAAATCTTCTGTTCTGTATTGATCTATGGTGCATT

Section 10

Clon 4.1.3A (577) GATCAGAAGTTAATACCTAGAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Clon 4.34.5 D (500) -----
Clon 7.48.5 (508) -----

148

Al alinear los clones en base a la secuencia aminoacídica deducida de dicho ORF, se encontró que los clones 4.1.3A y 7.48.5 son idénticos, mientras que la proteína codificada por el clon 4.34.5D difiere en dos residuos aminoacídicos (Figura 5.14 A). Además, al analizar por “BLASTP” del NCBI la secuencia aminoacídica de los clones 4.34.5D y 4.1.3A, ambos presentaron similitud con las proteínas de la familia de las **tiorredoxinas** (TRX), con un E-valor de 4×10^{-19} (Figura 5.14 B). Los residuos catalíticos de las TRX son dos cisteínas que forman un ditiol (**CXXC**). La mayor parte de las proteínas que presentaron similitud con los clones eran proteínas de plantas, específicamente gramíneas de los géneros *Hordeum*, *Oryza*, *Brachipodium* y *Zea* predichas como del tipo “tiorredoxina 3-1 cloroplástica”, mientras que en algunos casos eran predichas como “tiorredoxinas tipo 5”. Utilizando la base de datos del NCBI no se encontró similitud significativa con ninguna proteína de trigo.

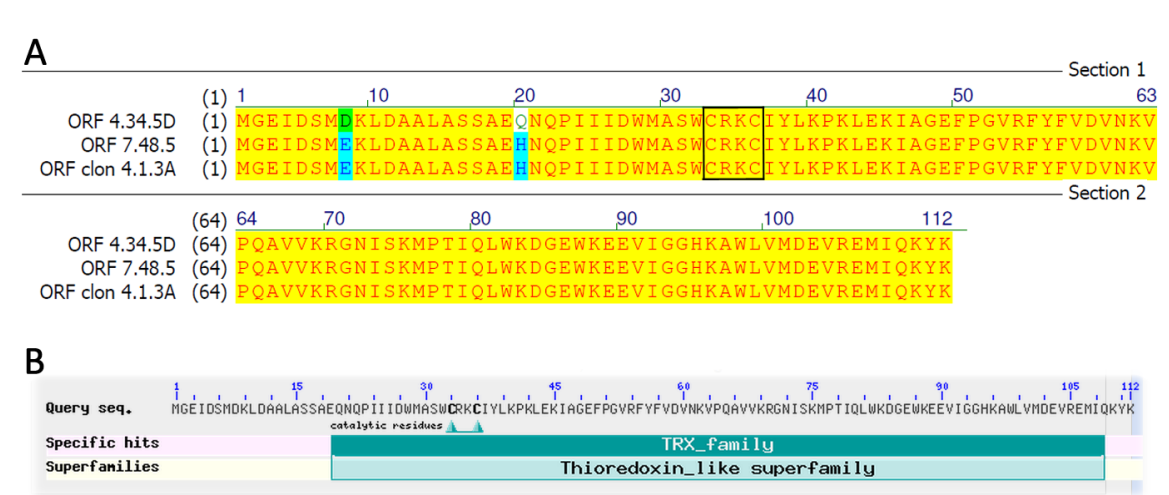


Figura 5.14: Análisis de las secuencias aminoacídicas de los clones 4.1.3A, 4.34.5D y 7.48.5. **A.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas a partir del ORF presente en los clones utilizando el programa AlignX. **B.** Los clones poseen dominios funcionales característicos de las familias de las tiorredoxinas y sus residuos catalíticos (marcados en negrita, CXXC). Resultado de la búsqueda por BLASTP del NCBI con las secuencias aminoacídicas deducidas del ORF presente en los tres clones relevados. En el ejemplo de la figura se utilizó el clon 4.34.5D.

A continuación, y ya que no fue posible identificar secuencias de trigo de la base de datos del NCBI, se identificó la región del genoma de *T. aestivum* donde se encuentran las secuencias de 4.1.3A y 4.34.5D, utilizando la herramienta BLASTN del servidor EnsemblPlants. Se encontró que el ORF de 4.1.3A presenta mayor similitud con la posición 1956-2274 dentro del “scaffold” IWGSC_CSS_6DL_scaff_864149:1956-2274 del cromosoma **6D** (E-valor $1,6 \times 10^{-84}$ y 86% de identidad). A su vez, el ORF de 4.34.5D presentó similitud con la región 2036-2276 dentro del mismo “scaffold” del cromosoma **6D** que el clon 4.1.3A (E-valor $9,8 \times 10^{-72}$ y 93% de identidad).

En esa región se encuentra el gen Traes_6DL_3D072DB07. Efectivamente, la anotación GO muestra que codifica para una tiorredoxina (código InterPro IPR005746). En la Figura 5.15 se marca la posición en el mapa cromosómico de *T. aestivum*. En base a su ubicación en el genoma de *T. aestivum*, es probable que los ORF dentro de los clones 4.1.3A y 4.34.5D sean variantes alélicas del mismo locus.

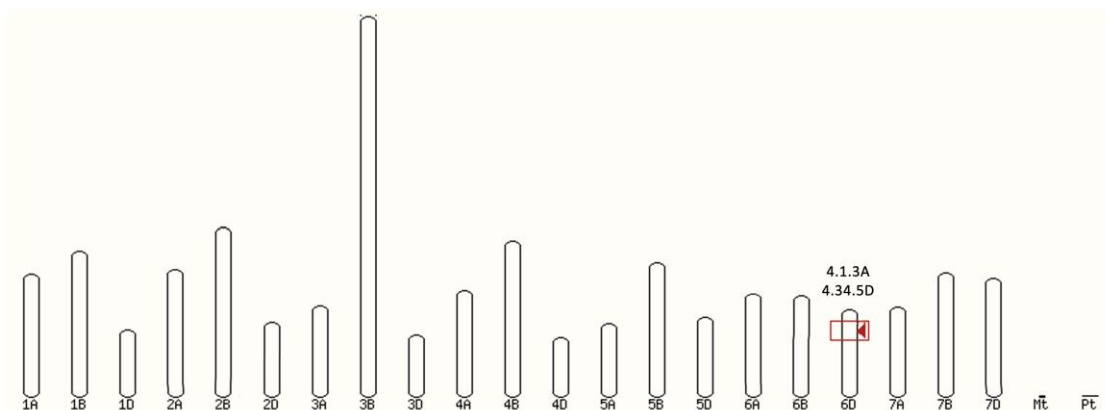


Figura 5.15: Mapeo de las secuencias de los ORFs de los clones 4.1.3A y 4.34.5D en el genoma de *T. aestivum*. El análisis de las secuencias se realizó por BLASTN con el servidor EnsemblPlants. La región recuadrada en rojo marca la ubicación de las secuencias identificadas.

Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas (12-14 kDa) que catalizan la reducción de puentes disulfuro de sus proteínas blanco, a través de su sitio catalítico formado por dos cisteínas, **CXXC**. De esta forma, estas proteínas intervienen en el mantenimiento del balance redox celular, y están conservadas en organismos desde *E. coli*, levaduras, mamíferos y plantas (Meyer y col., 1999). En plantas, las tiorredoxinas se han caracterizado de acuerdo a su localización celular y función, siendo la presencia del motivo **WCGPC** una característica distintiva de este tipo de proteínas. Además, se caracterizan por constituir familias multigénicas, y en comparación con otros organismos como el humano o microorganismos como *E. coli*, donde existen unas pocas tiorredoxinas, la gran diversidad que presentan en el reino vegetal permite suponer que cumplen importantes roles fisiológicos, que sus proteínas blanco son igualmente abundantes y que dichas interacciones son específicas (Meyer y col., 1999). Con el tiempo se fueron descubriendo otras tiorredoxinas (las tipo-TRX o “TRX-like”) con motivos atípicos en el sentido de que si bien conservan las dos cisteínas, los residuos que las separan no son glicina-prolina (Chibani y col., 2012; Dangoor y col., 2009; Meyer y col., 2005). Uno de estos motivos es el **WCRKC**, y se encuentra presente en las tiorredoxinas codificadas por los clones 4.1.3A y 4.34.5D. En *Arabidopsis* se han caracterizado dos “TRX-like”

con motivos WCRKC y ambas se localizan en el estroma de los cloroplastos (Cain y col., 2009; Meyer y col., 2005).

Caracterización de la proteína con posible función de tiorredoxinas

En base al ORF completo encontrado en los tres clones con similitud a una posible tiorredoxina de 12,8 kDa, se diseñaron oligonucleótidos específicos, y se amplificó la secuencia codificante completa por PCR utilizando como templado el ADN plasmídico de los clones 4.1.3A y 4.34.5D. Los productos de amplificación se denominaron “Ta TRX 4.1.3A” y “Ta TRX 4.34.5D” y las secuencias completas fueron clonadas en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO, analizadas por secuenciación, y recombinadas en los vectores para expresión en levaduras pLAW11 y pLAW10, que se utilizaron para transformar levaduras, y se evaluaron las interacciones por Y2H. Los resultados se muestran en la Figura 5.16.

La fusión AD:TaTRX4.1.3A presentó autoactivación ya que las levaduras crecieron en presencia de BD solo (Figura 5.16 A), mientras que se observó interacción entre AD:TaTRX4.34.5D y BD:P6, sin detectarse autoactivación. De este modo, se descartó del análisis la fusión AD:TaTRX4.1.3A y solo se tuvo en cuenta la interacción positiva encontrada entre AD:TaTRX4.34.5D y BD:P6. De manera complementaria, se evaluó la capacidad de interacción de TaTRX 4.1.3A y 4.34.5D fusionadas al BD con AD:P6 (Figura 5.16 B) y se encontró que ambas presentaron interacción con P6, sin detectarse autoactivación en este caso.

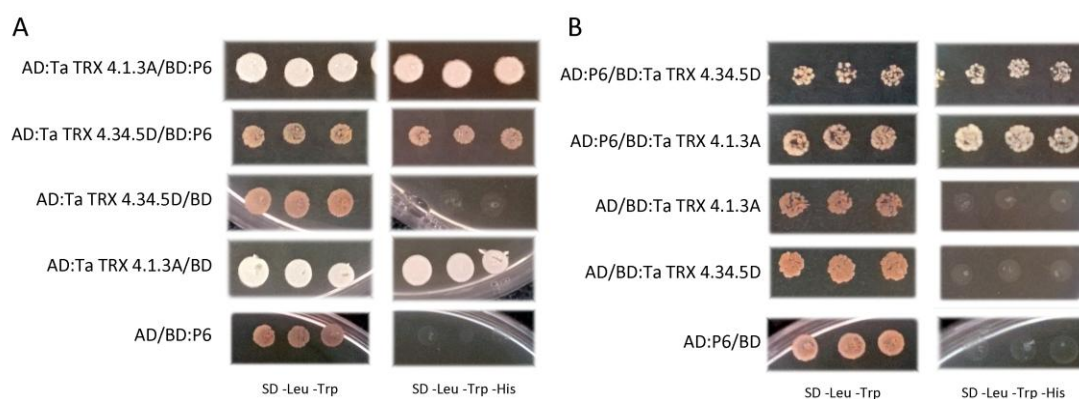


Figura 5.16: Evaluación por Y2H de la interacción entre TaTRX 4.1.3A y 4.34.5D con P6 de MRCV. TaTRX 4.1.3A presenta autoactivación cuando está fusionada al AD (**A**) pero no cuando está fusionada al BD (**B**). TaTRX 4.34.5D interactúa con P6 cuando está fusionado al AD (**A**) y al BD (**B**). Las levaduras que coexpresan las fusiones al AD y BD fueron plaqueadas en medio SD -Leu-Trp (control de viabilidad) y las interacciones fueron evaluadas en medio SD -Leu-Trp-His. Se incubaron a 28 °C por 5 a 10 días. Control

positivo: AD:T/BD. Como control negativo se utilizó cada proteína fusionada al AD o BD sin su correspondiente par de interacción y AD:T/BD.

Estos resultados muestran que TaTRX4.1.3A y TaTRX4.34.5D son capaces de interactuar *in vivo* con la proteína viral P6 por Y2H. Análisis de predicción de la localización subcelular de estas dos “TRX-like” con el predictor ChloroP, mostraron que ninguna de las dos tendría localización cloroplástica, de manera que constituirían una nueva clase de “TRX-like” que no estarían presentes en el estroma de los cloroplastos. Por otra parte, se analizó bioinformáticamente la secuencia de P6 en busca de cisteínas con potencial de formar puentes disulfuro que pudieran ser blancos de reducción por parte de TRX. Utilizando el servidor DIANNA se encontró que las 14 cisteínas presentes en P6 tienen potencial para formar 7 puentes disulfuro: cinco de ellos fueron predichos con un alto grado de confianza (superiores a 0,99) y uno de ellos fue predicho con una confianza de 0.87. De manera interesante, la formación de puentes disulfuro contribuye a estabilizar proteínas, manteniendo su estructura terciaria, evitando su desnaturalización y degradación proteolítica (Buchanan y Balmer, 2005). Se analizó también la secuencia de P9-1 y se encontró que solo posee 2 cisteínas y que la probabilidad de que formen puentes disulfuro es de 0,01, mientras que las predicciones de P6 tuvieron un puntaje de confianza mayores a 0,99 para 5 de los puentes potenciales, y 0,87 y 0,47 en dos de ellos.

En arroz una de las proteínas más abundantes de los elementos de tubo criboso del floema es una tiorredoxina de tipo H (que no contiene señal de localización a cloroplasto; Ishiwatari y col., 1995). El floema constituye la ruta para el transporte a distancia de nutrientes y señales químicas en la planta. Muchos iones inorgánicos, compuestos orgánicos, como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y hormonas han sido detectados en exudados floemáticos, así como también ácidos nucleicos y proteínas. En particular, las tiorredoxinas han cobrado especial relevancia en los últimos años debido a sus funciones como moléculas de señalización capaces de sensor el estado redox celular (Serrato y col., 2013).

Estudios realizados con mutantes de TRX que forman uniones disulfuro con las proteínas blanco pero son deficientes en la reacción completa quedando unidas covalentemente, han permitido la identificación de los sustratos celulares de algunas TRX. Por ejemplo, se ha encontrado que TRX citosólicas de *Arabidopsis* tienen como blanco a proteínas antioxidantes, proteínas que intervienen en la síntesis proteica, en la degradación proteica (subunidad regulatoria del 26S), y varias enzimas metabólicas así como chaperonas cloroplásticas (Yamazaki y col., 2004). Estas interacciones destacan la importancia del “cross-talk” en el

mantenimiento de la homeostasis celular, y representan posibles e importantes blancos celulares de una infección por parte de los virus. En particular, un trabajo reciente demostró que líneas mutantes de *A. thaliana* deficientes en una tiorredoxina reductasa C dependiente de NADPH cloroplástica (NTRC), que posee tanto el dominio tiorredoxina como el dominio reductasa, presentan enanismo. De manera interesante, demostraron que este retraso en el crecimiento no se debe mayoritariamente a la acumulación de especies reactivas del oxígeno sino que la causa principal es una deficiencia en la acumulación de almidón en hojas (Lepisto y col., 2013). Tanto las vías de síntesis como de degradación de almidón involucran enzimas que se encuentran reguladas según el estado redox en cloroplastos (Kotting y col., 2010). En ese trabajo determinaron por Y2H que la tiorredoxina NTRC interactúa con la enzima ADP-glucosa-pirofosforilasa, clave en la síntesis de almidón (Lepisto y col., 2013). De manera complementaria, en otro trabajo publicado en el año 2013 se encontró que la sobreexpresión de las tiorredoxinas f y m en plantas de tabaco provoca incrementos de hasta 700% en los niveles de acumulación de almidón en hojas, junto con un aumento en los niveles de azúcares y aumento de la biomasa en hojas. Estos resultados muestran que las tiorredoxinas son reguladores del metabolismo fotosintético de carbono en plantas (Sanz-Barrio y col., 2013). Estas evidencias son relevantes dado que como se mencionó en la Introducción, el MRCV provoca enanismo y una marcada alteración en los cloroplastos (Arneodo y col., 2002b) pero por otra parte causa también un aumento en la concentración de almidón en tejidos foliares (Di Feo, 2010). Esto último podría deberse a que la infección provoca el colapso del sistema vascular impidiendo el transporte de hidratos de carbono de la fuente (hoja) a destino, y provocando por lo tanto su acumulación en hojas.

Respecto del rol de las TRX en la interacción hospedante-patógeno, se encontró en tomate una tiorredoxina (CITRX) capaz de interactuar con la proteína de resistencia Cf-9. De manera interesante, CITRX modula negativamente la respuesta de defensa, ya que se observó que su silenciamiento inducido por VIGS resulta en una respuesta hipersensible acelerada, que induce la acumulación de especies reactivas del oxígeno, la alteración de actividades de quinasas y la inducción de genes de defensa. Asimismo, el silenciamiento de CITRX en un tomate susceptible resulta en resistencia frente a hongos. De esta forma CITRX modularía negativamente la respuesta de defensa (Rivas y col., 2004).

Las interacciones encontradas en esta Tesis resultan de gran relevancia y abren nuevos rumbos en la investigación de la interacción MRCV-hospedante. Será importante caracterizar las “TRX-like” de trigo identificadas, en cuanto a su localización subcelular, ensayar su actividad como

tiorredoxinas, así como identificar el agente que las reduce luego de que hayan reducido al sustrato. Este es usualmente NADPH a través de la vía NADPH-tiorredoxin reductasa (NTR), o una tiorredoxin-reductasa dependiente de ferredoxina (Fdx, sistema ferredoxin-tiorredoxin-reductasa, FTR; Nikkanen y Rintamaki, 2014).

A su vez, aún resta determinar la naturaleza de la interacción “TRX-like” con P6 de MRCV. P6 podría ser sustrato de las “TRX-like” identificadas, de forma que las funciones de P6, su capacidad de unir otras proteínas o bien su estabilidad se encuentren reguladas mediante cambios estructurales producidos por la reducción de puentes disulfuro por parte de las “TRX-like”. También es posible que la interacción de “TRX-like”/P6 redirija las tiorredoxinas hacia los viroplasmas donde éstas podrían actuar reduciendo otras proteínas (virales o del hospedante) que puedan cumplir funciones durante la replicación o ensamblado viral. Por otra parte, teniendo en cuenta que uno de los síntomas principales del Mal de Río Cuarto es el enanismo, se podría especular que la interacción de P6 con las tiorredoxinas identificadas en este trabajo de Tesis podría desencadenar dicho síntoma. En cuanto a la alteración de los cloroplastos en células de la vaina de trigo y cebada infectadas por MRCV (Arneodo y col., 2002b; Figura 1.5), esto se podría deber a un desbalance oxidativo en las células infectadas.

En conjunto, los resultados de este Capítulo destacan la importancia del uso de Y2H para detectar proteínas del hospedante que puedan cumplir importantes roles en el ciclo infectivo y que tienen la potencialidad de servir como blanco de estrategias biotecnológicas que permitan lograr la resistencia frente a patógenos o atemperar los efectos de la enfermedad.

En cuanto al uso de la técnica de Y2H, esta ha sido ampliamente utilizada para estudiar interacciones a escala genómica, principalmente porque permite un manejo sencillo de las levaduras, favorecido por la obtención de cotransformantes por apareamiento de cepas haploides así como por la aplicación de la tecnología Gateway en la obtención de las colecciones de clones. Por estos motivos es que la mayoría de los relevamientos a gran escala de interacciones intra-virus o virus-hospedante publicados se han basado en esta técnica (Bailer y Haas, 2009). Al basarse en la localización nuclear de un sistema reportero transcripcional, el Y2H se encuentra limitado para el análisis de activadores transcripcionales y de proteínas de membrana. Sin embargo, a pesar de que la evaluación de una interacción depende de que las proteínas en estudio se localicen en el núcleo de las levaduras, no se ha observado un sesgo en cuanto a los resultados con proteínas nucleares o no nucleares (Braun y col., 2009). Una de las principales desventajas de los relevamientos por Y2H a gran escala es que presenta una baja cobertura de las interacciones analizadas, hecho que se debe

principalmente a una baja sensibilidad, y no tanto a una baja especificidad de las interacciones detectadas (Yu y col., 2008). En particular, análisis en paralelo de varias técnicas sugieren que el uso del Y2H no resulta en la obtención de más falsos positivos que el resto de las técnicas empleadas para evaluar interacciones binarias (Cusick y col., 2009). Esto avala la elección de esta técnica y destaca la necesidad de complementar los análisis de interactomas con otras metodologías.

CAPÍTULO IV

Análisis de la estabilidad de P6 y P9-1

Análisis de la estabilidad de P6 y P9-1

Como se explicó en el Capítulo I, a lo largo de este trabajo de Tesis se encontraron dificultades al intentar expresar transitoriamente las proteínas de MRCV P6 y P9-1 en plantas mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*. Los niveles de acumulación proteica para P6 y P9-1 no resultaron suficientes como para permitir la confirmación de las interacciones encontradas por BiFC o coIP en los casos de las interacciones P6/P6, P6/P9-1 y P9-2/P9-2 detectadas por Y2H en el Capítulo I, así como de las interacciones con proteínas de trigo encontradas en los relevamientos de la biblioteca de ADNc en el Capítulo III. Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que el índice de uso de codones de las secuencias codificantes para P6 y P9-1 en *N. benthamiana*, maíz y chicharritas es similar, indicando que la baja expresión de las proteínas de MRCV no parece deberse a diferencias entre los codones de uso frecuente para sus hospedantes naturales y para *N. benthamiana* (Mongelli, 2010). Estos resultados nos condujeron a la búsqueda de posibles señales de degradación en P6 y P9-1 que pudieran explicar los bajos niveles de acumulación encontrados para ambas proteínas.

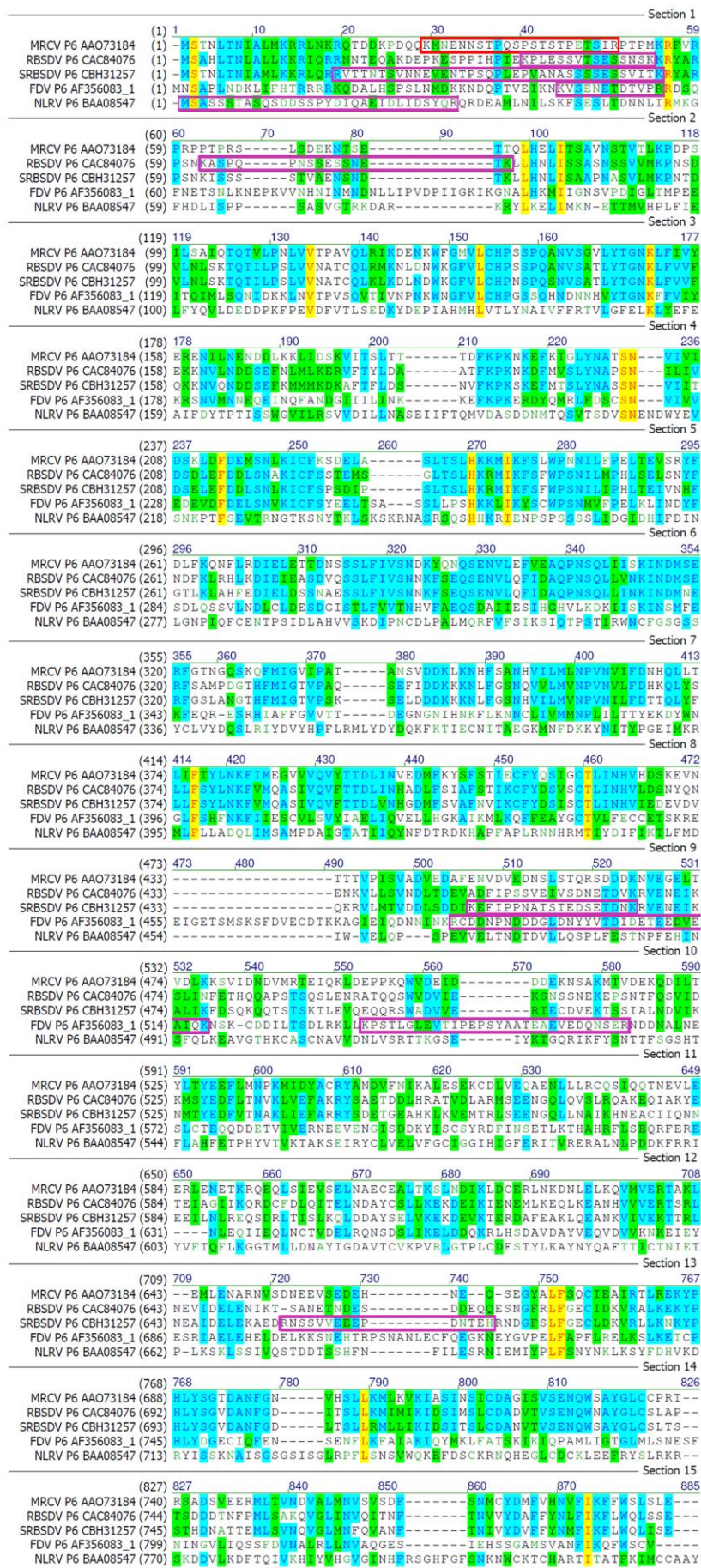
Búsqueda e identificación de señales de degradación en las proteínas codificadas por el MRCV

Para determinar si las proteínas codificadas por el MRCV poseen motivos de degradación de tipo PEST, se utilizó el algoritmo ePESTfind (emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind). El mismo identifica motivos PEST potenciales dentro de una secuencia proteica y les asigna un puntaje de confianza a la predicción: cuanto mayor es el puntaje por encima de un valor umbral (+5,0) a partir del cual el programa asume que el motivo PEST podría poseer un interés biológico relevante, mayor es la probabilidad de que una proteína sea degradada vía el motivo PEST potencial en células eucarióticas. El algoritmo reconoce regiones hidrofílicas con una alta abundancia relativa de los residuos prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T).

Al analizar las secuencias proteicas de P6 y P9-1, ePESTfind predijo un motivo PEST potencial de 20 aminoácidos en P6, con un puntaje PEST de 12,23, entre los residuos 28 y 49, y otro motivo PEST potencial de 10 residuos en P9-1, con un puntaje PEST de 8,88, entre los residuos 142 a 153 de la secuencia (Figura 6.1). Es importante resaltar que de el resto de las proteínas codificadas por el virus de Mal de Río Cuarto carecen de potenciales motivos PEST.

PEST: uno de 35 aa entre los residuos 18 y 54 (valor PEST 6,81), otro de 17 aa entre los residuos 448 y 466 (valor PEST 13,16) y finalmente un último de 13 aa entre los residuos 655 y 669 (valor PEST 12,46). Por su parte, P6 de FDV posee tres potenciales PEST, el primero de 10 aa ubicado entre las posiciones 44 y 55 con un valor de predicción PEST de 5,51, y dos en la región central de la proteína: uno de 30 aa entre la posición 486 y la 517 de valor PEST 8,35 y otro de 28 aa entre los residuos 534 y 563 con valor PEST de 7,45. Por último, P6 de NLRV posee un motivo PEST potencial entre los residuos 1 a 31, con un valor PEST asignado de 5,15.

Figura 6.2 (Página siguiente): Análisis de la conservación de los potenciales motivos PEST entre MRCV P6 (AAO73184.1) y sus homólogas de RBSDV (CAC84076.1), SRBSDV (CBH31257.1), FDV (AAM00194.1) y NLRV (BAA08547.1). El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las distintas P6 fue realizado con el programa AlignX y las predicciones de los motivos PEST con el programa ePESTfind. Se muestra recuadrado en rojo el motivo PEST predicho para MRCV P6, y en violeta los motivos PEST predichos para las P6 de los otros fijivirus. Los residuos idénticos se muestran con letra roja y fondo amarillo; los conservados en letra azul y fondo celeste; los que pertenecen a un mismo grupo funcional se muestran en letra negra y fondo verde; los que son débilmente similares se muestran en letra verde y fondo blanco y los que pertenecen a distintos grupos funcionales en letra negra con fondo blanco.



(RRA) 886

De forma equivalente, se analizaron las secuencias de las P9-1 codificadas por el RBSDV [CAC59968.1, aislamiento Zhejiang, 64,5% de identidad (Guzmán y col., 2007)], SRBSDV [ACC60252.1, aislamiento Hainan, 67,1% de identidad (Wang, 2010)], MRDV (AGB67522.1, 62,1% de identidad), FDV (AAD04815.1, 37,3% identidad), y NLRV [BAA08549, no presenta identidad detectable (Guzmán y col., 2007)] respecto de P9-1 de MRCV (ADD71691). Se realizó un alineamiento múltiple de secuencia por ClustalW con el programa AlignX (Figura 6.3) y se muestra recuadrado en rojo el motivo PEST potencial de P9-1 de MRCV y en violeta los motivos PEST predichos para el resto de las proteínas homólogas.

La búsqueda bioinformática de motivos PEST en las secuencias de las P9-1 codificadas por otros fijivirus con el programa ePESTfind indicó que P9-1 de RBSDV presenta un PEST potencial de 13 aa comprendido entre los residuos 130 y 144 (valor PEST 19,31) y P9-1 de MRDV posee un potencial PEST de 11 aa entre las posiciones 130 y 142 (valor PEST 15,32, Figura 6.3, recuadrados en violeta). El programa ePESTfind no predijo la presencia de motivos PEST para las P9-1 codificadas por SRBSDV, FDV y por NLRV.

En conjunto, estos resultados indican que la presencia de potenciales PEST en las proteínas codificadas por los segmentos S6 y S9 de estos fijivirus se encuentra especialmente conservada en P6, principalmente en la región aminoterminal, sugiriendo por lo tanto que la función de los PEST sería necesaria para la regulación de las distintas P6 del género *Fijivirus*. Por su parte, la presencia de PEST potenciales en las P9-1 parecería estar menos conservada, si bien la ubicación dentro de las secuencias aminoacídicas se conserva en dos especies además de MRCV. También es interesante notar que el motivo PEST de P6 es más grande (20 aa) y tiene un puntaje PEST mayor (12,23) que el motivo PEST de P9-1 (10 aa y puntaje PEST 8,88).

Para determinar si las regiones PEST predichas en P6 y P9-1 son efectivamente funcionales, se resolvió analizar la estabilidad de mutantes que no contienen estos motivos en plantas e insectos.



Figura 6.3: Análisis de conservación de los potenciales motivos PEST entre MRCV P9-1 (ADD71691) y sus proteínas homólogas de RBSDV (CAC59968.1), SRBSDV (ACC60252.1), MRDV (AGB67522.1), FDV (AAD04815.1) y NLRV (BAA08549). Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las distintas P9-1. Se muestra recuadrado en rojo el motivo PEST predicho para MRCV P9-1, y en violeta los motivos PEST predichos para las de los otros fijivirus. El alineamiento se realizaron con el programa AlignX y las predicciones de los motivos PEST con el programa ePESTfind. Los residuos idénticos se muestran con letra roja y fondo amarillo; los conservados en letra azul y fondo celeste; los que pertenecen a un mismo grupo funcional se muestran en letra negra y fondo verde; los que son débilmente similares se muestran en letra verde y fondo blanco y los que pertenecen a distintos grupos funcionales en letra negra con fondo blanco.

Análisis de la acumulación de mutantes de P6 que carecen del motivo PEST en plantas

Si la región aminoterminal de P6 predicha como desordenada que contiene el posible motivo PEST afectara negativamente a la estabilidad de esta proteína, la ausencia de dicha región podría resultar en un aumento en los niveles de acumulación de P6. Como primer paso para evaluar esta hipótesis, se resolvió analizar la estabilidad de la mutante P6 Δ RD que carece de los primeros 105 aa (obtenida en el Capítulo) luego de expresarla transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, se obtuvieron vectores capaces de expresar las fusiones cMyc:P6 y cMyc:P6 Δ RD en plantas mediante recombinación de los vectores de entrada pCR8/GW/TOPO que contienen P6 completa o la mutante P6 Δ RD sin ATG y con STOP con el vector de destino pEarleyGate203. Con dichas construcciones se transformó la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con una mezcla de las agrobacterias transformadas (o sin transformar para el control negativo denominado “GV3101” en el esquema de la Figura 6.4 A), junto con agrobacterias capaces de expresar el supresor del PTGS P19 del *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) para evitar una baja expresión de las proteínas en estudio por silenciamiento génico. Se agroinfiltró un disco por hoja de cada tratamiento (cMyc:P6, cMyc:P6 Δ RD o bacteria GV3101 sin transformar), 3 hojas por planta y 8 plantas en total. A los 3 días posagroinfiltración (d.pa.), se extrajeron proteínas del tejido agroinfiltrado, y los 3 discos de cada tratamiento por planta se agruparon y procesaron juntos (n= 8). Las proteínas se cuantificaron por Bradford, y se sometieron cantidades iguales de proteínas de cada tratamiento a SDS-PAGE 10% y “Western blot” utilizando como anticuerpo primario anti-cMyc. En la Figura 6.4 se muestra el esquema de agroinfiltración implementado (Figura 6.4 A) y los resultados del “Western blot” (Figura 6.4 B) para dos de las ocho plantas analizadas. En el panel inferior se muestra la tinción de las proteínas transferidas con Rojo Ponceau que demuestra una carga pareja por calle y la calidad de las proteínas extraídas. Como se puede observar en la Figura 6.4 B, los niveles de acumulación de cMyc:P6 (90 kDa) fueron casi indetectables, mientras que para el caso de cMyc:P6 Δ RD (78,4 kDa) se detectó una acumulación baja. Estas diferencias no pudieron ser cuantificadas debido a que con los programas de cuantificación y procesamiento de imágenes como el ImageJ no se logró diferenciar bandas específicas tan tenues del fondo o “background”.

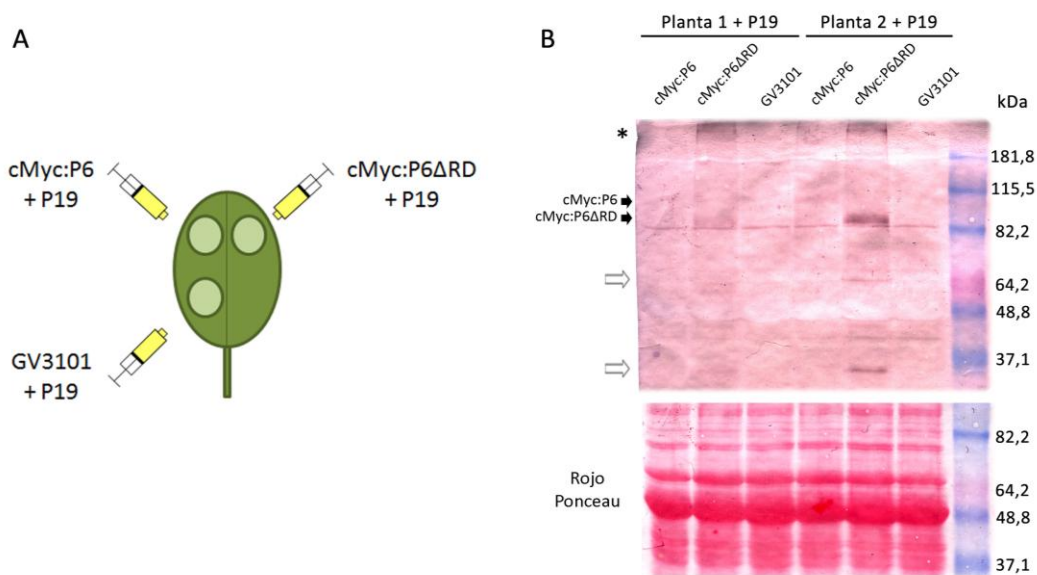


Figura 6.4: Análisis del efecto de la región desordenada (RD) sobre la estabilidad de P6 en *N. benthamiana*. **A.** Esquema de agroinfiltración utilizado. **B.** Análisis de "Western blot". Las cepas de agrobacterias GV3101 llevando las distintas construcciones que se indican en el esquema o sin transformar a una $OD^{600} = 0,8$ fueron coinfiltradas en partes iguales con agrobacterias capaces de expresar el supresor de silenciamiento P19 a una $OD^{600} = 0,4$ resultando las OD^{600} luego de la mezcla 0,4 y 0,2, respectivamente. A los 3 d.pa. se extrajeron proteínas totales y se sometieron a SDS-PAGE 10% y "Western blot" utilizando un anticuerpo anti-cMyc hecho en ratón y revelando con el método de fosfatasa alcalina. Las flechas negras indican el tamaño esperado para cMyc:P6 (90 kDa) y cMyc:P6ΔRD (78,4 kDa), mientras que el asterisco y las flechas vacías muestran bandas específicas que aparecen solo cuando se agroinfiltró con construcciones capaces de expresar P6ΔRD.

Por otra parte, para el caso de cMyc:P6ΔRD si bien su peso molecular estimado es de 78,4 kDa, la banda de migración correspondiente se detectó por encima de los 82,2 kDa. Además, se observaron bandas específicas de mayor y menor peso molecular al esperado: una por encima de los 181,8 kDa, una de aproximadamente 65 kDa y otra de aproximadamente 32 kDa. No se puede descartar la posibilidad de que la banda mayor a 181,8 kDa corresponda a dímeros de P6ΔRD. Si bien la electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada en condiciones desnaturalizantes, y no es esperable encontrar dímeros unidos por uniones débiles no covalentes, a menudo éstas se pueden detectar por SDS-PAGE (Maroniche y col., 2010). Por otra parte, las bandas de menor peso molecular podrían corresponder a productos de degradación parcial. En todos los casos se asume que conservan la región aminoterminal de P6ΔRD ya que el epítopo cMyc se encuentra en esta región. Es interesante remarcar que las tres bandas específicas que se detectaron para el caso de cMyc:P6ΔRD no fueron detectadas

para cMyc:P6. Esto se podría deber a que la mayor acumulación de cMyc:P6 Δ RD dé lugar a una mayor acumulación de posibles dímeros y productos de degradación de esta proteína.

Estos resultados indican que la región aminoterminal de P6, predicha como desordenada, favorece la inestabilidad de la proteína cuando es expresada por transitoriamente en *N. benthamiana*, siendo que su ausencia promueve la acumulación de mayores niveles de la proteína viral. En base a estos resultados se propuso analizar la contribución del motivo PEST contenido en los primeros 49 aa en la estabilidad de P6 en plantas.

Análisis de la contribución del motivo PEST predicho en la estabilidad de P6

Para poder analizar la contribución específica del motivo PEST predicho a la estabilidad de P6, se obtuvo la mutante P6 Δ PEST, que carece de los primeros 49 residuos dentro de los cuales se encuentra el PEST predicho (residuos 28 a 49). En primer lugar se evaluó por Y2H si la mutante Δ PEST es funcional y conserva la capacidad de interacción con P6 y con P9-1. Como se muestra en la Figura 6.5, P6 Δ PEST interactuó consigo misma y con P6 completa, así como con P9-1, indicando que la delección aminoterminal no afecta su capacidad de interacción. Estos resultados son esperables dados los resultados del análisis de la interacción de la mutante P6 Δ RD (Figura 3.4 del Capítulo I).

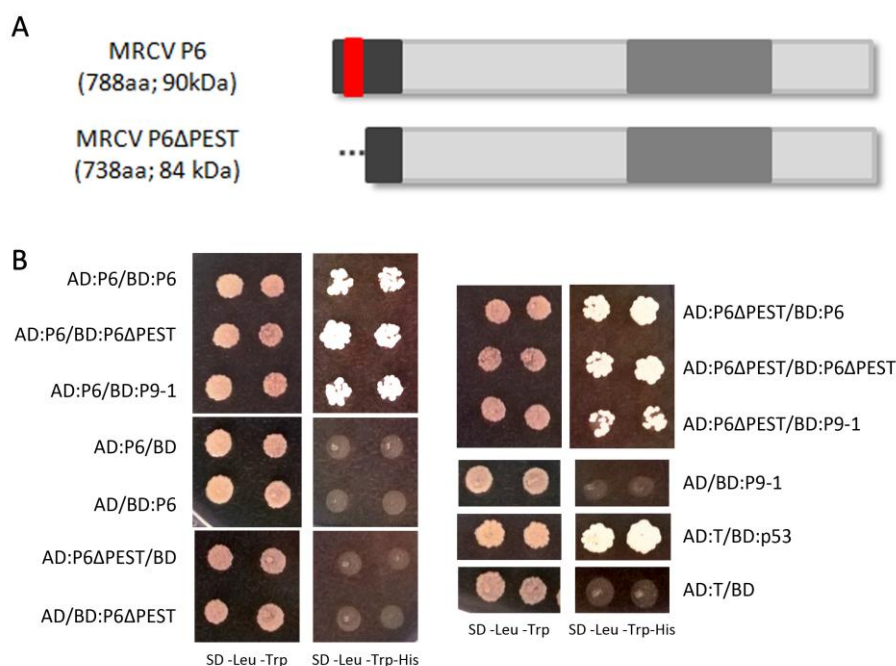


Figura 6.5: Análisis de la interacción de P6 Δ PEST consigo misma y con P9-1 por Y2H. **A.** Esquema de la mutante P6 Δ PEST. En rojo se indica la posición del PEST potencial (residuos 28 a 49) en P6 completa, contenida dentro de la región predicha como desordenada (en negro, residuos 1 a 105). **B.** P6 Δ PEST conserva su capacidad de interactuar consigo misma y con P6 y P9-1 por Y2H. Las levaduras doble transformantes se seleccionaron en medio SD -Leu-Trp, y las interacciones fueron evaluadas creciendo a las levaduras en medio SD -Leu-Trp-His a 28 °C por 5 a 10 días. Control positivo: AD:T/BD:p53. Control negativo: AD:T/BD así como cada proteína fusionada al AD o BD sin su correspondiente par de interacción.

A continuación se coinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con agrobacterias GV3101 capaces de expresar las proteínas recombinantes cMyc:P6, cMyc:P6 Δ PEST o sin transformar, junto con agrobacterias capaces de expresar el supresor del silenciamiento P19. Se agroinfiltró un disco de cada tratamiento por hoja, 3 hojas por planta, 8 plantas en total. A los 2 d.pa se colectaron de manera conjunta los 3 discos de cada tratamiento por planta (n=8), se extrajeron proteínas totales, se cuantificaron por Bradford, y cantidades iguales de cada tratamiento fueron sometidas a SDS-PAGE 10% y “Western blot” utilizando como anticuerpo primario anti-cMyc. En la Figura 6.6 se muestran los resultados para dos de las ocho plantas analizadas (Figura 6.6 A) y la cuantificación por Image J de la intensidad de las bandas del “Western blot” para cMyc:P6 y cMyc:P6 Δ PEST (84,4 kDa) relativo a la tinción de Rojo Ponceau seguido de la cuantificación de las bandas y su análisis estadístico utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (p significativo $\leq 0,05$, n= 8, Figura 6.6 B).

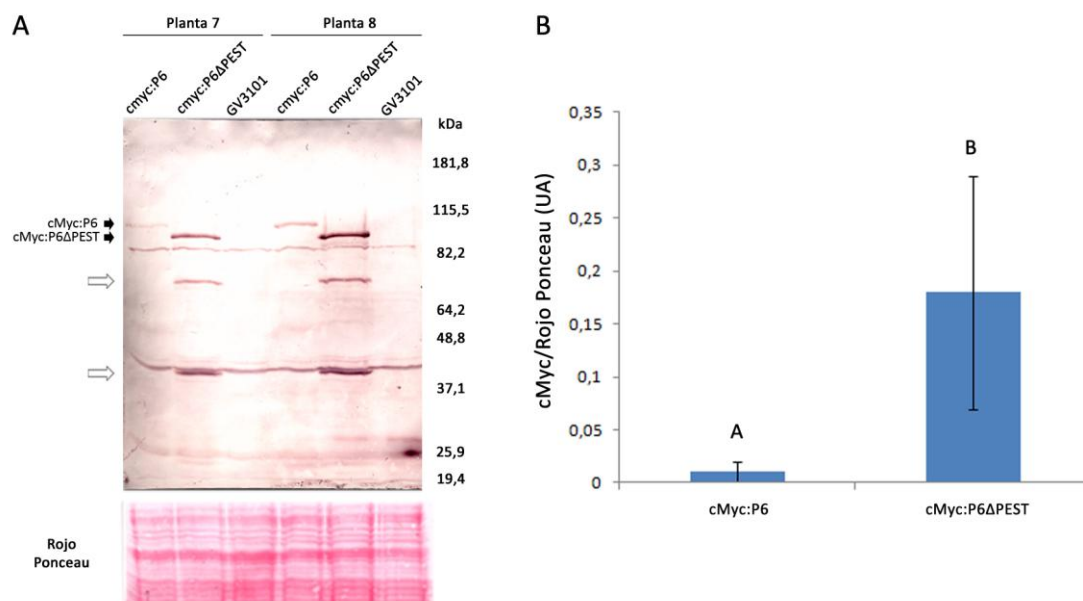


Figura 6.6: Análisis del efecto de la región predicha como PEST sobre la estabilidad de P6 en *N. benthamiana* por “Western blot”. **A.** Las cepas de agrobacterias llevando las distintas construcciones (o GV3101 sin transformar como control, todas a una $OD^{600} = 0,8$) fueron coinfiltradas en partes iguales con agrobacterias capaces de expresar el supresor de silenciamiento P19 ($OD^{600} = 0,4$) resultando las OD^{600} luego de la mezcla 0,4 y 0,2, respectivamente. A los 2 d.pa. se extrajeron proteínas totales y se sometieron a SDS-PAGE y “Western blot” utilizando un anticuerpo anti-cMyc y revelando con el método de fosfatasa alcalina. Las flechas negras indican el tamaño esperado para cMyc:P6 (90 kDa) y cMyc:P6ΔPEST (84,4 kDa), mientras que las flechas vacías muestran bandas específicas que aparecen solo cuando se agroinfiltró con la versión deletcionada de P6. **B.** Cuantificación de las intensidades de las bandas detectadas para cMyc:P6 y cMyc:P6ΔPEST de las 8 plantas analizadas por “Western blot” con el programa ImageJ. Las intensidades se normalizaron respecto a la intensidad de la tinción de proteínas totales por Rojo Ponceau, y su significancia estadística se determinó mediante análisis no paramétrico de Kruskal Wallis. A y B indican diferencias significativas ($p\text{-valor} \leq 0,05$). UA: unidades arbitrarias.

Como se puede observar en la Figura 6.6, la ausencia de los primeros 49 residuos produjo un aumento significativo en la acumulación de P6ΔPEST ($p\text{-valor}=0,003$) respecto de P6, siendo la acumulación de la proteína completa muy baja, en ocasiones apenas detectable mediante “Western blot”. Por otra parte, tal como había sido observado al expresar cMyc:P6ΔRD por agroinfiltración, cMyc:P6ΔPEST presentó dos bandas específicas de menor peso molecular -una de alrededor de 72 kDa y otra de aproximadamente 42 kDa- (que se señalan con una flecha vacía en la Figura 6.6) que no son detectadas cuando se expresa P6 completa.

Para descartar que el aumento en los niveles de acumulación de cMyc:P6ΔPEST se pudiera deber a una mayor acumulación de su ARN mensajero respecto del de cMyc:P6, se extrajo ARN

total de los tejidos agroinfiltrados, se obtuvo ADNc por retrotranscripción y se cuantificaron ambos ARNm por PCR en tiempo real (RT-qPCR, Figura 6.7). Se utilizó actina como gen de referencia o “housekeeping”, ya que este gen se mantiene estable durante agroinfiltraciones de hoja de *N. benthamiana* (Tesis Doctoral en curso de L. de Haro, resultados no publicados).

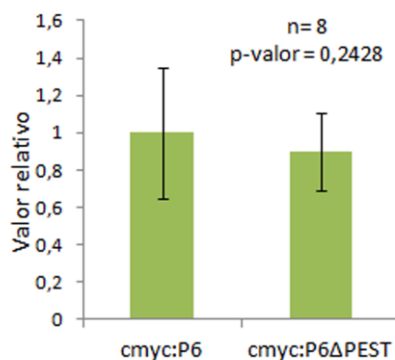


Figura 6.7: Análisis de la acumulación relativa de ARNm de cMyc:P6 y cMyc:P6ΔPEST por PCR en tiempo real. Expresión de cMyc:P6ΔPEST relativo a los niveles de mensajero de cMyc:P6. Se analizaron 8 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas en cada caso y se utilizó el gen de actina como gen de referencia. La significancia estadística de las diferencias de Ct entre tratamientos fue calculada usando el test T de Mann-Whitney incluido en el software Graphpad Prism 5 (diferencias significativas con un p-valor $\leq 0,05$).

Como se muestra en la Figura 6.7, no se detectaron diferencias significativas entre los niveles de acumulación de los ARNm que codifican para cMyc:P6 y cMyc:P6ΔPEST que pudieran explicar la mayor abundancia relativa de cMyc:P6ΔPEST. En conjunto, estos resultados indican que la regulación de la acumulación proteica de P6 ocurre a nivel postraducciona, y que la delección de los primeros 49 residuos en cMyc:P6ΔPEST provoca la estabilización de la proteína P6, lo que sugiere que el motivo PEST ubicado entre los residuos 28 y 49 de P6 es funcional. Es interesante además notar que el motivo PEST se encuentra dentro de una región predicha como desordenada. Los dominios intrínsecamente desordenados son regiones en una proteína que no adquieren una estructura conformacional definida y por lo tanto son flexibles (Linding y col., 2003a). A menudo las regiones desordenadas contienen motivos lineales funcionales, así como sitios de modificaciones postraduccionales o de unión a ligandos específicos (Dunker y col., 2002; Wright y Dyson, 1999).

Dado que el virus de Mal de Río Cuarto es capaz de replicar en plantas y en insectos, es posible que los motivos PEST sean regulados diferencialmente, resultando en cambios en la acumulación de P6 de acuerdo al hospedante en donde se exprese. Por ello se resolvió

investigar si el motivo PEST de P6 interfiere con la estabilidad de esta proteína en un sistema modelo de expresión en insectos.

Análisis de estabilidad de P6 y P6 Δ PEST en células de insecto

Durante las Tesis de los Dres. Mongelli y Maroniche, nuestro grupo observó que en general, las proteínas de MRCV se acumulaban transitoriamente en mayores niveles en células de insecto Sf9 que en *N. benthamiana*. Esta diferencia de acumulación relativa en ambos hospedantes es particularmente pronunciada para las proteínas P6 y P9-1 (Maroniche, 2011; Mongelli, 2010). En base a esas observaciones, se propuso evaluar la estabilidad de P6 y el rol del PEST en células de insecto no hospedante. Para ello se obtuvieron construcciones capaces de expresar P6 y P6 Δ PEST en células Sf9 de *Spodoptera frugiperda*, mediante recombinación del vector de destino pIB-V5/His-DEST con los vectores pCR8/GW/TOPO que contienen las secuencias codificantes para P6 y P6 Δ PEST con ATG y sin STOP, a fin de obtener las fusiones P6:V5/6xHis y P6 Δ PEST:V5/6xHis (denominadas de ahora en adelante “P6:V5” y “P6 Δ PEST:V5”). Estos vectores permiten la expresión en Sf9 bajo el control del promotor constitutivo *OpIE2* de la multicápside del baculovirus de la polihedrosis nuclear *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV).

Se transfectaron monocapas de la línea celular Sf9 en 3 pocillos independientes para cada tratamiento con las construcciones que dan lugar a P6:V5 (95,3 kDa) y P6 Δ PEST:V5 (89,1 kDa); al cabo de 2 días postransfección se colectaron las células, se resuspendieron en buffer de carga para SDS-PAGE 2X y se sometieron a SDS-PAGE 10% y “Western blot” utilizando como anticuerpo primario anti-V5. Llamativamente se encontró que los niveles de acumulación de P6 Δ PEST:V5 fueron menores que los de P6:V5. Se detectaron además bandas de menor tamaño (Figura 6.8 A, indicadas con asteriscos) que podrían ser productos de degradación. Una de dichas bandas (indicada con dos asteriscos) solo fue detectada para P6:V5 y no para P6 Δ PEST:V5. Para descartar que las mismas pudieran ser resultado de reconocimiento inespecífico por parte del anticuerpo (primario o secundario) se utilizó como control una construcción capaz de expresar P9-1:V5 (44,3 kDa), para la cual solo se obtuvieron dos bandas específicas para la fusión P9-1:V5 (Figura 6.8 B). La banda de menor peso molecular es más abundante y migra de acuerdo al tamaño esperado. La banda de mayor peso molecular aparente había sido detectada por nuestro grupo con anterioridad y probablemente sea el resultado de algún tipo de modificación postraducciona de P9-1:V5 (Maroniche, 2011). Por otra parte, la definición de las bandas de migración de P6:V5 y P6 Δ PEST:V5 se vio afectada posiblemente debido al alto contenido de ADN de alto peso molecular, ya que las muestras no

fueron sonicadas previo a la siembra en el gel de poliacrilamida. Esto se evidencia también en la tinción relativamente poco definida de las proteínas totales con rojo Ponceau.

Debido a que el epítopo V5 utilizado en las construcciones para Sf9 se ubica en el extremo C-terminal de P6, mientras que las construcciones utilizadas en las agroinfiltraciones presentan el epítopo cMyc en el extremo N-terminal, existe la posibilidad de que la posición del epítopo en P6 y P6 Δ PEST estuviera afectando la estabilidad de las construcciones. Por esta razón, se decidió evaluar la estabilidad de P6 y P6 Δ PEST en Sf9 utilizando un epítopo N-terminal. Para ello, se amplificaron por PCR las fusiones cMyc:P6 y cMyc:P6 Δ PEST (con ATG y con STOP) a partir de los vectores pEarleyGate203, se clonaron en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO, se analizaron por secuenciación y se recombinaron con el vector pIB-V5/His-DEST. De esta forma, la presencia del codón STOP impide la traducción de los epítopes carboxiterminales V5/6xHis, permitiendo así la expresión en Sf9 de las mismas fusiones utilizadas en plantas.

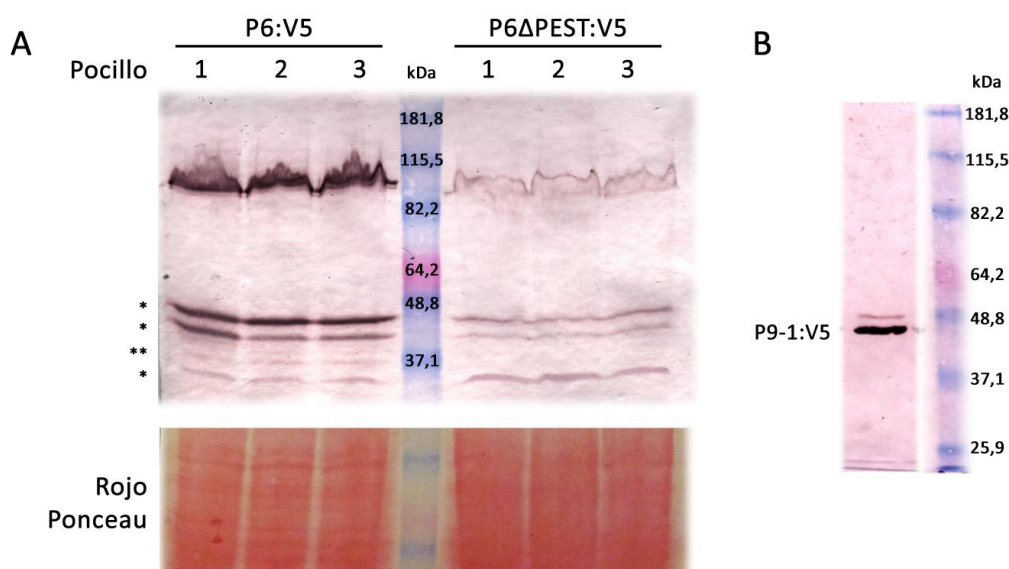


Figura 6.8: Análisis del efecto de la región predicha como PEST sobre la estabilidad de P6 en células de insecto Sf9 por “Western blot”. **A.** Se sembraron células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 60-70%, se transfectaron las células de cada pocillo con 1 μ g de ADN plasmídico para expresar P6:V5 (95,3 kDa) o P6 Δ PEST:V5 (89,1 kDa) y se incubaron a 27 °C por 48 hs. Las muestras se analizaron por “Western blot” utilizando un anticuerpo comercial anti-V5 (hecho en ratón) y revelando con fosfatasa alcalina. Los asteriscos (*) indican bandas de menor peso molecular y el doble asterisco (**) marca una banda que es específica para P6:V5. **B.** Análisis por “Western blot” de células Sf9 transfectadas con la construcción P9-1:V5 (44,3 kDa) que muestra que las bandas marcadas con asteriscos en **A** son específicas para P6:V5 y P6 Δ PEST:V5.

Se transfectaron células de insecto con las construcciones resultantes y se evaluaron los niveles de acumulación de las proteínas cMyc:P6 (90 kDa) y cMyc:P6 Δ PEST (84,4 kDa) por “Western blot” utilizando como anticuerpo primario anti-cMyc. Las células transfectadas fueron resuspendidas en buffer de carga para SDS-PAGE 2X y, a diferencia de las muestras obtenidas para P6:V5 y P6 Δ PEST:V5, estas muestras fueron sonicadas en un baño ultrasónico para fragmentar el ADN celular. Adicionalmente, al momento de sembrar en gel, las muestras se resuspendieron cuidadosamente utilizando una jeringa Hamilton con una aguja de 0,168 mm de diámetro interior, a fin de mejorar la definición de la separación electroforética. En la Figura 6.9 se muestran los resultados del análisis por “Western blot” para dos eventos de transfección independientes (placas 1 y 2), en donde se observa el mismo resultado observado para P6:V5 y P6 Δ PEST:V5: la versión completa de P6 se acumula en mayor nivel que la mutante que carece del motivo PEST cuando se la expresa en células de insecto Sf9, de manera que este resultado es independiente de la ubicación N- o C-terminal del epítopo en la proteína de fusión. Es interesante destacar que se puede observar la presencia de una banda de migración más lenta para cMyc:P6 y cMyc:P6 Δ PEST (se indican con flechas) que podría ser consecuencia de algún tipo de modificación postraduccional de P6 y P6 Δ PEST, y que esto no ocurre cuando estas proteínas son expresadas en *N. benthamiana* (ver Figura 6.6).

Al igual que lo observado cuando se utilizó un epítopo carboxiterminal, los resultados del “Western blot” mostraron que cMyc:P6 se acumula en Sf9 en mayor cantidad que cMyc:P6 Δ PEST, y presenta el mismo patrón de expresión relativa (P6 versus P6 Δ PEST) que P6:V5 y P6 Δ PEST:V5. Por su parte, se detectaron varias bandas de intensidad tenue y menor peso molecular, pero que se deben a una reacción inespecífica del anticuerpo anti-cMyc, ya que las mismas también son detectadas para Sf9 sin transfectar. Cabe mencionar que al sonicar las muestras y pasar la muestra por una jeringa de 0,168 mm de diámetro de aguja, se logró mejorar la definición de las bandas detectadas. En conjunto, se demostró que la presencia de un epítopo carboxi o aminoterminal no afecta diferencialmente a los niveles de expresión de P6 y P6 Δ PEST cuando se las expresa en células de insecto Sf9.

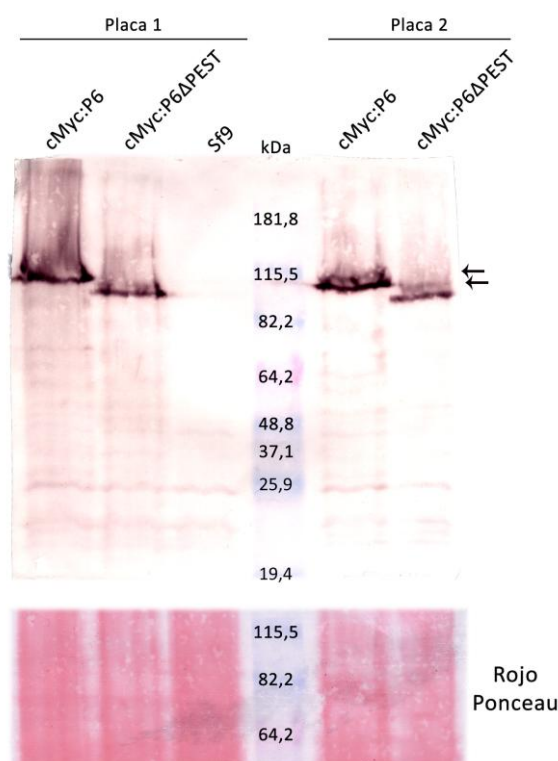


Figura 6.9: Análisis del efecto de la posición aminoterminal del epítipo cMyc sobre la estabilidad de P6 y P6 Δ PEST en células de insecto Sf9 por “Western blot”. Se realizaron dos ensayos de transfección independientes de células Sf9 (placas 1 y 2) a 27 °C por 48 hs. Sf9: control sin transfectar. Las muestras se analizaron por “Western blot” utilizando un anticuerpo comercial anti-cMyc y revelando con fosfatasa alcalina. Con flechas se marca la presencia de una banda de mayor peso molecular aparente por encima de las de cMyc:P6 y cMyc:P6 Δ PEST.

De manera importante, los resultados en Sf9 muestran además que P6 presenta un perfil de acumulación opuesto al observado en *N. benthamiana* y permiten postular que las diferencias entre los niveles de expresión de P6 en plantas e insectos se podrían deber a una regulación diferencial de la acumulación de esta proteína entre ambos sistemas modelos de los dos hospedantes de MRCV: plantas e insectos. A menudo, los motivos PEST actúan como señales proteolíticas de degradación condicionales, que pueden ser activadas por diversos mecanismos (Rechsteiner y Rogers, 1996). Los resultados aquí presentados sugieren que cuando P6 y su mutante Δ PEST son expresadas en plantas, la ausencia del motivo PEST estabiliza a P6, sugiriendo que el PEST es funcional en plantas, mientras que cuando son expresadas en células de insecto, se observa el efecto opuesto, donde el PEST no parecería ser funcional. Es importante recordar que la mutante P6 Δ PEST carece de los primeros 49 aminoácidos que incluyen al PEST, pero es posible que los primeros 28 residuos (previos al PEST) contengan alguna señal para la regulación de la estabilidad de P6 necesaria en insectos

pero no en plantas. De manera interesante, la banda de mayor peso molecular aparente para cMyc:P6 y cMyc:P6 Δ PEST detectada en Sf9 permite hipotetizar que estas proteínas estarían siendo modificadas postraduccionalmente en insectos. Dichas modificaciones podrían intervenir en los niveles de acumulación diferenciales encontrados en *N. benthamiana* y en Sf9. A su vez, esos cambios postraduccionales no ocurrirían dentro del motivo PEST ya que se observan tanto para P6 como para su mutante Δ PEST.

La presencia de motivos PEST está asociada a proteínas que poseen una vida media extremadamente corta, y la principal vía de degradación de las mismas es la del sistema de ubiquitina-proteasoma (Rechsteiner y Rogers, 1996). Por este motivo, se propuso a continuación analizar el rol del UPS en la estabilidad de P6.

Rol del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) en la estabilidad de P6 en plantas

Se propuso estudiar el rol del UPS en la estabilidad de P6 utilizando el inhibidor de proteasoma MG132 (Goldberg, 2012). La hipótesis de trabajo fue que si el UPS intervenía en la degradación diferencial de P6 mediada por el motivo PEST, la construcción cMyc:P6 expresada en plantas se acumularía en mayores niveles en presencia de MG132. Por su parte, si la degradación estuviera mediada solamente por el motivo PEST, la acumulación de cMyc:P6 Δ PEST no debería verse afectada por la presencia de MG132. Para poner a prueba esta hipótesis, se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con agrobacterias capaces de expresar las fusiones cMyc:P6 y cMyc:P6 Δ PEST, junto con MG132 100 μ M disuelto en DMSO al 0,1% o con DMSO al 0,1% como control negativo. Se agroinfiltró un disco de cada tratamiento por hoja, 3 hojas por planta, 4 plantas en total. A los 2 d.pa. se colectaron de manera conjunta los 3 discos de cada tratamiento por planta (n= 4), se extrajeron proteínas, se cuantificaron por Bradford, y se sometieron cantidades iguales de proteínas de cada tratamiento a SDS-PAGE 10% y “Western blot” utilizando como anticuerpo primario anti-cMyc. En la Figura 6.10 A se muestra el esquema de agroinfiltración utilizado, y en la Figura 6.10 B los resultados del análisis por “Western blot”. Para este ensayo no se utilizó el supresor del silenciamiento P19. En los resultados se observa que cMyc:P6 se expresa en niveles apenas detectables, y que la presencia de MG132 a una concentración final de 100 μ M produce un aumento leve en la acumulación de dicha proteína. Por su parte, si bien su expresión también fue baja, cMyc:P6 Δ PEST se acumuló en mayores niveles que cMyc:P6 y la inhibición del proteasoma por MG132 condujo a mayor acumulación de la mutante P6 Δ PEST respecto del control con DMSO. Si bien estos resultados no presentan significancia estadística y a pesar de que no se evaluaron

otras concentraciones de MG132, se observa que el motivo PEST contribuye a la estabilidad de P6, ya que la presencia del inhibidor conduce a un aumento en los niveles de acumulación tanto de cMyc:P6 como de cMyc:P6 Δ PEST, sugiriendo que la estabilidad de P6 es regulada por el UPS y que el motivo PEST no es la única señal de degradación, ya que en su ausencia, la acumulación de la mutante P6 Δ PEST es mayor cuando el proteasoma se encuentra inhibido.

En línea con esta hipótesis, si P6 poseyera otras señales de degradación además del PEST, las mismas podrían estar involucradas en las diferencias de acumulación de P6 y P6 Δ PEST observadas en las expresiones en células de insecto Sf9.

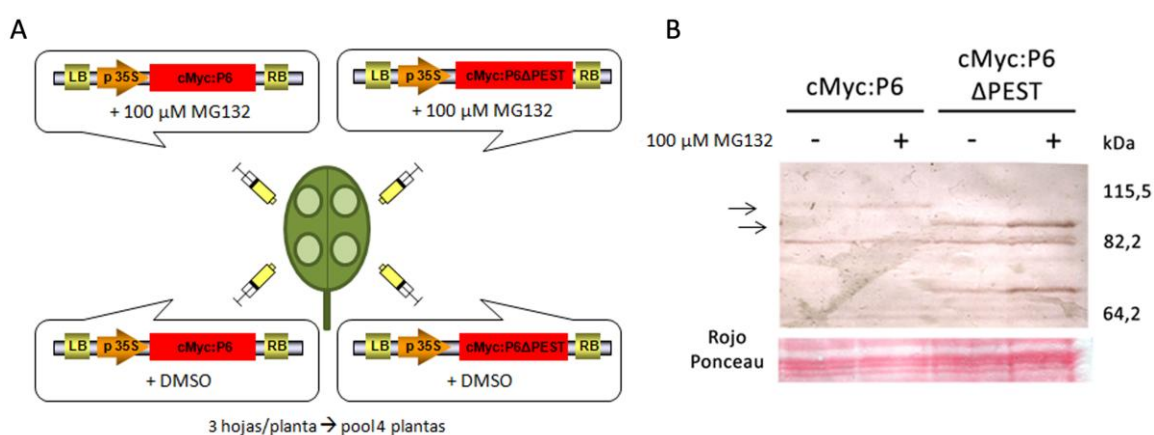


Figura 6.10: Análisis del efecto de inhibidor de proteasoma MG132 sobre la estabilidad de cMyc:P6 y cMyc:P6 Δ PEST en *N. benthamiana*. **A.** Esquema de agroinfiltración utilizado. **B.** Análisis de “Western blot”. Las cepas de agrobacterias llevando las distintas construcciones ($OD^{600} = 0,8$) fueron coinfiltradas con el inhibidor de proteasoma MG132 en DMSO a una concentración final de 100 μ M, o solo con DMSO (0,1%) como control. A los 2 d.pa. se extrajeron proteínas totales y se sometieron a SDS-PAGE y “Western blot” utilizando un anticuerpo anti-cMyc y revelando con el método de fosfatasa alcalina.

Debido a que se postula que las proteínas que poseen motivos PEST son de alguna forma reconocidas, ubiquitinadas y degradadas por el UPS (Rechsteiner y Rogers, 1996), se analizó la secuencia de P6 con el programa UbPred, que predice la presencia de lisinas que puedan ser potencialmente ubiquitinadas. Se encontró que de las 54 lisinas totales de P6, 3 fueron predichas como posibles de ser ubiquitinadas con un alto grado de confianza, y 13 con un grado medio de confianza. Si bien en este trabajo de Tesis no se analizó experimentalmente si P6 es ubiquitinada, el proceso suele ser específico para la proteína blanco de degradación, y no tanto para el sitio de ubiquitinación: se ha observado para otras proteínas virales que en ausencia de los sitios aceptores de Ub, las proteínas a ser degradadas pueden ser ubiquitinadas en otras lisinas, logrando un efecto redundante (Camborde y col., 2010). En el

futuro es importante estudiar si P6 es ubiquitinada así como mapear las lisinas involucradas en ese proceso.

Como se mencionó en la Introducción, la fosforilación de las serinas y treoninas dentro de un motivo PEST puede regular su activación. Utilizando el predictor bioinformático NetPhos 2.0 se encontró que las 5 serinas y una de las 4 treoninas que están presentes en el motivo PEST son potencialmente fosforilables con grados de confianza de 0,71 para la treonina y entre 0,988 y 0,837 para las serinas, siendo 1 el mayor grado de confianza y 0,5 el umbral de confianza (Figura 6.11). Resta evaluar en el futuro el rol potencial de la fosforilación de las serinas y treoninas del motivo PEST de P6 como posible regulador de su degradación.

28 KMNENN**ST**PQ**S**P**ST**PET**S**IR 49

Figura 6.11: Predicción de las serinas y treoninas que pueden ser potencialmente fosforiladas dentro del motivo PEST de P6. La predicción se realizó con el programa NetPhos 2.0. Las serinas (S) y treoninas (T) predichas con altos grados de confianza están marcadas en negrita y subrayadas.

Por otra parte, también será importante estudiar la existencia de otros sitios de fosforilación ubicados por fuera del PEST de P6, que puedan estar involucrados en los perfiles de acumulación opuestos observados en *N. benthamiana* y Sf9.

Análisis de la contribución del motivo PEST predicho en la estabilidad de P9-1 de MRCV en plantas

Para que un motivo PEST sea funcional, el mismo debe ser estructuralmente accesible para que pueda ser reconocido por la maquinaria del UPS. Teniendo en cuenta la predicción de la estructura de MRCV P9-1 basada en el modelado por homología con el servidor Phyre², fue posible predecir la ubicación del potencial motivo PEST en la estructura, y de esta forma obtener una aproximación respecto de la accesibilidad del PEST para ser reconocido o regulado. Como se muestra en la Figura 6.12, la estructura predicha de P9-1 donde los átomos se representan como esferas (“space-filled model”), se puede observar que el motivo PEST parecería ser accesible. Además, si se tiene en cuenta la dinámica estructural de la proteína es posible que bajo ciertas condiciones P9-1 pueda adoptar una conformación tal que permita exponer aún más al motivo PEST. Por ejemplo es posible que la formación de octámeros de P9-1 durante el establecimiento de los viroplasmias modifique la estructura conformacional de

cada monómero, exponiendo o protegiendo a los PEST. Por otra parte, se ha propuesto que los motivos PEST tienden a tener una estructura conformacional flexible, y que debido a su naturaleza hidrofílica, es factible que los mismos tiendan a estar expuestos en presencia de solventes (Rechsteiner y Rogers, 1996).

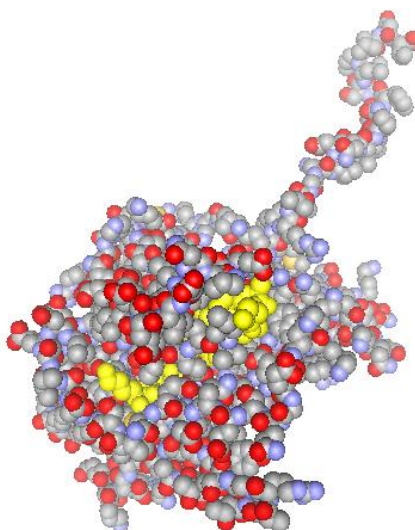


Figura 6.12: Ubicación del motivo PEST predicho en la estructura de MRCV P9-1 obtenida por modelado por homología. Los átomos están representados por esferas, y en color amarillo se indican los residuos que conforman el motivo PEST predicho.

Analizando la secuencia con el predictor de sitios de fosforilación NetPhos2.0, se encontró que las tres serinas y una de las dos treoninas presentes en el PEST tienen un alto potencial de ser fosforiladas (grado de confianza entre 0,933 y 0,979; Figura 6.13). Si bien en este trabajo de Tesis no se caracterizó bioquímicamente si P9-1 es fosforilada ni cuáles son los sitios fosforilables, es importante continuar con estos estudios en el futuro para lograr una mejor comprensión de las características moleculares de la proteína mayoritaria de viroplasma.

142 KTE**ST**SELPK 153

Figura 6.13: Predicción de las serinas y treoninas que pueden ser potencialmente fosforiladas dentro del motivo PEST de P9-1. La predicción se realizó con el programa NetPhos 2.0. Las serinas (S) y treoninas (T) predichas están marcadas en negrita y subrayadas.

A continuación, para evaluar la funcionalidad del motivo PEST en P9-1 ubicado entre los residuos 142 a 153 de esta proteína, se construyó la mutante P9-1 Δ PEST que carece precisamente de dichos residuos (Figura 6.14), se clonó en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO, se analizó su secuencia y se recombinó en el vector de destino pEarleyGate203 para obtener las fusiones a cMyc en el extremo aminoterminal. Luego, se realizaron ensayos de agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* para expresar las fusiones cMyc:P9-1, cMyc:P9-1 Δ PEST o con la cepa GV3101 sin transformar como control negativo, junto con agrobacterias capaces de expresar P19, de acuerdo al mismo esquema utilizado para P6 (ver Figura 6.4 A).



Figura 6.14: Esquema de P9-1 y su mutante Δ PEST. En celeste se indica la región con el PEST predicho (residuos 142 a 153), y en negro el “C-arm” carboxiterminal (residuos 313 a 337).

En la Figura 6.15 se muestra el resultado de un inmunoblot, en donde se puede observar que los niveles de acumulación de cMyc:P9-1 Δ PEST fueron significativamente mayores que los de cMyc:P9-1 (p -valor $\leq 0,05$, $n=3$). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos para la expresión de P6 en plantas y sugieren que el motivo PEST de P9-1 sería funcional ya que su ausencia estabiliza a P9-1 favoreciendo su acumulación.

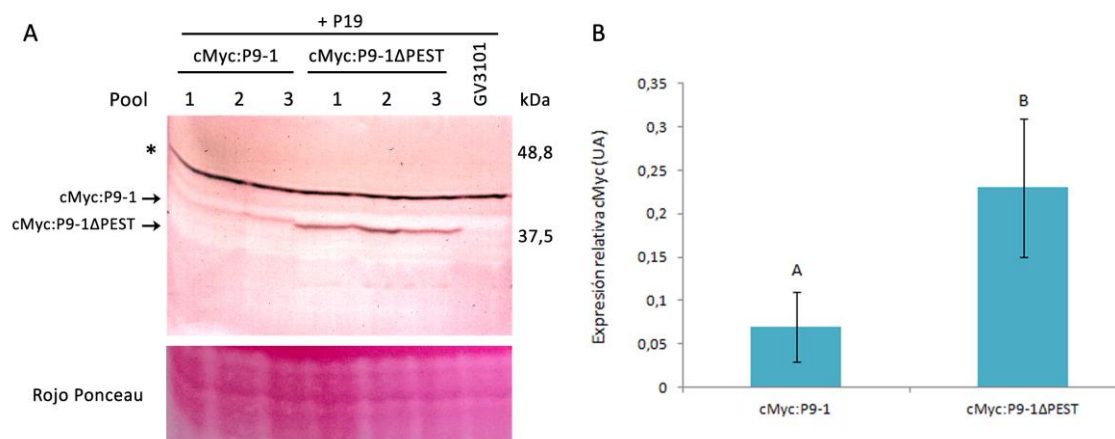


Figura 6.15: Análisis del efecto de la región predicha como PEST sobre la estabilidad de P9-1 en *N. benthamiana* por “Western blot”. **A.** Las cepas de agrobacterias llevando las distintas construcciones ($OD^{600}=0,8$) fueron coinfiltradas en partes iguales con agrobacterias capaces de expresar el supresor de silenciamiento P19 ($OD^{600}=0,4$) resultando las OD^{600} luego de la mezcla 0,4 y 0,2, respectivamente. A los 2 d.p.a. se extrajeron proteínas totales y se sometieron a SDS-PAGE y “Western blot” utilizando un anticuerpo anti-cMyc y revelando con el método de fosfatasa alcalina. Las flechas negras indican el tamaño esperado para cMyc:P9-1 (39 kDa) y cMyc:P9-1ΔPEST (37,7 kDa), mientras que el asterisco (*) muestra una banda inespecífica de mayor peso molecular presente en todos los tratamientos, incluso el infiltrado con la cepa GV3101 sin transformar. **B.** Cuantificación de las intensidades de las bandas específicas detectadas para cMyc:P9-1 y cMyc:P9-1ΔPEST por “Western blot” con el programa ImageJ. La cuantificación se realizó relativizando la abundancia de cMyc:P9-1 o P9-1ΔPEST respecto de la abundancia de la banda inespecífica de mayor peso molecular (*) presente en todos los tratamientos, ya que la tinción con Rojo Ponceau no presentó buena resolución. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal Wallis. A y B indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). UA: unidades arbitrarias.

Análisis de la contribución del motivo PEST predicho en la estabilidad de P9-1 de MRCV en insectos

Tal como se realizó con P6, se propuso evaluar la estabilidad de P9-1 cuando es expresada en células de insecto no hospedante. Para ello se obtuvieron construcciones capaces de expresar P9-1 y P9-1ΔPEST en células Sf9 mediante recombinación del vector de destino pIB-V5/His-DEST con los vectores pCR8/GW/TOPO que contienen las secuencias codificantes para P9-1 y P9-1ΔPEST con ATG y sin STOP, a fin de obtener las fusiones P9-1:V5/6xHis y P9-1ΔPEST:V5/6xHis, denominadas de ahora en adelante “P9-1:V5” (44,32 kDa) y “P9-1ΔPEST:V5” (44,29 kDa). Se transfectaron monocapas de la línea celular Sf9 con dichas construcciones, y al cabo de 2 días postransfección se colectaron las células, se resuspendieron en buffer de carga

y se sometieron a SDS-PAGE 10% y “Western blot” utilizando como anticuerpo primario anti-V5.

El resultado del “Western blot” se muestra en la Figura 6.16, donde se puede observar que la acumulación de P9-1:V5 es abundante. Por su parte, si bien los niveles de acumulación de P9-1ΔPEST:V5 también son abundantes, resultaron levemente menores que los de P9-1:V5. Es interesante destacar además que, como ya había sido notado en la Figura 6.8 B para P9-1:V5, se detectó que P9-1ΔPEST:V5 también presenta una banda de migración más lenta (indicada con una flecha en la Figura 6.16), que podría deberse a modificaciones postraduccionales. De manera llamativa y al igual que lo que ocurría en P6, esas bandas no fueron detectables cuando P9-1 y su mutante ΔPEST se expresaron en *N. benthamiana* (Figura 6.15).

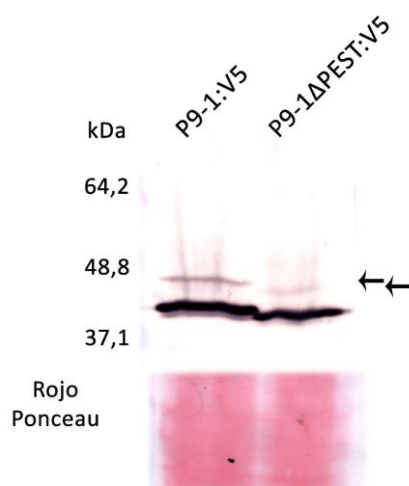


Figura 6.16: Análisis del efecto de la región predicha como PEST sobre la estabilidad de P9-1 en células de insecto Sf9 por “Western blot”. **A.** Se sembraron células Sf9 en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 60-70%, se transfectaron las células de cada pocillo con 1 µg de ADN plasmídico para expresar P9-1:V5 (44,32 kDa) y P9-1ΔPEST:V5 (44,29) y se incubaron a 27 °C por 48 hs. Las muestras se analizaron por “Western blot” utilizando un anticuerpo comercial anti-V5 y revelando con fosfatasa alcalina.

A pesar de que los resultados no presentan significancia estadística, se puede observar que aunque la diferencia no es muy grande, hay una menor acumulación de P9-1ΔPEST:V5 respecto de P9-1:V5 cuando se las expresa en insectos. Es decir, al igual que lo observado para P6, el motivo PEST parece ser funcional y provocar degradación en plantas pero tener un efecto opuesto en células de insectos reforzando la hipótesis de que la estabilidad de P6 y P9-1 es regulada diferencialmente en plantas e insectos, posiblemente mediante modificaciones

postraduccionales que ocurren en Sf9 y no en *N. benthamiana*. Con respecto a P6, las construcciones utilizadas no permitieron descartar la presencia de otras señales en los residuos aminoterminales que puedan estar involucrados en la estabilidad de esta proteína en Sf9, pero al estar el PEST ubicado en una región aminoterminal desordenada es muy factible que los efectos observados no se deban a cambios estructurales de la proteína completa en la mutante P6 Δ PEST. En cuanto a P9-1, al estar el PEST ubicado en una región central, es posible que los efectos observados se puedan deber a que la proteína P9-1 Δ PEST adquiere un plegamiento inestable en insectos. Sin embargo, esto no fue observado en *N. benthamiana*, por lo que se podría especular que la delección del PEST en P9-1 favorece la inestabilidad estructural en Sf9 pero no en *N. benthamiana*.

Para poder conocer en profundidad la dinámica de los viroplasma será necesario continuar estudiando la estabilidad de las proteínas de viroplasma P6 y P9-1 así como también determinar si son afectadas por modificaciones postraduccionales en plantas e insectos. Es interesante destacar que la fosforilación cumple un importante rol en la regulación de las proteínas de viroplasma de rotavirus: la proteína NSP5 es rica en serinas y treoninas y tiene la capacidad de ser hiperfosforilada por NSP2 y por VP2 (Contin y col., 2010; Criglar y col., 2014; Eichwald y col., 2004; Torres-Vega y col., 2000). Además, recientemente se observó que NSP2 puede cambiar su localización de “citoplasmática” a “asociada a los viroplasma” mediante la interacción con NSP5 en el estado hipofosforilado, luego de la cual ambas proteínas son fosforiladas (Criglar y col., 2014).

Resulta evidente que P6 y P9-1 deben ser expresadas abundantemente en etapas tempranas de una infección por MRCV para que se formen los viroplasma, independientemente de si el hospedante es una planta o una chicharrita. Es posible que en etapas más tardías de la infección su expresión disminuya o se detenga para dar lugar a la expresión de proteínas tardías. Si bien se desconoce cómo podría estar regulado ese proceso, es factible que la expresión de manera aislada (en ausencia de infección) y en un sistema no hospedante propicie una desregulación de la estabilidad de P6 y P9-1.

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones generales

Capítulo I: Análisis de las interacciones de las proteínas de MRCV

- ✓ La capacidad de P9-1 de formar dímeros y de interactuar con P6 refuerza otras evidencias que indican que ante la infección con MRCV la formación de los viroplasma ocurre por multimerización de P9-1 y que la estructura resultante de esta interacción actúa como una plataforma donde se concentran otras proteínas virales y del hospedante que posiblemente intervienen en etapas claves del ciclo infectivo como son la replicación y el ensamblado de nuevas partículas virales. En particular, el “brazo” C-terminal de P9-1 es necesario para la formación de dímeros y por lo tanto de él dependería la capacidad de multimerizar de P9-1.
- ✓ La región de P6 que contiene un dominio “coiled-coil” está involucrada en la capacidad de interactuar con P9-1 y de formar dímeros de P6. Este resultado apoya la hipótesis de que P6 es una proteína minoritaria de los viroplasma, capaz de “reclutar” otras proteínas necesarias para su dinámica y función (Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2012).
- ✓ La interacción P9-2/P9-2 identificada en este trabajo de Tesis sugiere que la formación de las protrusiones membranosas en Sf9 observadas por nuestro grupo (Maroniche y col., 2012) ocurre por interacción directa de P9-2 consigo misma. Este hallazgo es relevante ya que esta proteína tendría un rol en el movimiento de célula a célula en insectos (Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2012).
- ✓ La proteína no estructural P7-2 se comporta como un regulador transcripcional en levaduras. Esto concuerda con evidencias previas que indican que es capaz de ingresar ocasionalmente al núcleo celular tanto en Sf9 (Maroniche, 2011; Maroniche y col., 2012) como en protoplastos de trigo (Saavedra Pons, 2012). Estos resultados son relevantes porque P7-2 es un determinante de patogenicidad cuando es expresada en plantas a partir de un PVX recombinante (Mongelli, 2010).

Capítulo II: Análisis de la interacción de proteínas del MRCV con proteínas candidato de plantas e insectos

- ✓ P7-2 se comporta como una proteína F-box capaz de interactuar con la proteína SKP1 del complejo E3 ligasa de plantas e insectos, lo que sugiere que P7-2 tiene la capacidad de interferir con la vía de ubiquitinación y de degradación de proteínas del proteasoma.

Capítulo III: Identificación de proteínas de trigo con capacidad de interacción con las proteínas mayoritaria y minoritaria del viroplasma de MRCV

- ✓ La dinámica y función de los viroplasmas podría requerir de una aciltransferasa de trigo de tipo BAHD dada su interacción con P9-1. Dicha proteína intervendría en la síntesis de lípidos y podría ser relevante para el movimiento intracelular de la progenie viral.
- ✓ P9-1 también interactúa con una aldosa 1-epimerasa de trigo que tendría función de glucosa-6-fosfato 1-epimerasa y posible localización en cloroplastos. Esta interacción podría estar ligada a una alteración en el metabolismo primario de azúcares.
- ✓ P6 es capaz de interactuar con dos posibles tioredoxinas que contienen el motivo no canónico WCRKC. Dicha interacción podría dar lugar a cambios en la estructura conformacional de P6 por reducción de sus puentes disulfuro y/o alterar la señalización del estado redox celular mediada por las tioredoxinas.
- ✓ En cuanto a las técnicas implementadas durante este trabajo de Tesis, el doble híbrido de levaduras resultó una herramienta útil y práctica para la identificación de interacciones proteicas a gran escala pero que debe ser complementada utilizando otras metodologías. Por su parte, la expresión transitoria de proteínas de MRCV por agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* no resultó una técnica adecuada, ya que los niveles de expresión alcanzados no fueron suficientes para su detección y análisis posteriores por microscopía confocal, “Western blot” o coimmunoprecipitación.

Capítulo IV: Análisis de la estabilidad de P6 y P9-1

- ✓ A pesar de la baja expresión detectada, los estudios de expresión en *N. benthamiana* permitieron determinar que P6 y P9-1 poseen motivos PEST de degradación vía el UPS que serían funcionales en plantas.
- ✓ La inhibición del proteasoma con MG132 provoca una mayor acumulación de P6 y de P6 Δ PEST en *N. benthamiana*, indicando que el PEST de P6 detectado no sería el único motivo que media la participación del proteasoma en la estabilidad de esta proteína.
- ✓ En células de insecto Sf9, y en contraposición a lo encontrado en *N. benthamiana*, la ausencia del motivo PEST de P9-1 y de los primeros 50 residuos que contienen el PEST de P6, provoca la desestabilización de ambas proteínas.
- ✓ La expresión transitoria tanto de P6 como de P9-1 en células de insectos da lugar a bandas minoritarias de migración más lenta detectadas por “Western blot”, que acompañan a las bandas de expresión mayoritarias de ambas proteínas. Estas bandas de menor peso molecular aparente no se observan cuando ambas proteínas son expresadas transitoriamente en *N. benthamiana* y sugiere que las proteínas P9-1 y P6 de MRCV sufren modificaciones postraduccionales diferenciales en plantas e insectos. Estas modificaciones podrían regular diferencialmente la estabilidad de P6 y P9-1 en ambos sistemas de expresión.

Perspectivas futuras

- ✓ Evaluar las interacciones entre las proteínas del MRCV encontradas por Y2H en un sistema de expresión en plantas alternativo al utilizado, preferentemente en monocotiledóneas. Asimismo, se propone evaluar las interacciones expresando las proteínas en Sf9.
- ✓ Profundizar en el análisis de la estabilidad de P6 y P9-1 en plantas e insectos. Se analizará la presencia de señales adicionales de degradación que puedan ser reguladas diferencialmente en ambos hospedantes, y la ocurrencia de modificaciones postraduccionales en P6 y P9-1.
- ✓ Establecer el impacto biológico de las interacciones encontradas entre P6 y P9-1 con proteínas de trigo en el ciclo infectivo de MRCV. Para ello se propone realizar una caracterización bioquímica de las proteínas de trigo interactuantes mediante ensayos bioquímicos de actividad enzimática de las proteínas purificadas. Asimismo se propone obtener mutantes nulos de los genes que codifican para estas proteínas a partir de una población de mutantes de trigo tetraploide (AABB) por TILLING que se encuentra secuenciada y analizar sus características fenotípicas así como su comportamiento frente a una infección por MRCV.
- ✓ Analizar en detalle la participación del UPS en una infección por MRCV en cuanto a su rol en la interacción P7-2/SKP1 y en la estabilidad de P6 y P9-1 en plantas e insectos. En particular se propone determinar si la característica de P7-2 de ser un determinante de patogenicidad depende o no de su interacción con SKP1. Para ello se propone evaluar la interacción de P7-2 con SKP1 de *N. benthamiana* y si esta fuera positiva analizar el efecto del silenciamiento de NbSKP1 por VIGS en una infección con PVX-P7-2 versus PVX-GFP. Respecto de la estabilidad de P6 y P9-1, se propone evaluar el efecto del inhibidor de proteasoma MG132 sobre la capacidad de multimerización de P9-1 y de reclutar a P6 en transfecciones transitorias en Sf9. Asimismo, se propone determinar si P6 y P9-1 son poliubiquitinadas en plantas e insectos.

Bibliografía

Achon, M.A., y Alonso-Duenas, N. (2009). Impact of 9 years of Bt-maize cultivation on the distribution of maize viruses. *Transgenic research* 18, 387-397.

Akita, F., Higashiura, A., Shimizu, T., Pu, Y., Suzuki, M., Uehara-Ichiki, T., Sasaya, T., Kanamaru, S., Arisaka, F., Tsukihara, T., y col. (2012). Crystallographic analysis reveals octamerization of viroplasm matrix protein P9-1 of Rice black streaked dwarf virus. *Journal of virology* 86, 746-756.

Akita, F., Miyazaki, N., Hibino, H., Shimizu, T., Higashiura, A., Uehara-Ichiki, T., Sasaya, T., Tsukihara, T., Nakagawa, A., Iwasaki, K., y col. (2011). Viroplasm matrix protein Pns9 from rice gall dwarf virus forms an octameric cylindrical structure. *J Gen Virol* 92, 2214-2221.

Alcaide-Loridan, C., y Jupin, I. (2012). Ubiquitin and plant viruses, let's play together! *Plant Physiol* 160, 72-82.

Altenburg, B.C., Graham, D.Y., y Estes, M.K. (1980). Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol* 46, 75-85.

Antczak, J.B., y Joklik, W.K. (1992). Reovirus genome segment assortment into progeny genomes studied by the use of monoclonal antibodies directed against reovirus proteins. *Virology* 187, 760-776.

Aponte, C., Poncet, D., y Cohen, J. (1996). Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *Journal of virology* 70, 985-991.

Arneodo, J.D. (2003). Caracterización biológica del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) y estudios de variabilidad entre aislamientos. In Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba).

Arneodo, J.D., Guzman, F.A., Conci, L.R., Laguna, I.G., y Truol, G.A. (2002a). Transmission features of *Mal de Río Cuarto virus* in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. *Ann appl Biol* 141, 195-200.

Arneodo, J.D., Lorenzo, E., Laguna, I.G., Abdala, G., y Truol, G.A. (2002b). Cytopathological characterization of Mal de Río Cuarto virus in corn, wheat and barley. *Fitopatol Bras* 27, 298-302.

Attoui, H., Mertens, P.P.C., Becnel, J., Belaganahalli, S., Bergoin, M., Brussaard, C.P., Chappell, J.D., Ciarlet, M., del Vas, M., Dermody, T.S., y col. (2011). Family Reoviridae. In *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Castens, y E.J. Lefkowitz, eds. (San Diego, Elsevier), pp. 541-638.

Ausubel, F.M. (1999). Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology, 4th edn (New York, Wiley).

Avila, A. (2005). Incidencia del Mal de Río Cuarto (MRCV), sus vectores y hospedantes alternativos según diferentes unidades fisiográficas del Centro de Argentina. In Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba).

Bailer, S.M., y Haas, J. (2009). Connecting viral with cellular interactomes. *Curr Opin Microbiol* 12, 453-459.

Bailey, J.M., Fishman, P.H., y Pentchev, P.G. (1967). Studies on mutarotases. I. Purification and properties of a mutarotase from higher plants. *J Biol Chem* 242, 4263-4269.

Bassi, M.y.F., M.A. (1972). Electron microscopy of maize rough dwarf virus assembly sites in maize. Cytochemical and autoradiographic observations. *J Gen Virol* 16, 153-160.

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., y Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.

Becker, M.M., Goral, M.I., Hazelton, P.R., Baer, G.S., Rodgers, S.E., Brown, E.G., Coombs, K.M., y Dermody, T.S. (2001). Reovirus sigmaNS protein is required for nucleation of viral assembly complexes and formation of viral inclusions. *Journal of virology* 75, 1459-1475.

Becker, M.M., Peters, T.R., y Dermody, T.S. (2003). Reovirus sigma NS and mu NS proteins form cytoplasmic inclusion structures in the absence of viral infection. *Journal of virology* 77, 5948-5963.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293-300.

Bhushan, S., Kuhn, C., Berglund, A.K., Roth, C., y Glaser, E. (2006). The role of the N-terminal domain of chloroplast targeting peptides in organellar protein import and miss-sorting. *FEBS letters* 580, 3966-3972.

Binaghi, M. (2012). Rol de la fosforilación en la regulación funcional de la proteína de movimiento TGBp1 del Potato virus X. In Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires).

Blackburn (2009). Quick and Easy Yeast Colony PCR v2.0.

Blom, N., Gammeltoft, S., y Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351-1362.

Bonamico, N.C.D.R., M. A.; Ibañez, M. A.; Borghi, M. L.; Díaz, D. G.; Salerno, J. C. y Balzarini, M. G. (2012). QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using recombinant inbred lines. *The Journal of Agricultural Science* 150, 619-629.

Bragg, J.N., y Jackson, A.O. (2004). The C-terminal region of the Barley stripe mosaic virusgammab protein participates in homologous interactions and is required for suppression of RNA silencing. *Mol Plant Pathol* 5, 465-481.

Braun, P., Tasan, M., Dreze, M., Barrios-Rodiles, M., Lemmens, I., Yu, H., Sahalie, J.M., Murray, R.R., Roncari, L., de Smet, A.S., y col. (2009). An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions. *Nat Methods* 6, 91-97.

Broering, T.J., Kim, J., Miller, C.L., Piggott, C.D., Dinoso, J.B., Nibert, M.L., y Parker, J.S. (2004). Reovirus nonstructural protein mu NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. *Journal of virology* 78, 1882-1892.

Broering, T.J., Parker, J.S., Joyce, P.L., Kim, J., y Nibert, M.L. (2002). Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells. *Journal of virology* 76, 8285-8297.

Brookes, S.M., Hyatt, A.D., y Eaton, B.T. (1993). Characterization of virus inclusion bodies in bluetongue virus-infected cells. *J Gen Virol* 74 (Pt 3), 525-530.

Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., y Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci* 10, 2763-2788.

Brunt, A.A.C., K.;Dallwitz, M. J.;Gibbs, A. J.;Watson, L. (1996). Viruses of plants. Descriptions and lists from the VIDE database. (CAB International).

Buchan, D.W., Ward, S.M., Lobley, A.E., Nugent, T.C., Bryson, K., y Jones, D.T. (2010). Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucleic Acids Res* 38, W563-568.

Buchanan, B.B., y Balmer, Y. (2005). Redox regulation: a broadening horizon. *Annual review of plant biology* 56, 187-220.

Burckhardt, C.J., y Greber, U.F. (2009). Virus movements on the plasma membrane support infection and transmission between cells. *PLoS Pathog* 5, e1000621.

Burkhard, P., Stetefeld, J., y Strelkov, S.V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11, 82-88.

Cabral-Romero, C., y Padilla-Noriega, L. (2006). Association of rotavirus viroplasms with microtubules through NSP2 and NSP5. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 603-611.

Cain, P., Hall, M., Schroder, W.P., Kieselbach, T., y Robinson, C. (2009). A novel extended family of stromal thioredoxins. *Plant Mol Biol* 70, 273-281.

Camborde, L., Planchais, S., Tournier, V., Jakubiec, A., Dugeon, 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, 3142-3152.

Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F., y Burrone, O.R. (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J Gen Virol* 86, 1481-1487.

Cann, A.J. (2005). Transcriptional control of expression. In *Principles of Molecular Virology* (Elsevier Pte Ltd), pp. 150–155.

Cardozo, T., y Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 739-751.

Casano, L.M.T., V. S. (1992). The effect of oxygen radicals on induced proteolysis in isolated chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 329- 332.

Cashdollar, L.W. (1994). Characterization and structural localization of the reovirus lambda 3 protein. *Res Virol* 145, 277-285.

Conti, M. (1984). Epidemiology and Vectors of reolike plant viruses. Harris, K F (Eds) Current topics in pathogen-vector-host research *New York: Proegher Scientific*, 111-139.

Contin, R., Arnoldi, F., Campagna, M., y Burrone, O.R. (2010). Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *J Gen Virol* 91, 1782-1793.

Contin, R., Arnoldi, F., Mano, M., y Burrone, O.R. (2011). Rotavirus replication requires a functional proteasome for effective assembly of viroplasms. *Journal of virology* 85, 2781-2792.

Crawford SE, U.B., Hyser JM, Broughman JR, Estes MK.. (2013). Rotavirus exploits lipid metabolism and energy production for replication. In American Society for Virology Annual Meeting (Pennsylvania State University, University Park, PA), pp. 74 (W72-76).

Criglar, J.M., Hu, L., Crawford, S.E., Hyser, J.M., Broughman, J.R., Prasad, B.V., y Estes, M.K. (2014). A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *Journal of virology* 88, 786-798.

Cusick, M.E., Yu, H., Smolyar, A., Venkatesan, K., Carvunis, A.R., Simonis, N., Rual, J.F., Borick, H., Braun, P., Dreze, M., y col. (2009). Literature-curated protein interaction datasets. *Nat Methods* 6, 39-46.

Chandra-Shekara, A.C., Venugopal, S.C., Barman, S.R., Kachroo, A., y Kachroo, P. (2007). Plastidial fatty acid levels regulate resistance gene-dependent defense signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7277-7282.

Chen, C.C., Hsu, Y.H., Chen, M.J., y Chiu, R.J. (1989). Comparison of proteins and nucleic acids of Echinochloa ragged stunt and rice ragged stunt viruses. *Intervirology* 30, 278-284.

Chen, H., Chen, Q., Omura, T., Uehara-Ichiki, T., y Wei, T. (2011). Sequential infection of Rice dwarf virus in the internal organs of its insect vector after ingestion of virus. *Virus research* 160, 389-394.

Chen, Q., Wang, H., Ren, T., Xie, L., y Wei, T. (2014). Interaction between nonstructural protein Pns10 of rice dwarf virus and cytoplasmic actin of leafhoppers is correlated with insect vector specificity. *Journal of General Virology*.

Chen, Y.T., Lin, C.H., Ji, W.T., Li, S.K., y Liu, H.J. (2008). Proteasome inhibition reduces avian reovirus replication and apoptosis induction in cultured cells. *J Virol Methods* 151, 95-100.

Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C.F., Courousse, N., Chwetzoff, S., Trugnan, G., Keshavan, N., Lever, A., y Desselberger, U. (2010). Rotaviruses associate with cellular lipid

droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *Journal of virology* **84**, 6782-6798.

Chibani, K., Tarrago, L., Gualberto, J.M., Wingsle, G., Rey, P., Jacquot, J.P., y Rouhier, N. (2012). Atypical thioredoxins in poplar: the glutathione-dependent thioredoxin-like 2.1 supports the activity of target enzymes possessing a single redox active cysteine. *Plant Physiol* **159**, 592-605.

Chwetzoff, S., y Trugnan, G. (2006). Rotavirus Assembly: An Alternative Model That Utilizes an Atypical Trafficking Pathway. In *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*, P. Roy, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 245-261.

D'Auria, J.C. (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 331-340.

Dagoberto, E., Remes Lenicov, A.M.d., Teson, A., y Paradell, S. (1985). Avena Sativa L, hospedante preferencial del transmisor del "Mal de Río Cuarto", *Delphacodes kuscheli* Fennah (Homoptera; Delphacidae). *Neotrópica* **31**, 82.

Dales, S., Gomatos, P.J., y Hsu, K.C. (1965). The Uptake and Development of Reovirus in Strain L Cells Followed with Labeled Viral Ribonucleic Acid and Ferritin-Antibody Conjugates. *Virology* **25**, 193-211.

Dangoor, I., Peled-Zehavi, H., Levitan, A., Pasand, O., y Danon, A. (2009). A small family of chloroplast atypical thioredoxins. *Plant Physiol* **149**, 1240-1250.

de Haro, L. Tesis Doctoral en curso.

Denno, R.F. (1978). The relation between habitat stability and the migratory tactics of planthoppers (Homoptera: Delphacidae). *Misc Publ Entomol Soc Am* **11**, 41-69.

Devoto, A., Muskett, P.R., y Shirasu, K. (2003). Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 307-311.

Di Feo, L.d.V.B., C.; Truol, G.; Biderbost, Elvio B. Laguna, Irma G. (2001). Comportamiento diferencial de cultivares de trigo frente al virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) y su vector. Detección y caracterización de fuente de tolerancia. In *Informe Anual (Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal. INTA)*.

Di Feo, L.d.V.L., Irma G.; Biderbost, Elvio B. (2010). Alteraciones fisiológicas asociadas a la infección con Mal de Río Cuarto virus (MRCV) y a fitotoxicidad provocada por su insecto vector (*Delphacodes kuscheli* Fennah) en trigo. *Tropical Plant Pathology* **35**, 079-087.

Di Renzo, M.A.B., N. C.; Díaz, D.G.; Ibañez, M.A.; Faricelli, M. E.; Balzarini, M. G.; Salerno, J. C. (2004). Microsatellite markers linked to QTL for resistance to Mal de Río Cuarto disease in Zea mays L. *Journal of Agricultural Science*, 289–295.

Dinkel, H., Michael, S., Weatheritt, R.J., Davey, N.E., Van Roey, K., Altenberg, B., Toedt, G., Uyar, B., Seiler, M., Budd, A., y col. (2012). ELM--the database of eukaryotic linear motifs. *Nucleic Acids Res* **40**, D242-251.

Distéfano, A.J. (2004). Caracterización molecular del *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) del maíz: estudio de los segmentos genómicos S1-S6, S8 y S10 y de las proteínas codificadas por los mismos. In Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) (Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires).

Distéfano, A.J., Conci, L.R., Munoz Hidalgo, M., Guzmán, F.A., Hopp, H.E., y del Vas, M. (2002). Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of Mal de Río Cuarto virus (MRCV): evidence that the virus should be a separate Fijivirus species. *Arch Virol* 147, 1699-1709.

Distéfano, A.J., Conci, L.R., Muñoz Hidalgo, M., Guzmán, F.A., Hopp, H.E., y del Vas, M. (2003). Sequence and phylogenetic analysis of genome segments S1, S2, S3 and S6 of Mal de Río Cuarto virus, a newly accepted Fijivirus species. *Virus research* 92, 113-121.

Distéfano, A.J., Hopp, H.E., y del Vas, M. (2005). Sequence analysis of genome segments S5 and S10 of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae). *Arch Virol* 150, 1241-1248.

Distéfano, A.J., Maldonado, S., Hopp, H.E., y del Vas, M. (2009). Mal de Río Cuarto virus (MRCV) genomic segment S3 codes for the major core capsid protein. *Virus genes* 38, 455-460.

Doménech, R. (2007). La disputa entre alimentos y biocombustibles no existe, MAIZAR, ed.

Dovas, C.I., Eythymiou, K., y Katis, N.I. (2004). First report on Maize rough dwarf virus (MRCV) on maize crops in Greece. *Plant Pathology* 53, 238.

Dugeon, 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.

Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., y Obradovic, Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* 41, 6573-6582.

Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Oppen, K., Juehne, T., Song, K., y Pikaard, C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* 45, 616-629.

Eaton, B.T., Hyatt, A.D., y White, J.R. (1987). Association of bluetongue virus with the cytoskeleton. *Virology* 157, 107-116.

Eichwald, C., Arnoldi, F., Laimbacher, A.S., Schraner, E.M., Fraefel, C., Wild, P., Burrone, O.R., y Ackermann, M. (2012). Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PLoS One* 7, e47947.

Eichwald, C., Rodriguez, J.F., y Burrone, O.R. (2004). Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol* 85, 625-634.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., y von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300, 1005-1016.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., y von Heijne, G. (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8, 978-984.

Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., y Burrone, O.R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* 80 (Pt 2), 333-339.

FAO (2007). La Bioenergía y la Seguridad Alimentaria en América Latina y el Caribe, L.O.d.I.N.U.p.I.A.y.I. Alimentación, ed. (Maizar).

Favali, M.A., Bassi, M., y Appiano, A. (1974). Synthesis and migration of maize rough dwarf virus in the host cell: an autoradiographic study. *J Gen Virol* 24, 563-565.

Ferre, F., y Clote, P. (2005). DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res* 33, W230-232.

Fields, S., y Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Firth, A.E., y Atkins, J.F. (2009). Analysis of the coding potential of the partially overlapping 3' ORF in segment 5 of the plant fijiviruses. *Virol J* 6, 32.

Forján, H.M., L. (2013). Maíz: analizando el momento de sembrar (Chacra Experimental Integrada Barrow, Bioceres Semillas).

Francki, R.I.y.G., C.J. (1972). Occurrence of similar particles in Fiji disease virus-infected sugar cane and insect vector cells. *Virology* 48, 305-307.

Francki, R.M., B.; Hatta, T. (1985). In, A.o.P. Viruses, ed. (B.R. CRC Press Inc).

Gagne, J.M., Downes, B.P., Shiu, S.H., Durski, A.M., y Vierstra, R.D. (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11519-11524.

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, 309-319.

Gardet, A., Breton, M., Fontanges, P., Trugnan, G., y Chwetzoff, S. (2006). Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *Journal of virology* 80, 3947-3956.

Gaunt, E.R., Cheung, W., Richards, J.E., Lever, A., y Desselberger, U. (2013). Inhibition of rotavirus replication by downregulation of fatty acid synthesis. *J Gen Virol* 94, 1310-1317.

Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R.R., y Hansch, R. (2009). New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Mol Plant* 2, 1051-1058.

Ghida Daza, C. (2013). Situación económica del cultivo de maíz. Campaña 2013/14. . In Juárez GdEEIM (INTA), pp. 1-7.

Giannotti, J.y.M., R.G. (1977). Pangola stunt virus in thin sections and in negative stain. *Virology* 80, 347-355.

Gidda, S.K., Shockey, J.M., Rothstein, S.J., Dyer, J.M., y Mullen, R.T. (2009). Arabidopsis thaliana GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. *Plant Physiol Biochem* 47, 867-879.

Giménez Pecci, M., Laguna, I.G., Lenardón S.L. (2012). Mal de Río Cuarto del Maíz. In *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina*, E. INTA, ed. (INTA), pp. 41-56.

Giménez Pecci, M.P., Carloni, E.J., Virla, E.G., Díaz, C.G., Maggio, M.E. y Laguna, I.G. (2008a). Incidencia del corn stunt y del mal de Río Cuarto en cultivos de maíz en el norte argentino durante 2006/07. In 1° Congreso Argentino de Fitopatología (Ciudad de Córdoba, Córdoba).

Giménez Pecci, M.P., Laguna, I.G., Dagoberto, E., Truol, G.A.R.P., P. E., Conci, L.R., Ferrer, F., y Ornaghi, J.A. (1997). Cebada (*Hordeum vulgare* L.) , un nuevo hospedante natural del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) en Argentina. Paper presented at: VI Congreso Nacional de Maíz (Pergamino, Argentina.).

Giménez Pecci, M.P., Laguna, I.G., García, A. y Carpane, P.D. (2008b). Bandas extragenómicas en el perfil electroforético del dsRNA de Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae). *Revista Argentina de Microbiología* 40.

Giorda, L., Ornaghi, J.A., Boito, G., y March, G.J. (1993). Identificación del vector del virus causal del Mal de Río Cuarto en sorgo y estudios poblacionales de delfácidos. Paper presented at: Workshop Mal de Río Cuarto del Maíz (Córdoba, Argentina).

Glickman, M.H., y Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.

Godge, M.R., Purkayastha, A., Dasgupta, I., y Kumar, P.P. (2008). Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Rep* 27, 209-219.

Goldberg, A.L. (2012). Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J Cell Biol* 199, 583-588.

Gonzalez, R.A., Espinosa, R., Romero, P., López, S., y Arias, C.F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch Virol* 145, 1963-1973.

Goregaoker, S.P., Lewandowski, D.J., y Culver, J.N. (2001). Identification and functional analysis of an interaction between domains of the 126/183-kDa replicase-associated proteins of tobacco mosaic virus. *Virology* 282, 320-328.

Graille, M., Baltaze, J.P., Leulliot, N., Liger, D., Quevillon-Cheruel, S., y van Tilbeurgh, H. (2006). Structure-based functional annotation: yeast ymr099c codes for a D-hexose-6-phosphate mutarotase. *J Biol Chem* 281, 30175-30185.

Greber, U.F., y Way, M. (2006). A superhighway to virus infection. *Cell* 124, 741-754.

Guglielmi, K.M., Johnson, E.M., Stehle, T., y Dermody, T.S. (2006). Attachment and Cell Entry of Mammalian Orthoreovirus. In *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*, P. Roy, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1-38.

Gutiérrez, M., Isa, P., Sanchez-San Martín, C., Perez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F., y López, S. (2010). Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol* 84, 9161-9169.

Guzmán, F.A., Arneodo, J.D., Pons, A.B., Truol, G.A., Luque, A.V., y Conci, L.R. (2010). Immunodetection and subcellular localization of Mal de Río Cuarto virus P9-1 protein in infected plant and insect host cells. *Virus genes* 41, 111-117.

Guzmán, F.A., Distéfano, A.J., Arneodo, J.D., Hopp, H.E., Lenardón, S.L., del Vas, M., y Conci, L.R. (2007). Sequencing of the bicistronic genome segments S7 and S9 of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) completes the genome of this virus. *Arch Virol* 152, 565-573.

Hanke, C., Wolter, F.P., Coleman, J., Peterek, G., y Frentzen, M. (1995). A plant acyltransferase involved in triacylglycerol biosynthesis complements an *Escherichia coli* sn-1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase mutant. *Eur J Biochem* 232, 806-810.

Harding, R.M., Burns, P., Geijskes, R.J., McQualter, R.M., Dale, J.L., y Smith, G.R. (2006). Molecular analysis of Fiji disease virus segments 2, 4 and 7 completes the genome sequence. *Virus genes* 32, 43-47.

Harpaz, I. (1972). Maize Rough Dwarf. A planthopper virus disease affecting maize, rice, small grains and grasses. Israel University Press, Jerusalem, 252.

Harries, P.A., Schoelz, J.E., y Nelson, R.S. (2010). Intracellular transport of viruses and their components: utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 1381-1393.

Heckman, K.L., y Pease, L.R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2, 924-932.

Héricourt, F., Blanc, S., Redeker, V., y Jupin, I. (2000). Evidence for phosphorylation and ubiquitinylation of the turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase domain expressed in a baculovirus-insect cell system. *Biochem J* 349, 417-425.

Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., Jr., y Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* 16, 1295-1298.

Hirumi, H., Granados, R.R., y Maramorosch, K. (1967). Electron microscopy of a plant-pathogenic virus in the nervous system of its insect vector. *Journal of virology* 1, 430-444.

Hiscox, J.A. (2003). The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. *Virus research* 95, 13-22.

Ho, M.S., Tsai, P.I., y Chien, C.T. (2006). F-box proteins: the key to protein degradation. *J Biomed Sci* 13, 181-191.

Hull, R. (2002). Induction of Disease 1: Virus Movement through the Plant and Effects on Plant Metabolism (San Diego CA, Matthews Plant Virology. Academic Press.).

ICTV, ed. (2012). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. (London, UK, Elsevier Inc.).

Ishiwatari, Y., Honda I, C., Kawashima, I., Nakamura, S.-i., Hirano, H., Mori, S., Fujiwara, T., Hayashi, H., y Chino, M. (1995). Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* 195, 456-463.

Isogai, M., Uyeda, I., y Lee, B.C. (1998a). Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10. *J Gen Virol* 79 (Pt 6), 1487-1494.

Isogai, M., Uyeda, I., y Lindsten, K. (1998b). Taxonomic characteristics of fijiviruses based on nucleotide sequences of the oat sterile dwarf virus genome. *J Gen Virol* 79 (Pt 6), 1479-1485.

Jain, M., Nijhawan, A., Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Sharma, P., Kapoor, S., Tyagi, A.K., y Khurana, J.P. (2007). F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. *Plant Physiol* 143, 1467-1483.

Jayaram, H., Taraporewala, Z., Patton, J.T., y Prasad, B.V. (2002). Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature* 417, 311-315.

Jia, D., Chen, H., Zheng, A., Chen, Q., Liu, Q., Xie, L., Wu, Z., y Wei, T. (2012a). Development of an insect vector cell culture and RNA interference system to investigate the functional role of fijivirus replication protein. *Journal of virology* 86, 5800-5807.

Jia, D., Guo, N., Chen, H., Akita, F., Xie, L., Omura, T., y Wei, T. (2012b). Assembly of the viroplasm by viral non-structural protein Pns10 is essential for persistent infection of rice ragged stunt virus in its insect vector. *J Gen Virol* 93, 2299-2309.

Jia, D., Mao, Q., Chen, H., Wang, A., Liu, Y., Wang, H., Xie, L., y Wei, T. (2014). Virus-induced tubule: a vehicle for rapid spread of virions through basal lamina from midgut epithelium in the insect vector. *Journal of virology* 88, 10488-10500.

Jiang, J., Ridley, A.W., Tang, H., Croft, B.J., y Johnson, K.N. (2008). Genetic variability of genome segments 3 and 9 of Fiji disease virus field isolates. *Arch Virol* 153, 839-848.

Jiang, X., Jayaram, H., Kumar, M., Ludtke, S.J., Estes, M.K., y Prasad, B.V. (2006). Cryoelectron microscopy structures of rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA complexes: implications for genome replication. *Journal of virology* 80, 10829-10835.

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., y Angenon, G. (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122, 101-108.

Karsies, A., Hohn, T., y Leclerc, D. (2001). Degradation signals within both terminal domains of the cauliflower mosaic virus capsid protein precursor. *Plant J* 27, 335-343.

Kelley, L.A., y Sternberg, M.J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4, 363-371.

Klis, F.M., Boorsma, A., y De Groot, P.W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185-202.

Kotting, O., Kossmann, J., Zeeman, S.C., y Lloyd, J.R. (2010). Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr Opin Plant Biol* 13, 321-329.

Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 361, 13-37.

Kunst, L., Browse, J., y Somerville, C. (1988). Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4143-4147.

Laguna, I.G., Ávila, A.O., Delfino, M.A., Garay, J. y Fiorona, M (2003). Incidencia del Mal de Río Cuarto virus en tres unidades fisiográficas diferentes del centro de Argentina. In XXXVI Congreso Brasileiro de Fitopatología (Uberlandia. MG. Brasil).

Laguna, I.G., Giménez Pecci, M.P., Herrera, P.S., Rodríguez Pardina, P.E., Virla, E.G. y Ávila, E. (1999). Prospección del virus del Mal de Río Cuarto en Argentina. In Fitopatología, ALd (Ed), XI Congreso Latinoamericano de Fitopatología (Sao Pedro, Brasil).

Laguna, I.G., Remes Lenicov, A.M.d., Virla, E., Avila, A., Giménez Pecci, M.P., Herrera, P., Garay, J., Ploper, D., y Mariani, R. (2002). Difusión del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz, su vector, delfácidos asociados y huéspedes alternativos en la Argentina. *Plant Disease* 82, 448.

Lecker, S.H., Goldberg, A.L., y Mitch, W.E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 17, 1807-1819.

Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., y Genschik, P. (2006). F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* 9, 631-638.

Lenardón, S.L., y March, G.J. (1983). Estado actual del "Mal de Río Cuarto" en cultivo de maíz. . *CREA* 104, 22-42.

Lenardón, S.L., March, G.J., Nome, S.F., y Ornaghi, J.A. (1998). Recent outbreak of Mal de Río Cuarto virus on corn in Argentina. *Plant Disease* 82, 448.

Lenardón, S.L., March, G.J., Ornaghi, J.A., y Beviacqua, J.E. (1985). Virosis del maíz en Argentina. In Jornada de actualización técnica (Chacabuco, Buenos Aires, Argentina, Northrup King Semillas).

Lenardón, S.L., March, G.J., Ornaghi, J.A., y Beviacqua, J.E. (1985). Virosis del maíz en Argentina. In Jornada de actualización técnica (Chacabuco, Buenos Aires, Argentina, Northrup King Semillas).

Lenardón, S.L.R., A.; Giolitti, F.; March, G. J. y Nome, S. F. (1998). Virus del Mal de Río Cuarto: Estudios de transmisión por semilla. In RIA (Argentina, INTA), pp. 99 a105.

Lepisto, A., Pakula, E., Toivola, J., Krieger-Liszkay, A., Vignols, F., y Rintamaki, E. (2013). Deletion of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase results in inability to regulate starch synthesis and causes stunted growth under short-day photoperiods. *Journal of experimental botany* 64, 3843-3854.

- Letunic, I., Doerks, T., y Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* 43, D257-260.
- Li, J., Xue, J., Zhang, H.M., Yang, J., Lv, M.F., Xie, L., Meng, Y., Li, P.P., y Chen, J.P. (2013). Interactions between the P6 and P5-1 proteins of southern rice black-streaked dwarf fijivirus in yeast and plant cells. *Arch Virol* 158, 1649-1659.
- Li, J., Xue, J., Zhang, H.M., Yang, J., Xie, L., y Chen, J.P. (2014). Characterization of homologous and heterologous interactions between viroplasm proteins P6 and P9-1 of the fijivirus southern rice black-streaked dwarf virus. *Arch Virol*.
- Li, Y., Bao, Y.M., Wei, C.H., Kang, Z.S., Zhong, Y.W., Mao, P., Wu, G., Chen, Z.L., Schiemann, J., y Nelson, R.S. (2004). Rice dwarf phytooreovirus segment S6-encoded nonstructural protein has a cell-to-cell movement function. *Journal of virology* 78, 5382-5389.
- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., y Russell, R.B. (2003a). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* 11, 1453-1459.
- Linding, R., Russell, R.B., Neduva, V., y Gibson, T.J. (2003b). GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res* 31, 3701-3708.
- Liu, H., Wei, C., Zhong, Y., y Li, Y. (2007a). Rice black-streaked dwarf virus minor core protein P8 is a nuclear dimeric protein and represses transcription in tobacco protoplasts. *FEBS letters* 581, 2534-2540.
- Liu, H., Wei, C., Zhong, Y., y Li, Y. (2007b). Rice black-streaked dwarf virus outer capsid protein P10 has self-interactions and forms oligomeric complexes in solution. *Virus research* 127, 34-42.
- Liu, Y., Jia, D., Chen, H., Chen, Q., Xie, L., Wu, Z., y Wei, T. (2011). The P7-1 protein of southern rice black-streaked dwarf virus, a fijivirus, induces the formation of tubular structures in insect cells. *Arch Virol* 156, 1729-1736.
- López, T., Silva-Ayala, D., López, S., y Arias, C.F. (2011). Replication of the rotavirus genome requires an active ubiquitin-proteasome system. *Journal of virology* 85, 11964-11971.
- Lucas, W.J. (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344, 169-184.
- Ma, X., Koepke, J., Panjikar, S., Fritzsche, G., y Stockigt, J. (2005). Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J Biol Chem* 280, 13576-13583.
- MacFarlane, S.A., y Uhrig, J.F. (2008). Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Host–Virus Interactions. In *Methods in Molecular Biology, Plant Virology Protocols: From Viral Sequence to Protein Function*, G.D. Foster, I.E. Johansen, Y. Hong, y P.D. Nagy, eds. (Humana Press).
- Majeran, W., Cai, Y., Sun, Q., y van Wijk, K.J. (2005). Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell* 17, 3111-3140.

Mao, Q., Zheng, S., Han, Q., Chen, H., Ma, Y., Jia, D., Chen, Q., y Wei, T. (2013). New model for the genesis and maturation of viroplasms induced by fijiviruses in insect vector cells. *Journal of virology* 87, 6819-6828.

March, G.J., Balzarini, M., Ornaghi, J.A., Beviacqua, J.E., y Marinelli, A. (1995). Predictive Model for "Mal de Río Cuarto" Disease Intensity. *Plant Disease* 79, 1051-1053.

March, G.J., Marinelli, A.D., Oddino, C., García, J., Zuza, M. y Giuggia, J. (2008). Modelo empírico de pérdidas causadas por el Mal de Río Cuarto-2006/07. In 1º Congreso Argentino de Fitopatología (Ciudad de Córdoba. Córdoba).

Maroniche, G.A. (2011). Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre el Mal de Río Cuarto virus (MRCV) y el delfácido transmisor *Delphacodes kuscheli*. In Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires), pp. 131.

Maroniche, G.A., Mongelli, V.C., Alfonso, V., Llauger, G., Taboga, O., y del Vas, M. (2011). Development of a novel set of Gateway-compatible vectors for live imaging in insect cells. *Insect Mol Biol* 20, 675-685.

Maroniche, G.A., Mongelli, V.C., Llauger, G., Alfonso, V., Taboga, O., y del Vas, M. (2012). In vivo subcellular localization of Mal de Río Cuarto virus (MRCV) non-structural proteins in insect cells reveals their putative functions. *Virology*.

Maroniche, G.A., Mongelli, V.C., Peralta, A.V., Distefano, A.J., Llauger, G., Taboga, O.A., Hopp, E.H., y Del Vas, M. (2010). Functional and biochemical properties of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) P9-1 viroplasm protein show further similarities to animal reovirus counterparts. *Virus research* 152, 96-103.

Martin, D., Duarte, M., Lepault, J., y Poncet, D. (2010). Sequestration of free tubulin molecules by the viral protein NSP2 induces microtubule depolymerization during rotavirus infection. *Journal of virology* 84, 2522-2532.

Marzachi, C., Antoniazzi, S., d'Aquilio, M., y Boccardo, G. (1996). The double-stranded RNA genome of maize rough dwarf Fijivirus contains both mono y dicistronic segments. *Eur J Plant Pathol* 102, 601-605.

Marzachi, C., Boccardo, G., y Nuss, D.L. (1991). Cloning of the maize rough dwarf virus genome: molecular confirmation of the plant-reovirus classification scheme and identification of two large nonoverlapping coding domains within a single genomic segment. *Virology* 180, 518-526.

Mateyak, M.K., y Kinzy, T.G. (2010). eEF1A: thinking outside the ribosome. *J Biol Chem* 285, 21209-21213.

Matthews, R.E.F., Hull, R., y ScienceDirect (Online service) (2002). Matthews' plant virology (San Diego, Academic Press), pp. xx, 1001 p.

Mattio, M.F., Cassol, A., Remes Lenicov, A.M.d., y Truol, G.A. (2008). Tagosodes orizicolus: nuevo vector potencial del Mal de Río Cuarto virus. . *Tropical Plant Pathology* 33, 237-240.

McQualter, R.B., Burns, P., Smith, G.R., Dale, J.L., y Harding, R.M. (2004). Molecular analysis of Fiji disease virus genome segments 5, 6, 8 and 10. *Arch Virol* 149, 713-721.

- McQualter, R.B., Smith, G.R., Dale, J.L., y Harding, R.M. (2003). Molecular analysis of Fiji disease Fijivirus genome segments 1 and 3. *Virus genes* 26, 283-289.
- Meyer, Y., Reichheld, J.P., y Vignols, F. (2005). Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynth Res* 86, 419-433.
- Meyer, Y., Verdoque, L., y Vignols, F. (1999). Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends in plant science* 4, 388-394.
- Milne, R.G., y Lovisolo, O. (1977). Maize rough dwarf and related viruses. *Adv Virus Res* 21, 267-341.
- Miller, C.L., Parker, J.S., Dinoso, J.B., Piggott, C.D., Perron, M.J., y Nibert, M.L. (2004). Increased ubiquitination and other covariant phenotypes attributed to a strain- and temperature-dependent defect of reovirus core protein mu2. *Journal of virology* 78, 10291-10302.
- Moffett, P.a.K., D. F., ed. (2008). Plant resistance to viruses: Natural resistance associated with dominant genes.
- Mohl, B.P., y Roy, P. (2014). Bluetongue virus capsid assembly and maturation. *Viruses* 6, 3250-3270.
- Molina, I., y Kosma, D. (2014). Role of HXXXD-motif/BAHD acyltransferases in the biosynthesis of extracellular lipids. *Plant Cell Rep.*
- Mongelli, V.C. (2010). Estudio funcional de las proteínas codificadas por el virus del Mal de Río Cuarto en hospedantes vegetales. In Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) (Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires).
- N.C.G.A. (2014). National Corn Growers Association.
- Nagy, P.D. (2008). Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 46, 217-242.
- Nakashima, N., Koizumi, M., Watanabe, H., y Noda, H. (1996). Complete nucleotide sequence of the Nilaparvata lugens reovirus: a putative member of the genus Fijivirus. *J Gen Virol* 77 (Pt 1), 139-146.
- Nakashima, N., y Noda, H. (1995). Nonpathogenic Nilaparvata lugens reovirus is transmitted to the brown planthopper through rice plant. *Virology* 207, 303-307.
- Nault, L. (1994). Transmission biology, vector specificity and evolution of planthopper-transmitted plant viruses. Denno, RF & Perfect, TJ (Eds), *Planthoppers* New York: Chapman & Hall, pp 429-448.
- Nault, L.R., y Ammar, E.D. (1989). Leafhopper and Planthopper Transmission of Plant Viruses, pp. 503-529.
- Nelson, R., Schoelz, J., y Harries, P.A. (2010). Intracellular transport of viruses and their components: Utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.

Nelson, R.S., y Citovsky, V. (2005). Plant Viruses. Invaders of Cells and Pirates of Cellular Pathways. *Plant Physiol* 138, 1809-1814.

Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E., y Wileman, T. (2007). A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv Virus Res* 70, 101-182.

Nikkanen, L., y Rintamäki, E. (2014). Thioredoxin-dependent regulatory networks in chloroplasts under fluctuating light conditions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130224.

Nome, S.F., Lenardón, S.L., Raju, B.C., Laguna, I.G., Lowe, S.M., y Docampo, D.M. (1981). Association of Reovirus like particles with "Enfermedad de Río Cuarto" of Maize in Argentina. *Phytopathologische Zeitschrift* 101, 7-15.

Ornaghi, J.A., Boito, G., Sanchez, G., March, G.J., y Beviacqua, J.E. (1993). Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah, in different years and agricultural areas. *J Genet Breed* 47, 277-282.

Palatnik, J.F.V.E.M.C.N. (2002). Oxidative stress and damage in chloroplasts from dawn to dusk. In Hemantaranjan A (Eds) *Advances in Plant Physiology* (Jodhpur. India, Scientific Publishers), pp. 75-88.

Parker, J.S., Broering, T.J., Kim, J., Higgins, D.E., y Nibert, M.L. (2002). Reovirus core protein mu2 determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. *Journal of virology* 76, 4483-4496.

Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K.E., Genschik, P., y col. (2006). F-box-like domain in the poliovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1994-1999.

Penrose, K.J., y McBride, A.A. (2000). Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *Journal of virology* 74, 6031-6038.

Pérez Fernández, J.F., A.M., y Lejarraga, M.B. (2005). Evaluación de la severidad del Mal de Río Cuarto en diferentes fechas de siembras y ECR. In *Cosecha Gruesa*, pp. 17-20.

Periz, J., Celma, C., Jing, B., Pinkney, J.N., Roy, P., y Kapanidis, A.N. (2013). Rotavirus mRNAs are released by transcript-specific channels in the double-layered viral capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12042-12047.

Petrie, B.L., Greenberg, H.B., Graham, D.Y., y Estes, M.K. (1984). Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus research* 1, 133-152.

Pickart, C.M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116, 181-190.

Pierini, R., Cottam, E., Roberts, R., y Wileman, T. (2009). Modulation of membrane traffic between endoplasmic reticulum, ERGIC and Golgi to generate compartments for the replication of bacteria and viruses. *Semin Cell Dev Biol* 20, 828-833.

Polychronakos, C. (2012). Gene expression as a quantitative trait: what about translation? *J Med Genet* 49, 554-557.

Pollard, T.D., y Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.

Pu, Y., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Tomaru, M., Jin, Y., Suga, H., Hagiwara, K., Akita, F., Shimizu, T., Netsu, O., y col. (2011). Rice dwarf viruses with dysfunctional genomes generated in plants are filtered out in vector insects: implications for the origin of the virus. *Journal of virology* 85, 2975-2979.

Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G., y Iakoucheva, L.M. (2010). Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins* 78, 365-380.

Radtke, K., Dohner, K., y Sodeik, B. (2006). Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* 8, 387-400.

Rajendran, K.S., y Nagy, P.D. (2004). Interaction between the replicase proteins of Tomato bushy stunt virus in vitro and in vivo. *Virology* 326, 250-261.

Rechsteiner, M., y Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267-271.

Remes Lenicov, A.M.d., Teson, A., Dagoberto, E., y Huguet, N. (1985). Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto en maíz. *Gac Agropecuaria* 25, 251-258.

Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schauser, L., Yoshioka, H., y Jones, J.D. (2004). CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO J* 23, 2156-2165.

Rodriguez Pardina, P., Giménez Pecci, M.P., y Laguna, I.G. (1998). Wheat: a new natural host for the Mal de Río Cuarto Virus in the endemic disease area, Río Cuarto, Córdoba province, Argentina. *Plant disease* 82, 149-152.

Rodriguez Pardina, P., Laguna, I.G., Dagoberto, E., y Truol, G.A. (1994). Trigo (*Triticum aestivum* L.): Hospedante natural del virus causal del "Mal de Río Cuarto" en Argentina. . In III Congreso Nacional de Trigo Primer Simposio Nacional de Cereales de siembra otoño invernal (Bahia Blanca, Argentina.).

Rogers, S., Wells, R., y Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.

Roy, P. (2008). Functional Mapping of Bluetongue Virus Proteins and Their Interactions with Host Proteins During Virus Replication. *Cell Biochemistry and Biophysics* 50, 143-157.

Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J., y Moorman, A.F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37, e45.

Saavedra Pons, A.B. (2012). Inmunodetección y localización subcelular in vivo de las proteínas codificadas por el segmento bicistrónico S7 del Mal de Río Cuarto virus (MRCV) en hospedantes vegetales. In Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) - INTA Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) (Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.).

Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sanz-Barrio, R., Corral-Martinez, P., Ancin, M., Segui-Simarro, J.M., y Farran, I. (2013). Overexpression of plastidial thioredoxin f leads to enhanced starch accumulation in tobacco leaves. *Plant biotechnology journal* 11, 618-627.

Scofield, S.R., Huang, L., Brandt, A.S., y Gill, B.S. (2005). Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant Physiol* 138, 2165-2173.

Scholthof, H.B. (2005). Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends in plant science* 10, 376-382.

Serrato, A.J., Fernandez-Trijueque, J., Barajas-Lopez, J.D., Chueca, A., y Sahrawy, M. (2013). Plastid thioredoxins: a "one-for-all" redox-signaling system in plants. *Front Plant Sci* 4, 463.

Sharpe, A.H., Chen, L.B., y Fields, B.N. (1982). The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV-1 cells. *Virology* 120, 399-411.

Shikata, E.y.K., Y. (1977). Rice black-streaked dwarf virus: its properties, morphology and intracellular localization. *Virology* 77, 826-842.

Shimizu, T., Nakazono-Nagaoka, E., Akita, F., Uehara-Ichiki, T., Omura, T., y Sasaya, T. (2011a). Immunity to Rice black streaked dwarf virus, a plant reovirus, can be achieved in rice plants by RNA silencing against the gene for the viroplasm component protein. *Virus research* 160, 400-403.

Shimizu, T., Nakazono-Nagaoka, E., Akita, F., Wei, T., Sasaya, T., Omura, T., y Uehara-Ichiki, T. (2012). Hairpin RNA derived from the gene for Pns9, a viroplasm matrix protein of Rice gall dwarf virus, confers strong resistance to virus infection in transgenic rice plants. *J Biotechnol* 157, 421-427.

Shimizu, T., Nakazono-Nagaoka, E., Uehara-Ichiki, T., Sasaya, T., y Omura, T. (2011b). Targeting specific genes for RNA interference is crucial to the development of strong resistance to rice stripe virus. *Plant biotechnology journal* 9, 503-512.

Shimizu, T., Yoshii, M., Wei, T., Hirochika, H., y Omura, T. (2009). Silencing by RNAi of the gene for Pns12, a viroplasm matrix protein of Rice dwarf virus, results in strong resistance of transgenic rice plants to the virus. *Plant biotechnology journal* 7, 24-32.

Silver, P. (2009). Colony PCR.

Silverstein, S.C., y Schur, P.H. (1970). Immunofluorescent localization of double-stranded RNA in reovirus-infected cells. *Virology* 41, 564-566.

Silvestri, L.S., Taraporewala, Z.F., y Patton, J.T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *Journal of virology* 78, 7763-7774.

Silvestri, L.S., Tortorici, M.A., Vasquez-Del Carpio, R., y Patton, J.T. (2005). Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *Journal of virology* 79, 15165-15174.

Slade, A.J., Fuerstenberg, S.I., Loeffler, D., Steine, M.N., y Facciotti, D. (2005). A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat Biotechnol* 23, 75-81.

Smillie, R.M.B., D. G.; Andersen, K. S. (1971). The Photosynthetic Electron Transfer System in Agranal Chloroplasts. In *11nd international Congress on Photosynthesis* (Stresa).

Songbai, Z., Zhenguo, D., Liang, Y., Zhengjie, Y., Kangcheng, W., Guangpu, L., Zujian, W., y Lianhui, X. (2013). Identification and characterization of the interaction between viroplasm-associated proteins from two different plant-infecting reoviruses and eEF-1A of rice. *Arch Virol* 158, 2031-2039.

Soo, H.M., Handley, J.A., Maugeri, M.M., Burns, P., Smith, G.R., Dale, J.L., y Harding, R.M. (1998). Molecular characterization of Fiji disease fijivirus genome segment 9. *J Gen Virol* 79 (Pt 12), 3155-3161.

St-Pierre, B., y De Luca, V. (2000). EVOLUTION OF ACYLTRANSFERASE GENES: Origin and Diversification of the BAHD Superfamily of Acyltransferases Involved in Secondary Metabolism. In *Evolution of Metabolic Pathways*, I.R. Romeo JT, Varin L, De Luca V, ed. (Elsevier Science Ltd), pp. 285-315.

Stavolone, L., Villani, M.E., Leclerc, D., y Hohn, T. (2005). A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6219-6224.

Sun, L., Xie, L., Andika, I.B., Tan, Z., y Chen, J. (2013a). Non-structural protein P6 encoded by rice black-streaked dwarf virus is recruited to viral inclusion bodies by binding to the viroplasm matrix protein P9-1. *J Gen Virol* 94, 1908-1916.

Sun, Z., Zhang, S., Xie, L., Zhu, Q., Tan, Z., Bian, J., Sun, L., y Chen, J. (2013b). The secretory pathway and the actomyosin motility system are required for plasmodesmatal localization of the P7-1 of rice black-streaked dwarf virus. *Arch Virol* 158, 1055-1064.

Sung, P.Y., y Roy, P. (2014). Sequential packaging of RNA genomic segments during the assembly of Bluetongue virus. *Nucleic Acids Res* 42, 13824-13838.

Supyani, S., Hillman, B.I., y Suzuki, N. (2007). Baculovirus expression of the 11 mycoreovirus-1 genome segments and identification of the guanylyltransferase-encoding segment. *J Gen Virol* 88, 342-350.

Szymanski, E.P., y Kerscher, O. (2013). Budding yeast protein extraction and purification for the study of function, interactions, and post-translational modifications. *J Vis Exp*, e50921.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.

Taraporewala, Z., Chen, D., y Patton, J.T. (1999). Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *Journal of virology* 73, 9934-9943.

Taraporewala, Z.F., y Patton, J.T. (2001). Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *Journal of virology* 75, 4519-4527.

Taraporewala, Z.F., y Patton, J.T. (2004). Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus research* 101, 57-66.

Tordable, M.C., Tavecchio, N., Lorenzo, E., y Abdala, G. (1991). Histology and gibberelin levels in Healthy and diseased maize (*Zea mays* L.) roots affected by "Mal de Río Cuarto". *Turrialba Revista Interamericana de Ciencias Agrícolas* 41, 183-189.

Torres-Vega, M.A., Gonzalez, R.A., Duarte, M., Poncet, D., López, S., y Arias, C.F. (2000). The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol* 81, 821-830.

Truol, G., Usugi, T., Hirao, J., Arneodo, J., Giménez Pecci, M.P., y Laguna, G. (2001). Transmisión experimental del virus del Mal de Río Cuarto por *Delphacodes kuscheli*. *Fitopatología Brasileira* 26, 195-200.

Tuominen, L.K., Johnson, V.E., y Tsai, C.J. (2011). Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among *Populus* paralogues. *BMC Genomics* 12, 236.

Urcuqui-Inchima, S., Walter, J., Dugeon, G., German-Retana, S., Haenni, A.L., Candresse, T., Bernardi, F., y Le Gall, O. (1999). Potyvirus helper component-proteinase self-interaction in the yeast two-hybrid system and delineation of the interaction domain involved. *Virology* 258, 95-99.

Van Der Heijden, M.W., Carette, J.E., Reinhoud, P.J., Haegi, A., y Bol, J.F. (2001). Alfalfa mosaic virus replicase proteins P1 and P2 interact and colocalize at the vacuolar membrane. *Journal of virology* 75, 1879-1887.

Varallyay, E., Giczey, G., y Burgyan, J. (2012). Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. *Arch Virol* 157, 1345-1350.

Vascotto, F., Campagna, M., Visintin, M., Cattaneo, A., y Burrone, O.R. (2004). Effects of intrabodies specific for rotavirus NSP5 during the virus replicative cycle. *J Gen Virol* 85, 3285-3290.

Velazquez, P.D., Arneodo, J.D., Guzmán, F.A., Conci, L.R., y Truol, G.A. (2003). *Delphacodes haywardi* Muir, a New Natural Vector of Mal de Río Cuarto virus in Argentina. *J Phytopathol* 151, 669-672.

Velazquez, P.D., Guzmán, F.A., Conci, L.R., Remes Lenicov, A.M.d., y Truol, G.A. (2006). *Pyrophagus tigrinus* Remes Lenicov & Varela (Hemiptera: Delphacidae), nuevo vector del Mal de Río Cuarto virus (MRCV, Fijivirus) en condiciones experimentales AGRISCIENCIA 23, 9-14.

Vidano, C. (1970). Phases of maize rough dwarf virus multiplication in the vector *Laodelphax striatellus* (Fallen). *Virology* 41, 218-232.

Vigliocco, A., Bonamico, B., Alemano, S., Miersch, O., y Abdala, G. (2002). Stimulation of jasmonic acid production in *Zea Mays* L. infected by the maize rough dwarf virus - Río Cuarto. Reversion of symptoms by salicylic acid. *BIOCELL* 26, 369-374.

Wagmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K., y Citovsky, V. (2004). The Ins and Outs of Nondestructive Cell-to-Cell and Systemic Movement of Plant Viruses. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23, 195 - 250.

Walsh, D., y Mohr, I. (2011). Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol* 9, 860-875.

Wang, L., y Roossinck, M.J. (2006). Comparative analysis of expressed sequences reveals a conserved pattern of optimal codon usage in plants. *Plant Mol Biol* 61, 699-710.

Wang, Q., Tao, T., Han, Y., Chen, X., Fan, Z., Li, D., Yu, J., y Han, C. (2013). Nonstructural protein P7-2 encoded by Rice black-streaked dwarf virus interacts with SKP1, a core subunit of SCF ubiquitin ligase. *Virol J* 10, 325.

Wang, Q., Tao, T., Zhang, Y., Wu, W., Li, D., Yu, J., y Han, C. (2011). Rice black-streaked dwarf virus P6 self-interacts to form punctate, viroplasm-like structures in the cytoplasm and recruits viroplasm-associated protein P9-1. *Virol J* 8, 24.

Wang, Q.Y., J.; Zhou, G-H.; Zhang, H-M.; Chen J-P.; Adams, M. J. (2010). The Complete Genome Sequence of Two Isolates of Southern rice black-streaked dwarf virus, a New Member of the Genus Fijivirus. *J Phytopathol*.

Wang, Z.H., Fang, S.G., Xu, J.L., Sun, L.Y., Li, D.W., y Yu, J.L. (2003). Sequence analysis of the complete genome of rice black-streaked dwarf virus isolated from maize with rough dwarf disease. *Virus genes* 27, 163-168.

Webster, K.A., Muscat, G.E., y Kedes, L. (1988). Adenovirus E1A products suppress myogenic differentiation and inhibit transcription from muscle-specific promoters. *Nature* 332, 553-557.

Wei, T., Chen, H., Ichiki-Uehara, T., Hibino, H., y Omura, T. (2007). Entry of Rice dwarf virus into cultured cells of its insect vector involves clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology* 81, 7811-7815.

Wei, T., Hibino, H., y Omura, T. (2009a). Release of Rice dwarf virus from insect vector cells involves secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *Commun Integr Biol* 2, 324-326.

Wei, T., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Suzuki, N., Shimizu, T., Hagiwara, K., Chen, H., Takahashi, M., Ichiki-Uehara, T., y Omura, T. (2006a). The spread of Rice dwarf virus among cells of its insect vector exploits virus-induced tubular structures. *Journal of virology* 80, 8593.

Wei, T., Shimizu, T., Hagiwara, K., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Suzuki, N., Chen, H., y Omura, T. (2006b). Pns12 protein of Rice dwarf virus is essential for formation of viroplasms and nucleation of viral-assembly complexes. *J Gen Virol* 87, 429-438.

Wei, T., Shimizu, T., y Omura, T. (2008). Endomembranes and myosin mediate assembly into tubules of Pns10 of Rice dwarf virus and intercellular spreading of the virus in cultured insect vector cells. *Virology* 372, 349-356.

Wei, T., Uehara-Ichiki, T., Miyazaki, N., Hibino, H., Iwasaki, K., y Omura, T. (2009b). Association of Rice gall dwarf virus with microtubules is necessary for viral release from cultured insect vector cells. *Journal of virology* 83, 10830-10835.

Weissman, J.D., Brown, J.A., Howcroft, T.K., Hwang, J., Chawla, A., Roche, P.A., Schiltz, L., Nakatani, Y., y Singer, D.S. (1998). HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11601-11606.

Winter, X., Huiying, D., Xie, L.-Y., Zu-Jian, y Lianhui, X. (2010). Yeast two-hybrid system and Rice black-streaked dwarf virus P6 protein interactions in rice. *Chinese Journal of Tropical Crops* 31.

Wright, P.E., y Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 293, 321-331.

Wu, J., Du, Z., Wang, C., Cai, L., Hu, M., Lin, Q., Wu, Z., Li, Y., y Xie, L. (2010a). Identification of Pns6, a putative movement protein of RRSV, as a silencing suppressor. *Virology Journal* 7, 335.

Wu, J., Li, J., Mao, X., Wang, W., Cheng, Z., Zhou, Y., Zhou, X., y Tao, X. (2013). Viroplasm protein P9-1 of Rice black-streaked dwarf virus preferentially binds to single-stranded RNA in its octamer form, and the central interior structure formed by this octamer constitutes the major RNA binding site. *Journal of virology* 87, 12885-12899.

Wu, Z., Wu, J., Adkins, S., Xie, L., y Li, W. (2010b). Rice ragged stunt virus segment S6-encoded nonstructural protein Pns6 complements cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus-based chimeric virus. *Virus research* 152, 176-179.

Xu, C., Yu, B., Cornish, A.J., Froehlich, J.E., y Benning, C. (2006). Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of Arabidopsis mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3- phosphate acyltransferase. *Plant J* 47, 296-309.

Xu, D., Mou, G., Wang, K., y Zhou, G. (2014). MicroRNAs responding to southern rice black-streaked dwarf virus infection and their target genes associated with symptom development in rice. *Virus research* 190, 60-68.

Xu, Y., Zhou, W., Zhou, Y., Wu, J., y Zhou, X. (2012). Transcriptome and comparative gene expression analysis of *Sogatella furcifera* (Horvath) in response to southern rice black-streaked dwarf virus. *PLoS One* 7, e36238.

Yamazaki, D., Motohashi, K., Kasama, T., Hara, Y., y Hisabori, T. (2004). Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45, 18-27.

- Yang, J., Zhang, H.M., Ying, L., Li, J., Lv, M.F., Xie, L., Li, P.P., Liu, X.Y., Liang-Ying, D., y Chen, J.P. (2014). Rice black-streaked dwarf virus genome segment S5 is a bicistronic mRNA in infected plants. *Arch Virol* 159, 307-314.
- Yu, H., Braun, P., Yildirim, M.A., Lemmens, I., Venkatesan, K., Sahalie, J., Hirozane-Kishikawa, T., Gebreab, F., Li, N., Simonis, N., y *col.* (2008). High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* 322, 104-110.
- Zhang, C., Liu, Y., Liu, L., Lou, Z., Zhang, H., Miao, H., Hu, X., Pang, Y., y Qiu, B. (2008a). Rice black streaked dwarf virus P9-1, an alpha-helical protein, self-interacts and forms viroplasms in vivo. *J Gen Virol* 89, 1770-1776.
- Zhang, H.M., Chen, J.P., y Adams, M.J. (2001a). Molecular characterisation of segments 1 to 6 of Rice black-streaked dwarf virus from China provides the complete genome. *Arch Virol* 146, 2331-2339.
- Zhang, H.M., Chen, J.P., Cheng, Y., Lei, J.L., y Xue, Q.Z. (2001b). Cloning and Sequencing of the Genome Segment S9 of Rice Black-streaked Dwarf Virus. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 33, 467-471.
- Zhang, H.M., Yang, J., Chen, J.P., y Adams, M.J. (2008b). A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus. *Arch Virol* 153, 1893-1898.
- Zhang, L., Wang, Z., Wang, X., Li, D., Han, C., Zhai, Y., y Yu, J. (2005). Two virus-encoded RNA silencing supressors, P14 of Beet necrotic yellow vein virus and S6 of Rice black streak dwarf virus. *Chinese Science Bulletin* 50, 305-310.
- Zhang, Y., Zhao, J., Xiang, Y., Bian, X., Zuo, Q., Shen, Q., Gai, J., y Xing, H. (2011). Proteomics study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *Phytophthora sojae*. *Proteome Sci* 9, 52.
- Zheng, Z., Xia, Q., Dauk, M., Shen, W., Selvaraj, G., y Zou, J. (2003). Arabidopsis AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. *Plant Cell* 15, 1872-1887.
- Zhou, G., Wen, J., Cai, D., Li, P., Xu, D., y Zhang, S. (2008). Southern rice black-streaked dwarf virus: A new proposed Fijivirus species in the family Reoviridae. *Chinese Science Bulletin* 53, 3677-3685.
- Zhu, S., Gao, F., Cao, X., Chen, M., Ye, G., Wei, C., y Li, Y. (2005). The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms. *Plant Physiol* 139, 1935-1945.