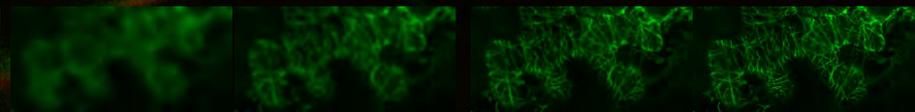
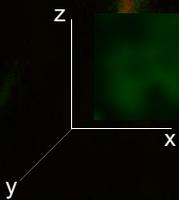
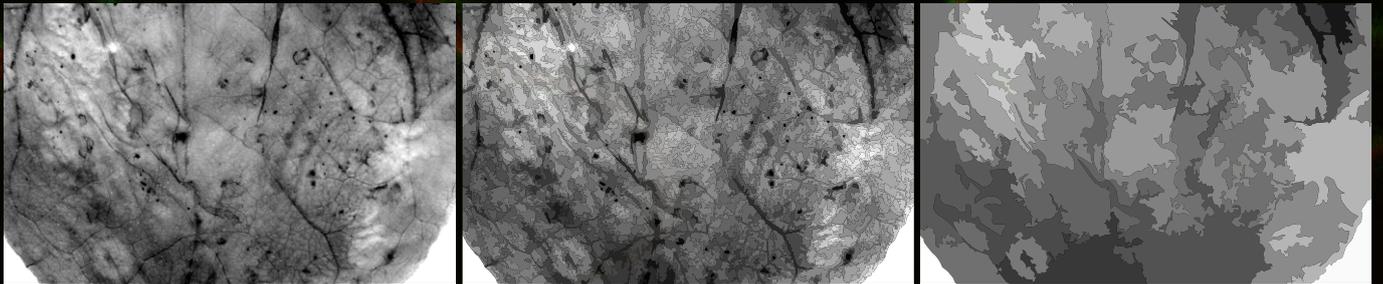




Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
CCT-La Plata CONICET-UNLP

Estudio de la función de las proteínas de *Citrus psorosis virus* y *Mirafiori lettuce big-vein virus*



Trabajo de Tesis Doctoral 2014

Lic. Gabriel Robles Luna

Director: Ma. Laura García

*El presente trabajo de Tesis para optar
por el grado de Doctor de la
Facultad de Ciencias Exactas ha sido
realizado en el Instituto de Biotecnología y
Biología Molecular (IBBM, UNLP-
CONICET- La Plata), del Departamento de
Ciencias Biológicas de la Facultad de
Ciencias Exactas de la Universidad
Nacional de La Plata, bajo la dirección de
la Dra. María Laura García.*

Mi reconocimiento,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme realizar el doctorado en el ámbito de la institución.

-A la Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas otorgadas que me permitieron realizar el doctorado.

-Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, por brindarme el espacio y recursos que me permitió finalizar mi doctorado.

-A la European Molecular Biology Organization, por la beca otorgada que contribuyó a mi aprendizaje

Mi agradecimiento,

-A mi Familia, mis viejos Tina y Alberto, a Esteban y a Sole. Porque siempre estuvieron ahí cuando necesito hacer catarsis sin entender mucho de que se trataba, por los asados domingueros y los partidos de tenis. A mi flia. Platense, siempre puedo contar con ellos.

-A la Familia de Flor por todo el aguante, gracias por todo.

-A Laura por permitirme realizar mi tesis en el instituto, por darme libertad para embarcarme en proyectos o ideas, incentivar a seguir a pesar de todo. Gracias por las correcciones de redacción.

-A Manfred Heinlein, por contribuir con mi aprendizaje y permitirme visitar el IBMP. A Annette Niehl, Dalya Gereige y Khalid Amari por ayudarme en el laboratorio, conseguir departamento, internet y facilitarme material para poder trabajar.

-A Richard Kormelink por las discusiones y consejos sobre las supresoras de los opios.

-A mis compañeras, Agus, Belu Eli y Lu por aguantarme en mis locuras.

-A Daniel Grasso la colaboración constante con el grupo VV.

-A todos mis compañeros del IBBM, en especial: A Carito, Mati, Santi y todos los VA por su compañerismo y buena voluntad, para cuando faltan reactivos, programas o se necesita ayuda. A Nacho, Eli, Flor, Chandrú y los R3 en general por la buena predisposición y el buen compañerismo.

-A Silvana, Fabricio, Vanesa, Flavio, Eugenia, Mauri y todos los R4, Al Dr. Guíamet, por los seminarios de Vegetales, por los intercambios de opiniones y experiencias. A Sebastián Azurmendi y a Gabi, por siempre colaborar con nuestro grupo y por la invitación a la charla.

-A Chandrú por forzarme a que practique mi “inglés”.

-A todos los investigadores del IBBM que no se durmieron durante los seminarios y contribuyeron a la discusión y a la formación de los becarios, en especial al Negro, Flor del Papa, Daniela Hozbor, Mario, Tony y Aníbal.

-A Aníbal, Flavio y Nacho por ofrecerse a leer la tesis y ayudarme en tiempos difíciles.

-A todos los CPAs, a Paula y Silvana por ayudar con su trabajo diario a que tengamos todo lo necesario para poder trabajar. A los Ingenieros inseparables, Berna y Abelardo, por salvarnos n veces con los cortes de luz, arreglando e inventando equipamiento para que el trabajo sea más ameno. A Claudio por poner 200 plantas para que todo salga bien. A Gigi por todas la veces que me ayudó con los papeles de CONICET que sigo sin querer entender.

-A Diana Lauff por el aguante, la buena predisposición y por hacer que el uso del confocal sea más eficiente.

-Al Negro Bolla porque siempre me salva a Roberto por la buena predisposición.

-A Pato y Cutu, por los consejos y por la buena onda.

-A Edu, mi co-director extraoficial, y Marina que me ayudaron a instalarme en Estrasburgo, a llevar adelante la tesis, desinteresadamente, de buena gente que son.

-No hubiese podido terminar esta tesis si no fuera por Flor, gracias por estar siempre, por bancarme en las buenas y en las malas. Te amo Pi!!!!

Muchas Gracias

Índice	Pág.
Abreviaturas	XI
Acrónimos virales	XII
Capítulo I: Introducción general	1
Introducción	3
I.1. Virus vegetales	3
I.1.1. Historia de la virología vegetal	3
I.1.2. Nomenclatura y clasificación de los virus vegetales	5
I.2. Virus de la psorosis de los cítricos	6
I.2.1 El cultivo de los cítricos	6
I.2.2 La enfermedad psorosis de los cítricos	7
I.2.3 Sintomatología	8
I.2.4 Transmisión	9
I.2.5. El agente causal: <i>Citrus psorosis virus</i>	10
I.2.6 Ubicación taxonómica de CPsV – Familia <i>Ophioviridae</i>	12
I.3. Virus del ensanchamiento de las nervaduras o “ <i>Big-vein</i> ” de lechuga	13
I.3.1 Producción de lechuga	13
I.3.2 La enfermedad del “ <i>Big-vein</i> ”	14
I.3.3 Sintomatología	14
I.3.4 Transmisión	15
I.3.5 El agente causal: <i>Mirafiori lettuce big-vein virus</i>	15
I.4. Funciones de las proteínas de los ophiovirus	18
I.4.1 Replicasa viral	18
I.4.2 Proteína de cubierta viral	22
I.4.3 Proteína supresora del silenciamiento	22
I.4.4 Proteína de movimiento	23
Hipótesis	25
Objetivos	27
Capítulo II: Materiales y Métodos	29
Materiales	31
II.1. Reactivos químicos	31
II.2. Cepas bacterianas	31
<i>Escherichia coli</i>	31
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
II.3. Aislamientos de ophiovirus	31

II.4. Vectores de clonado	31
II.5. Plásmidos binarios	32
II.6. Primers utilizados	32
II.7. Sueros utilizados	33
II.8. Plantas hospedantes	33
Métodos	35
II.9. Extracciones de RNA de tejido vegetal	35
II.10. Northern blot	35
II.10.1. Detección de mRNA	35
II.10.2. Detección de siRNA	35
II.11. Reacción de transcripción reversa (RT)	36
II.11.1 Reacción de RT para el clonado de los ORF de MiLBVV	36
II.11.1 Reacción de RT para RT-PCR semicuantitativa	36
II.12. Reacción de PCR	37
II.13. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	37
II.14. Clonado en vectores	37
II.15. Preparación y transformación de bacterias competentes	38
<i>-Bacterias competentes para el método químico</i>	38
<i>-Bacterias competentes para electroporación</i>	38
<i>-Transformación mediante electroporación</i>	38
<i>-Transformación mediante shock térmico</i>	39
II.16. Minipreparación de DNA plasmídico	39
II.17. Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> , <i>C. sinensis</i> y <i>L. sativa</i>	40
II.18. Condiciones de crecimiento de plantas	40
II.19. Microscopía de fluorescencia	40
II.20. <i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i> (FLIM)	41
II.21. <i>Fluorescence recovery after photobleaching</i> (FRAP)	41
II.22. “ <i>Gating</i> ” de GFP	41
II.23. Midi preparación de DNA plasmídico	42
II.24. Bombardeo génico	42
II.25. Reacción histoquímica para GUS	42
II.26. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)	43
II.27. Extracción de proteínas totales para Western blot	43
II.28. <i>Western blot</i>	43
II.29. Co-inmunoprecipitación: RFP-Trap	44
II.30. Análisis de la secuencia de las proteínas de CPsV y MiLBVV	45
Capítulo III: Localización subcelular de las proteínas de cubierta de CPsV y MiLBVV	47

Introducción	49
III.1. La Proteína de Cubierta viral	49
III.1.1. CP en el movimiento viral	49
III.1.2. CP en la interacción con el vector	50
III.1.3. Interacción de la CP con componentes de la célula hospedante	50
III.1.4. Replicación y traducción viral	51
III.2. La CP de ophiovirus MiLBVV, CPsV y RWMV	51
Objetivos	53
Resultados	55
III.1. Vectores binarios para la expresión ectópica de las CPs fusionadas a proteínas reporteras	55
III.2. Análisis bioinformático de las proteínas CP ^{CPsV} y CP ^{MiLBVV}	56
III.3. Las proteínas CP ^{CPsV} y CP ^{MiLBVV} se localizan en el citoplasma	56
III.3.1. En células epiteliales de hojas de <i>N. benthamiana</i>	57
III.3.2. En hojas de los hospedantes naturales <i>C. sinensis</i> y <i>L. sativa</i>	59
III.4. Interacción homóloga y heteróloga entre las CPs	61
III.4.1. Interacción homóloga de la CP ^{MiLBVV}	61
III.4.2. Interacción homóloga de la CP ^{CPsV}	63
III.4.3. Interacción heteróloga de las proteínas CP ^{MiLBVV} y CP ^{CPsV}	64
III.5. Dominios involucrados en la interacción CP-CP	66
Conclusiones	69
Discusión	71
Perspectivas	75
Capítulo IV: Estudio de la supresión del PTGS de las proteínas de CPsV y MiLBVV	77
Introducción	79
IV.1. Silenciamiento de RNA	79
IV.2. Silenciamiento como mecanismo de defensa antiviral	80
IV.3. Supresión del silenciamiento génico	82
IV.4. Identificación de VRS	82
IV.4.1. VSRs que impiden la generación de siRNAs	83
IV.4.2. VSRs que unen siRNAs	84
IV.4.3. VSRs que inhiben la diseminación de la señal sistémica	85
IV.5. VRS de virus a RNA de polaridad negativa	86
IV.6. VRS de los ophiovirus	86
Objetivos	89
Resultados	91
IV.1. Vectores binarios para la expresión ectópica de las proteínas de CPsV y MiLBVV fusionadas a	91

proteínas reporteras	
IV.2 Supresión local	91
IV.3 Supresión sistémica	95
IV.4 Localización subcelular de 24K ^{CPsV} , 54K ^{CPsV} , 25K ^{MiLBVV} y 55K ^{MiLBVV} asociada a la actividad supresora	98
IV.4.1 Las proteínas 24K ^{CPsV} y 25K ^{MiLBVV} se localizan en núcleo y citoplasma	98
IV.4.2 Las proteínas 54K ^{CPsV} y 55K ^{MiLBVV} se localizan en núcleo, citoplasma y P-bodies	103
Conclusión	107
Discusión	109
Perspectivas	113
Capítulo V: Los ophiovirus CPsV y MiLBVV codifican para una proteína de movimiento en el RNA 2	115
Introducción	117
V.1. Identificación de proteínas de movimiento	119
V.1.1 Localización en PD	119
V.1.2 Modificación del SEL	119
V.1.3. Capacidad NCAP	120
V.1.4. <i>Trans</i> -complementación de virus defectivos en el movimiento	120
V.2. MPs de los ophiovirus	121
Objetivos	123
Resultados	125
V.1. Análisis de la expresión de las fusiones de las proteínas 54K ^{CPsV} y 55K ^{MiLBVV}	125
V.2. Análisis bioinformático de las proteínas codificadas en el RNA 2 de CPsV y MiLBVV	127
V.3. Localización subcelular de las proteínas 54K ^{CPsV} y 55K ^{MiLBVV} asociadas con la actividad de movimiento viral	127
V.3.1 Localización en cloroplastos	128
V.3.2 Localización en microtúbulos	129
V.3.3 Localización en plasmodesmos	132
V.4. Análisis de la capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para transportar proteínas y RNA a la célula vecina en <i>N. benthamiana</i>	134
V.4.1. Capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para transportar proteínas a la célula vecina	134
V.4.2. Capacidad NCAP de las proteínas de CPsV y MiLBVV	136
V.4.3. Capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para transportar RNA a la célula vecina	137
V.5. Capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para <i>trans</i> -complementar el movimiento célula-a-célula de PVX.GUS-BspI en <i>N. benthamiana</i>	138
Conclusión	141
Discusión	143

Perspectivas	147
Capítulo VI: Evidencias indirectas del mecanismo de movimiento de CPsV y MiLBVV	149
Introducción	151
VI.1 Mecanismos de movimiento viral	151
VI.2 Mecanismo de movimiento de los ophiovirus	153
Objetivos	155
Resultados	157
VI.1. Evidencias acerca del tipo de mecanismo que poseen los ophiovirus para el movimiento célula-a-célula	157
VI.1.1. La MP ^{CPsV} :eGFP forma túbulos en el PD	157
VI.1.2. La MP ^{MiLBVV} :eGFP no forma túbulos en el PD	158
VI.1.3. Interacciones homólogas de MP ^{CPsV} y MP ^{MiLBVV} en el PD	158
VI.1.4. Interacciones de MP ^{CPsV} y MP ^{MiLBVV} con PDLPI en PD	160
VI.2. Participación de CPs, 24K ^{CPsV} y 25K ^{MiLBVV} en el movimiento de CPsV y MiLBVV	162
VI.2.1. Rol de la CP en el movimiento viral	162
<i>-Las CPs de CPsV y MiLBVV interactúan con sus respectivas MPs en el citoplasma de N. benthamiana</i>	162
<i>-Las CPs de CPsV y MiLBVV no son reclutadas por sus respectivas MPs al PD</i>	165
<i>-Las CPs de CPsV y MiLBVV no son transportadas célula-a-célula por sus respectivas MPs</i>	166
VI.2.2. Rol de las proteínas 24K ^{CPsV} y 25K ^{MiLBVV} en el movimiento viral de los ophiovirus	167
<i>-La proteína 24K^{CPsV} no es reclutada por la MP^{CPsV} a otros compartimentos celulares</i>	169
<i>-La proteína 25K^{MiLBVV} no es reclutada por MP^{MiLBVV} a otros compartimentos celulares</i>	170
<i>- Los agregados citoplasmáticos de eGFP:25K^{MiLBVV} se mueven en el citoplasma hasta anclarse en el PD cuando está presente la MP^{MiLBVV}</i>	173
<i>Las proteínas eGFP:25K^{MiLBVV} y 24K^{CPsV}:eGFP se mueven a la célula adyacente en presencia de sus respectivas MP^{MiLBVV}</i>	175
Conclusiones	177
Discusión	179
Perspectivas	183
Capítulo VII Conclusiones y discusión	185
Funciones de las proteínas de CPsV y MiLBVV	187
Discusión general	188
Anexo	190
Leyenda de videos	190

Bibliografía

193

Publicaciones científicas

206

Barcala Tabarrozi, A. E., Peña, E. J., Dal Bo, E., Robles Luna, G., Reyes, C. A. & Garcia, M. L. (2010). Identification of Mirafiori lettuce big-vein virus and Lettuce big-vein associated virus infecting *Lactuca sativa* with symptoms of lettuce big-vein disease in Argentina. *Plant Pathology* **59**, 1160-1161.

Peña, E. J., Robles Luna, G., Zaneck, M. C., Borniego, M. B., Reyes, C. A., Heinlein, M. & Garcia, M. L. (2012). Citrus psorosis and Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus coat proteins localize to the cytoplasm and self interact in vivo. *Virus research* **170**, 34-43.

Robles Luna, G., Peña, E. J., Borniego, M. B., Heinlein, M. & Garcia, M. L. (2013). Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology* **441**, 152-161.

Abreviaturas

AGO: Argonauta
 CP: Proteína de cubierta, del inglés *Coat protein*
 CLSM: *Confocal laser scanning microscopy*
 CP^{CPsV}: Proteína de cubierta de CPsV
 CP^{MiLBVV}: Proteína de cubierta de
 CW : *cell wall*
 DCL: *Dicer like*
 Dpai: Días post agronifiltración
 dsDNA: *double-strand DNA*
 dsRNA: *double-strand RNA*
 DT: desmotúbulo
 FLIM: *Fluorescence-lifetime imaging microscopy*
 FRET: *Fluorescence resonance energy transfer*
 GFP: *Green fluorescent protein*
 HR: *hypersensitive response*
 IL: Índice de localización
 kDa: *kilo Dalton*
 miRNA: *micro RNAs*
 MP: *Movement protein*
 MT: microtúbulos
 NCAPs: *Non cell autonomous protein*
 NEA: Noreste Argentino
 NLS: *Nuclear localization signal*
 NoLS: *Nucleolar localization signal*
 NOA: Noroeste Argentino
 NSm: *Non Structural medium*
 ORF: *open reading frame*
 P-bodies: *Processing bodies*
 PD: *Plasmodesmata*
 PDLPI: *plasmodesmata located protein*
 PDCBI: *Plasmodesmata callose binding proteins*
 Ps A: Psorosis A
 Ps B: Psorosis B
 PTGS: *post transcriptional gene silencing*
 R: Producto del gen *r* (resistencia)
 RdRp: *RNA dependent RNA polimerase*
 RISC: *RNA induced silencing complex*

RNAi: *RNA interference*
 RNP: *ribonucleoproteína*
 SAR: *Systemic aquired resistance*)
 SEL: *size exclusion limit*
 siRNA: *small interference RNA*
 ssRNA: *single strand RNA*
 τ: tiempo de vida medio en el estado exitado
 TGB: *Triple gene box*
 VIGS: *Virus induced gene silencing*
 vRNPs: *viral ribonucleoproteins*
 VRCs: *Viral replication complexes*
 VSRs: *Viral suppressor of RNA silencing protein*
 WT: *wild-type*

Acrónimos virales

ACMV *African cassava mosaic virus*
AMV *Alfalfa Mosaic Virus*
BCMNV *Bean common mosaic necrosis virus*
BMV *Brome Mosaic Virus*
BWYV *Beet western yellows virus*
BYV *Beet yellow virus*
CMV *Cucumber mosaic virus*
CPMV: *Cowpea mosaic virus*
CPsV: *Citrus psorosis virus*
CTV *Citrus tristeza virus*
FHV *Flock house virus*
FreSV: *Fressia sneak virus*
GRV *Groundnut rosette virus*
LBVaV (*Lettuce big-vein associated virus*)
LMV *Lettuce mosaic virus*
LRNV: *Lettuce ring necrosis virus*
MiLBVV: *Mirafiori lettuce big-vein virus*
PLRV *Potato Leaf Roll Virus*
PVX: *Potato virus X*
PVY : *Potato virus Y*
RCNMV *Red Clover Necrotic Mosaic Virus*
RHBV *Rice hoja blanca virus*
RWMV *Ranunculus white mottle virus*
SYNV *Sonchus yellow net virus*
TBSV *Tomato bushy stunt virus*
TCV *Turnip crinkle virus*
TEV *Tobacco etch virus*
TLCV: *Tobacco Leaf Curl Virus*
TMV *Tobacco Mosaic Virus*
TMMMV: *Tulip mild mottle mosaic virus*
ToMV *Tomato mosaic virus*
TSWV *Tomato spotted wilt virus*

Capítulo I

Introducción general

Introducción

I.1. Virus vegetales

I.1.1. Historia de la virología vegetal

La palabra “virus” es de origen latín, significa “jugo nocivo para la salud”, es decir, veneno. El químico y bacteriólogo francés Luis Pasteur (1822-1895), usando filtros de porcelana, había descubierto que las infecciones sólo podían pasarse de un tejido a otro por medio de microorganismos. En 1892, el científico ruso Dimitri Ivanovski (1864-1929) publicó un reporte sobre el mosaico del tabaco, donde explicó que el extracto infectivo de una planta de tabaco podía pasar por un filtro de porcelana. Con esto concluyó que había organismos infectivos más pequeños que las bacterias, invisibles al microscopio óptico, que podían infectar plantas sanas de tabaco. Estos pequeñísimos agentes infectivos fueron llamados virus. La investigación sobre las enfermedades de plantas, que ahora sabemos las causan los virus, no empezó hasta 1890. Sin embargo, hay registros previos de descripciones e imágenes de estas enfermedades. Un poema del año 752 DC (Empress Koken) describe el “amarillamiento de las hojas en pleno verano, como si helara continuamente”, refiriéndose a una planta identificada como *Eupatorium lindleyanum*, la cual ha sido encontrada susceptible a *Tobacco Leaf Curl Virus* (TLCV, del género *Begomovirus*), el cual causa la enfermedad de amarillamiento. Entre 1600 y 1660, en Europa, muchos artistas pintaron tulipanes con síntomas, provocados por enfermedades virales hoy ya reconocidas, haciendo que el patrón de rayas, síntoma de infección, sea considerado característica de las variedades más preciadas. En 1714, para demostrar que la savia fluye por debajo y por encima del injerto, esto es, la circulación de la savia a través de la planta, Lawrence describe la primera transmisión de una enfermedad viral, por medio de injertos entre jazmines. Entre 1900 y 1930, muchas enfermedades virales fueron descritas, pero había una gran confusión por no poseer metodologías para distinguir un virus de otro. Un importante paso fue descubrir que los virus podían ser transmitidos de planta a planta por medio de insectos. En 1931 se plantea el uso plantas indicadoras, es decir, plantas que muestran sintomatología frente a infecciones virales, y reaccionan de manera diferente a distintos virus (hospedantes diferenciales), ayudando a la caracterización de los virus. Por ejemplo, fue así como trabajando con enfermedades de papa, se pudo mostrar que muchas enfermedades de esta planta eran causadas por una combinación de dos virus, a los que se llamó virus de la papa “X” e “Y” (PVX, *Potato virus X* y PVY, *Potato virus Y*) (Smith, 1931).

En 1931, William Elford, utilizando membranas de colodión con orificios microscópicos, de tamaños inferiores a los poros de los filtros de porcelana, logró determinar que el tamaño del virus con el que trabajaba era de 100 nanómetros de diámetro. En 1933, Wendell Stanley, siguiendo estudios químicos que le indicaban que los virus podían ser de naturaleza proteica, y junto al desarrollo de la

ultracentrifugación, fue capaz de cristalizar *Tobacco mosaic virus* (TMV) puro. Una década donde el desarrollo de la microscopía electrónica y la difracción de rayos X, hicieron posible la visualización y caracterización de estos agentes. Hasta 1948 se prestó atención a la fracción proteica de los virus, el conocimiento de los ácidos nucleicos era muy rudimentario y no se sabía de la susceptibilidad del RNA a ser degradado por RNasas, hidrólisis ácida o alcalina. Markham y Smith (1949) aislaron TMV y se encontraron con 2 clases de partículas, unas nucleoproteínas infectivas con aproximadamente un 35 % de RNA y otras aparentemente idénticas que no contenían RNA y que no eran infectivas. Esto claramente indicaba que el RNA era importante para la actividad biológica del virus, y finalmente, se vio que el RNA desnudo era suficiente para transmitir la enfermedad.

Myron Brakke, en 1951, conociendo factores químicos que afectan la estabilidad de las partículas virales, desarrolla la centrifugación en gradiente como método de purificación de virus y durante los años '60, la microscopía electrónica fue dominante gracias a la incorporación de técnicas para preparar secciones delgadas que permitieron visualizar los virus directamente dentro de la célula hospedante. En la década siguiente se mejoraron las técnicas de cristalografía y junto a un creciente conocimiento de las secuencias aminoacídicas se determinó la estructura tridimensional de muchas cubiertas virales. En 1977, Takebe y colaboradores desarrollaron un sistema de protoplastos que les permitió la sincronización de la infección, y así estudiar la replicación viral. Durante los años '80, avanzaron los métodos de detección basados en serología, con el aporte de los anticuerpos monoclonales y la hibridación de ácidos nucleicos, permitiendo también determinar relaciones entre los diferentes virus y especies virales.

Posteriormente, la secuenciación de genomas completos permitió entender muchos aspectos de la virología como, (1), el número, tamaño y localización de los genes en el genoma (2), conocer la secuencia aminoacídica de proteínas conocidas o productos génicos, (3), predecir funciones de proteínas (4) determinar los mecanismos de transcripción, (5) determinar secuencias de regulación de la expresión y replicación de los genomas, (6) conocer elementos asociados con algunos virus (RNAs satélites), (7) bases moleculares de la variabilidad y adaptación evolutivas, y (8) el comienzo de una taxonomía basada en relaciones evolutivas.

Más tarde, la capacidad de generar transcritos *in vitro* que resultaran tan infectivos como los agentes virales, partiendo de secuencias de cDNA clonadas (Ahlgquist *et al.*, 1984), permitió la manipulación genética de los virus, aplicada fundamentalmente a determinar funciones génicas. A finales de la década del '80 y comienzo de la década del '90 fue un período donde se aplicaron gran variedad de técnicas de biología molecular, como la genética reversa para dilucidar funciones, sistemas en levaduras para estudiar interacciones entre proteínas, transformación genética de plantas para

expresar genes virales, marcado de genomas virales para estudiar interacciones con la célula hospedante.

Toda esta información y datos fueron aportando al conocimiento de los virus de plantas permitiendo establecer un sistema internacional de clasificación taxonómica y nomenclatura de virus de plantas, insertándolo en la virología general.

I.1.2. Nomenclatura y clasificación de los virus vegetales

En todos los estudios de objetos naturales, el hombre presenta el deseo innato de asignar nombres y clasificarlos. Los virólogos, obviamente no son una excepción. El procesamiento de la información entre la biología y la lógica humana sigue diferentes caminos, y es la taxonomía la encargada de reconciliarlos. La clasificación viral, como muchas otras clasificaciones, organiza objetos por poseer características similares. Trabajos iniciales, usaban el hospedante en el cual el virus fue encontrado por primera vez, los síntomas que éste causaba para asignar nombres, modos de transmisión, hospedantes naturales o diferenciales, longevidad *in vitro*, punto de temperatura letal y síntomas específicos o diferenciales (Hull, 2001).

Entre 1940 y 1966, se propusieron varios sistemas de clasificación, para el total de los virus, separando a aquellos virus que infectaban plantas. Ninguno fue aceptado fuertemente y comenzó a verse la necesidad de un único y universal sistema de nomenclatura y clasificación de virus, que podía desarrollarse únicamente con la colaboración y el acuerdo de la mayoría de los virólogos de todo el mundo. En 1966, en el Congreso Internacional de Microbiología llevado a cabo en Moscú, se mantuvo la primera reunión del Comité Internacional para la Nomenclatura de Virus, con 43 personas representando Sociedades de Microbiología de diversas partes del mundo. Se crea una organización dedicada al desarrollo de una nomenclatura y taxonomía virales acordada internacionalmente, actualmente conocida como Comité Internacional para la taxonomía de Virus (ICTV, *International Committee for Taxonomy of Viruses*). Su reporte más reciente, el “IX th Report of the International Committee on Taxonomy of Virus”, de 2009, es el actual referente estándar de la taxonomía viral. Los niveles taxonómicos aceptados por la ICTV son orden, familia, género y especie, siendo esta última la base del sistema de clasificación. Según los criterios de la ICTV, actualmente hay 7 órdenes, y entre los virus que infectan plantas, 49 familias reconocidas y 73 géneros, de los cuales 22 no han sido asignados a ninguna familia y se los denomina “géneros flotantes” (Fauquet & Fargette, 2005).

El conocimiento acerca de las diferentes familias y géneros de los virus de plantas ha ido aumentando a lo largo del tiempo. En los virus con genoma ssRNA positivo (la gran mayoría de los virus que

infectan plantas) se ha avanzado notablemente en el conocimiento, mientras que mucho menos el que se ha obtenido en el caso de los virus con genoma a RNA de polaridad negativa. La razón principal es que la naturaleza negativa del genoma dificulta el estudio mediante genética reversa. Los virus que se estudian en esta tesis pertenecen a este grupo, y por lo tanto nos encontramos con esa limitación a la hora de abordar las investigaciones y diseñar estrategias de estudio. En los siguientes apartados se describirá la importancia de los cultivos y las enfermedades virales que los afectan, y que han sido relevantes en nuestro país. Además se presentarán los conocimientos con que contamos acerca de la estructura, genoma y función de los genes virales que las generan.

I.2. Virus de la psorosis de los cítricos

I.2.1 El cultivo de los cítricos

La familia de las Rutáceas de más de 1.600 especies comprende al género botánico *Citrus*, el más importante de la familia, y consta de unas 20 especies con frutos comestibles todos ellos muy abundantes en vitamina C, flavonoides y aceites esenciales. El naranjo dulce, y como todos los cítricos, procede del sudeste de China. Su cultivo se realiza en el Sur de China desde hace miles de años, desde donde se extendió por todo el mundo, desde China hacia Europa, Brasil y finalmente a California donde se convirtió años más tarde en la “reina de las naranjas”, variedad que hoy se conoce como Washington Navel. Posteriormente se cultiva en Florida, Sudamérica, Sudáfrica y ciertas partes de Australia.

La producción de fruta cítrica fresca en Argentina se estimó que sería, para el año 2013, de 2.283.000 Tn. Ocupa el primer lugar en la producción de frutas en el país, seguida de pepita, carozo, uvas de mesa y arándanos. El país produce el 3,29% del total mundial y exporta el 5,11% del total mundial de fruta cítrica. La superficie plantada con cítricos en el año 2012 fue de 129.986 ha, incluyendo naranjas, mandarinas, pomelo, limón y otros, con un empleo directo de 100.000 trabajadores como mano de obra; 5.300 productores; 440 empaques para fruta cítrica, de los cuales 112 son para exportación, y 20 plantas industriales de procesamiento. Los destinos de la producción de citrus de la Argentina (en toneladas métricas) para el año 2012 fueron: procesado en la industria (jugos, aceites, pellets, etc) 1.464.450; consumo interno como fruta fresca 796.646; y exportado como fruta fresca 454.294; lo que hace un total de 2.895.761 Tn. En dicho año como fruta fresca total se exportaron cítricos por un valor FOB (del Inglés, *free on board*) de 315.583.000 de dólares US. En tanto que el valor de la producción cítrica de Argentina se estimó en 1.067.000.000 de dólares (381 millones

del mercado doméstico y 686 millones de la exportación de fruta, jugo y subproductos) (FEDERCITRUS, 2013).

La actividad cítrica Argentina se desarrolla principalmente en regiones bien definidas, la región noroeste argentino (NOA) que comprende Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca, productores principalmente de limones, y en menor medida naranjas y pomelo, con el 62 % de la producción total nacional. La región mesopotámica, del noreste argentino (NEA), que incluye las provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos, produce el 34 % del total de la producción total, principal zona productora de naranjas y mandarinas; y el Nordeste de Buenos Aires y el resto del país, Formosa, Santa Fe y Chaco, que en conjunto producen el 4 % restante.

I.2.2 La enfermedad psorosis de los cítricos

La psorosis es una de las enfermedades virales más antiguas descritas en los cítricos. En 1896, en Florida (USA), se describe y nombra la enfermedad (Swingle & Webber, 1896), y recién en 1932 se la asocia probablemente a una enfermedad viral, ya que se logró su transmisión por medio de injertos desde una planta enferma a una planta sana (Fawcett, 1932). En 1938 se describen dos tipos de Psorosis, denominadas Psorosis A (Ps A) y Psorosis B (Ps B). La primera produce una descamación lenta del tronco y ramas principales, y la segunda, se manifiesta más agresiva, una rápida descamación y reacciones de shock necróticos y pústulas en ramas jóvenes, manchas cloróticas persistentes en hojas adultas, y anillos incoloros en frutos (Fawcett & Klotz, 1938).

En 1945, Wallace descubre que al injertar yemas de plantas infectadas sobre naranjo sano, al cabo de 6-10 semanas se observaban síntomas en hojas nuevas, jóvenes, dándole la posibilidad de diagnosticar la enfermedad. El diagnóstico diferencial entre Ps A y B se determinaba por las reacciones de shock necróticas generadas por Ps B dentro de las 5 semanas de inoculadas, manifestando además gomosis y pústulas en hojas y ramas jóvenes (Wallace, 1945).

En 1968, se describe por primera vez la enfermedad *Ringspot* de los cítricos, la cual además de dar síntomas en la corteza y en las hojas muy similares a los de Ps A y B (Wallace & Drake, 1968) presentaba anillos cloróticos muy marcados en hojas jóvenes. Aún así, y durante mucho tiempo la Ps A, la Ps B y *citrus ringspot*, se consideraban enfermedades similares, pero además, se agruparon junto a otras enfermedades como *concave gum*, *blind pocket*, *infectious variegation*, *crinkly leaf*, *impietratura* y *cristacortis*, debido a que presentaban síntomas comunes, y que en árboles a campo no era posible distinguir entre ellas. A medida que avanzaron las investigaciones y se fueron determinando los distintos agentes causales, las enfermedades fueron diferenciándose. Entre esas investigaciones, un test realizado en base a pruebas denominadas de protección cruzada fue determinante. Las plantas

que mostraban esas enfermedades no eran capaces de proteger contra Ps B, mientras que una planta infectada con Ps A protegía frente a la infección con Ps B. Mediante este test biológico, quedaron incluidas dentro de la enfermedad denominada psorosis la Ps A, Ps B y *citrus ringspot* (Timmer, 1974), y cuyos agentes, sospechados como virales, compartían características comunes como la transmisión a *Chenopodium quinoa* y otros hospedantes herbáceos locales (Garnsey & Timmer, 1988).

La Psorosis de los cítricos es una enfermedad lenta, que afecta a todas las variedades de cítricos y puede permanecer asintomática durante los primeros 10 a 15 años de vida de la planta. A esta edad, las plantas están en máxima producción. Durante estos años es que la enfermedad puede ser diseminada mediante multiplicación del material vegetal, si éste no está certificado, además de la diseminación por el vector que la transmite. Hoy se aplican programas de saneamiento basados en la utilización de yemas libres de virus y plantas de origen nucelar (Navarro *et al.*, 1980) a fin de obtener cítricos libres de la enfermedad. Estos programas han logrado controlar la Psorosis en la mayoría de los países donde se han aplicado. Sin embargo, en la región mesopotámica argentina y en San Pedro (Provincia de Buenos Aires), el programa de saneamiento implementado ha sido efectivo pero no lo



Figura I.1. Síntomas de psorosis en árboles a campo. Descamación de tronco (Izquierda). Aparición de flecos cloróticos y anillos en hojas jóvenes (Derecha). Tomada de (Peña, 2009).

suficiente para controlar la enfermedad, la cual aún causa pérdidas económicas (Danós, 1990; Larocca, 1985; Anderson 2000) (ver transmisión).

I.2.3 Sintomatología

La enfermedad se caracteriza por una descamación de troncos y ramas (Figura I.1), con producción de goma por debajo de estas lesiones corticales, lo que trae un decaimiento, pudiendo llegar a causar la muerte de ramas y plantas infectadas. En hojas jóvenes se observan flecos y anillos cloróticos (Figura I.1) y en los aislamientos más severos, se pueden ver pústulas y producción de goma en el envés de las hojas. Existe variación en la intensidad de los síntomas de psorosis según los aislamientos, los climas, la época del año y las variedades cultivadas, siendo naranjo dulce y pomelo donde se manifiesta la enfermedad con mayor claridad y pueden observarse los síntomas más característicos. La Figura I.2.B muestra hojas de *Chenopodium quinoa*, con lesiones locales en forma de anillos cloróticos que aparecen entre los 4 a 7 días post infección, y luego se tornan necróticos. *Gomphrena globosa*, otro hospedante muy utilizado, entre 10 a 15 días post infección da lesiones cloróticas y necróticas en la zona de inoculación (infección local) (Figura I.2.A), y a los 21 días post infección, el mismo tipo de lesiones en las hojas superiores (infección sistémica). Otras especies han sido descritas como hospedantes del agente causal de psorosis, siendo una de ellas *Nicotiana benthamiana* donde produce una infección asintomática, y sólo en las hojas inoculadas (Timmer *et al.*,

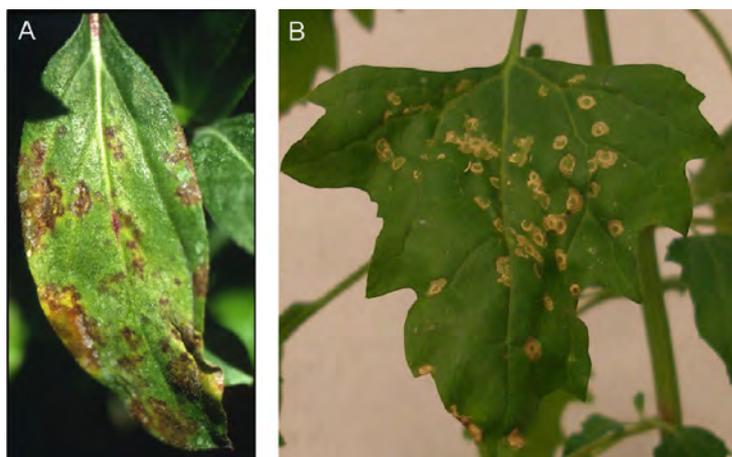


Figura I.2. Síntomas locales en hospedantes herbáceos: (A) *G. globosa* (B) *C. quinoa*. Tomada de Peña (2009).

1978, Reyes *et al.*, 2009).

I.2.4 Transmisión

No hay evidencia experimental que la enfermedad pueda ser transmitida por polinización de flores o a través de las semillas (Roistacher, 1993). Hay viejos estudios epidemiológicos realizados en Argentina y Texas (EE.UU.) sugiriendo que la enfermedad se disemina naturalmente (Pujol & Beñatena, 1965; Timmer L. W. & Garnsey, 1980; Beñatena & Portillo, 1984;), asociándole un vector

alado, aunque aún no se ha determinado cuál sería el vector asociado a esta dispersión natural. La existencia de un vector podría ser la causa de encontrar aún hoy plantas enfermas en regiones donde se aplica el programa de certificación de yemas implementado en todo el país (Zanek et al., 2006). En Texas, EEUU, recientemente fueron reportados datos preliminares de la presencia de psorosis (Palle et al., 2004) cuya dispersión se asocia a un hongo de suelo, *Olpidium brassicae*, pero estos datos no fueron confirmados. En Argentina no se han abordado investigaciones que apunten a este posible vector.

En el laboratorio se transmite entre cítricos por injerto de varetas infectadas, además esta enfermedad puede ser transmitida mecánicamente a hospedantes herbáceos como se mencionó anteriormente (Timmer et al., 1978).

I.2.5. El agente causal: *Citrus psorosis virus*

Si bien se tenían sospechas de la naturaleza viral del agente causal de psorosis, un experimento clave en su identificación fue el realizado por Timmer et al. (1978), quienes infectaron hojas de *Chenopodium quinoa*, con un extracto crudo de cítrico infectado con el aislamiento de CRsV 4 (de *citrus ringspot virus*, USA). A partir de una lesión local obtenida en esa infección, se realizó un nuevo extracto, que fue transmitido mecánicamente a una nueva hoja de *C. quinoa*. De una sola lesión del segundo pasaje se transmitió mecánicamente a hojas de *G. globosa*. De ésta última se obtuvo un extracto con el que se infectó el cítrico, también mecánicamente haciendo cortes e inoculando las hojas de naranjo con un abrasivo. Estas plantas luego manifestaron los síntomas de la enfermedad corroborando que el extracto llevaba el agente causal de psorosis. Si bien los postulados de Koch no han sido completados, éste experimento permitió asociar la enfermedad al virus que luego se observó en el microscopio electrónico, y que reprodujo los síntomas de la enfermedad. El virus se denominó *Citrus psorosis virus* (CPsV), y fue purificado de diferentes aislamientos de psorosis, corroborando así el trabajo hecho por Timmer y col. en 1978 (da Graça et al., 1991; Derrick et al., 1988; García et al., 1991; Navas-Castillo & Moreno, 1993).

A partir del aislamiento CPV 4 usado por Timmer y col., se obtuvo la secuencia completa del genoma y la mayoría de los estudios posteriores de éste virus (Sánchez de la Torre et al., 1998, Sánchez de la Torre et al., 2002; Naum-Onganía et al., 2003; Peña et al., 2012; Robles Luna et al., 2013). Luego se determinó la secuencia genómica completa del aislamiento español PI21 (Martín et al., 2006), y secuencias parciales de varios otros, dentro de ellos el aislamiento CPsV 90-1-1, de Concordia, Entre Ríos, Argentina.

La morfología del virus, inicialmente fue descrita como partículas con forma de espiroqueta (Derrick *et al.*, 1988), teñidas positivamente con acetato de uranilo, que correspondía lo que después se denominó conformaciones cerradas. Luego, mediante tinciones negativas se observó por primera vez la estructura abierta, tratándose de nucleocápsides circulares (García *et al.*, 1994). En extractos de plantas, éstas pueden colapsar *in vitro* para formar estructuras cerradas que pueden tomar conformaciones parcialmente ramificadas (formas de T, o pseudolineales) que llegan a 9 nm de

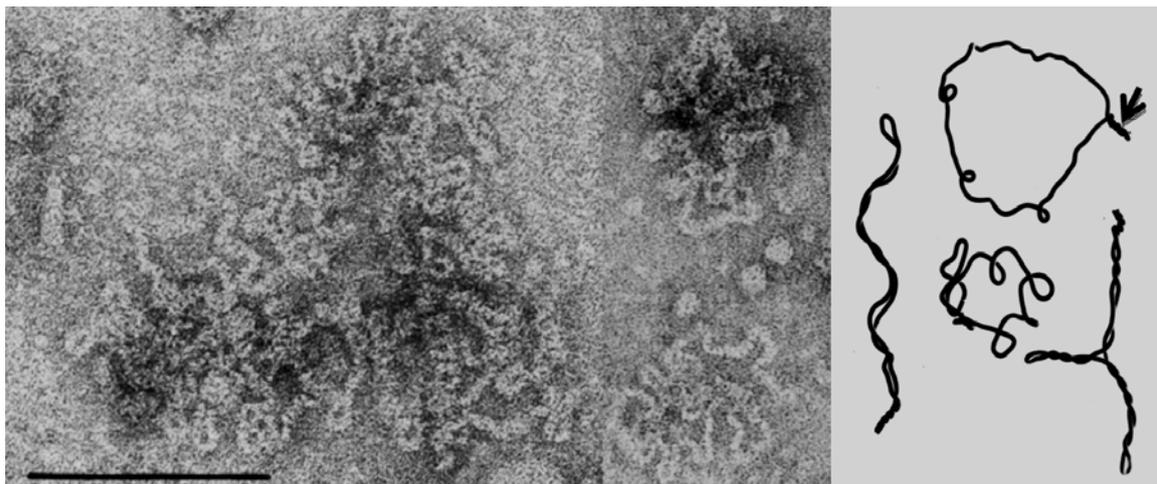


Figura I.3. Morfología de partículas de CPsV. En la micrografía electrónica de la izquierda se observan tres partículas virales filamentosas circulares, teñidas negativamente con acetato de uranilo al 1%. La barra representa 100 nm. A la derecha se muestran modelos de las partículas circulares y pseudolineales. La flecha indica la probable estructura de RNA donde el RNA genómico se circulariza. Tomada de (García *et al.*, 2012)

diámetro y alrededor de la mitad de la longitud del contorno circular (Figura I.3) (García *et al.*, 1994; Milne *et al.*, 2000). Las partículas virales son nucleocápsides desnudas, es decir, no poseen envoltura, y se observan de diferentes tamaños, indicando que el virus sería multipartito, como se había determinado previamente (Derrick *et al.*, 1988; García *et al.*, 1991; Navas Castillo *et al.*, 1993). Las partículas más pequeñas poseen una longitud estimada entre 690-760 nm, y las más largas poseen una longitud alrededor de 5 veces mayor, aprox. 2000 nm (García *et al.*, 1994). Las partículas son muy frágiles, y dependientes del pH, el cual que debe mantenerse alrededor de 8 para que sean infectivas (García *et al.*, 1991).

El virus es multipartito y su genoma segmentado en tres RNAs de cadena simple y de polaridad negativa (Figura I.4). El RNA 1 posee 8184 nt (Naum-Ongania *et al.*, 2003); en el extremo 5' presenta un ORF (del inglés *open reading frame*) que codifica para una proteína denominada 24K, cuya función está en estudio. La asignación genómica de la proteína 24K a CPsV ha sido demostrada en nuestro grupo de trabajo en plantas infectadas (Eliana Ocolotobiche, trabajo de tesis en curso). Separado de este gen *24k* por una región intergénica de 109 nt, se encuentra un segundo ORF que codifica para la proteína 280K, que contiene el módulo con los dominios característico de la polimerasas, por lo que “*in silico*” se corresponde a la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) viral (Naum-Ongania *et al.*, 2003). El RNA 2 posee 1644 nt, contiene un ORF que codifica para un polipéptido de 476 aminoácidos dando una proteína de aproximadamente 53,6 kDa, denominada proteína 54K (Sánchez de la Torre, *et al.*, 2002). El estudio de la función de esta proteína fue iniciado por Peña (Tesis doctoral, 2009) y es objeto de estudio en este trabajo de tesis (Capítulo V).

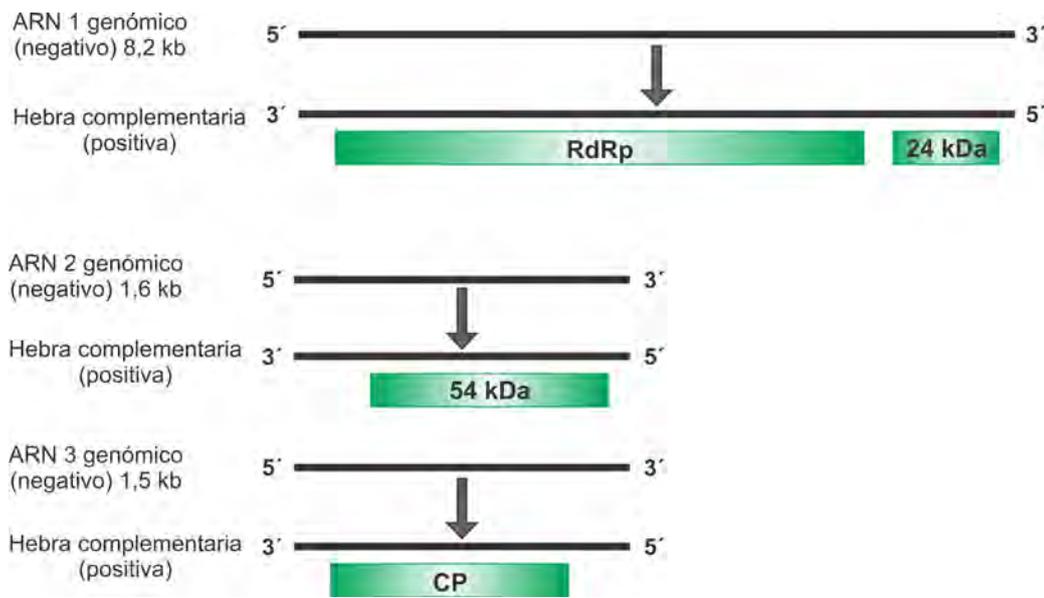


Figura I.4. Representación esquemática de la organización genómica de CPsV. Los rectángulos verdes indican los ORFs encontrados que codifican para las proteínas virales.

El RNA 3 de CPsV posee 1447 nt presenta sólo un ORF que codifica para la proteína de cubierta, o CP (del inglés *coat protein*) de 439 aminoácidos, con un peso molecular de 48,6 kDa, (Sánchez de la Torre *et al.*, 1998), que en adelante se nombrará como CP^{CPsV} y que también ha sido objeto de estudio de este trabajo de tesis (Capítulo III).

I.2.6 Ubicación taxonómica de CPsV – Familia *Ophioviridae*

Citrus psorosis virus, fue considerado el miembro tipo del género *Ophiovirus* por su morfología, su genoma tripartito, y su hospedante natural, cítricos, a diferencia del género *Tenuivirus* que infecta gramíneas (García *et al.*, 1994). Poco después, a este nuevo género se agregaron otros virus que presentaban morfología similar, siendo además distinguibles de otras nucleocápsides de virus negativos envueltos. Así se sumaron *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV) (Morikawa *et al.*, 1995), *Ranunculus white mottle virus* (RWMV) (Vaira *et al.*, 2003), de los que se cuenta con secuencias parciales de su genoma, y *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MiLBVV) (van der Wilk *et al.*, 2002) y *Lettuce ring necrosis virus* (LRNV) (Bos & Huijberts, 1996; Torok & Vetten, 2002) que han sido completamente secuenciados. Recientemente, se ha propuesto como una especie tentativa *Fressia sneak virus* (FreSV) (Vaira *et al.*, 2007; Vaira *et al.*, 2009). En el IX Report del International Committee of Taxonomy of Viruses, a este género se le ha asignado una nueva familia de virus, *Ophioviridae*, ubicada dentro de la clasificación “*Negative sense ssRNA viruses*”, pero fuera del Orden *Mononegavirales* (ICTV, 2009). Sin embargo, entre los ophiovirus se distinguen diferentes propiedades, entre ellas: infectan plantas no relacionadas, contienen diferente número y tamaño de segmentos en su genoma, las proteínas de cubierta poseen diferentes tamaños y las relaciones serológicas entre ellas no son muy cercanas, algunas de ellas distantes o nulas (ver Capítulo III). Dentro de esta familia, MiLBVV, agente causal de la enfermedad *Big-vein* de lechuga, ha sido también objeto de estudio de este trabajo de tesis, permitiendo la búsqueda de características comunes y diferentes entre los ophiovirus.

I.3. Virus del ensanchamiento de las nervaduras o “*Big-vein*” de lechuga

I.3.1 Producción de lechuga

La lechuga (*Lactuca sativa*) perteneciente a la familia *Asteraceae*, se cultivó inicialmente en el antiguo Egipto, para extraer aceite de sus semillas. Era considerada sagrada para el Dios Min, utilizándose en festivales y celebraciones. Los egipcios intercambiaron la lechuga con los Griegos y estos con los Romanos, los cuales le atribuyeron propiedades medicinales.

Hoy en día la producción de lechuga en todo el mundo alcanza las 23 millones de toneladas anuales, siendo China, Estados Unidos e India los mayores productores según datos de la FAO. En Argentina, y en especial en el cinturón hortícola platense se siembran alrededor de 700 ha bajo cubierta con una producción aproximada de 13000 toneladas anuales, constituyendo el 70 % de la producción de la provincia de Buenos Aires. Si bien antiguamente el mantenimiento de la calidad de la planta luego de la cosecha era corto, la aplicación de tecnología orientada a su conservación y la mejora en la logística para su distribución ha hecho posible que el tiempo de vida pos-cosecha se incremente

notablemente. Tanto factores abióticos o bióticos afectan la producción de esta planta, siendo uno de estos últimos el que se describe a continuación.

I.3.2 La enfermedad del “*Big-vein*”

La enfermedad conocida como “*Big-vein*” (BV) que afecta a lechuga constituye un problema importante distribuido ampliamente en todo el mundo. En 1934 fue la primera vez que se postuló que la enfermedad de BV podría estar causada por un virus transportado por el suelo (Jagger & Chandler, 1934). Sin embargo, la comprensión de la etiología de la enfermedad de BV demoró más de 60 años. Inicialmente se planteó la hipótesis de que era causada por un virus, transmisible por medio de un hongo. Por esta época, al no existir evidencia acerca del virus, se asumió como hipótesis alternativa que el agente podría ser el hongo *Olpidium brassicae*, el cual se encontraba siempre en las plantas con sintomatología de BV (Fry, 1958; Grogan *et al.*, 1958). Posteriormente a través de injertos se logró separar el hongo de la enfermedad y por lo tanto se volvió a la hipótesis del virus transmitido por el hongo (Campbell, 1962; Campbell *et al.*, 1961). En esta relación virus-vector, las zoosporas libres de virus al infectar la raíz de plantas infectadas con el virus causal de BV, incorporaban el virus en sus protoplastos, permitiendo la diseminación del mismo. Incluso dada la resistencia de las zoosporas, pueden persistir en el ambiente por varios años, aún en ausencia de un huésped (Lot *et al.*, 2002).

En Argentina, la enfermedad ha sido observada por los agricultores desde hace muchos años, pero fue reportada recién en 2010, en el cinturón hortícola platense (Barcala Tabarozzi *et al.*, 2010) donde se observó una incidencia de la enfermedad de hasta el 60 %.

I.3.3 Sintomatología

La característica más evidente de la sintomatología que presenta una planta infectada con MiLBVV es el aclaramiento de la región próxima a las venas de las hojas. A ojo desnudo se observa como un engrosamiento de las nervaduras, de ahí el nombre *big vein*, aunque constituye tejido clorótico adyacente a las venas. Además de su aclaramiento, poco atractivo al consumidor, las plantas jóvenes infectadas con MiLBVV permanecen pequeñas y por lo tanto su valor comercial decae dando una pérdida económica para el sector. Cuando la infección ocurre en plantas adultas se observa un aumento en el ancho de las nervaduras de las hojas, pudiendo presentar deformaciones parciales de las hojas (Figura I.5). Estos síntomas también acompañan a la disminución del tamaño de la planta y un retraso en la formación del centro de la planta (Navarro *et al.*, 2004).

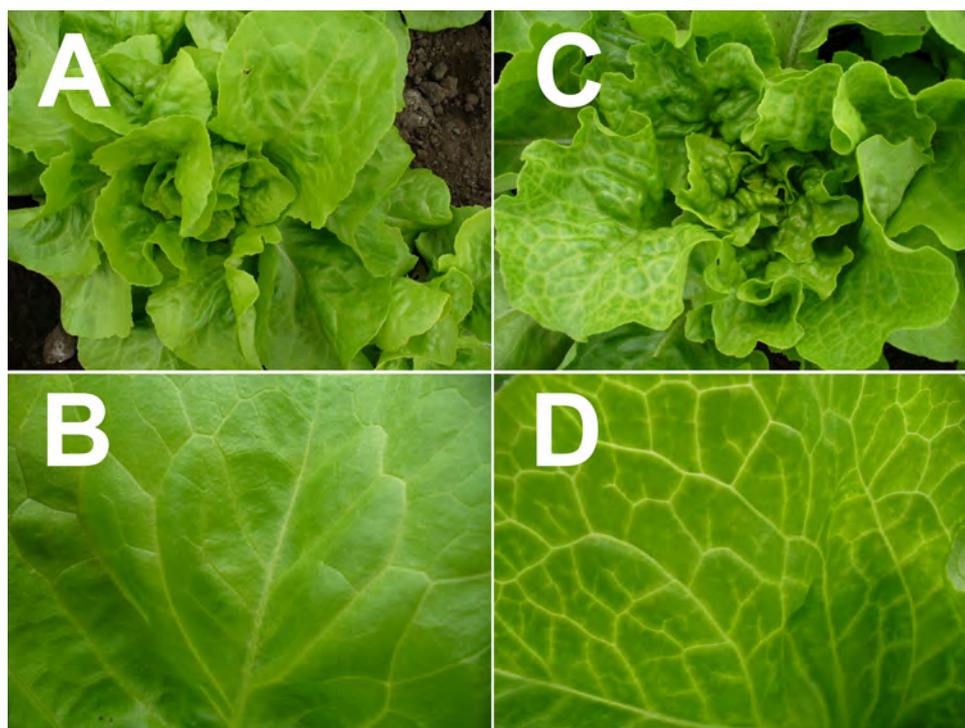


Figura I.5. Síntomas de MiLBVV en plantas a campo. Lechuga sana A). Zoom de una hoja sana B). Lechuga con sintomatología de MiLBVV C). Zoom de una hoja D).

I.3.4 Transmisión

El vector, como se ha mencionado anteriormente es *O. brassicae*, cuyas zoosporas pueden persistir en el ambiente hasta 20 años (Lot *et al.*, 2002). En el laboratorio se puede inocular plantas sanas de lechuga simplemente empleando como sustrato tierra contaminada con zoosporas de *O. brassicae*. Además las zoosporas pueden liberarse mediante incubación de las raíces de plantas infectadas en agua, que puede utilizarse para transmitir el virus, mediante el simple riego de plantas de lechuga sanas (Lot *et al.*, 2002). La transmisión mecánica ha sido ensayada en *C. quinoa*, *N. benthamiana*, *N. occidentalis* PI, *N. tabacum* White Burley. La inoculación es exitosa cuando se incuba rápidamente el inóculo frío (0-4 °C) y las plantas se mantienen a una temperatura por debajo de 20 °C. Las plantas inoculadas de *C. quinoa* y *N. tabacum* desarrollan síntomas a los 10 dpi. En *N. benthamiana* se detecta infección sistémica asintomática a las 2 semanas, mientras que *N. occidentalis* se observan lesiones locales a los 10 dpi y posteriormente necrosis en hojas superiores (Roggero *et al.*, 2000).

I.3.5 El agente causal: *Mirafiori lettuce big-vein virus*

A principio de los años 80 había un consenso de que el agente causal de la enfermedad de BV era causada por un virus, y en 1983, se observaron partículas rígidas de un virus presente en las plantas enfermas, que denominaron *Lettuce big-vein virus* (LBVV) (Kuwata *et al.*, 1983). Este virus se logró transmitir a hospedantes herbáceos y de estos a lechuga, reproduciendo la sintomatología. Por lo tanto se asignó a este virus como el causal de la enfermedad y el miembro tipo de un nuevo género, *Varicosavirus*. Sin embargo, se encontraban discrepancias entre la presencia del virus en la planta y su asociación a la enfermedad. Es así que una re-evaluación del agente causal de la enfermedad se llevó a cabo cuando se observó que otro virus co-infectaba las plantas con síntomas de BV. Las observaciones al microscopio electrónico mostraron un virus de morfología similar a la presentada por CPsV. Esta observación y posteriores estudios del genoma del virus, que denominaron *Mirafiori lettuce virus* (MiLV), lo incluyeron en el género *Ophiovirus* (Roggero *et al.*, 2000). Posteriormente, LBVV y MiLV, presentes en plantas con BV, fueron separados (Lot *et al.*, 2002), analizando las infecciones por separado. De esta manera, se demostró que las plantas infectadas sólo con LBVV no manifestaban sintomatología de BV, mientras que las plantas infectadas sólo con MiLV mostraban los síntomas de BV, independientemente de la presencia de LBVV (Lot *et al.*, 2002). Al determinar que el agente causal de la enfermedad era MiLV y no LBVV, sus acrónimos fueron cambiados por *Mirafiori lettuce big-vein virus*, MiLBVV, y *Lettuce big-vein associated virus*, LBVaV. En éste último, se agregó a su nombre “asociado” debido a que está presente en todas las plantas enfermas de BV analizadas, aunque no es el virus que genera los síntomas.

La secuencia del genoma de MiLBVV fue obtenida por van der Wilk y col. (2002), determinando que posee cuatro RNAs genómicos, de aproximadamente 7,8 kb para el RNA 1, 1,7 kb para el RNA 2, 1,5 kb para el RNA 3 y 1,4 kb para el RNA 4 (Figura I.6). Los extremos 5' y 3' de los segmentos genómicos presentan una estructura tipo “saca corcho”, con complementariedad parcial, que podría justificar la morfología circular de las nucleocápsides, no habiéndose encontrado en CPsV. En el genoma de MiLBVV se reconocen 7 marcos de lectura abiertos. Al mayor de ellos se le asignó la función RdRp, una proteína de 263 kDa, que se encuentra codificada en el RNA 1 de MiLBVV, y presenta homología con la RdRp de otros miembros de la familia (van der Wilk et al., 2002). El otro gen al cual se le asignó una función es el que se encuentra en el RNA 3 de MiLBVV, ya que presenta

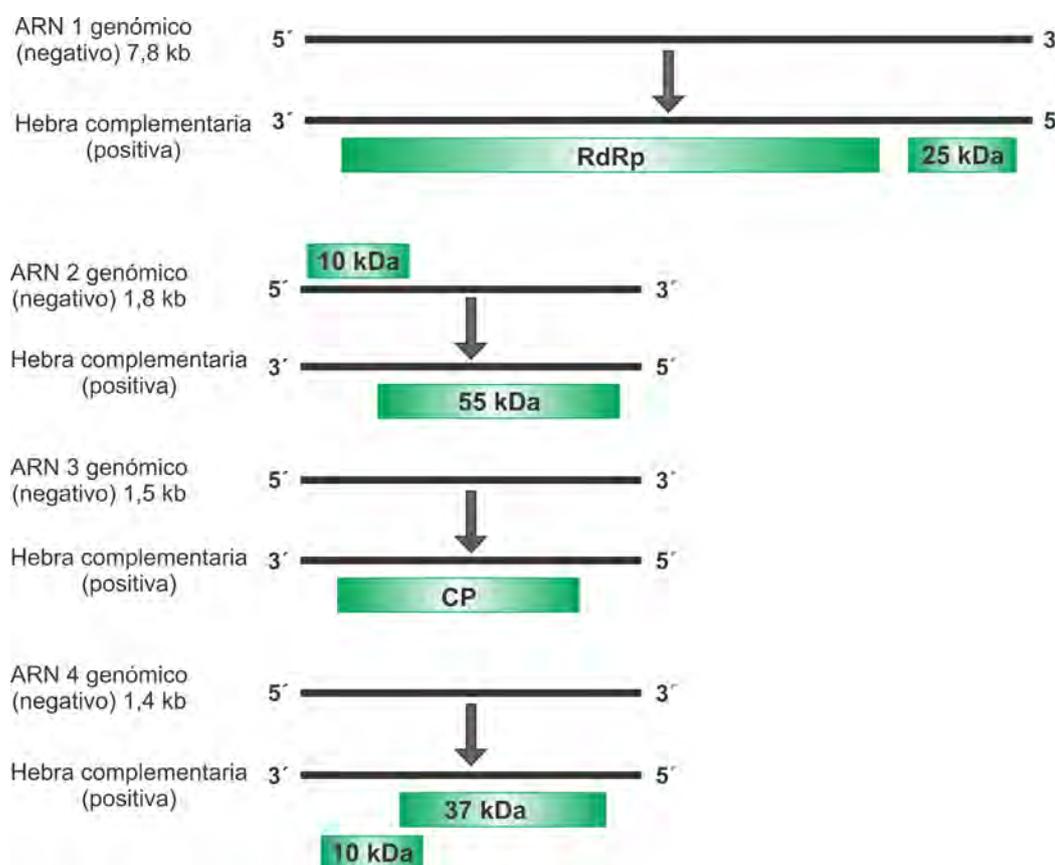


Figura I.6. Representación esquemática de la organización genómica de MiLBVV. Los rectángulos verdes indican los ORFs encontrados que codifican para las proteínas virales

homología con CP^{CPsV} y posee el mismo tamaño, 48 kDa, proteína que será nombrada en este trabajo de tesis como CP^{MiLBVV}. El RNA 1 de MiLBVV presenta otro ORF que codifica para una proteína de 25 kDa, de función desconocida, pero manteniendo la misma localización genómica que la proteína 24K de CPsV. El RNA 2 de MiLBVV codifica para dos proteínas, una de ellas en el RNA genómico viral (o cadena negativa) de 10 kDa (ausente en CPsV), y otra en el RNA genómico viral complementario, de 55 kDa, de igual localización genómica que la proteína 54K de CPsV; ambas

proteínas de función no determinada, son objeto de estudio de esta tesis. El RNA 4 codifica para dos proteínas, una de 10 kDa y otra de 37 kDa en las cadenas virales y viral complementaria, respectivamente (Figura I.6) de función desconocida (van der Wilk *et al.*, 2002)

En Argentina, la detección de MiLBVV en plantas de lechuga, fue reportada en el cinturón hortícola platense por nuestro grupo de trabajo (Barcala Tabarozzi *et al.*, 2010), mediante RT-PCR, y su transmisión se realizó mediante su vector, un hongo de suelo que morfológicamente correspondió al género *Olpidium*. A partir de esas plantas de lechuga, los aislamientos denominados MiLBVV-LP1 y MiLBVV-LP2, se lograron transmitir a plantas de lechuga sanas en forma satisfactoria. De estas plantas se extrajo RNA total, del cual se clonaron y secuenciaron fragmentos amplificados del RNA 3, que porta el gen de la CP. Las secuencias de las CPs de MiLBVV-LP1 (FJ864681.1) MiLBVV-LP2 (FJ864680.1) fueron comparadas con las secuencias que se encuentran en las bases de datos encontrándose que posee 97 % de identidad con el aislamiento italiano (AY204674.1) y brasileño (DQ854813.1) (Barcala Tabarozzi *et al.*, 2010),

Como ha sido mencionado previamente, era esperable que en las mismas plantas de lechuga del cinturón hortícola plantense, donde MiLBVV fue detectado, también estuviera presente LBVaV. Esto fue confirmado mediante RT-PCR, pero no se continuó con el proceso de separación de ambos virus (Barcala Tabarozzi *et al.*, 2010). Por lo tanto los aislamientos MiLBVV-LP1 y MiLBVV-LP2 causan una infección mixta de MiLBVV y LBVaV.

I.4. Funciones de las proteínas de los ophiovirus

Los virus deben manipular la maquinaria celular para poder infectar, multiplicarse, evadir o suprimir mecanismo de defensa del huésped, formar nuevas partículas virales y moverse a la célula adyacente para poder infectar nuevamente y al resto de la planta. Este intrincado ciclo es llevado a cabo por un número bajo de genes, unas pocas proteínas codificadas en el genoma viral, por lo que frecuentemente presentan múltiples funciones. En el caso de CPsV, que codifica para sólo cuatro proteínas, claramente señala que sus proteínas virales muy probablemente sean multifuncionales.

I.4.1 Replicasa viral

Para virus de plantas de polaridad (+), el término replicasa viral se asigna a un conjunto de tres actividades, RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp), sintetiza RNA utilizando como molde RNA; Helicasa, permite la separación de estructuras de doble cadena por la hidrólisis de nucleótidos trifosfatos; Metiltransferasa, la cual transfiere un grupo metilo formando el 5' cap (Hull, 2002). En



Figura I.7. Alineamiento de las secuencias correspondientes a las RdRp de MiLBVV, RWMV y CPsV. Se indican los premotivos A y motivos A, B, C y D. El asterisco indica aminoácidos idénticos y los puntos aminoácidos similares. Tomada de (Naum-Ongania *et al.*, 2003)

los virus cuyo genoma consiste en ssRNA, la Replicasa participa en la síntesis de la cadena complementaria a la viral en el mecanismo de replicación, y también en la transcripción de sus genes. Dentro del grupo de virus a ssRNA se encuentran los positivos (secuencias codificantes en la hebra genómica), los negativos (secuencia codificante en la hebra genómica complementaria) y los *ambisense* (secuencias codificantes en ambas cadenas). Los virus de polaridad negativa y *ambisense* contienen a la RdRp en la partícula viral, unida a los extremos 3' del RNA viral, de forma que cuando ingresa a la célula es capaz de sintetizar la hebra viral complementaria (codificante), y permitir la expresión de las proteínas virales. Los virus de polaridad positiva no requieren de la presencia de la RdRp en la partícula, ya que el propio RNA genómico puede actuar como mRNA y traducir la RdRp y otras proteínas (Hull, 2002).

En los ophiovirus, la actividad RdRp se asignó al ORF de mayor tamaño en el RNA I por análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos. En este análisis se encontraron cinco motivos conservados en

las polimerasas, y específicamente, en los módulos de las RdRp virales (Figura I.7) (Naum-Ongania *et al.*, 2003). Además, se realizó un estudio filogenético con el objetivo de determinar la relación de estos virus con otros virus negativos (Naum-Ongania *et al.*, 2003). Para esto se compararon las secuencias completas de la RdRp de CPsV, MiLBVV y una secuencia parcial de RWMV correspondiente al módulo de la polimerasa viral, con las RdRp de las familias *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae* y *Tenuivirus*. La Figura I.8 muestra el resultado de éste análisis donde están representadas todas las familias pertenecientes al orden *Mononegavirales*, y los géneros de virus de polaridad negativa sin familia asignada.

El módulo de la RdRp presenta cuatro motivos, el premotivo A, motivo A, motivo B y motivo C. Estos motivos se conservan dentro de las secuencias analizadas de los ophiovirus, presentando similitudes y diferencias con las demás familias. Esto posicionó a los ophiovirus cerca de las *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* y *Rhabdoviridae*. Un cambio importante en la secuencia de las RdRp se encuentra en el motivo C, el cual para las familias de virus negativos no segmentados, la secuencia GDNQ se encuentra conservada, mientras que en los ophiovirus, la secuencia conservada es SDD, como se muestra en el alineamiento de la Figura I.7. A diferencia de los mononegavirales no segmentados, la secuencia SDD está presente en las RNA polimerasa de los virus negativos segmentados (*Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae* y *Bunyaviridae*) del orden *Mononegavirales* (Naum-Ongania *et al.*, 2003). El resultado del análisis del módulo de la RdRp mostró que el género *Ophiovirus*, se separa como un nuevo grupo taxonómico (Naum-Ongania *et al.*, 2003), como una nueva familia, *Ophioviridae*, luego aceptada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTVdB, 2009).

Si bien al encontrar el módulo de replicasa viral en una proteína, es indicativo de la función que esta cumple en el ciclo viral, esto no descarta que pueda participar en otros procesos celulares que permitan al virus multiplicarse y continuar con la infección. A modo de ejemplo, para TMV, la RdRp

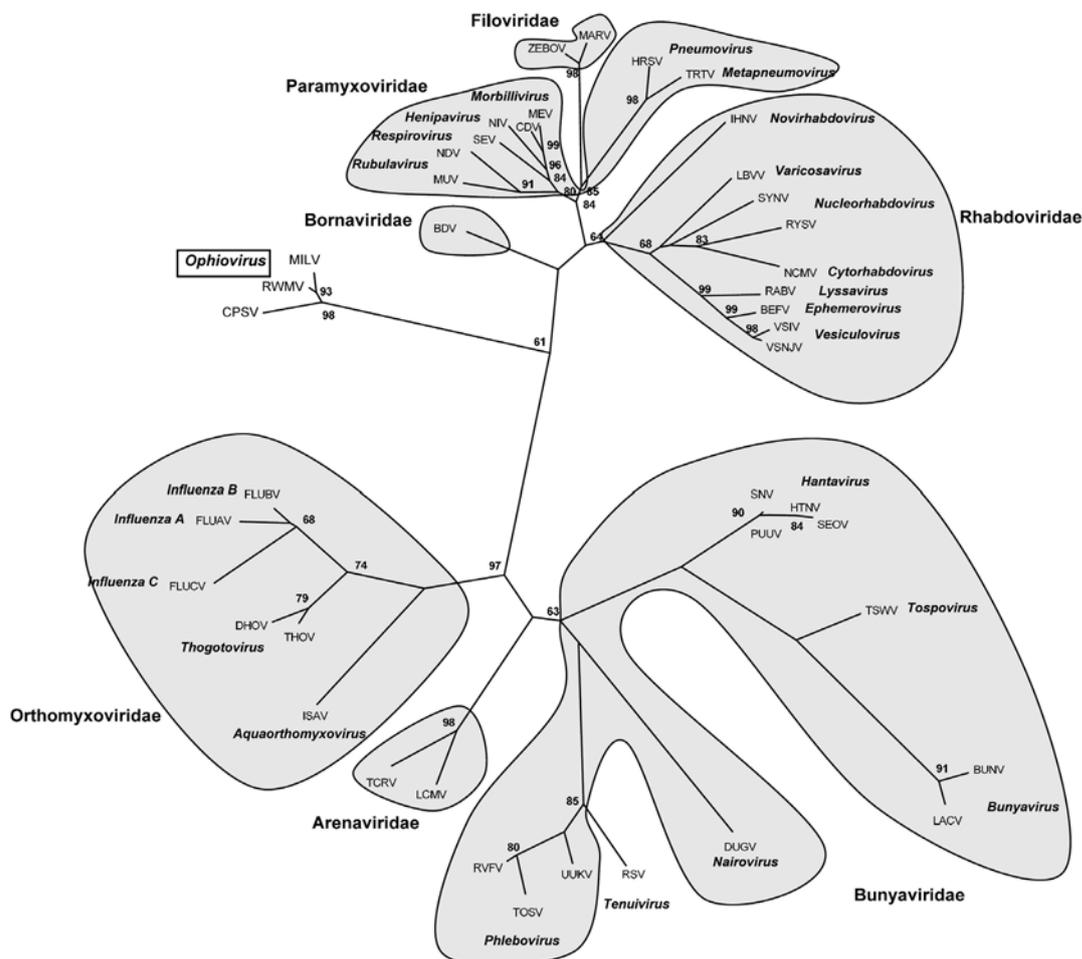


Figura I.8. Árbol filogenético del género *Ophiovirus* y de algunos miembros representativos de las familias del orden *Mononegavirales*, basado en el módulo conservado de la RNA polimerasa RNA dependiente. Tomado de (Naum-Onganía et al, 2003).

participa en la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, del inglés: *post-transcriptional gene silencing*) (Ding et al., 2004) el cual actúa como mecanismo celular de defensa antiviral. Además, otras proteínas virales también participan de la replicación, o de su regulación, a pesar de no poseer funciones ligadas estrictamente a la actividad enzimática.

La replicación es un proceso complejo que generalmente ocurre en asociación con el retículo endoplásmico (RE), en complejos virales de replicación (VRCs). Por ejemplo, los VRCs de TMV, en donde entre otras proteínas virales se encuentra la replicasa, se forman asociados a la red de RE, y se mueven intracelularmente por los microfilamentos de actina que están asociados a la red de retículo

endoplásmico cortical (Kawakami *et al.*, 2004), moviéndose a lo largo de la red de microfilamentos (Liu *et al.*, 2005). Dentro de estos VRCs se encuentran otras proteínas virales que le dan estabilidad y regulan su formación (Asurmendi *et al.*, 2004; Heinlein *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2005; Mas & Beachy, 1999; 2000). En los potyvirus la proteína transmembrana 6K forma vesículas de ER (Restrepo-Hartwig & Carrington, 1994; Schaad *et al.*, 1997) que luego se fusionan con la membrana externa de los cloroplastos e induce invaginaciones. En estas vesículas se encuentran además la replicasa y RNA genómico (Wei & Wang, 2008).

I.4.2 Proteína de cubierta viral

Esencialmente la CP es la encargada de cubrir o encapsidar el genoma viral. Por lo tanto su función estructural es importante. Sin embargo otras funciones han sido atribuidas a las CP, entre ellas, su participación en el movimiento viral, en la interacción virus-vector, la regulación de la replicación, la traducción de las proteínas virales y la modificación del ambiente celular haciéndolo propicio para la infección (Callaway *et al.*, 2001; Ivanov & Makinen, 2012). El estudio de la CP de los ophiovirus se analiza en el Capítulo III.

I.4.3 Proteína supresora del silenciamiento

El PTGS constituye un mecanismo de defensa frente a la infección de virus, que es inducido por estructuras de doble cadena, como son los intermediarios de replicación viral. Este evento desencadena una cascada de reacciones que tienen como producto la degradación dependiente de secuencia del genoma viral en la célula infectada. Al mismo tiempo envía una señal a las células adyacentes, capaz de preparar a estas células ante la presencia del virus, ocasionando la contención de la infección. Los virus codifican para proteínas que bloquean el mecanismo de PTGS en algún punto de esta cascada, y se denominan proteínas supresoras del silenciamiento por RNA (VSR del inglés, *viral suppressor of RNA-silencing*). Así, facilitan la replicación viral en una célula en donde, en su ausencia, sería imposible la replicación, el movimiento a la célula adyacente y avance de la infección. Aunque esta actividad frecuentemente se encuentra en una única proteína viral, se han descrito casos en donde un virus codifica para tres proteínas supresoras que inhiben diferentes pasos de la cascada del PTGS (Lu *et al.*, 2004). El estudio de la/s proteínas supresoras de los ophiovirus se analiza en el Capítulo IV.

I.4.4 Proteína de movimiento

Las proteínas de movimiento (MP) son las encargadas de facilitar el movimiento del virus de una célula a la célula adyacente y en último término a toda la planta. Ésta función también se puede encontrar en una o varias proteínas. A modo de ejemplo la función de movimiento en TMV se encuentra en una única proteína, denominada 30K o MP^{TMV}, mientras que en los virus pertenecientes a los poty- y potexvirus se encuentra en tres proteínas, cuyos genes forman lo que se denomina *triple gene box* (TGB). Las MPs se caracterizan por acumularse en canales intercelulares denominados plasmodesmos (PD), aumentar el tamaño del poro del PD y unir RNA, estas actividades son indispensables para movilizar el genoma o los VRCs a la célula adyacente (Lucas, 2006). El estudio de la MP de los ophiovirus se analiza en el Capítulo V.

Hipótesis

Tanto CPsV como MiLBVV codifican para proteínas virales multifuncionales, y desempeñan un rol particular en el ciclo de infección:

- La CP desempeña una función estructural y dada la morfología de la partícula viral, debe presentar interacción homóloga y poseer dominios proteicos responsables de esta interacción.
- Alguna/s de la/s proteína/s codificadas por CPsV y MiLBVV son capaces de suprimir el silenciamiento génico, interfiriendo con este mecanismo de defensa de la planta.
- Estos virus codifican para una o más MP las cuales permiten el movimiento célula-a-célula del virión o de un complejo ribonucleoproteico. Además, otras proteínas virales podrían tener un rol secundario en el movimiento, o estar involucradas en el movimiento a larga distancia u hoja-a-hoja.

Objetivos

El conocimiento de la biología de los virus pertenecientes a la familia *Ophioviridae* está en sus comienzos. Se han secuenciado los genomas de CPsV, MiLBVV y LRNV, sin embargo el estudio de la función de sus proteínas recién ha comenzado. Se ha avanzado en la asignación de la función de la RdRp de los ophiovirus, mediante alineamiento de secuencias y predicción *in silico* de dominios involucrados en esta función, y también se ha determinado que el gen *48k* codifica para la CP^{CPsV}. Sabiendo que las proteínas virales son probablemente multifuncionales, es de esperar que la RdRp y CP, cuyas funciones estarían determinadas, que participen de otras funciones virales. Además, se desconoce la función del resto de las proteínas codificadas en el genoma de CPsV y MiLBVV. Por lo tanto, se propone para este trabajo de tesis identificar nuevas funciones de las proteínas de CPsV y extender el análisis a otro miembro de la familia *Ophioviridae*, MiLBVV, aportando evidencias a la biología de los ophiovirus. Para esto, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1- Determinar la localización subcelular de las proteínas de cubierta de CPsV y MiLBVV e interacciones CP-CP homólogas y heterólogas.
- 2- Identificar la/s proteínas virales involucradas en el mecanismo de supresión del PTGS
- 3- Identificar y caracterizar cuál/es de la/s proteínas de CPsV y MiLBVV poseen la función de movimiento viral célula-a-célula.
- 4- Aportar evidencias que permitan conocer el mecanismo que poseen los ophiovirus MiLBVV y CPsV para el movimiento célula-a-célula.

Capítulo II

Materiales y Métodos

Materiales

II.1. Reactivos químicos

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, EE.UU.), Fluka (Buchs, Suiza), Carlo Erba (Milán, Italia). Las drogas y enzimas empleadas en los experimentos de Ingeniería genética fueron de grado Biología Molecular de Sigma (St. Louis, EE.UU.), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs, NEB (Beverly, EE.UU.) o Gibco BRL (Gaithersburg, EE.UU), PIERCE (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois EEUU). Kits de clonado de Invitrogen (USA), y de co-inmunoprecipitación (Chromo Tek, Alemania).

II.2. Cepas bacterianas

Escherichia coli

- DH5 α F': *E. coli* supE44 Δ lacUI69 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.
- TOP10: *E. coli* F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ ⁻.

Agrobacterium tumefaciens

- LBA4404: *A. tumefaciens* LBA4404 (Ach5 pTiAch5) Sm/Spr en el plásmido de virulencia (de Tn904); el T-DNA completo de pTiAch5 eliminado en pAL4404 (Hoekema *et al.*, 1983).
- GV3101:pMP90: *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 con resistencia a Rifampicina en el genoma y Gentamicina en el plásmido Ti, pTiC58 Δ T-DNA.

II.3. Aislamientos de CPsV y MiLBVV

CPsV: Como fuente de inóculo, así como para la purificación parcial de partículas virales se utilizó el aislamiento CPV4 de Florida (USA), que fue aislado de Texas (USA) (Garnsey & Timmer, 1980).

MiLBVV: Como fuente de inóculo se utilizó el aislamiento platense MiLBVV-LP2 (Barcala Tabarozzi *et al.*, 2010).

II.4. Vectores de clonado

- pCR8GW/TOPO, Invitrogen (USA).

II.5. Plásmidos binarios

- Plásmidos de la serie pGD: pGD, pGDG (Goodin *et al.*, 2002). Estos plásmidos binarios fueron empleados para expresar las proteínas de CPsV, desarrollando los plásmidos recombinantes pGD-24K^{CPsV}, pGD-CP^{CPsV} y pGD-54K^{CPsV} que expresan las proteínas de CPsV sin fusionar a proteínas reporteras (Zanek, 2007).
- Plásmidos pB7FWG2.0, pB7RWG2.0 y pB7WGF2.0 para el desarrollo de fusiones traduccionales a proteínas fluorescentes (Karimi *et al.*, 2002). Cedidos gentilmente por División de Genómica funcional del Departamento de Biología de sistemas de plantas (VIB-Ghent University).
- Plásmidos pGW11 y 12 para fusiones traduccionales del epítopo FLAG a los extremos N- y C-terminales (Nakagawa *et al.*, 2007).
- pBin61, donde se han clonado los genes GFP, 2b (CMV). Cedidos gentilmente por el Dr. Baulcombe (The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK).
- pBIC, donde se han insertado los genes NSs (TSWV) y pBIC-hpGFP. Cedido gentilmente por el Dr. K. Mise (Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan).
- PVX-GUS, PVX-GUS-BspI y pRT-25K, cedidos por el Dr. Atabekov (A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow 119899, Russia).
- X8GΔH90 y HDEL, fusiones a GFP con localización en aparato de Golgi y retículo endoplásmico respectivamente fueron cedidos por las Dras. V. Gomord y F. Loïc, Francia.
- PDLPI:mRFP, fusión C-terminal a mRFP de *Plasmodesmata located protein 1* cedida gentilmente por Manfre Heinlein, Universidad de Estrasburgo, Francia.
- PDCB1:mCherry fusión C-terminal a mCherry de *Plasmodesmata callose binding protein 1* cedida gentilmente por Andrew Maule, John Innes Centre, Norwich, UK.
- Golgi:cherry, fusión C-terminal a mCherry cedido gentilmente por Andreas Nebenfuhr, Department of Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, University of Tennessee, USA.

II.6. Primers utilizados

Los primers utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Nombre	Secuencia 5'-----) 3'
24Ks	ATGGCTGAATATATAGAAG
24Kas	CTCGCGGAAAGAATTGTCTG
25Ks	CATATGTCACAGTTCAAAGACAAATC
25Kas_new	AAGTTTTCTGCCTTTATC
25Kas_stop	AAGCATTAAAGTTTTCTGC
48cK_d	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGTCGATCCCAATCAAAG
48cK_r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCATAGTTGATGCTACC
48mi.s	CATATGTCAGGAGTATAACAAGG
48mi.as	CTCGAGTTTCTTTCCGTAAGC
48mi.as_stop	CTCGAGTCATTTCTTTCCGTAAGC
55Kas	CTCGAGTTCCGTCATCATTCTCTGC
55Ks	CATATGCAAAACAGTTTTTCATCC
55Kas_stop	CTCGAGTTATTCCGTCATCATTCTCTG
54KdClaI	GTATCGATAATGTCAATGGC
54Kas	TCCCTCAATTTTGATCTCAC
54KrSall	CGTCGACTCACTCAATTTTGATC
GFP_ER_fl	TTCTTGTTGAATTAGATGGTGA
GFP_ER_rl	ATGATCTGGGTATCTTGAAAAG

Los primers de Actina fueron cedidos gentilmente por la Dra. Reyes.

II.7. Sueros utilizados

- Suero anti ratón IgG-HRP: goat Anti-Mouse-IgG (H+L) – Peroxidase, BioRad
- Anticuerpo monoclonal anti GFP JL-8 (Living colours, Clontech, USA)
- Anticuerpo monoclonal anti mRFP 3F5 (Chromotek, Alemania)
- Anticuerpo monoclonal anti FLAG (Sigma Aldrich,)

II.8. Plantas hospedantes

- Citrus sinensis* ((L.) Osb.), llamado en esta tesis *C. sinensis*.
- Lactuca sativa*, Lechuga variedad crespa.
- Nicotiana benthamiana* wt y l6c, esta última expresa constitutivamente la proteína reportera GFP.

Métodos

II.9. Extracciones de RNA de tejido vegetal

La extracción de RNA total extraído de muestras de material foliar se realiza utilizando el reactivo TRIZOL (Life Technologies) según especificaciones del fabricante. Se parte de 100 mg de tejido, se muelen en N₂ líquido y se resuspende el RNA obtenido en 10 a 50 µl de agua bidestilada estéril libre de RNasa. Para el análisis por Northern blot, el RNA se extrae con 7 ml de TRIZOL por cada gramo de tejido foliar de *N. benthamiana*. Luego se siguen las instrucciones del fabricante, realizando una segunda extracción con cloroformo. El RNA se resuspende en 50 a 100 µl de H₂O destilada estéril.

II.10. Northern blot

II.10.1. Detección de mRNA

Electroforesis y transferencia: Alícuotas de 40 µg de RNA total se incuban durante 5' a 65 °C en buffer de muestra (RNA, 7,5 µl; formamida desionizada, 14,5 µl; formaldehído (37 %) 5 µl; MOPS 10X, 3 µl), luego se enfría en H₂O-hielo y se agrega buffer de siembra. Las muestras son fraccionadas por electroforesis, durante 15' a 80 V y luego a 60 V, en gel desnaturizante de agarosa 0,8 % conteniendo formaldehído en buffer MOPS (0,2 M MOPS; 50 mM acetato de sodio; EDTA 10 mM). Los ácidos nucleicos son transferidos a una membrana sin carga de nylon (Amersham Hybond™-N) mediante capilaridad en presencia de buffer 20X SSC, durante 24 hs. La membrana se fija por exposición a UV (320 nm) durante 5 minutos. Preparación de la sonda, hibridación y revelado: la sonda que abarca el gen *gfp* completo marcada con α-32P-dCTP (3000 µCi/mmol) se realizó mediante PCR con los primers T7 y SP6, a partir del molde pGT-GFP (Gen *gfp* completo amplificado por PCR a partir del clon pBin-6l GFP, The Sainsbury Lab. e insertado en el vector de clonado pGem-T, gentileza Vanesa Mongelli). La sonda se purificó por cromatografía de exclusión molecular en columna Sephadex G-25, en Tris-HCl pH 7, EDTA 5 mM. La hibridación se realizó en 5X SSC, 2X Denhardt, 0.1 % p/v SDS, 300 µg/ml DNA de esperma de salmón desnaturizado (Invitrogen) y 3 mg/ml tRNA de levadura desnaturizado (SIGMA) a 65 °C overnight. Después de 3 lavados en 2X SSC, 1X SSC, 0.2X SSC con el agregado de 0.1 % p/v SDS a 65°C (un cuarto lavado con 0.1X SSC en las mismas condiciones, según el fondo detectado), la membrana se expone a una placa radiográfica.

II.10.2. Detección de siRNA

Electroforesis y transferencia: las muestras se separan mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida acrilamida (17 % acrilamida, 7,0 M Urea en 0,5 X TBE). Se deben lavar las calles del gel, precorrer durante 1 h a 180 V y volver a lavar las calles, antes de sembrar. Se

siembran 50 µg de RNA total por calle. Un volumen de muestra se mezcla con 1,5 volúmenes de buffer de siembra (Formamida desionizada, 2 vol; 5X BPB loading, 1 volumen). Se incuba 5 min a 65 °C y enfría en H₂O-hielo. Se siembra y corre a 180 V hasta salida del frente de corrida. La transferencia se realiza mediante Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio- Rad (BioRad Laboratorios, California, EEUU), en buffer TBE 0,5 X, durante 1 h a 50 V. La membrana se fija por exposición a UV (320 nm) durante 5 minutos. Preparación de la sonda, hibridación y revelado: para la detección se utiliza una sonda de RNA de polaridad positiva, marcada con α-32P-UTP y realizada por transcripción *in vitro*, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit, Epicentre Biotechnologies). Como molde se utilizó el clon pGT-GFP. La sonda se purificó por cromatografía de exclusión molecular en columna Sephadex G-25, en Tris-HCl pH 7, EDTA 5 mM. La hibridación se realiza en 5X SSC, 2X Denhardt, 0.1 % p/v SDS, 300 µg/ml DNA de esperma de salmón desnaturalizado (Invitrogen) y 3 mg/ml tRNA de levadura desnaturalizado (SIGMA) a 45 °C overnight. Después de 3 lavados en 2X SSC, 1X SSC, 0.2X SSC con el agregado de 0.1 % p/v SDS a 45°C. Luego la membrana se expone a una placa radiográfica.

II.11. Reacción de transcripción reversa (RT)

II.11.1 Reacción de RT para el clonado de los ORF de MiLBVV

Se realiza en 10 µl de reacción, a partir de 1 µl de RNA total de tejido foliar o RNA viral. Se agrega el primer de interés a una concentración final de 10 µM, 1 µl de dNTPs (10 mM de cada uno) y 3 µl de agua bidestilada libre de RNAsa. Se incuba a 75°C durante 3 minutos y se enfría rápidamente en agua-hielo por 5 minutos. Se agregan 100 U de transcriptasa reversa SuperScript™III (Gibco BRL, Gaithersburg, EE.UU), 16 U de RNasin® Inhibidor de Ribonucleasa (Promega, Madison, EE.UU), 1 µl de DTT 0,1 M, y 2 µl del buffer 5 X de la enzima. Se incuba a 45 °C por 90 minutos. El producto generado en la reacción de RT se utiliza posteriormente como molde en reacciones de PCR.

II.11.1 Reacción de RT para RT-PCR semicuantitativa

Se corrobora la integridad de las extracciones de RNA, separando las mismas en un gel de agarosa 1% TAE IX. Posteriormente se cuantifican por espectrofotometría. Dos µg de RNA total se tratan con DNAsa libre de RNAsa (Promega, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Con 1 µg de RNA tratado con DNAsa se lleva a cabo la RT en 10 µl de reacción. Se le agrega 0,5 µg del primer de interés y agua bidestilada libre de RNAsas hasta completar los 5 µl. Se incuba a 75°C durante 3 minutos y se enfría rápidamente en agua-hielo por 5 minutos. A continuación se agregan 5 µl de una

mix que contiene 0,5 mM de cada dNTP, buffer de reacción 2X, inhibidor de RNAsas, RNAsa OUT (Invitrogen) y M-MLV-RT (Promega, USA). Se incubó a 42 °C por 60 min.

II.12. Reacción de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en ciclador Gene Amp PCR System 2400 o 9600 (PERKIN ELMER). Para un volumen de reacción de 10 µl se agregaron 1 µl de buffer de Taq DNA polimerasa (50mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9.0; 0,1 % v/v Tritón X-100), 0,2 µl dNTPs (10 mM de cada uno), 1,5 mM MgCl₂, los primers directo y reverso a una concentración final 1 µM y 0,25 U de Taq DNA polimerasa (Promega). Las condiciones de ciclado generalmente son de 4 minutos a 94°C como etapa inicial de desnaturalización, 36 ciclos (para la RT-PCR semicuantitativa son 25 ciclos) de 10" a 94°C, 10" a 50°C (esta temperatura varía de acuerdo a los primers utilizados), y 50" a 72°C (este tiempo varía de acuerdo a la extensión del fragmento a amplificar, Tabla 1) y una etapa de elongación final de 4 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa 1-2 %-TAE IX en presencia de bromuro de etidio.

II.13. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

El procedimiento utilizado es el que se detalla en el protocolo de GENE CLEAN III (BIO 101 Inc., Vista, California, EEUU). El fragmento de gel que contiene el DNA a recuperar se disuelve con 3 volúmenes de NaI 6M, calentando a 55 °C por 5 minutos. A la agarosa disuelta se le agrega matriz de sílice (glass milk), se mezcla y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. La suspensión de sílice se centrifuga y se lava 3 veces con New Wash (solución de NaCl, Tris, EDTA, agua y etanol). El *pellet* se seca al aire para eliminar los restos de alcohol y se agrega agua bidestilada estéril incubando por 2 o 3 minutos a 50 °C, seguida de centrifugación durante 1 minuto a 14000 xg. El sobrenadante contiene el DNA de interés.

II.14. Clonado en vectores

Se empleó la técnica de amplificación por PCR para el clonado del ORF de las proteínas del aislamiento CPV4 a partir de clones obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Zanek, 2007). Para el clonado del ORF de MiLBVV se partió de RNA total de plantas de lechuga infectadas con MiLBVV-LP2, y amplificó mediante la técnica de RT-PCR, usando el vector pCR8/GW/TOPO para su clonado. Este vector contiene sitios de recombinación específicos que permiten el clonado del inserto en vectores binarios de destino. Una vez clonados se corroboró la orientación y la secuencia de los insertos.

II.15. Preparación y transformación de bacterias competentes

-Bacterias competentes para el método químico

La preparación de bacterias competentes se realizó de acuerdo a Sambrook et al.(1989). Se cultiva la cepa de *E. coli* en medio LB, 16-24 hs a 37°C con agitación (200 rpm). Posteriormente, se realiza una dilución 1:100 del cultivo en 1 litro del mismo medio y las bacterias se crecen hasta fase logarítmica (DO_{600nm} de 0,5). La suspensión bacteria se incuba durante 30 minutos en hielo, se centrifuga a 4°C, durante 10 minutos a 5000 xg. El sedimento bacteriano se resuspende en 100 ml de una solución de $CaCl_2$ 100mM. Se incuba en agua-hielo durante 30 minutos, se centrifuga durante 10 minutos a 5000 xg y se resuspenden en 2 ml de $CaCl_2$ 100mM. Se fraccionan en alícuotas de 100 μ l y se congelan rápidamente a -70°C hasta que sean utilizadas.

-Bacterias competentes para electroporación

El protocolo para la obtención de bacterias de *E. coli* para electrotransformación se basa en el reportado por Dower y colaboradores (1988). Las bacterias se lavan con glicerol 10% v/v para eliminar todas las sales que puedan interferir en la conducción del pulso eléctrico. A partir de un cultivo saturado se realiza una dilución 1:100 en 1 litro de medio LB sin NaCl y se cultiva a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5. Las bacterias se centrifugan a 4°C durante 10 minutos y a 5000 xg. El sedimento bacteriano se resuspende en glicerol 10% v/v. Este procedimiento se repite tres veces disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados. Por último, las bacterias se resuspenden en 2 ml de glicerol 10% v/v, se fraccionan en alícuotas y se congelan rápidamente a -70°C hasta que sean utilizadas. Para la obtención de bacterias competentes de *A. tumefaciens* para electrotransformación, a partir de un cultivo saturado en LB crecido 48 horas 28°C se realiza una dilución 1:20 en 25 ml de medio LB y se cultiva a 28°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5 (aproximadamente 3 horas). Las bacterias se incuban durante 15 minutos en hielo y se centrifugan a 8000 xg durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspende en 10 ml de medio HEPES (1mM HEPES, pH 7) y se centrifuga a 8000 xg durante 10 minutos a 4°C. Este procedimiento se repite resuspendiendo en 500 μ l de medio HEPES. Posteriormente, las bacterias se resuspenden en 500 μ l de glicerol 10 % v/v y se centrifugan a 8000 xg durante 10 minutos a 4°C. Por último, las bacterias se resuspenden en 200 μ l de glicerol 10% v/v, se fraccionan en alícuotas y se congelan rápidamente a -80°C hasta que sean utilizadas.

-Transformación mediante shock térmico

Se mezclan las bacterias competentes obtenidas por el método químico con el producto de ligación y se incuban durante 30 minutos en agua-hielo. Luego se aplica un shock térmico por 2 minutos a 42°C y la mezcla se incuba nuevamente en agua-hielo durante 10 minutos. Posteriormente las bacterias se crecen a 37°C durante una hora, en medio LB sin antibiótico. Se siembran en placas de LB con el antibiótico adecuado incubando a 37°C overnight. En el caso de la transformación con plásmidos recombinantes que permiten la identificación por color, en cada caja se esparce en la superficie, antes de la siembra de las bacterias, 30 µl de una solución 10 mg/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y 2 µl de 1M IPTG (isopropiltio-β-galactósido).

-Transformación mediante electroporación

Para realizar las electroporaciones se utilizó un electroporador Bio-Rad Gene Pulser™. Se mezclan las bacterias competentes obtenidas para este método con el producto de ligación incubando en hielo por 5 minutos. Posteriormente dicha mezcla se coloca en una cubeta de electroporación, que se ubica en el electroporador. Una vez ajustadas las condiciones de la electroporación (2,2 kV/0,2 cm; 25 µF y 200 Ω para *E. coli*, 2,2 kV/0,2 cm; 25 µF y 400 Ω para *A. tumefaciens*) se somete a las bacterias al impulso eléctrico. Inmediatamente se las diluye con medio LB sin antibiótico, se las crece durante 1 hora a 37°C para *E. coli* o 3 horas a 28°C para *A. tumefaciens* y se las siembra en placas de LB conteniendo el antibiótico adecuado y, si corresponde, X-gal e IPTG.

II.16. Minipreparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se realiza mediante el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979), con algunas modificaciones. Una alícuota de 1 ml de cultivo bacteriano crecido ON en agitación se centrifuga a 14000 xg durante 1 minuto (este procedimiento se puede repetir hasta tres veces). El pellet obtenido se resuspende en 200 µl de Solución I (25 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM glucosa; 10 mM EDTA), se agregan 300 µl de Solución II (0,2 N NaOH; 1 % v/v SDS) y se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Luego se agregan 300 µl de Solución III (3 M acetato de potasio pH 4.8), se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Se realiza una centrifugación a 14000 xg por 15 minutos. Al sobrenadante obtenido se le agrega RNAsaA a una concentración final de 20 µg/ml incubando a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se realizan dos extracciones con un volumen de cloroformo para eliminar proteínas y se precipita el DNA plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado de un volumen de isopropanol. Se centrifuga por 20 minutos a 14000 xg, el pellet se lava con etanol 70 % y se resuspende en 20 µl de agua bidestilada estéril.

Cuando la preparación de DNA plasmídico fue utilizada para secuenciación automática, se realiza una segunda precipitación del DNA con 400 mM NaCl y 6,5 % Polietilenglicol 8000 (PEG8000).

Tras incubar en hielo por 20 minutos, se centrifuga a 4 °C durante 20 minutos a 14000 xg. El precipitado se lava con etanol 70 %, se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril.

II.17. Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*, *C. sinensis* y *L. sativa*

Los experimentos de agroinfiltración para ensayos de silenciamiento se efectuaron de acuerdo al protocolo reportado por Llave y colaboradores (2000). Para ello se cultivó un clon de *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido binario correspondiente en medio LB con los antibióticos adecuados a 28 °C por 20 horas. Se diluyó el cultivo en medio MES (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.7) con el agregado de 150 mM acetosiringona, a una DO_{600nm} de 1,0. Se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se infiltró el envés de las hojas de *N. benthamiana* utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja. Los % de supresión se transformaron como arc sen (raíz cuadrada (% de supresión)), para normalizarlos y compararlos con ANOVA y Tukey test con un $\alpha=0,05$. Por cada tratamiento se tenían cinco valores de % de supresión.

Cuando se realizaron experimentos de co-agroinfiltración para micorscopia, los cultivos en agua destilada estéril, se incubó una hora a 28 °C en agitación a temperatura ambiente y previo a la infiltración de las hojas de *N. benthamiana*, se mezclaron los cultivos de *A. tumefaciens* correspondientes en la proporción deseada para obtener una DO_{600nm} de 0,2. Sólo en el caso de DCPI:mRFP, PDLPI:mRFP y PCDBI:Cherry la DO_{600nm} fue de 0,1, en *N. benthamiana*. En *C. sinensis* y *L. sativa* se infiltró con DO_{600nm} de 0,8-1,0 para *C. sinensis* y *L. sativa*.

II.18. Condiciones de crecimiento de plantas

Las plantas de *N. benthamiana* se mantuvieron en cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas de luz, a 22-24 °C entre 3-4 semana antes de usar. Para los ensayos de microscopía, *gating*, co-inmunoprecipitación y silenciamiento local (ver más adelante) se emplearon plantas de 6 a 8 hojas verdaderas. Para los ensayos de silenciamiento sistémico se emplearon plantas con 4 hojas.

Las hojas de *C. sinensis* agroinfiltradas para observar al microscopio se incubaron en cámara húmeda durante 3-10 dpai, en nuestras condiciones experimentales los niveles de expresión fueron óptimos a los 7 dpai. Las plantas de *L. sativa* se incubaron en las mismas condiciones que las de *N. benthamiana* y se observaron 3-5 dpai.

II.19. Microscopía de fluorescencia

Se empleó un microscopio de epifluorescencia Nikon eclipse Ti equipado con un filtro para GFP y un objetivo 40X para las observaciones que no requieren confocalidad. De ser necesaria la confocalidad

se empleó un microscopio confocal Carl Zeiss LSM510 con un objetivo C-Apo-chromat (63/1.2 W Korr) de inmersión en agua en el modo multitrack, con longitudes de onda de excitación y emisión de 488 nm/505–550 nm para eGFP y 561/575–615 nm para mRFP. Se utilizó el software LSM510 versión 2.8 para su adquisición. Alternativamente se empleó un microscopio confocal Leica TCS SP5 II equipado con un objetivo HCX PL APO CS 63.0x 1.40 UV de inmersión en aceite, con longitudes de onda de excitación y emisión de 488/510–550 nm para eGFP y de 543/566–634 nm para mRFP, y adquiridos con el software LAS AF versión 2.2.1. Las imágenes fueron procesadas con ImageJ.

II.20. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* (FLIM)

El tiempo de vida medio (t) de eGFP se midió utilizando el equipo Lambert Instruments Fluorescence lifetime Attachment (LIFA), montados sobre un microscopio invertido Nikon TE2000 con un objetivo 63X, 1.4 de inmersión en aceite utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 460–500/510–560 nm para eGFP y de 550–600/615–665 nm para mRFP. Las imágenes de FLIM fueron adquiridas, previa calibración con fluoresceína ($t = 4.00$ ns) y procesadas con el programa LI-FLIM versión 1.2.9.117 (Lambert Instruments). Se empleó el análisis estadístico por ANOVA empleando el test de Tukey ($\alpha = 0.01$). La eficiencia de transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia se calculó como $FRET = (1 - t_{DA}/t_D) \times 100$, en donde t_{DA} es el tiempo de vida medio de GFP (donor) en presencia de mRFP (aceptor), t_D es el tiempo de vida medio de GFP cuando se expresa en ausencia de receptor.

II.21. *Fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)

Los ensayos de FRAP fueron llevados a cabo con el microscopio confocal Leica SP5, módulo FRAP wizard. Para esto se tomó una imagen previa y otra posterior al fotoblanqueo. Las condiciones del fotoblanqueo, si bien difirieron en las diferentes muestras, en general, se fotoblanqueó una zona con 2 a 3 radiaciones al 40%, y posteriormente se tomar imágenes de la misma zona a los 5, 10, 15, 30 min. Para el análisis de la recuperación se corrigió la fluorescencia de la zona fotoblanqueada por otra región donde no tratada.

II.22. “*Gating*” de GFP

En ensayo de “*Gating*” de GFP permite evaluar si existe difusión de monómeros de GFP entre células adyacentes. Éste se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito previamente (Bayne *et al.*, 2005). Se agroinfiltran hojas completamente desarrolladas con cultivos de *A. tumefaciens* que llevan el plásmido pGDG, $DO_{600nm} = 5 \times 10^{-4}$ final junto con cultivos de la misma bacteria que llevan plásmidos binarios

que permiten la expresión de la supresora P19 a un $DO_{600nm}=1$ y cultivos que permiten la expresión de la proteína de interés a la misma DO_{600nm} . Las células fluorescentes son observadas por microscopia a los 3 dpai.

II.23. Midi preparación de DNA plasmídico

Se utilizó el kit de purificación PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Madison, EE.UU.), según instrucciones del fabricante.

II.24. Bombardeo génico

Los bombardeos se realizaron utilizando un cañón PDS-1000/He (Bio-rad), equipo gentilmente cedido por Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI). Preparación de las muestras a bombardear: para 6 disparos, sobre 30 μ l de partículas de oro de 1 μ m de diámetro (60 mg/ml) se precipitaron entre 4 y 10 μ g de DNA. Para ello, se colocaron las partículas de oro en un tubo eppendorf, se agita con vórtex y sin dejar de agitar se agregan 10 μ l de la mezcla de DNA, luego 50 μ l de $CaCl_2$ 2,5 M, y finalmente 20 μ l de espermidina 100 mM. Se continúa agitando durante 10 minutos y se lleva a hielo durante 3 minutos. Se centrifuga a 10000 rpm durante 10" y se retira el sobrenadante. Se resuspende en 250 μ l de etanol (EtOH) 100 %, se centrifuga 10 " a 10000 rpm. Se retira el sobrenadante y se repite el lavado con EtOH 100 % una vez más. Se resuspende en 60 μ l de EtOH 100 y se agita hasta homogenizar. Se mantiene en hielo hasta el momento del bombardeo. Bombardeo: se utilizaron discos de ruptura de 1100 psi. Las partículas se colocan sobre el *microcarrier* y se deja evaporar el EtOH. Minutos antes de bombardear se cortan hojas de *N. benthamiana* y se mantienen en cámara húmeda (cajas de Petri con papel húmedo). Los disparos se realizan colocando la hoja a 10 cm de distancia del *microcarrier*, después de hacer vacío hasta 23 in.Hg. Las hojas bombardeadas son mantenidas en cámara húmeda, a 26 °C con 16 hs de fotoperíodo. La medición del diámetro de halos de infección correspondientes a PVX-GUS se realiza tomando fotografías y comparando las imágenes con patrones de dimensiones conocidas.

II.25. Reacción histoquímica para GUS

El tejido vegetal donde se determina la actividad de la enzima β -glucuronidasa (expresión del gen *uidA*, GUS) es infiltrado con una solución del reactivo colorante (100 mM Tris-ClH pH 7, 2mM X-Gluc (5-Bromo-4cloro-3-indolil- β -D-glucuronic acid cycloheximide salt), 0,01 % v/v Tritón-X100, 50 mM NaCl, 2,0 mM ferricianuro de potasio), incubando *overnight* a 37°C. Posteriormente, el tejido fue

fijado incubándolo en 1 % v/v glutaraldehído en 100 mM Tris-ClH pH 7, durante 3 horas a 4-10 °C. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno, con 100 mM Tris-ClH pH 7. El tejido se decoloró de la clorofila presente incubándolo durante 5 minutos con una serie creciente de soluciones conteniendo etanol: 30 % v/v, 50 % v/v, 70 % v/v, 90 % v/v y 100 % v/v. Se rehidrató el tejido invirtiendo los lavados de la serie de etanol, manteniendo la muestra en 100 mM Tris-ClH pH 7.

II.26. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de las muestras proteicas se efectúa utilizando el equipo Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell Biorad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación del gel de poliacrilamida se siguió el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), con modificaciones como se describen en Mini-protean II Electrophoresis Cell Manual, Bio-Rad, California, EEUU. El porcentaje de poliacrilamida de los geles realizados para el análisis de las proteínas 48K y 54K, fue generalmente de 10 %.

II.27. Extracción de proteínas totales para Western blot

Inmediatamente después de colectar las hojas, 100 mg de tejido foliar se homogenizan en mortero con nitrógeno líquido y rápidamente se resuspenden en 200 µl de buffer de extracción (0,2 % p/v PVP 40000; 50 mM Tris-HCl pH 6.8; 1 % v/v β- mercaptoetanol), o en caso de analizar la presencia de la proteína 54K^{CPsV}, se utiliza buffer de homogenización (0,4 M sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 8,2, 20 % glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF) conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas (0.5 mM PMSF, 2 µg/ml Pepstatina, 10 µg/ml Leupeptina, 10 µg/ml Inhibidor de tripsina de clara de huevo, 10 µg/ml Inhibidor de tripsina de soja). Luego se incubó a 4 °C con agitación durante 30 minutos. Se centrifuga a 14000 xg por 10 minutos y al sobrenadante se le agrega un volumen igual de SB 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8; 2 % p/v SDS; 10 % v/v glicerol; 5 % v/v β-mercaptoetanol; 0,001 % p/v azul de bromofenol). Las muestras se hierven por 5 minutos y se centrifugan durante 5 minutos a 14000 xg para eliminar agregados.

II.28. *Western blot*

Para la transferencia de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE a membrana de PVDF (Polifluoruro de vinilideno) (Hybond-P, Amersham Pharmacia, Biotech) se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad (BioRad Laboratorios, California, EEUU) y se procedió de acuerdo a las especificaciones del fabricante descritas en el manual de instrucciones. Se transfirió durante 45 minutos a 100 V en buffer de transferencia (Tris 5 mM; Gly 38 mM; CH₃OH 4 %; SDS 0,01 %). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloquea con 5 % p/v de leche

descremada en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realiza un lavado en TBS durante 5 minutos en agitación. Se incuba la membrana durante 90 minutos a temperatura ambiente con la dilución adecuada del anticuerpo primario diluido en TBS-T (TBS con el agregado de 0,05 % v/v de Tween 20) con 3 % p/v de leche descremada. Se realizan 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos en agitación. Se incuba durante 90 minutos a temperatura ambiente con la dilución adecuada del anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina diluido en TBS-T con 3 % p/v de leche descremada. Se realizan 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos en agitación y un último lavado en TBS para eliminar las trazas de detergente. Para el revelado se disuelven 5 µl de NBT (nitro blue tetrazolium) y 4 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate) por ml de buffer sustrato (100 mM Tris- HCl pH 9.5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂). Se incuba la membrana en la solución resultante hasta aparición de las bandas de interés. Se detiene la reacción lavando la membrana con agua bidestilada. Para la detección de la proteína GFP se utilizó el anticuerpo monoclonal anti GFP JL-8 (Living colours, Clontech, USA) dilución 1/2500. Para la detección de la proteína mRFP o mCherry se utilizó el anticuerpo monoclonal anti mRFP 3F5 (Chromotek, Alemania) dilución 1/3000. Para la detección de las proteínas fusionada al epitope FLAG se utilizó el anticuerpo monoclonal anti FLAG (Sigma Aldrich,) dilución 1/1000. Como anticuerpo secundario se empleó suero de cabra anti-ratón IgG-HRP (Horseradish peroxidase), (BioRad, USA)

II.29. Co-inmunoprecipitación: RFP-Trap

Se empleó RFP-Trap_A de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Chromotek, Alemania) para realizar las co-inmunoprecipitaciones. Extractos proteicos totales se obtuvieron por resuspensión de una molienda de tejido foliar en buffer de lisis modificado (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20) conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas (0.5 mM PMSF, 2 µg/ml Pepstatina, 10 µg/ml Leupeptina, 10 µg/ml Inhibidor de tripsina de clara de huevo, 10 µg/ml Inhibidor de tripsina de soja). Los extractos proteicos (Input, I) fueron diluidos en buffer de lisis sin Tween-20 (buffer de dilución) para reducir la concentración del detergente a menos de 0.15%. Estos extractos fueron incubados con 20 µl de esferas de agarosa de RFP-Trap_A por 30 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 2700×g, 4 °C por 2 min, el sobrenadante fue descartado, y las esferas de agarosa se lavaron dos veces con buffer de dilución. Para liberar las proteínas de las esferas se agregaron 20 µl de glicina 0.2 M pH 2.5, que inmediatamente se neutralizaron con 2 µl de Tris-HCl 1 M, pH 10 a temperatura ambiente. Estas

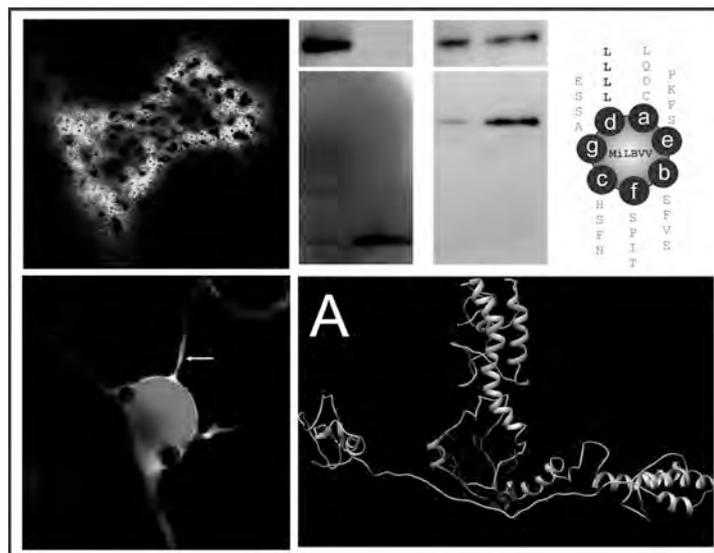
extracciones se hirvieron luego de agregar buffer de siembra a concentración 2X, por 10 min. Finalmente se centrifugo a 2700×g por 2 min (Bound, B).

II.30. Análisis de la secuencia de las proteínas de CPsV y MiLBVV

Las secuencias de las CP codificadas en los ophiovirus fueron adquiridas del GeneBank, cuyos números de acceso son para CPsV AAC41022, YP 089664, AAT72910, CAJ43825; para FreSV ACR56715, ACY40696, ABI33222; para LRNV AAT09112, YP 053239; para RWMV AAT08132; para TMMMV AAT08133; y para MiLBVV ABG67683, ADC55528, AAW82345, AAW82346, AAW82347, AAW82348, ABG67683, ABG67684 ABB04496, AAU12866, AAU12867, AAU12868, AAU12869, AAU12870, AAU12871, AAU12872, AAU12873, AAU12874, AAU12875, AAU12876, ADR31473, ADR31474, ADR31475, ADR31476, ADR31477, ADR31478, ADR31479, ADR31480, ADR31481, ADR31482, ADR31483, ADR31484, ABG67682, NP 848533, AAO49152, AAQ77398, AAQ77399, AAQ77400, AAQ77401, AF525936 4, ACX37416 and ACX37417. Estas secuencias fueron alineadas con el algoritmo Clustal W utilizando el programa MEGA versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Los motivos o dominios fueron analizados con el programa MotifScan , MyHits database (Hulo *et al.*, 2008; Pagni *et al.*, 2007). La localización subcelular fue predicha utilizando Wolf Psort (Nakai and Horton, 1999) se calculó el índice de localización (IL) como $IL = (\text{n}^\circ \text{ de proteínas relacionadas de X localización} / \text{n}^\circ \text{ total de proteínas relacionadas})$. La búsqueda de dominios de las CP fue llevada a cabo también por el servidor Phyre² (Kelley & Sternberg, 2009). La búsqueda de señales de localización nucleolar (NoLS) se realizó con el servidor NoD (Scott *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2011). También se analizó la presencia de dominios GW/WG que median la interacción directa con AGO con el servidor empleado fue AGO (Zielezinski & Karlowski, 2011).

Capítulo III

Localización subcelular de las proteínas de cubierta de CPsV y MiLBVV



Introducción

III.1. La Proteína de Cubierta viral

La proteína de cubierta (CP, del inglés *coat protein*) de los virus es la encargada de cubrir o encapsidar el genoma viral, protegiendo al genoma de su degradación, y permitiendo el desarmado del virión para su replicación y expresión. En ésta función estructural, existe una interacción específica entre el genoma y las subunidades de CP, así como también una interacción entre los monómeros de CP. El ejemplo emblemático es la CP de TMV. La partícula viral de TMV se caracteriza por ser una varilla de aproximadamente 300 nm de largo y 18 nm de ancho, que presenta una alta resistencia a factores ambientales pudiendo persistir en el ambiente por muchos años. El análisis estructural de la misma demostró que el RNA viral toma la conformación de una hélice y la CP se agrupa alrededor de la misma, formando la ampliamente conocida estructura de bastón (Klug, 1999).

Así como existen otras proteínas virales que pueden contribuir al ensamblado y desensamblado de las partículas virales, otras funciones además de la estructural, han sido asignadas a las CP. Entre ellas se encuentran vinculadas al movimiento viral, la interacción virus-vector, la regulación de la replicación, la traducción de las proteínas virales y la modificación del ambiente celular haciéndolo propicio para la infección.

III.1.1. CP en el movimiento viral

La CP es indispensable para el movimiento viral de aquellos virus que se mueven como virión a la célula adyacente, como el caso de *Cowpea mosaic virus* (CPMV), y es en los plasmodesmos, donde existe una interacción específica entre la CP del virión y la proteína de movimiento (van Lent *et al.*, 1991). Otros virus como los potexvirus requieren de la CP para el movimiento viral, aunque se desconoce si se mueven como viriones o como ribonucleoproteínas no encapsidadas en donde la CP está presente (Chapman *et al.*, 1992; Forster *et al.*, 1992; Sit & AbouHaidar, 1993).

En el caso de TMV la CP es indispensable para el movimiento célula-a-célula en *Nicotiana benthamiana*. Se han descrito mutantes de la CP que no pueden moverse a otros tejidos, pero sí lo hacen célula-a-célula, indicando que TMV se mueve a la célula adyacente en una forma no encapsidada (Holt & Beachy, 1991), mientras que para su movimiento a larga distancia requiere de la

CP. Posteriormente se demostró que además de no requerir la CP para moverse a la célula adyacente, se mueve célula-a-célula directamente como VRCs (Kawakami *et al.*, 2004).

III.1.2. CP en la interacción con el vector

La permanencia de un virus en la naturaleza se sustenta en la capacidad de infectar nuevos individuos. Para lograr este movimiento planta-a-planta, la mayoría de los virus han utilizado organismos móviles denominados vectores. Los vectores conocidos de virus de plantas son artrópodos, nemátodos y hongos, a este último grupo pertenece el vector de la mayoría de los ophiovirus. Las especies de hongos que han sido encontradas como vectores de virus de plantas son *Olpidium brassicae*, *Olpidium bornobanus*, *Polymyxa graminis*, *Polymyxa betae* y *Spongospora subterranea* (Campbell 1996).

Resulta evidente que debe existir una interacción entre algún componente del vector con componentes del virus que transportan, y aún más si el virus puede mutiplicarse en el vector. Las proteínas de la envoltura, y para los virus no envueltos generalmente la CP o la CP junto con otra proteína viral median esta interacción. Esta interacción puede ocurrir en la superficie de la zoospora, denominada *in vitro transmission* o dentro de la misma denominada *in vivo transmission*, dado que requiere que el hongo se esté multiplicando en una planta infectada con el virus (Campbell, 1996; Rochon *et al.*, 2004).

Es decir que generalmente la CP es el factor responsable de esta interacción, la cual contribuye a la especificidad respecto a la especie de zoospora y además a la correcta transmisión del virus (Callaway *et al.*, 2001).

III.1.3. Interacción de la CP con componentes de la célula hospedante

Es esperable que las CPs también interaccionen con proteínas del hospedante vinculadas a diversas funciones celulares. Entre ellas se han descrito, CP que actúan como supresoras del silenciamiento génico, como por ejemplo la CP de *Citrus tristeza virus* (CTV) (Lu *et al.*, 2004) o la CP de *Turnip crinkle virus* (TCV) (Azevedo *et al.*, 2010). CPs que son reconocidas por el gen R de resistencia, es decir como factor de avirulencia, como es el caso de la CP de PVX por el gen Rx1 de *Solanum tuberosum* (Bendahmane *et al.*, 1999). Además, se han descrito mecanismos endógenos de regulación, mediados por fosforilación o la acción de proteínas chaperonas, vinculados a la actividad de la CPs en el ciclo viral (Ivanov & Makinen, 2012).

III.1.4. Replicación y traducción viral

La CP de *Brome mosaic virus* (BMV; género *Bromovirus*), es un ejemplo de cómo la concentración de la CP regula diferentes etapas de la infección viral. En un estadio temprano de la infección de BMV, en donde los niveles de CP son bajos, ésta favorece la replicación, ya que se une a la región 3' del genoma, que adopta estructura similar a un tRNA. En esta región se encuentra el promotor para la síntesis de la cadena genómica negativa, favoreciendo así la replicación (Chapman & Kao, 1999). Cuando los niveles de CP aumentan, en un estado más avanzado de la infección, la CP se une además a la región 5' UTR, lo que favorece el ensamblado viral y la inhibición de la traducción de los RNA virales (Yi *et al.*, 2009a; Yi *et al.*, 2009b). La CP de *Alfalfa mosaic virus* (AMV) se caracteriza por aumentar la traducción de las proteínas virales uniéndose al extremo 3' actuando como proteína de unión a poli A (PABP) que junto con el cap 5' permite la formación de RNA circular y de este modo facilita la traducción de las proteínas virales (Guogas *et al.*, 2004). Por otro lado también presenta la característica de inducir la formación de una estructura tipo tRNA en el extremo 3' del RNA genómico. Esta estructura es reconocida por la polimerasa viral para la síntesis de la cadena negativa, observándose que la presencia de la CP induce la formación del complejo RdRp-RNA, con lo cual la CP induce la iniciación de la replicación viral (Reichert *et al.*, 2007).

III.2. La CP de ophiovirus MiLBVV, CPsV y RWMV

La ubicación genómica del gen de la CP de CPsV fue realizado mediante secuenciación del genoma del aislamiento CPV4. Los ORFs ubicados en los RNAs 2 y 3 de CPV4 fueron clonados y expresados en un sistema heterólogo. Mediante esta metodología se determinó la reactividad de las proteínas codificadas en cada RNA, usando un suero anti-partícula viral, determinándose la ubicación del gen de la CP en el RNA 3 de CPsV (Sánchez de la Torre *et al.*, 1998). Como se mencionó en la introducción general, la proteína 48K o CP de CPsV, es una proteína estructural, siendo parte probablemente del complejo ribonucleoproteico (García *et al.*, 1991; García *et al.*, 1994). Por otro lado, se han observado diferencias en la movilidad electroforética de las CPs de distintos aislamientos de CPsV. El aislamiento argentino CPsV 90-1-1 presenta un peso molecular de alrededor de 50 kDa (García *et al.*, 1991) mientras que el aislamiento estadounidense CPV 4 es de alrededor de 48 kDa (Derrick *et al.*, 1991; García *et al.*, 1994). Esta diferencia aún no ha sido explicada, ya que no se justifica por la secuencia nucleotídica del gen, o secuencia primaria de la proteína, lo que induce a pensar en modificaciones post traduccionales.

Posteriormente, en su tesis doctoral, Eduardo Peña inició el estudio de la localización subcelular de la CP de CPsV (CP^{CPsV}) en tejido infectado con CPV 4. Para eso se prepararon fracciones subcelulares de tejido infectado que fueron analizados por *Western blot*. Los resultados mostraron que en *Citrus sienensis* y en los hospedantes experimentales *Chenopodium quinoa* y *Gomphrena globosa*, la CP^{CPsV} se acumulaba en la fracción soluble y no se encontraba en la fracciones enriquecidas en núcleo y cloroplasto, microsomal, ni en pared celular (Peña, 2009). Estos resultados fueron coincidentes con las observaciones previas de otro ophiovirus, RWMV cuya CP fue detectada en el citoplasma de células infectadas, por microscopía electrónica (Vaira *et al.*, 1997). El Dr. Peña también realizó los primeros estudios que vincularan la CP^{CPsV} con el movimiento viral y la supresión del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional. Así, el análisis del movimiento, llevado a cabo por trans-complementación de un virus mutante en esta función, *Potato virus X* (PVX-GUS BspI) (Morozov *et al.*, 1997), mostró en dos ensayos independientes, que la CP^{CPsV} no complementa la función de movimiento célula-a-célula de PVX-GUS BspI. El análisis de supresión del PTGS, por un ensayo de expresión transitoria en *N. benthamiana*, mostró que CP^{CPsV} no presentaría actividad de supresión local ni sistémica (Peña, 2009). En este trabajo de tesis, no sólo se confirmaron algunos de estas propiedades sino que además se abordó el estudio de la CP de MiLBVV. Para ello, se utilizaron aislamientos platenses de MiLBVV, denominados MiLBVV-LP1 y MiLBVV-LP2 obtenidos previamente (Barcala Tabarozzi *et al.*, 2010).

A continuación se muestran los resultados del estudio de las CPs de los ophiovirus CPsV y MiLBVV.

Objetivos

Determinar la localización subcelular de las proteínas de cubierta de CPsV y MiLBVV e interacciones CP-CP homólogas y heterólogas.

Resultados

En este capítulo se muestran los resultados de la localización subcelular de las CP de CPsV y MiLBVV, el análisis de las interacciones CP-CP, y la caracterización parcial del dominio que estaría involucrado en esta interacción, indispensable para la formación de la partícula viral. Los ensayos fueron realizados principalmente en células epiteliales de *N. benthamiana* expresando fusiones traduccionales a proteínas fluorescentes, las cuales fueron observadas y analizadas por microscopía confocal.

III.1. Vectores binarios para la expresión ectópica de las CPs fusionadas a proteínas reporteras

Se realizaron fusiones traduccionales a proteínas fluorescentes como se describe en Materiales y

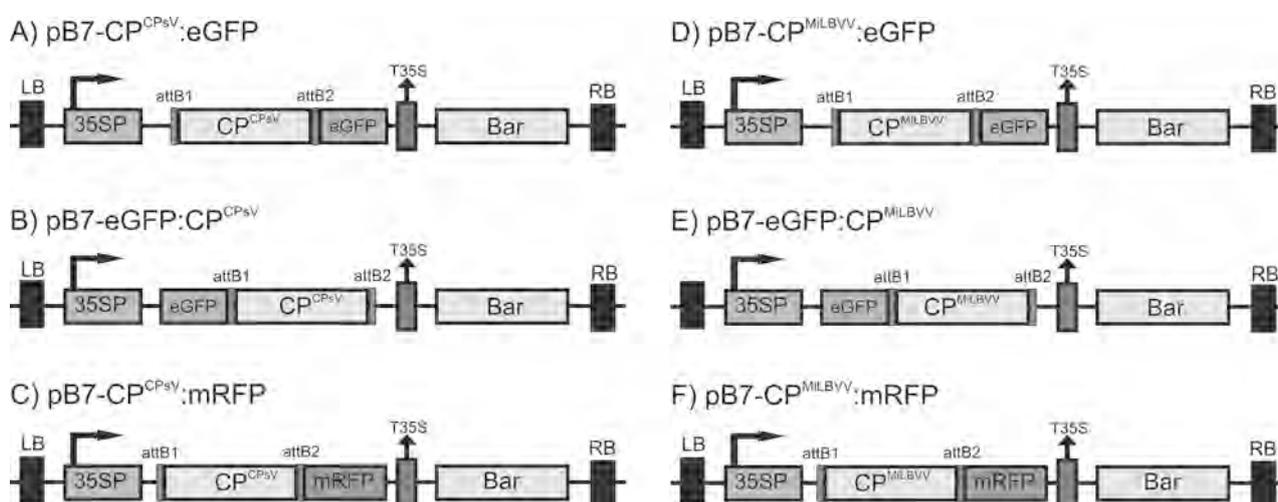


Figura III.1. Representación esquemática de la región T-DNA de los plásmidos recombinantes construidos para la expresión transitoria de las proteínas virales (A) CP^{CPsV} fusionada a eGFP al extremo C-terminal; (B) CP^{CPsV} fusionada a eGFP al extremo N-terminal; (C) CP^{CPsV} fusionada a mRFP al extremo C-terminal; (D) CP^{MiLBVV} fusionada a eGFP al extremo C-terminal; (E) CP^{MiLBVV} fusionada a eGFP al extremo N-terminal; (F) CP^{MiLBVV} fusionada a mRFP al extremo C-terminal. Abreviaciones: 35SP, promotor 35S *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); T35S, terminador 35S CaMV; LB, borde izquierdo; RB, borde derecho; Bar, gen de *phosphinothricin acetyl transferase*; attb1, sitio de recombinación 1; attb2, sitio de recombinación 2; eGFP, proteína fluorescente verde; mRFP, proteína fluorescente roja monomérica.

Métodos (Figura III.1). Con el objeto de corroborar la expresión de las CPs fusionadas a eGFP, se analizaron por *Western blot* las proteínas totales de extractos hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con los clones recombinantes. En la Figura III.2 se observa que a los 3 dpai las proteínas de fusión eGFP:CP^{CPsV}, CP^{CPsV}:eGFP, eGFP:CP^{MiLBVV} y CP^{MiLBVV}:eGFP presentan el tamaño esperado cuando se expresan ectópicamente en hojas de *N. benthamiana*.

III.2. Análisis bioinformático de las proteínas CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV}

Se analizó la secuencia de la CP^{MiLBVV} del aislamiento MiLBVV LP-2 obtenida en nuestro laboratorio (Barcala Tabarozzi *et al.*, 2010). Se buscó la localización subcelular de esta proteína por predicciones *in silico* utilizando el programa WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007), encontrando que esta proteína se localizaría principalmente en el citoplasma de la célula, ya que no sería procesada por la vía RE-Golgi. Esto es, cuando se analizó con el servidor SignalP (Petersen *et al.*, 2011), no se encontró una señal hidrofóbica que debería estar presente en una proteína que se procesa por la vía RE-Golgi. Cuando se realizó el análisis de motivos con el programa MotifScan y la base

de datos MyHits (Hulo *et al.*, 2008; Pagni *et al.*, 2007) se encontró un motivo cierre de leucinas (4 repeticiones) cuya secuencia es ²⁵³LSSADPSLFPSQVFLKISLENL²⁷⁵ y una señal de retención en la membrana de RE de tipo KKXX en la posición 433-436.

Analizando la CP^{CPsV} del aislamiento CPV 4, también se encontró que ésta proteína estaría localizada en el citoplasma, y que no sería procesada por la vía RE-Golgi. Además, a diferencia de la CP^{MiLBVV}, la CP^{CPsV} no posee una señal de retención a la membrana del ER, ni mostró claramente el cierre de leucinas, tal como lo presenta la CP^{MiLBVV}. Estos resultados serán discutidos con mayor profundidad en la sección III.5.

III.3. Las proteínas CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV} se localizan en el citoplasma

Resultados previos de fraccionamiento subcelular habían mostrado que la CP^{CPsV} se acumula en la fracción soluble de un extracto de *C. sinensis* infectado sistémicamente con CPsV, así como también en los hospedantes experimentales *C. quinoa* y *G. globosa* (Peña, 2009).

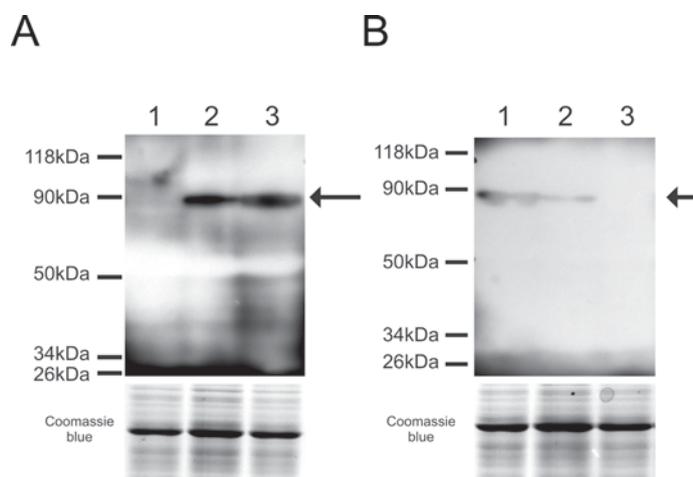


Figura III.2 Análisis de la integridad de las fusiones traduccionales. Western blot de extractos de proteínas totales de *N. benthamiana* expresando las proteínas fusionadas a eGFP, a los 3 dpi. (A) Calle 1: extracto de hojas infiltradas con agua (-); calle 2, eGFP:CP^{CPsV}; calle 3, CP^{CPsV}:eGFP. (B) calle 1, eGFP:CP^{MiLBVV}; calle 2, CP^{MiLBVV}:eGFP; calle 3, extracto de hojas infiltradas con agua (-). Por debajo de cada membrana se muestra la tinción del gel con *Coomassie blue* como control de carga para cada *Western blot*.

Este trabajo se profundizó en la localización subcelular de la CP^{CPsV} y éste estudio se extendió a la CP^{MiLBVV}.

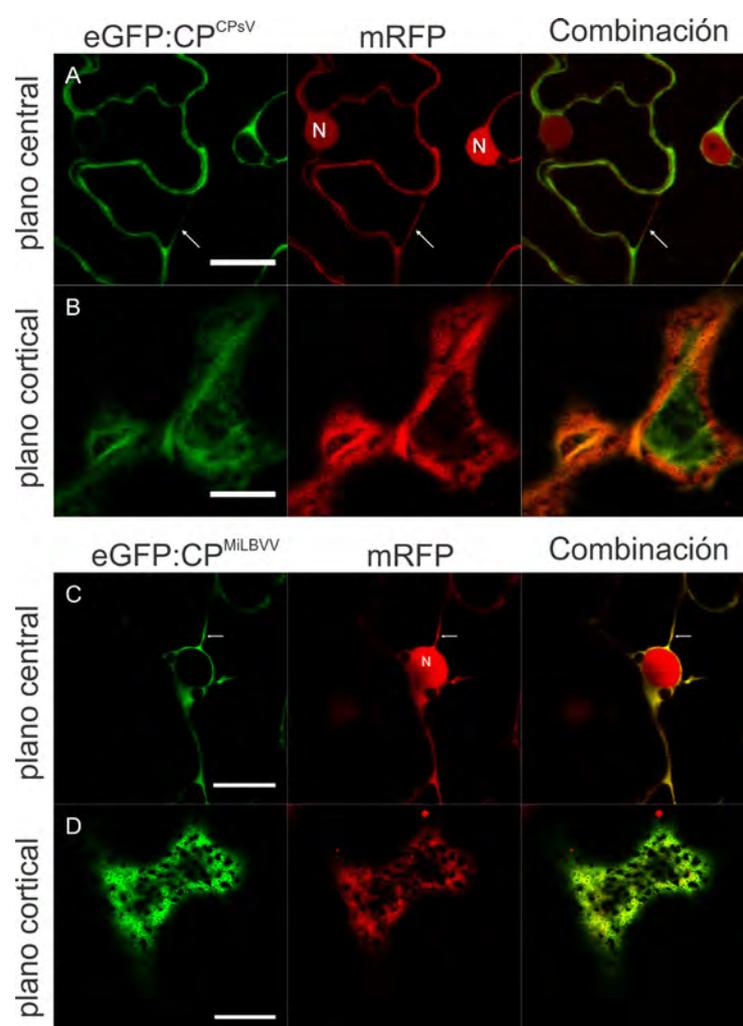


Figura III.3. Localización subcelular de CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV} fusionadas a eGFP en *N. benthamiana*. A y B: co-expresión de la proteína eGFP:CP^{CPsV} con mRFP libre (marcador inespecífico de núcleo y citoplasma) a las 48 hpai en células epidérmicas de *N. benthamiana* (A) plano central; (B), plano cortical. C y D Co-expresión de la proteína eGFP:CP^{MiLBVV} con mRFP libre (marcador citoplasmático) a las 48 hpai en células epidérmicas de *N. benthamiana* (C) plano central; (D), plano cortical. N, núcleo. Las flechas indican hebras citoplasmáticas transvacuolares. La barra representa 20 μm .

III.3.1. En células epiteliales de hojas de *N. benthamiana*

Para determinar la localización de las CP de los ophiovirus, estas proteínas virales se expresaron transitoriamente junto con marcadores subcelulares fusionados a proteínas fluorescentes distintivas por co-agroinfiltración. A 2, 3 y 4 dpai se observaron *in vivo* las células epiteliales de estas hojas por microscopía confocal de barrido laser (CSLM, del inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*)

agroinfiltradas con estas proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes, junto con marcadores de distintas localizaciones subcelulares, fusionados a proteínas fluorescentes distintivas.

Entre los marcadores empleados, la proteína mRFP se localiza en el citoplasma, y en el núcleo, localización que se explica por su fácil difusión a través del poro nuclear, debido a su pequeño tamaño, por lo que no fue necesario un marcador específico en estos compartimientos subcelulares. Como se observa en la Figura III.3 las proteínas eGFP:CP^{CPsV} y eGFP:CP^{MiLBVV} se encuentran en la región periférica citoplasmática de la célula, donde también se observa fluorescencia de la proteína mRFP. El patrón observado en la región próxima a la pared celular en el plano central (Figura III.3.A y C) sugiere que las CPs no están asociadas a la membrana plasmática, y se observa que mRFP co-localiza con ambas CPs. Además, en este mismo plano se observan hebras transvacuolares citoplasmáticas (Figura III.3.A y C, flechas) que confirma su localización. A diferencia de mRFP, ambas CPs nunca fueron encontradas en el núcleo, como se observa en la Figura III.3.A y C. Tampoco se han encontrado asociadas a elementos del citoesqueleto, ni al sistema de endomembranas, como se observa en un plano cortical (Figura III.3.B y D, flechas). Resultados similares se obtuvieron con la fusiones al extremo C-terminal, con lo cual la posición en la que se encuentra el fluoróforo no afecta la localización subcelular. Igualmente, para descartar alguna asociación de la CP al retículo endoplásmico (RE), se empleó el marcador del lumen del RE, GFP-HDEL, que posee la señal de retención en el RE, HDEL, en el extremo C-terminal. Así, se co-expresaron el marcador GFP-HDEL con las proteínas CP^{CPsV}:mRFP o CP^{CPsV}:mRFP, usando como control negativo la co-expresión de mRFP con GFP:HDEL. Como se puede observar en la Figura III.4 el marcador GFP:HDEL se localiza en una red cortical de RE, y el control mRFP, cuya localización es citoplasmática, rodea la red pero sin co-localizar con GFP:HDEL (ver panel de combinación). Cuando se co-expresan las proteínas CP^{CPsV}:mRFP y CP^{MiLBVV}:mRFP con el mismo marcador de RE, se observa claramente que las CPs no se encuentran asociadas al RE (Figura III.4B y C).

La localización de la proteína CP^{CPsV} expresada en *N. benthamiana* coincide con la localización mostrada por los ensayos de fraccionamiento subcelular realizado en el contexto de la infección

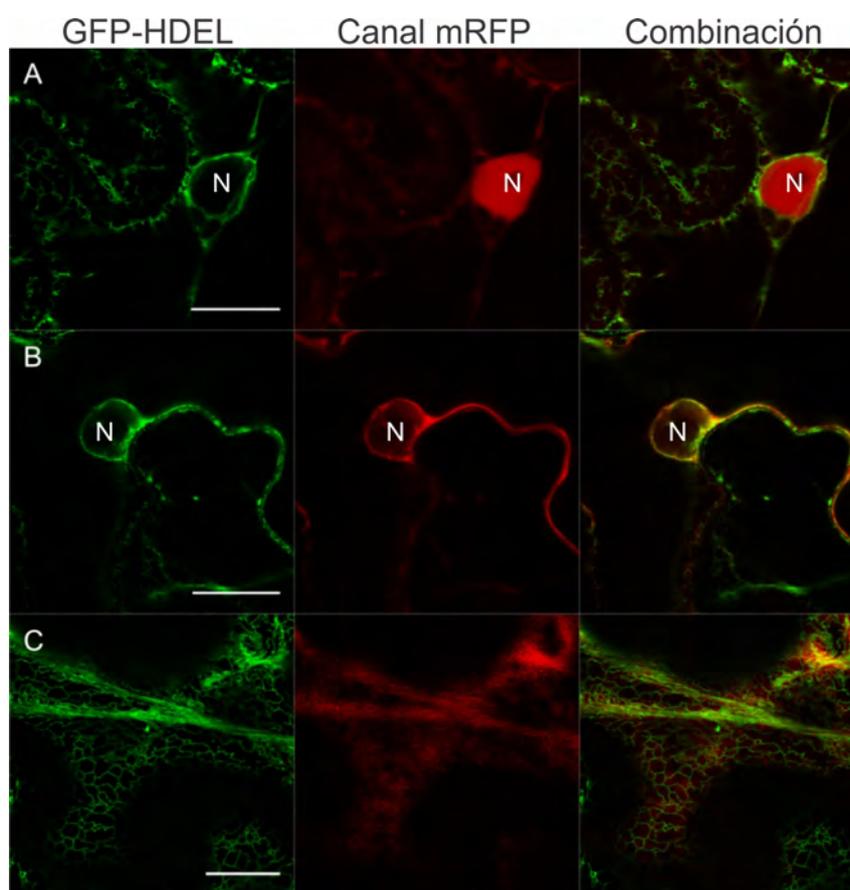


Figura III.4. Co-expresión del marcador de RE, GFP-HDEL con las CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV}. (A) Co-expresión de GFP-HDEL con mRFP, marcador inespecífico de núcleo y citoplasma. (B) Co-expresión de GFP-HDEL con CP^{CPsV}.mRFP. (C) Co-expresión de GFP-HDEL con CP^{MiLBVV}.mRFP. Esta observación se llevó a cabo a los 2 dpi. N: núcleo. La barra en A y B representa 12 μ m y en C representa 20 μ m.

(Peña, 2009).

III.3.2. En hojas de los hospedantes naturales *C. sinensis* y *L. sativa*

A fin de estudiar la localización subcelular de éstas proteínas en el contexto viral, y en el hospedante

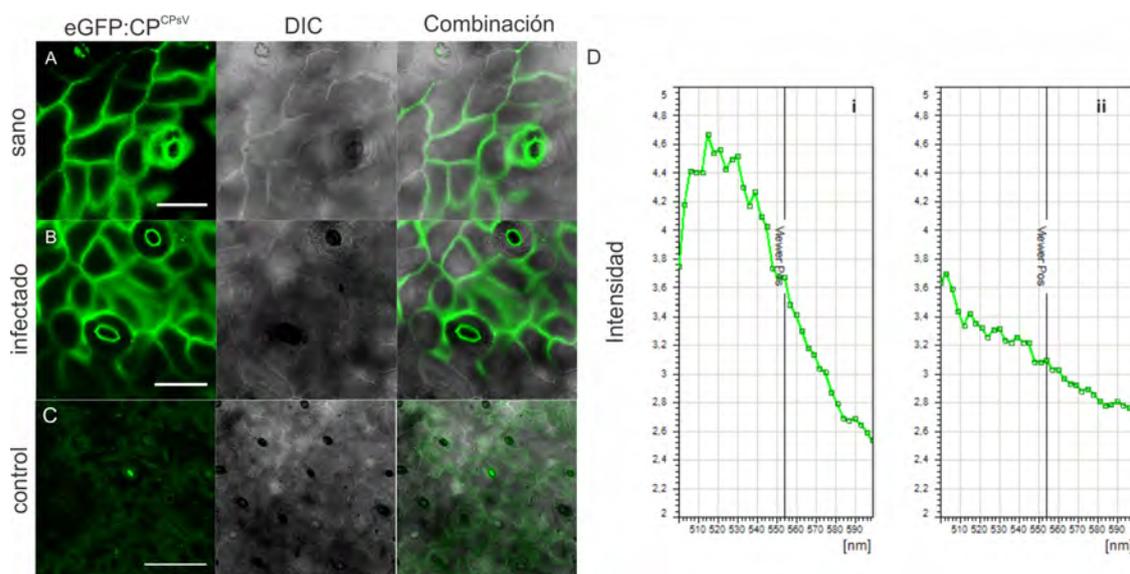


Figura III.5. Localización subcelular CP^{CPsV} en *C. sinensis*. (A) expresión de CP^{CPsV}:eGFP en *Citrus sinensis* sano a los 5 dpai. (B) expresión de CP^{CPsV}:eGFP en *C. sinensis* infectado con CPsV a los 5 dpai. DIC: contraste diferencial de interferencia. La barra corresponde a 20 μ m. (C) Células epiteliales de *C. sinensis* agrinfiltrada con *A. tumefaciens* sin vector (control de autofluorescencia) La barra corresponde a 50 μ m. (D) Análisis del espectro de emisión (500-600 nm) de células epiteliales expresando CP^{CPsV}:eGFP (i) y de células agronifiltradas con *A. tumefaciens* sin vector (ii).

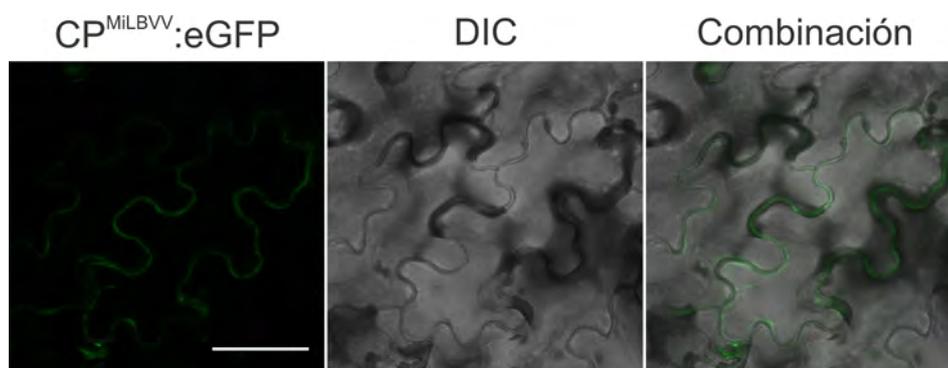


Figura III.6. Localización subcelular de la CP^{MiLBVV} en *L. sativa*. Expresión de CP^{MiLBVV}:eGFP en *L. sativa* sana a los 3 dpai. DIC: contraste diferencial de interferencia. La barra corresponde a 40 μ m.

natural, se expresó transitoriamente la CP^{CPsV}:eGFP en hojas de *C. sinensis* sano e infectado con CPsV (hojas con síntomas), mediante agroinfiltración. Luego de 5 dpai se observaron muestras de estas hojas por CLSM (Figura III.5A y B). En las células epiteliales de hojas de *C. sinensis*, la fluorescencia se encuentra en la periferia de la célula de forma difusa, tanto en un plano medio como en el cortical, sin observarse fluorescencia proveniente de otras estructuras celulares, ni en hojas agroinfiltradas con el *A. tumefaciens* sin vector binario (Figura III.5.C). Esta es una clara evidencia de que la CP^{CPsV} se encuentra en el citoplasma de citrus cuando se analiza en el contexto viral, expresada

ectópicamente. Con el objeto de descartar que la fluorescencia provenga de autofluorescencia de pigmentos de la hoja, se realizó un espectro de emisión de la muestra expresando CP^{CPsV}:eGFP y se comparó con el espectro del control. Como se muestra en la Figura III.5.D se observa un máximo entre 505-530 nm característico de eGFP (Figura III.5.Di), así como una mayor intensidad con respecto al control en donde la fluorescencia es baja y no aumenta (Figura III.5.D.ii). Dado que el aislamiento platense MiLBVV-LP-2 aún contiene LBVaV, un virus asociado a la enfermedad presente en todas las plantas que se encuentran infectadas con MiLBVV, el estudio de la localización de la CP^{MiLBVV} en el contexto de la infección en su hospedante natural, *Lactuca sativa*, no pudo ser evaluada. Por lo tanto, la expresión transitoria de CP^{MiLBVV} fusionada a GFP fue observada en *L. sativa* sin infectar a los 3 dpai, encontrándose también localización citoplasmática (Figura III.6).

III.4. Interacción homóloga y heteróloga entre las CPs

Las partículas virales observadas por microscopía electrónica de transmisión han sido descritas como filamentos ribonucleicos delgados superenrollados con forma de ovillo (García *et al.*, 1994), en donde la CP se encuentra cubriendo el RNA genómico, en íntimo contacto, sugiriendo una fuerte interacción entre las subunidades de la CP. Con el objeto de demostrar esta interacción CP-CP, se aplicaron dos técnicas diferentes que permitieran evidenciar en forma independiente tal interacción. Se empleó la técnica de *Fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM) y de co-inmunoprecipitación. Mediante FLIM se determinó la interacción entre las proteínas CP^{CPsV}:eGFP y CP^{CPsV}:mRFP analizando el tiempo de vida medio de la proteína GFP en estado excitado (τ). Como control negativo de interacción se utilizó mRFP libre expresada con CP^{CPsV}:eGFP. Es de esperar que si existe interacción proteína-proteína, el τ de GFP sea menor respecto del τ que resulte cuando no existe interacción, dado que la presencia de mRFP en la proximidad permitiría una desexcitación más rápida, esto es, por transferencia de energía de eGFP (donor) a mRFP (aceptor).

III.4.1. Interacción homóloga de la CP^{MiLBVV}

Cuando sólo se expresó la proteína CP^{MiLBVV}, el τ de 2.59 ns (DS=0,07; N=25) (Figura III.7.I.A y D), mientras que cuando se co-expresó CP^{MiLBVV}:eGFP junto con mRFP el τ fue de 2,52 ns (DS=0,07;N=21) (Figura III.7.I.B y D), es decir sin cambio significativo ($p < 0.01$). Sin embargo, cuando CP^{MiLBVV}:eGFP fue co-expresada con CP^{MiLBVV}:mRFP el τ detectado fue de 2,34 ns (DS=0,06 ; N=23) (Figura III.7.I.C y D), es decir significativamente diferente al obtenido cuando sólo se expresa

CP^{MiLBVV}:eGFP ($p < 0,01$). Con estos τ se puede estimar el porcentaje de energía transferida (FRET del inglés, *Fluorescence resonance energy transfer*) (%FRET) como $\%FRET = (1 - \tau_d / \tau_a) \times 100$, el cual fue de 10% para estas proteínas. Estos resultados indican que la CP^{MiLBVV} presenta interacción homóloga en células epiteliales de hojas de *N. benthamiana*. Una segunda evidencia de ésta interacción se obtuvo por co-immunoprecipitación. Con este objetivo, se co-expresan *in planta* las proteínas en estudio, mediante ensayo transitorio en hojas, a partir de las cuales se extraen las proteínas totales (fracción cruda: I). De ésta fracción I, se inmunoprecipita una de las proteínas en estudio con un anticuerpo específico. Posteriormente, en el precipitado (fracción unida: B), se analiza la presencia de la proteína con la que supuestamente interacciona. En este estudio se co-expresaron *in planta* las CP^{MiLBVV} fusionadas al C-terminal a eGFP y a mRFP. Como control negativo se co-expresó mRFP libre junto con CP^{MiLBVV}:eGFP. Como se observa en la co-expresión de los controles, en la calle correspondiente a la fracción B no se encuentra la fusión CP^{MiLBVV}:eGFP mientras se observa la banda correspondiente a mRFP libre, mostrando que no precipita junto con mRFP. La presencia de CP^{MiLBVV}:eGFP se corrobora en la fracción I. Es decir, en estas condiciones no detectamos interacciones inespecíficas entre CP^{MiLBVV}:eGFP y mRFP (Figura III.7.II. membranas de la izquierda). En las mismas condiciones se evaluó la interacción homóloga. Como se observa en la Figura III.7.II (membranas de la derecha), cuando se co-expresa CP^{MiLBVV}:mRFP y CP^{MiLBVV}:eGFP, esta última co-precipita junto con CP^{MiLBVV}:mRFP (fracción B), mostrando que existe interacción homóloga entre ellas.

Estos resultados indican que la CP^{MiLBVV} presenta interacción homóloga en células epiteliales de hojas de *N. benthamiana*.

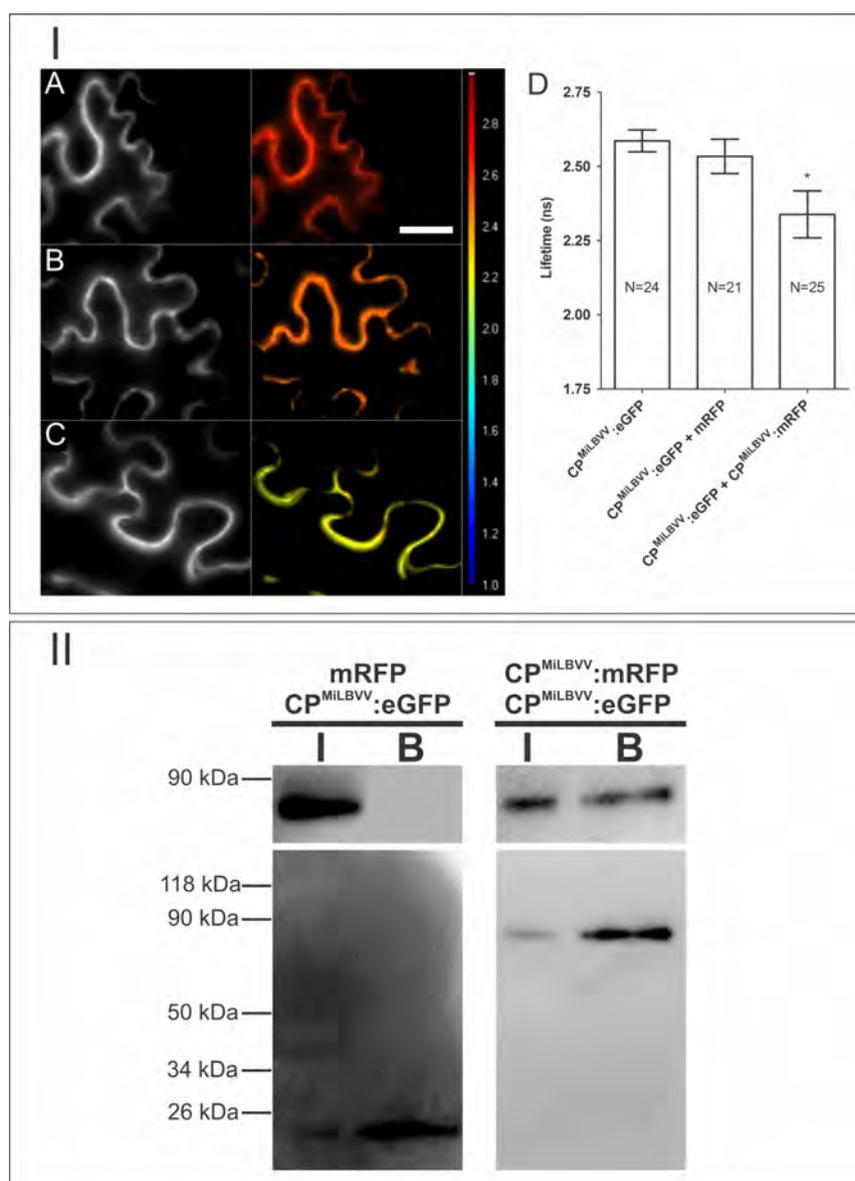


Figura III.7. Interacción homóloga de CP^{MiLBVV} *in vivo*. (I) Análisis por FRET-FLIM de las proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes en células epiteliales de *N. benthamiana*. Expresión de CP^{MiLBVV}:eGFP (A) sola, (B) con mRFP, (C) con CP^{MiLBVV}:mRFP. El panel izquierdo muestra las imágenes de intensidad de fluorescencia y a la derecha imágenes de tiempo de vida de fluorescencia en la escala de color, mostradas de A-D, con valores que van desde 1 ns (azul) a 3 ns (rojo). La barra representa 20 μ m. (E) Análisis estadístico de los tiempos de vida de la fluorescencia: τ , tiempo de vida de la fluorescencia (ns); DS, desviación estándar; n, número de células analizadas; N, número de experimentos independientes. Los asteriscos representan una diferencia significativa con un $p < 0.01$ comparada con cuando sólo se expresa CP^{MiLBVV}:eGFP. (II) Interacción homóloga de CP^{MiLBVV} analizada por co-inmunoprecipitación. Luego de inmunoprecipitar con mRFP-Trap las fracciones crudas (I) o unidas (B) fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas por western blot usando anti-GFP (α -GFP) (panel superior) o anti-RFP (α -RFP) (panel inferior). Las interacciones analizadas están indicadas en cada membrana. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular.

III.4.2. Interacción homóloga de la CP^{CPsV}

Los mismos ensayos se llevaron a cabo con la CP^{CPsV}. Cuando sólo se expresó la proteína CP^{CPsV}:eGFP, el τ fue de 2.59 ns (DS=0,04; N=22) (Figura III.8.I.A y E), y cuando se co-expresó junto con mRFP el τ resultó 2,53 ns (DS=0,08; N=21), es decir, sin cambio significativo ($p < 0.01$) (Figura III.8.I.B y E). Sin embargo, cuando CP^{CPsV}:eGFP fue co-expresada con CP^{CPsV}:mRFP el τ fue de 2,1 ns (DS=0,1; N=24), el cual fue significativamente diferente comparado cuando sólo se expresa CP^{CPsV}:eGFP ($p < 0,01$) (Figura III.8.I.C y E). El % de FRET para el par CP^{CPsV}:eGFP-CP^{CPsV}:mRFP es de 11%.

Una segunda evidencia de ésta interacción se obtuvo por co-inmunoprecipitación. Para esto se expresó la proteína CP^{CPsV}:eGFP junto con mRFP (control negativo) y CP^{CPsV}:eGFP + CP^{CPsV}:mRFP. Se analizaron las fracciones B y I. Encontrando que todas las proteínas se encuentran en la fracción y, mientras que para el primer par sólo se detecta mRFP, como era de esperar (Figura III.8.II.A, membranas de la izquierda), mientras que el segundo par de proteínas muestra que la CP^{CPsV}:eGFP se encuentra en la fracción B (Figura III.8.II.A, membranas de la derecha)

Estos resultados indican que la CP^{CPsV} presenta interacción homóloga en células epiteliales de hojas de *N. benthamiana*

III.4.3. Interacción heteróloga de las proteínas CP^{MiLBVV} y CP^{CPsV}

A fin de evaluar la especificidad de la interacción homóloga, y al mismo tiempo, determinar si hubiera una interacción entre las CPs de los dos ophiovirus, se co-expresó CP^{CPsV}:eGFP junto con CP^{MiLBVV}:mRFP. Como se observa en la Figura III.8.I.D y E, para la primera de ellas el τ fue de 2,25 ns (DS=0,06; N=18), resultando significativamente diferente al τ del control cuando sólo se expresa CP^{CPsV}:eGFP ($p < 0,01$), dando 5 % FRET.

Para obtener una segunda evidencia de ésta interacción se empleó la técnica de co-inmunoprecipitación. El análisis de las interacciones heterólogas se llevo a cabo con las dos combinaciones posibles de ambas proteínas CPs fusionadas, y en los dos casos se observaron las bandas correspondientes a las proteínas CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV} fusionadas en la fracción I y B, es decir, evidenciando la interacción entre ellas (Figura III.8.II.B).

Tomando todos estos resultados, evidenciados por dos metodologías diferentes, confirman que existen interacciones homólogas y heterólogas entre las CP de los ophiovirus CPsV y MiLBVV *in vivo*.

La interacción de las CPs de los ophiovirus con sus respectivas proteínas de movimiento también fue estudiada y se mostrará en el capítulo V.

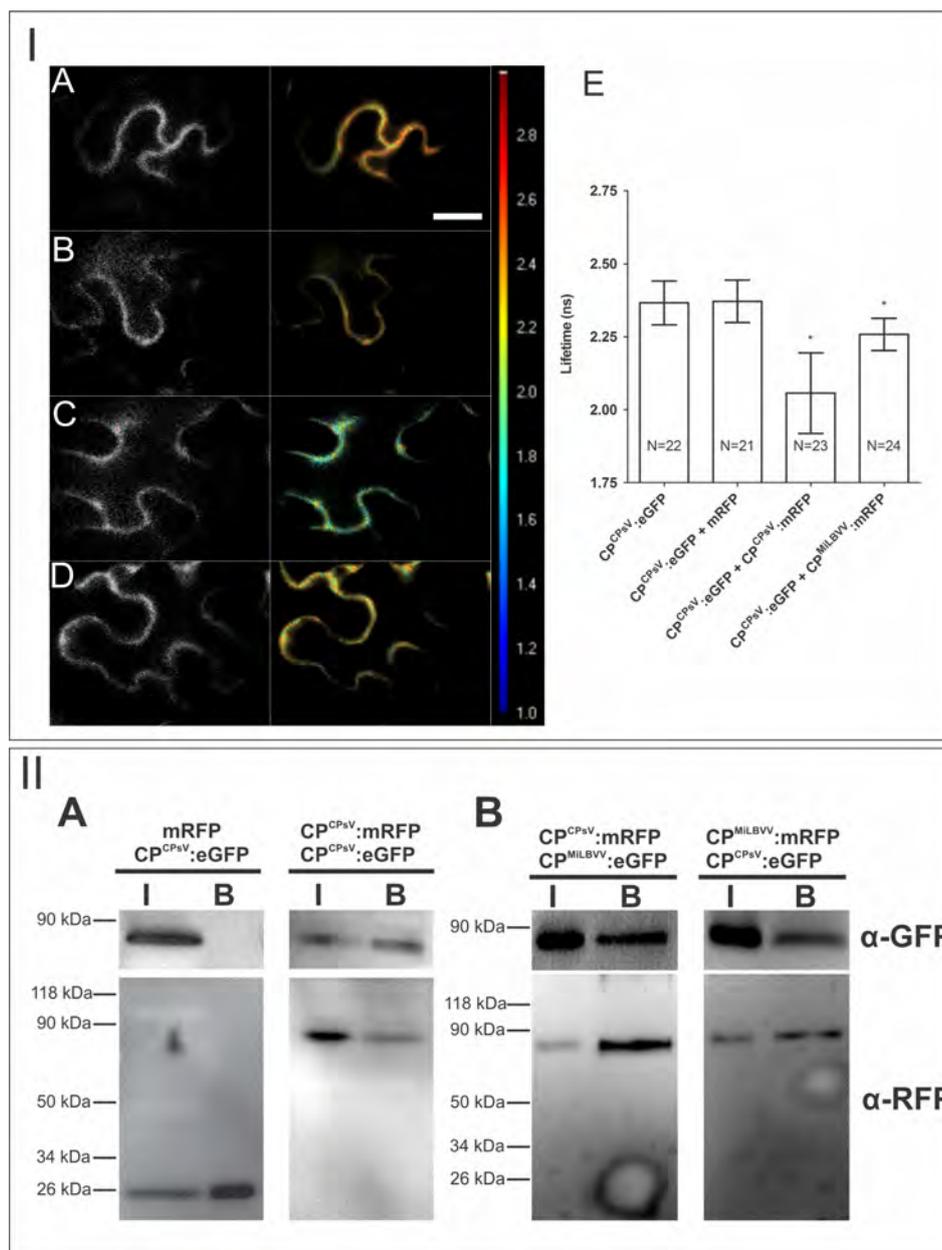


Figura III.8. Interacción homóloga y heteróloga de CP^{CPsV} *in vivo*. (I) Análisis por FRET-FLIM de las proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes en células epiteliales de *N. benthamiana*. Expresión de CP^{CPsV}:eGFP (A) sola, (B) con mRFP, (C) con CP^{CPsV}:mRFP y (D) con CP^{MILBVV}:mRFP. El panel izquierdo muestra imágenes de intensidad de fluorescencia, y a la derecha imágenes de tiempo de vida de fluorescencia en la escala de color, de A-D con valores que van desde 1 ns (azul) a 3 ns (rojo). La barra representa 20 μm. (E) Análisis estadístico de los tiempos de vida de la fluorescencia: τ, tiempo de vida de la fluorescencia (ns); DS, desviación estándar; n, número de células analizadas; N, número de experimentos independientes. Los asteriscos representan una diferencia significativa con un p < 0.01 comparada sólo se expresa CP^{CPsV}:eGFP. (II) Interacción homóloga y heteróloga de las CPs analizadas por co-immunoprecipitación. Luego de inmunoprecipitar con mRFP-Trap las fracciones crudas (I) o unidas (B) fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas por *Western blot* usando anti-GFP (α-GFP) (paneles superiores) o anti-RFP (α-RFP) (paneles inferiores). Las interacciones analizadas se indican en cada membrana, y a la izquierda el marcador de peso molecular.

III.5. Dominios involucrados en la interacción CP-CP

Como se mencionó previamente, por análisis bioinformático, se encontró un dominio de cierre de leucinas en las CPs de ophiovirus (sección III.2). Este dominio, que está descrito como de unión proteína-proteína, contiene al menos cuatro heptámeros en tándem (L-(X)₆-L(X)₆-L(X)₆-L), donde el primer aminoácido del heptámero es una leucina (L). En particular en la CP^{MiLBVV} se encuentran cuatro heptámeros. Con el fin de analizar la conservación de este cierre de leucinas entre aislamientos de ophiovirus, se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas consenso de

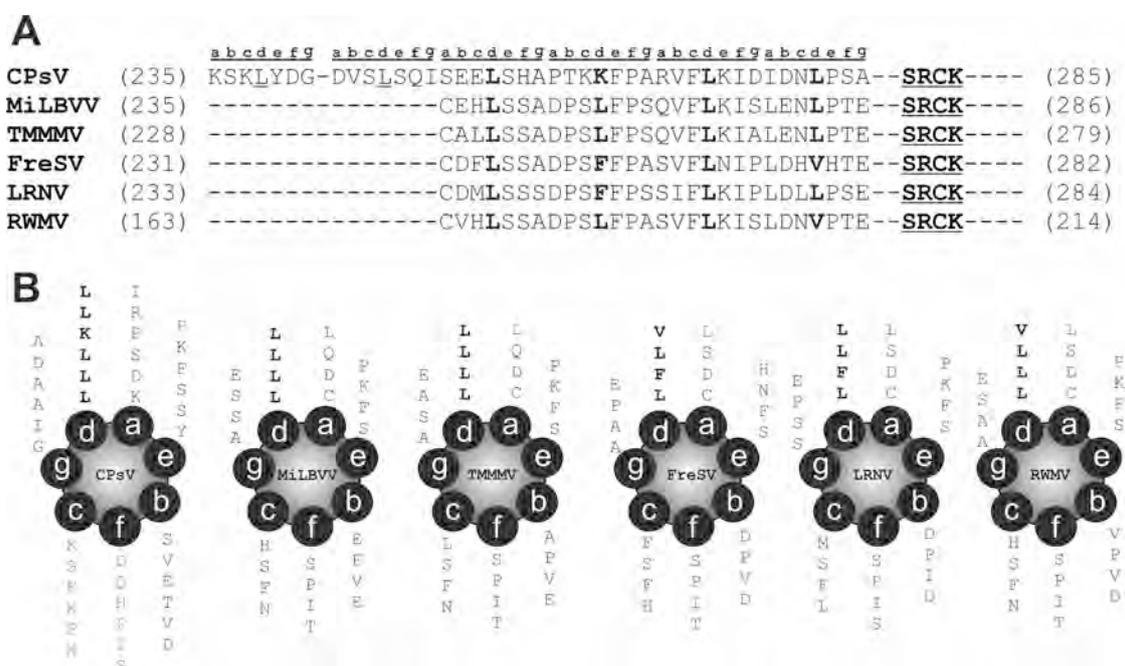


Figura III.9. Las CPs de los ophiovirus contienen un dominio probable del tipo cierre de leucinas. (A) Alineamiento de las secuencias consenso de las CPs de CPsV, MiLBVV, TMMMV, FreSV, LRNV and RWMV. Las leucinas (L) conservadas se muestran en negrita. En la secuencia de CP^{CPsV} se encontraron dos L extras que se muestran subrayadas. Las siete posiciones que representan el heptámero fueron nombradas con letras a a g. Las líneas corresponden a aminoácidos no conservados. El tetrapéptido SRCK conservado en todas las CPs se muestra en negrita y subrayado. (B) Representaciones de “Helical wheel” de cada secuencia de las CP de los ophiovirus. Los aminoácidos del heptámero se muestran con la misma nomenclatura que en (A).

las CPs de todos los miembros de la familia *Ophioviridae* (Figura III.9.A). Este alineamiento muestra que el cierre de leucinas se encuentra completamente conservado entre diferentes aislamientos de MiLBVV y de TMMMV, mientras que en el resto de las secuencias de otros ophiovirus se presentaron algunas diferencias. En esta región de las CPs, la primer y tercer L se conservan en todos los ophiovirus. En la segunda L, ésta es reemplazada por una K en CPsV, o por una F en FreSV y LRNV. La cuarta L es reemplazada por una V para FreSV y RWMV. De estos cambios el que más afectaría a este motivo es la K de CPsV, dado que el cierre leucinas se define como un saco

hidrofóbico en donde las L son raramente reemplazadas por otros aminoácidos hidrofóbicos, por lo tanto la presencia de una K en esta posición afectaría considerablemente la estructura (Krylov & Vinson, 2001). Además hacia el extremo N-terminal y contiguo a este probable cierre de leucinas la CP^{CPsV} presenta dos repeticiones más en tándem con las L antes mencionadas para las secuencias de CPsV. Realizando esquemas de rueda para estos motivos se encontró que los aminoácidos de las posiciones e y g podrían contribuir a la dimerización de las proteínas por formación de puentes salinos e-g' y e'-g (O'Shea *et al.*, 1989) (Figura III.9.B).

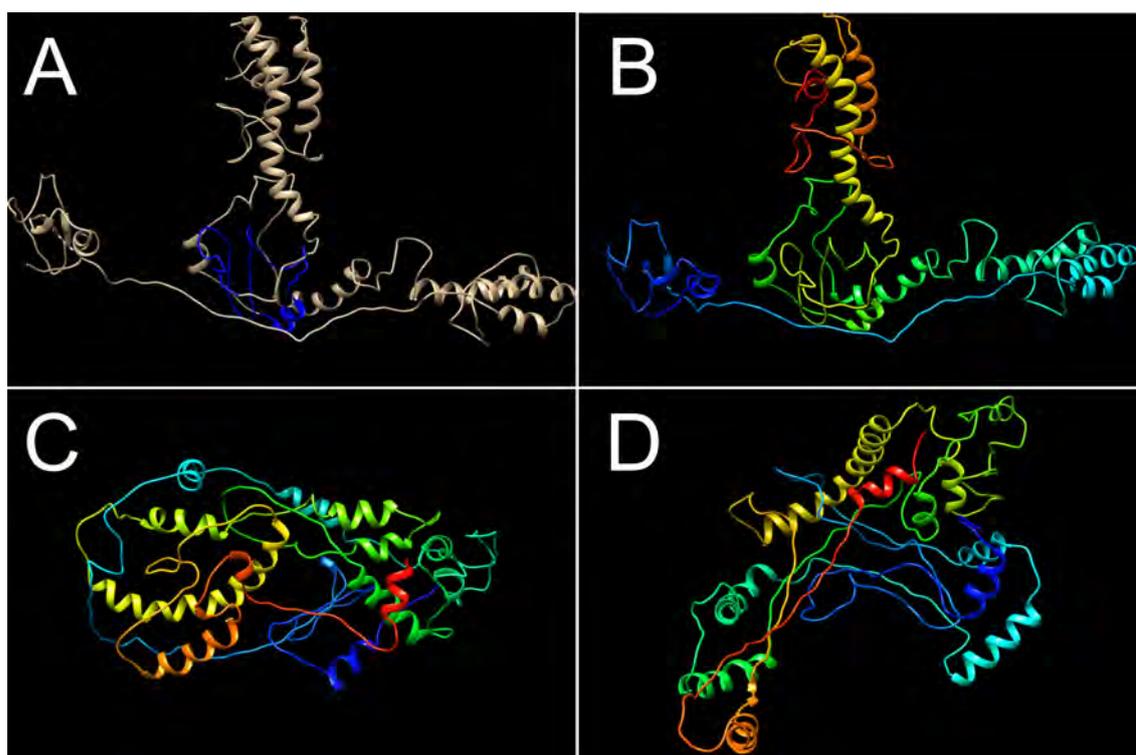


Figura III.10. La CP^{MILBVV} presenta homología con la proteína TBP. (A) Estructura 3D predicha por el servidor Phyre2 de la CP^{MILBVV}, en donde se indica en azul la secuencia que presenta homología con TBP. (B) Se indica en escala rainbow desde azul, el N-terminal de CP^{MILBVV}, a rojo, C-terminal de CP^{MILBVV}, los dominios predichos por el servidor. (C) Estructura predicha para la proteína CP^{MILBVV} ΔLeu en donde se ha delecionado el cierre de leucinas en la escala mostrada en B y D. Estructura predicha, para la proteína CP^{MILBVV}L-A en donde se han reemplazado las L del cierre de Leucinas por A en la escala mostrada en (B).

Se prepararon modelos 3D de las CP de los ophiovirus, en base al programa Phyre² que busca dominos o estructuras ya publicadas para desarrollar modelos 3D de proteínas en estudio (Kelley & Sternberg, 2009). En todas las proteínas CP^{Ophio} se encontró un dominio de *TATA-box binding protein* del factor TBP o TFIID. Sólo para CP^{MILBVV} presentó una confianza de 62,5 % (Figura III.10.A), al límite de lo recomendable. El resto de las CP^{Ophio} presentan homología con el dominio TBP-like, siendo la confianza menor al límite inferior sugerido por los programadores del algoritmo. El resto de

la estructura de CP^{MiLBVV} fue modelada por el algoritmo *ad initio*, aunque los modelos predichos con este algoritmo debe tomarse con cautela. La CP^{MiLBVV} presentaría dominios bien diferenciados. Como se observa en la Figura III.10.B el dominio N-terminal (en azul) se encuentra separado del resto de la proteína, y luego hacia el C-terminal (en cian) se encuentra otro dominio, ambos de función desconocida. En amarillo se observa el dominio que presenta homología con TBP. Por último el C-terminal (rojo y anaranjado), sería otro dominio de la proteína. Cuando se analiza el resto de las proteínas CP^{Ophio}, esperando algún tipo de semejanza con la estructura de CP^{MiLBVV}, las estructuras son más globulares y cerradas y no presentan dominios tan claros como para CP^{MiLBVV} (datos no mostrados), lo cual indica que el algoritmo podría no ser apropiado para este análisis.

Además, se analizaron *in silico* dos mutantes de interés para estudios futuros de este dominio, CP^{MiLBVV} ΔLeu y CP^{MiLBVV} L-A. En el primero se deleta el cierre de leucinas, y en el segundo se reemplazan las leucinas por alaninas. Al generar las estructuras 3D, se observó si estas mutaciones afectaban considerablemente la estructura de la proteína (Figura III.10.C y D). La proteína CP^{MiLBVV} ΔLeu pierde la estructura y la homología con TBP (Figura III.10.C), mientras que cuando se reemplaza las cuatro L con A, sigue teniendo similitud con TBP, siendo la confianza del 53 %, es decir, por debajo de lo recomendado. Además, la estructura de este mutante se ve afectada notablemente, sugiriendo que estas L contribuyen a la estructura de la proteína de acuerdo a este algoritmo (Figura III.10.D).

Conclusiones

- Las CPs de CPsV y de MiLBVV se localizan en el citoplasma de células epiteliales de *N. benthamiana*.
- Las CPs de CPsV y de MiLBVV tendrían la misma localización subcelular en sus hospedantes naturales, *C. sinensis* y *L. sativa*, respectivamente.
- La misma localización subcelular fue observada, para la CP^{CPsV}, en *C. sinensis* infectado con CPsV.
- Las CP de CPsV y de MiLBVV presentan interacción homóloga *in vivo* en el citoplasma de *N. benthamiana* cuando se las expresa ectópicamente.
- Las CP de CPsV y de MiLBVV presentan interacción heteróloga *in vivo* en el citoplasma de *N. benthamiana* cuando se las expresa ectópicamente.
- Un dominio “cierre de leucinas”, encontrado con distintos grados de conservación en las CPs de los ophiovirus, estaría involucrado en las interacciones CP-CP.

Discusión

La caracterización de las CPs de los ophiovirus contribuye al conocimiento básico de la familia *Ophioviridae*, y a los virus negativos multipartitos de plantas. La determinación de la localización subcelular de las proteínas virales, provee información acerca de las probables funciones que éstas llevan a cabo. Hasta el momento, los intentos por inmunolocalizar la CP^{CPsV} por microscopía electrónica no han sido exitosos (Robert G. Milne, IVV, Torino, Italia y Elliot W. Kitajima, Piracicaba, Brasil, comunicaciones personales). Estos resultados pudieron deberse en parte al bajo título viral y a los sueros anti-CPs utilizados, cuyos títulos resultaron bastante bajos. La única CP que se ha logrado inmunolocalizar por microscopía electrónica es la de RWMV, encontrándose en el citoplasma, planteando la hipótesis de que las partículas de RWMV se ensamblarían en esta localización (Vaira *et al.*, 1997). Dadas estas condiciones, decidimos estudiar la localización de las CPs por otras metodologías. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraban que la CP^{CPsV} se acumulaba en la fracción soluble citoplasmática (Peña, 2009). En este trabajo de tesis se analizó por microscopía confocal la localización subcelular de las CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV}. Este análisis además de verificar los resultados previos, nos permitió obtener mayor resolución, en cuanto a la distribución *in vivo* de la proteína CP^{CPsV} encontrando la misma localización para la CP^{MiLBVV}, coincidente con la hallada para CP^{RWMV}. Esto sugiere que el ensamblado de las partículas virales de los ophiovirus, o su acumulación ocurriría en el citoplasma. Estudios previos de las proteínas de nucleocapside (proteína N) de dos virus negativos como *Rice stripe virus*, (RSV) perteneciente al género *Tenuvirus* (Liang *et al.*, 2005), no envuelto, y de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), del género *Tospovirus*, envuelto, se localizan en el citoplasma formando agregados, en donde las proteínas N se encuentran interaccionando (Ribeiro *et al.*, 2009). Esta característica usualmente observada en éstos virus y otros virus de plantas no fue observada en ninguna de las CPs de los ophiovirus. Sin embargo hemos detectado interacción homóloga y heteróloga. La interacción homóloga, sin duda, ocurre en las partículas virales, ya que éstas están formadas por el RNA genómico, la CP y la RdRp. La proteína mayoritaria de éstos complejos ribonucleoproteicos es la CP, como lo muestra el hecho de que es la única proteína que se detecta en extracciones de proteínas totales de partículas de CPsV purificadas (García *et al.*, 1994; García *et al.*, 1991). La RdRp muy probablemente se encuentre en cantidades por debajo de su detección, o por su tamaño (280 Kda) podría no haber sido resuelta en las electroforesis realizadas (García *et al.*, 1994; García *et al.*, 1991). Otras proteínas virales que estuvieran en mucha menor proporción no podrían descartarse.

El empaquetado viral exige una distancia relativa muy pequeña entre los monómeros de CP. Las medidas de interacción obtenidas por FLIM indican que las PF de los monómeros de CP se encuentran en contacto cuando se expresan ectópicamente en *N. benthamiana*, pero sabemos que estas distancias son mayores que el diámetro de una partícula viral, de alrededor de 3 nm.

Por otro lado, la interacción entre la CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV} medida *in vivo*, sugiere la existencia de un dominio conservado dentro de la familia, que permitiría la interacción CP-CP, aunque no es de esperar que ocurra en la naturaleza dado que infectan diferentes hospedantes. Sin embargo, otros ophiovirus comparten el hospedante natural, como es el caso de LRNV y MiLBVV, donde podría ser probable un efecto sinérgico en lo que respecta a esta interacción. En el mismo sentido, y sabiendo que está presente LBVaV, un varicosavirus que se encuentra siempre asociado a plantas de lechuga infectadas con MiLBVV (Natsuaki *et al.*, 2002; Roggero *et al.*, 2003), sería interesante estudiar si existe interacción entre las CPs de MiLBVV y de LBVaV, y si esta interacción pudiera afectar su transmisión por el hongo vector.

Si bien las especies de la familia *Ophioviridae* se encuentran agrupadas en un solo género, *Ophiovirus*, las características encontradas en estos estudios contribuirían a diferenciar taxones, aunque aún es necesario obtener más información acerca de la biología de cada uno de ellos, la expresión génica, la función de sus proteínas y la interacción con sus respectivos vectores. La comparación de las secuencias aminoacídicas de las CPs, y su comportamiento serológico ha sido un criterio de distancia entre especies. En el caso de los ophiovirus, ese análisis mostró que CPsV está alejado del resto de las demás especies (Roggero *et al.*, 2000). Sin embargo, la interacción entre CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV} obtenida en este trabajo mediante técnicas diferentes, encuentra una estrecha relación entre estos dos ophiovirus. Esto además señala que la interacción entre monómeros de CPs podría ser otro criterio para determinar la distancia entre las especies de la familia *Ophioviridae*.

El análisis bioinformático de las CPs de todos los ophiovirus cuyas secuencias están disponibles, reveló la presencia de un dominio de tipo cierre de leucinas. Estos dominios han sido encontrados en otros sistemas que presentan interacciones proteína-proteína implicadas en funciones críticas, como factores de transcripción en eucariotes, y en proteínas virales. A modo de ejemplo, la proteína de movimiento de *Pelargonium flower break virus* (PFBV) contiene un cierre de leucinas que es esencial para conservar la infectividad en plantas (Martinez-Turino & Hernandez, 2011). La proteína UL6 de *Herpes simplex virus* (HSV-1), depende de un cierre de leucinas para su oligomerización, la formación de un anillo de portal y la encapsidación del genoma (Nellisery *et al.*, 2007; Newcomb *et al.*, 2001). Como se ha reportado en varios casos, los dominios de cierre de leucinas son críticos para la unión a

DNA (O'Shea *et al.*, 1989). Además, el estudio de los dominios involucrados en la interacción CP-CP también contribuiría al conocimiento de la arquitectura de la partícula viral.

Perspectivas

Como se mencionó en la Introducción, las CPs pueden tener otras funciones además de las estructurales, como por ejemplo estar vinculadas a la interacción con su vector. En este sentido, el vector de MiLBVV, LRNV y FreSV es *Olpidium brassicae*, y por lo tanto es esperable que regiones conservadas en las CPs de estos virus puedan estar involucradas en su interacción con las zoosporas del vector. Se ha descrito que el virus *Cucumber necrosis virus*, el cual es transmitido por *Olpidium bornovanus*, presenta sitios específicos en la CP que se unen a las zoosporas (Rochon *et al.*, 2004). Sería interesante estudiar entre las CPs de los ophiovirus cuál es el dominio responsable en la interacción partícula viral-zoospora, dado que el conocimiento de esta interacción podría aportar información sustancial para el desarrollo de estrategias de control de la enfermedad, de gran importancia para el sector hortícola.

Contamos con fuertes evidencias de que la CP^{CPsV} no está involucrada en el movimiento célula-a-célula de los ophiovirus (ver Capítulo V). Sin embargo, podría participar de forma accesoria en el movimiento célula-a-célula y/o larga distancia. Estos dos tipos de movimiento se están estudiando. Para el primero, se intenta determinar si la CP facilita el movimiento de RNA genómico a la célula adyacente (ver Capítulo V y VI); en el segundo si la CP es capaz de transcomplementar un clon infectivo de TMV mutante defectivo en movimiento a larga distancia (Belén Borniego, tesis doctoral). Estos estudios contribuirían al conocimiento de la biología de éstos virus y por lo tanto es un tema pendiente en el estudio de los ophiovirus.

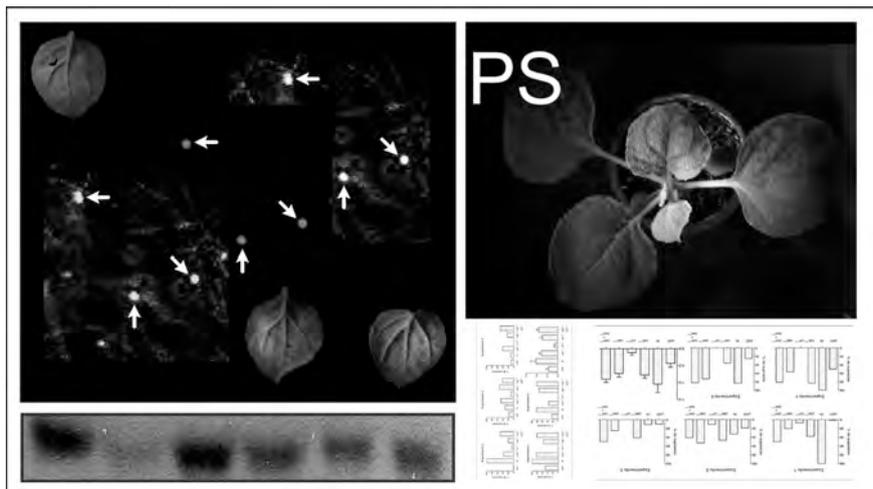
El estudio estructural de la CP y los dominios funcionales que esta contiene, están directamente vinculados con las funciones que desarrolla durante el ciclo viral. La funcionalidad del dominio cierre de leucinas encontrado se está llevando a cabo por mutaciones de delección y puntuales, CP^{MiLBVV} Δ Leu y CP^{MiLBVV} L-A, como también el análisis funcional del mismo por *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC). Estos estudios permitirán conocer como es la interacción CP-CP la cual permitirá profundizar en la estructura de la partícula, y en la interacción con otras proteínas virales y celulares, ya que la interacción CP-CP se debe poder romper y formar en diferentes situaciones del ciclo viral.

Dentro de los dominios que no han sido buscados con detenimiento se encuentra el responsable de la unión a RNA. Predicciones con el programa BindN indicarían que la región 60-90 de ésta proteína podría participar en esta función. Además, ya se mencionó que hacia la región C-terminal, en la posición 279-282, se encuentra un tetrapéptido SRCK conteniendo aminoácidos básicos, conservados en todas las CP de los ophiovirus analizados. Los aminoácidos cargados positivamente se encuentran frecuentemente involucrados en la interacción proteína-ácidos nucleicos (Chen &

Varani, 2005; Weiss & Narayana, 1998). Estos aminoácidos se encuentran en la región 60-90 en la estructura 3D generada. Sería interesante desarrollar mutantes en estas regiones y llevar a cabo estudios de unión a RNA para confirmar los aminoácidos involucrados en esta unión.

Capítulo IV

Estudio de la supresión del PTGS de las proteínas de CPsV y MiLBVV



Introducción

IV.1. Silenciamiento de RNA

El silenciamiento génico mediado por RNA es un mecanismo de regulación de expresión génica que se encuentra ampliamente distribuido en eucariotas y que controla varios procesos celulares. Este mecanismo actúa a diferentes niveles de expresión génica. Puede actuar sobre el DNA, inhibiendo la síntesis del RNA (silenciamiento transcripcional) mediante metilación y formación de heterocromatina; o bien, sobre los RNA sintetizados degradando los mismos (silenciamiento post transcripcional), o arresando los mRNA en la traducción (Figura IV.1). La especificidad de este mecanismo viene dada por la homología de secuencia nucleotídica entre las moléculas efectoras y las moléculas blanco. Las moléculas efectoras comprenden pequeños RNA (siRNA) de 21-24 nts los cuales presentan completa o parcial homología por sus moléculas blanco. Estos siRNAs se generan a partir de RNA doble cadena de mayor longitud (dsRNAs largos), por acción de las proteínas tipo *Dicer* (DCL), generando siRNAs doble cadena. Si la molécula blanco es un mRNA sólo una de las cadenas del siRNA será homóloga a esta molécula. Del siRNA doble cadena, la hebra efectora se une a un complejo proteico denominado RiSC (del inglés, *RNA-induced silencing complex*), el cual es el encargado de llevar a cabo el silenciamiento génico postranscripcional. Uno de los componentes de este complejo es la proteína Argonauta (AGO) (Ding & Voinnet, 2007; Incarbone & Dunoyer, 2013; Li & Ding, 2006). En *Arabidopsis thaliana* existen cuatro proteínas tipos *Dicer* (DCL1, DCL2, DCL3 y DCL4) y cuatro proteínas AGO (AGO1, AGO4, AGO6, y AGO9). Cada una de estas proteínas presenta una función específica. La DCL1 genera un tipo especial de siRNAs denominados micro RNAs (miRNA) (Voinnet, 2009). Mientras que las DCL4, DCL3 y DCL2 generan siRNAs de 21nt, 22nt y 24 nt respectivamente (Brodersen & Voinnet, 2006; Chapman & Carrington, 2007). En el caso de las proteínas AGO, la AGO1 participa en la acción de los miRNAs y de los siRNA producidos por la DCL4. Mientras que las AGO4, AGO6 ó AGO9 participan en la metilación de citosinas en el DNA en regiones de homología con los siRNAs de 24nt, modificando la cromatina, contribuyendo a la estabilización del genoma en regiones donde hay transposones o donde hay secuencias repetitivas (Law & Jacobsen, 2010). Los miRNAs son RNAs pequeños de 20-40 nt, codificados en el genoma de la planta, estos se transcriben por la RNA polimerasa II y son procesados en el núcleo. Su función es regular la expresión de genes principalmente del desarrollo. Esta regulación puede ocurrir arresando la traducción o por clivado del mRNA blanco. En cuerpos asociados al nucléolo

denominados D-bodies, los precursores de miRNAs son procesados por DCL1 y otras proteínas (Fang & Spector, 2007; Fujioka *et al.*, 2007; Kurihara *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007). Los miRNA procesados son exportados del núcleo al citoplasma para ejercer allí su función. Al menos en mamíferos, los miRNA actúan en agregados citoplasmáticos denominados *Processing-bodies* (P-bodies) (Jakymiw *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005a; Pillai *et al.*, 2005; Sen & Blau, 2005). En plantas se ha encontrado que además de encontrarse en el núcleo, AGO1 se encuentra libre en el citoplasma, asociada a la membrana externa del retículo endoplásmico (RE) y co-localiza con marcadores de P-bodies. Hasta el momento se ha encontrado que la función asociada al complejo de arresto de la traducción ocurre en la membrana externa de RE mientras se desconoce si AGO1 cliva los mRNAs en P-bodies o libre en el citoplasma (Rogers & Chen, 2013; Li *et al.*, 2013; Pomeranz *et al.*, 2010a; Pomeranz *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2006; Brodersen *et al.*, 2008; Voinnet, 2009; Xu *et al.*, 2006).

IV.2. Silenciamiento como mecanismo de defensa antiviral

Además de participar en la estabilización del genoma y controlar la expresión génica a nivel del desarrollo de la planta, este mecanismo ha demostrado que actúa como mecanismo de defensa antiviral, y como es de esperar los virus han encontrado formas de evitar o suprimir la acción del mismo, (Incarbone & Dunoyer, 2013; Li & Ding, 2006). Evidencias del primero surgieron de la infección de plantas transgénicas que expresan un gen viral. En estadios tempranos de la infección se observaban síntomas característicos de la infección, pero luego en las hojas superiores no se observaban síntomas, fenómeno denominado “*recovery*”. El análisis de estas plantas llevó a la conclusión de que la degradación específica del RNA también ocurría con los RNAs virales, llevando a este estado de *recovery* o de recuperación de la planta (Lindbo *et al.*, 1993). A éste proceso se lo denominó VIGS (*virus-inducing gene silencing*), y ha sido confirmado en muchos virus de plantas (Li & Ding, 2006). El estudio funcional de las proteínas virales y la caracterización de algunas de ellas llevó a determinar que existe un mecanismo de contra defensa del virus frente al VIGS, que se denomina supresión del silenciamiento, lo que aportó evidencias y herramientas para el estudio del silenciamiento en plantas, como un mecanismo no sólo de defensa viral, sino fundamentalmente de regulación de la expresión genética (Incarbone & Dunoyer, 2013; Ding & Voinnet, 2007; Voinnet, 2009).

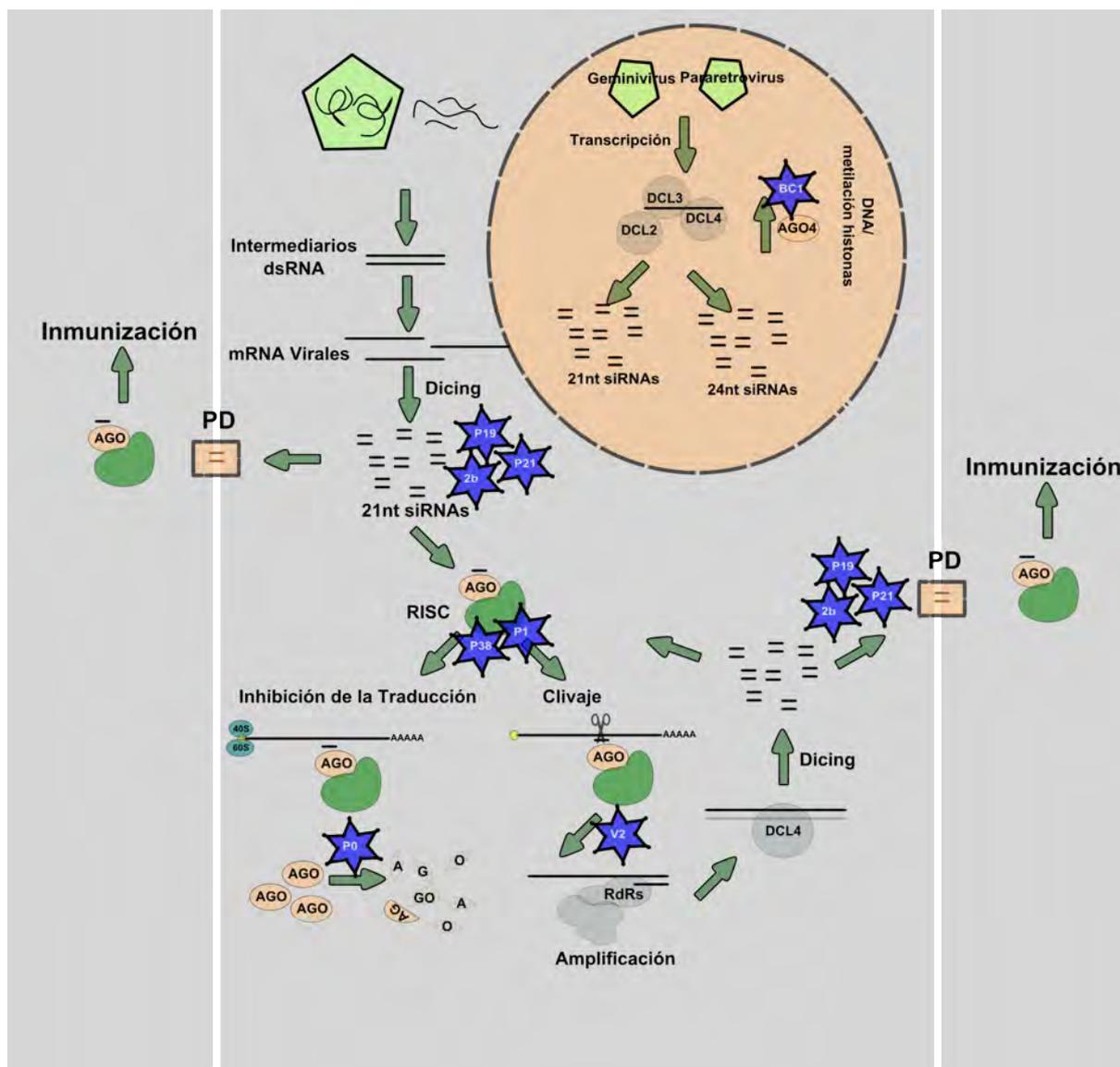


Figura IV.1. Silenciamiento de RNA viral en plantas. El silenciamiento antiviral es inducido por estructuras de dsRNA que ocurren durante la replicación viral. Éstas son procesadas en RNAs pequeños virales (vsRNAs) por DCL4, DCL3,y DCL2. Los vsRNAs se cargan en AGO y formando los complejos RISC, que guían el silenciamiento del RNA viral, clivando el mismo o arrojando su traducción. Además ocurre la amplificación de la señal dado que los vsRNAs se emplean como primers para inducir la formación de dsRNA por las RdRs celulares aumentando el sustrato de las DCLs. Estos vsRNAs pueden moverse a la célula adyacente a través de los plasmodesmos (PD) inmunizando a las mismas. Los virus a DNA, producen vsRNAs de 24nt por DCL3 que dirigen la metilación del DNA e histonas. Las supresoras virales pueden inhibir varios de los pasos esquematizados en este esquema (P19, P21, P38, P1, 2b, P0, P6, V2, and bC1), que se describen para alguna de ellas en el texto. Figura tomada de (Incarbone & Dunoyer, 2013)

Durante la replicación viral se generan estructuras de dsRNA que pueden inducir la maquinaria de silenciamiento génico. En general, estas estructuras son procesadas por las DCL4 o DCL2 generando siRNAs primarios de 21 y 22 nt. Los cuales al ser homólogos al genoma viral culminan en la degradación de estas regiones. Sumado a este proceso antiviral, la célula amplifica la señal generando

siRNAs secundarios cuyo blanco son regiones adyacentes a la región degradada por los siRNAs primarios (Figura IV.1). Estos últimos reclutan RNA polimerasas RNA dependientes (RdRp, del inglés *RNA-dependent RNA polymerases*), las cuales generan la hebra complementaria al genoma viral, donde nuevamente actúa las DCLs degradando el genoma viral (Figura IV.1) (García-Ruiz *et al.*, 2010; Qu, 2010; Qu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Además estos siRNAs generados en la célula infectada pueden moverse célula-a-célula “inmunizando” a la célula adyacente contra secuencias virales y al resto de la planta (Havelda *et al.*, 2003; Himber *et al.*, 2003; Voinnet *et al.*, 2000; Voinnet *et al.*, 1998) (Figura IV.1).

IV.3. Supresión del silenciamiento génico

El mecanismo antiviral descrito anteriormente, es la principal forma con la que cuentan las plantas para defenderse del ataque viral. Se han encontrado proteínas virales, denominadas VSR (VSR del inglés, *viral suppressor of RNA-silencing*) que pueden impedir la acción del mismo, interrumpiendo alguno o varios puntos de la cascada desencadenada por las estructuras virales (Ding & Voinnet, 2007). Como se muestra en la Figura IV.1. se pueden encontrar VSR que actúan uniendo dsRNAs y que por lo tanto inhiben el procesamiento de las proteínas Dicer, otras que unen siRNAs doble cadena y los secuestran impidiendo la formación del complejo RISC, o por interacción directa con los efectores o proteínas efectoras inhibiéndolas o desestabilizándolas (Incarbone & Dunoyer, 2013).

IV.4. Identificación de VRS

Las VRS suelen presentar una gran variabilidad en cuanto a su secuencia amoniocídica, incluso entre miembros de la misma familia de virus. Sin embargo a pesar de presentar esta variabilidad, genes ubicados en la misma posición genómica entre miembros de la misma familia codifican para VRS. Las VRS se diferencian en su mecanismo de acción, pudiendo actuar en uno o más pasos de la cascada de silenciamiento (Figura IV.1). Incluso se han encontrado virus que presentan la función supresora en más de una proteína, como es el caso de *Citrus tristeza virus* (CTV), el cual codifica para tres supresoras que actúan en evitar la diseminación de la señal de silenciamiento, p20 y CP, e impidiendo el establecimiento del silenciamiento intracelular, p20 y p23 (Lu *et al.*, 2004).

A continuación se describen las dos estrategias más utilizadas para la identificación de supresoras virales.

-Co-infiltración

Este es el método utilizado en la mayoría de la bibliografía, ya que es fácil y rápido. Se basa en la co-infiltración de dos cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* en *N. benthamiana* 16c transgénica para el gen reportero GFP. Uno de ellos permite la expresión de un inductor del silenciamiento de un gen transgénico y el otro con la probable VRS. Este ensayo puede ser evaluado de dos formas diferentes, el primero es el análisis local, es decir si en la región agroinfiltrada se establece o no el silenciamiento del reportero y el segundo es si la inducción en la región agroinfiltrada es capaz de moverse sistémicamente a toda la planta (sistémico) (Guo & Ding, 2002; Johansen & Carrington, 2001; Voinnet *et al.*, 2000).

-Injerto

Estos ensayos utilizan injertos y permiten determinar si la VRS es capaz de impedir la diseminación sistémica del silenciamiento pero no aquellas que lo suprimen localmente. Se basa en injertar en un pie transgénico que expresa y transporta una señal de silenciamiento para un gen reportero y la probable VRS. Sobre este pie se injerta una copa o brote de planta transgénica que expresa el gen reportero. A las 3 y 4 semanas se observa en el brote injertado se ha silenciado el mRNA del gen reportero (Li & Ding, 2006).

IV.4.1. VSRs que impiden la generación de siRNAs

Aunque sabemos poco sobre los mecanismos de supresión de la mayoría de las VSRs identificadas, hay algunas de ellas estudiadas en detalle. La inhibición de la producción de siRNAs, es resultado de la unión de las VSRs al dsRNA, posiblemente evitando que Dicer alcance al RNA blanco. Estudios tempranos indicaron que la proteína HcPro de TEV (*Tobacco etch virus*, del género *Potyvirus*) es capaz de favorecer la replicación de virus no relacionados (Pruss *et al.*, 1997), lo que la hacía una buena candidata a poseer una función de VSR. Al año siguiente se mostró que era capaz de revertir el PTGS establecido (Anandalakshmi *et al.*, 1998), y también se propuso que actúa *downstream* la RdRp pero que inhibe la acumulación de siRNAs, sugiriendo que la actividad de Dicer estaba impedida (Mallory *et al.*, 2001). Luego se vio que afectaba de forma negativa la actividad del RISC, y que interactúa con un complejo proteico necesario para separar el dúplex de siRNA (Burgyán, 2008).

Experimentos realizados *in vitro* muestran que la proteína B2 de *Flock house virus* (FHV, del género *Alphanodavirus*) une dsRNAs, sin especificidad de tamaño, previniendo su degradación por Dicer. De esta manera evita la generación de siRNAs, pero además, una vez formados, es capaz de secuestrarlos e impedir el ensamblaje del RISC (Chao *et al.*, 2005). Otra proteína con función similar es la proteína de cubierta de *Turnip crinkle virus* (TCV, del género *Carmovirus*), denominada P38, que primeramente se describió como capaz de evitar la acción de la enzima Dicer, secuestrando los dsRNAs sin especificidad de tamaño e impide su degradación (Merai *et al.*, 2006). Recientemente se describió que presenta un dominio de dimerización GW/WG, que permite secuestrar a AGO1 e inhibiendo el silenciamiento (Azevedo *et al.*, 2013) (Figura IV.1). La proteína P0 *Beet western yellows virus* induce la degradación de AGO por la vía de la autofagia, evitando la acción del complejo RISC. (Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Derrien *et al.*, 2012; Pazhouhandeh *et al.*, 2006) (Figura IV.1).

La proteína V2 de *Tomato yellow leaf curl virus* interacciona con un factor de la vía de amplificación mediada por RDR6, dado que presenta actividad de unión a RNA con extremos 5' protuyente impidiendo que se una este factor a sus sustrato y por lo tanto se generen siRNAs secundarios (Fukunaga & Doudna, 2009; Glick *et al.*, 2008) (Figura IV.1).

IV.4.2. VSRs que unen siRNAs

La proteína P19 codificada por *Tomato bushy stunt virus* (TBSV, del género *Tombusvirus*), es una de las VSRs mas estudiada. Ejerce su supresión uniendo específicamente siRNAs de 21 nt, impidiendo que éstos se unan al RISC (Lakatos *et al.*, 2004) (Figura IV.1). La capacidad de unir dsRNA es mucho menor para dúplex de 22 o más nt. El modelo es respaldado por la estructura tridimensional obtenida por cristalografía de rayos-X, la cual muestra que dímeros de esta proteína actúan como un “calibre” uniendo ambos extremos del siRNA doble cadena (Baulcombe & Molnar, 2004). Se sabe que una vez que el complejo RISC se ha ensamblado, la proteína P19 no puede impedir el silenciamiento, esto se debe a su incapacidad de unir los siRNAs de simple cadena como tampoco los miRNAs que forman parte del complejo (Lakatos *et al.*, 2006).

La proteína P21 de *Beet yellow virus* (BYV, del género *Closterovirus*), posee un mecanismo de acción muy similar al de la proteína P19, uniendo siRNAs, pero además une miRNAs (Figura IV.1) (Voinnet, 2005a).

La proteína AC4, de *African cassava mosaic virus* (ACMV, del género *Begomovirus*), un virus a DNA, une siRNAs y miRNAs maduros y los recluta interactuando con factores celulares involucrados en el ensamblaje del RISC o con el mismo RISC (Figura IV.1) (Chellappan *et al.*, 2005).

IV.4.3. VSRs que inhiben la diseminación de la señal sistémica

Otra estrategia utilizada por muchos virus para evadir esta línea de defensa de las plantas es evitar la diseminación de la señal sistémica de silenciamiento por el floema. Así se observó para la proteína P25 de *Potato virus X* (PVX, del género *Potexvirus*) (Figura IV.1), donde el silenciamiento sistémico inducido por mutantes de movimiento de este virus, no se producía a menos que P25 fuera inactivada (Voinnet *et al.*, 2000; Voinnet *et al.*, 1999). Luego, se vió que la supresión del PTGS es necesaria para el movimiento célula a célula de PVX, aunque no se ha podido precisar el mecanismo exacto y diferenciar el efecto de supresión del PTGS sin afectar la función de movimiento que además posee esta proteína (Bayne *et al.*, 2005). Estudios tempranos demostraron que la proteína 2b de *Cucumber mosaic virus* (CMV), era capaz de bloquear la diseminación de la señal sistémica. En experimentos donde se utilizan injertos de copa y pie de diferentes plantas, se observó que la expresión de 2b previene la diseminación del PTGS desde un pié silenciado hacia la copa. Esta diseminación tampoco ocurre si la expresión de 2b ocurre en un vástago injertado entre un pie silenciado y una copa en la que se expresa un gen reportero (Guo & Ding, 2002). Cuando esta proteína es expresada en plantas de *A. thaliana*, produce fenotipos anormales semejantes a los mutantes que no expresan AGO1, en concordancia con la observación de que AGO1 es blanco de la proteína 2b (Zhang *et al.*, 2006). Ésta no interfiere con la acumulación de miRNAs y siRNAs, por lo que se deduce que su efecto es posterior a la actividad de Dicer. Tampoco interfiere con la actividad de AGO1 de unir miRNA en la planta. En experimentos realizados *in vitro*, en presencia de 2b, AGO1 se une a los siRNA, pero no es capaz de ejercer su actividad sobre el mRNA blanco. Por otro lado no se puede descartar la unión a dsRNA o siRNAs, debido a que la misma proteína perteneciente a una cepa muy virulenta de CMV puede unir *in vitro* moléculas de dsRNA y siRNA (Goto *et al.*, 2007). Últimamente se ha encontrado que bloquea el PTGS indirectamente, interfiriendo en la respuesta de defensa mediada por ácido salicílico, que induce una RdRp de la célula hospedante, involucrada en la síntesis de siRNAs (Díaz-Pendon *et al.*, 2007). Por todas estas evidencias, podemos decir que aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento acerca de la acción de esta proteína, aún quedan muchos interrogantes por resolver.

Otra de las VSRs que interfieren en el silenciamiento sistémico es la proteína de movimiento 50K de *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV, del género *Trichovirus*). (Yaegashi *et al.*, 2007). Esta proteína no afecta el silenciamiento local ni la diseminación célula a célula del mismo, pero impide el viaje por floema de señales de silenciamiento sistémico (Yaegashi *et al.*, 2008).

El secuestro de siRNAs parece una estrategia ventajosa ya que la producción de los mismos es una característica conservada del silenciamiento génico entre todos los hospedantes. A pesar de que solamente ha sido demostrado inequívocamente para algunas pocas VSRs, es el mecanismo de acción sugerido para muchas otras como la proteína P14 de *Pothos latent virus*, P15 de *Peanut clump virus*, y Ψ B3 de *Barley stripe mosaic virus* (Merai *et al.*, 2006), todos virus con genoma a RNA de polaridad positiva.

IV.5. VRS de virus a RNA de polaridad negativa

Entre los virus de plantas con genoma a RNA de polaridad negativa, como es el caso de CPsV y de MiLBVV, también se han identificado proteínas VSRs. Las proteínas NSs, de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, del género *Tombusvirus*) (Takeda *et al.*, 2002) y NS3, de *Rice hoja blanca virus* (RHBV, del género *Tenuivirus*) (Bucher *et al.*, 2003) son capaces de suprimir el PTGS. Ambos genes tienen posiciones análogas en el genoma de estos virus (Bucher *et al.*, 2003). NS3 posee gran afinidad por siRNAs de 21 nt en células de insecto (Hemmes *et al.*, 2007), su actividad es también ejercida en células de mamíferos y se sugiere que su supresión es ejercida mediante el secuestro de los siRNAs de doble cadena, evitando la unión al complejo RISC (Schnettler *et al.*, 2008).

IV.6. VRS de los ophiovirus

Resultados previos de nuestro laboratorio indicaban que una vez establecido el silenciamiento del gen GFP en las plantas I6c (Ruiz *et al.*, 1998), al incocular estas plantas con CPsV, se observa que sólo en las plantas infectadas con CPsV el silenciamiento de GFP es revertido, indicando que CPsV puede interferir con el PTGS (Peña, 2009). En cuanto al estudio de cuál de las proteínas codificadas en este virus presenta esta capacidad, se encontró que las proteínas 24K^{CPsV} y 54K^{CPsV} podrían interferir con el silenciamiento sistémico, pero no se encontraron evidencias a favor de la supresión local, mientras que la proteína CP^{CPsV} no era capaz de interferir con el silenciamiento local o sistémico (Peña, 2009).

En este trabajo de tesis se repitieron ensayos similares, modificando las condiciones del experimento, lo que finalmente permitió poner en evidencia la capacidad supresora de las proteínas de CPsV, y este estudio se extendió a MiLBVV, en aquellos genes que están en la misma localización genómica que CPsV, confirmando así estas actividades en ambos ophiovirus.

Objetivos

Identificar la/s proteínas virales involucradas en el mecanismo de supresión del PTGS

Resultados

En este capítulo se muestran los resultados que describen la identificación de las proteínas supresoras de CPsV y MiLBVV, analizando la supresión del silenciamiento del transgen GFP de forma local y sistémica en plantas de *N. benthamiana* tipo salvaje y en la línea 16c, mediante expresiones transitorias.

IV.1. Vectores binarios para la expresión ectópica de las proteínas de CPsV y MiLBVV fusionadas a proteínas reporteras

Se realizaron fusiones traduccionales de las proteínas 24K^{CPsV}, CP^{CPsV}, 54K^{CPsV}, 25K^{MiLBVV}, CP^{MiLBVV} y 55K^{MiLBVV} a proteínas fluorescentes (eGFP y mRFP) y al epítopo FLAG, en los extremos N- y C-terminal (Figura IV.2). Estas construcciones fueron desarrolladas como se describe en Materiales y Métodos.

IV.2 Supresión local

Las VRS actúan a diferente altura de la cascada de silenciamiento, por lo que se espera que presenten diferente capacidad o eficiencia para suprimir el silenciamiento. De acuerdo a este criterio, se pueden clasificar como supresoras fuertes o débiles. El estudio de la actividad supresora de forma local se puede llevar a cabo empleando plantas *N. benthamiana* tipo salvaje (wt) o *N. benthamiana* línea 16c. En estos estudios se induce el silenciamiento de un gen reportero (*gfp*) en presencia de proteínas que podrían ser supresoras. En *N. benthamiana* wt, se sobreexpresa la región codificante para *gfp* (mRNA-GFP), lo que induce el sistema de PTGS. Mediante la acción de la proteína RDR6, que sintetiza la hebra complementaria al mRNA-GFP, se genera una molécula de dsRNA-GFP inductora del PTGS para GFP. En el caso de la línea 16c, esta planta lleva el transgen GFP-Er (Ruiz *et al.*, 1998), que puede ser silenciado post transcripcionalmente. La inducción de tal silenciamiento puede realizarse mediante expresión transitoria del RNA de GFP, sea tipo *hairpin* (horquilla generada por hebras complementarias), o *sense* (mRNA-GFP).

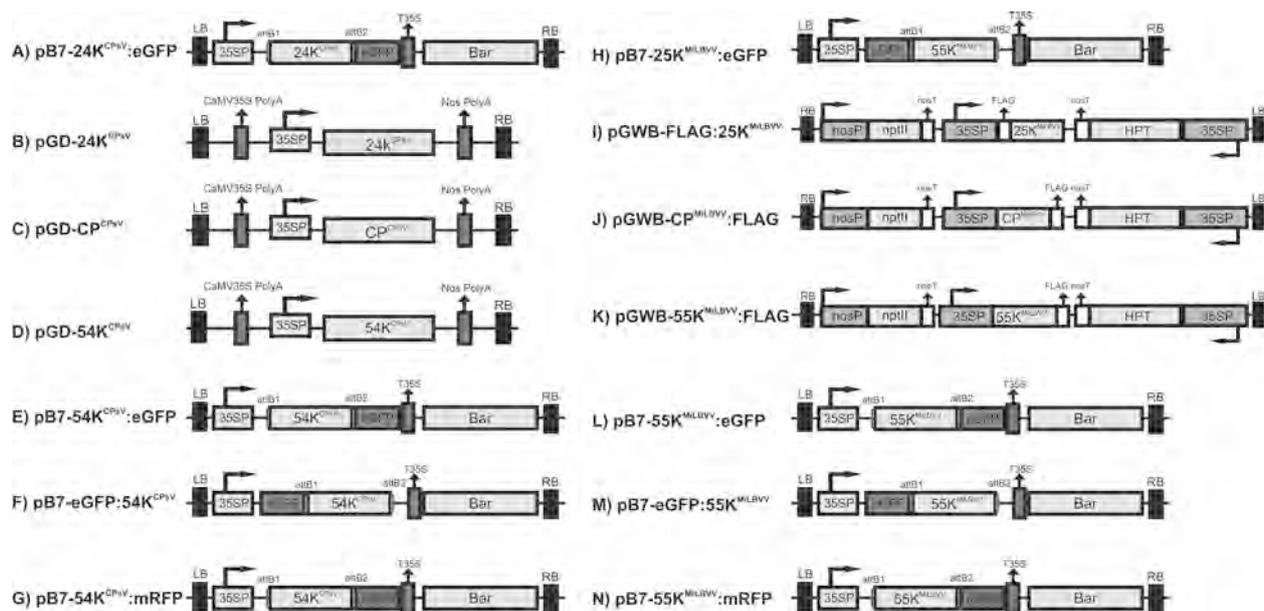


Figura IV.2. Representación esquemática de la región T-DNA de los plásmidos recombinantes construidos para la expresión transitoria de las proteínas de CPsV y MiLBVV. (A) 24K^{CPsV} fusionada a eGFP al extremo C-terminal; (B) 24K^{CPsV} sin fusionar; (C) CP^{CPsV} sin fusionar; (D) 54K^{CPsV} sin fusionar; (E) 54K^{CPsV} fusionada a eGFP al extremo C-terminal; (F) 54K^{CPsV} fusionada a eGFP al extremo N-terminal; (G) 54K^{CPsV} fusionada a mRFP al extremo C-terminal. (H) 25K^{MiLBVV} fusionada a eGFP al extremo N-terminal; (I) 25K^{MiLBVV} fusionada el epítopo FLAG; (J) CP^{MiLBVV} fusionada el epítopo FLAG; (K) 55K^{MiLBVV} fusionada el epítopo FLAG; (L) 55K^{MiLBVV} fusionada a eGFP al extremo C-terminal; (M) 55K^{MiLBVV} fusionada a eGFP al extremo N-terminal; (N) 55K^{MiLBVV} fusionada a mRFP al extremo C-terminal. Abreviaturas: 35SP, promotor 35S *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); T35S, terminador 35S CaMV; LB, borde izquierdo; RB, borde derecho; Bar, gen de *phosphinothricin acetyl transferase*; attb1, sitio de recombinación 1; attb2, sitio de recombinación 2; eGFP, proteína fluorescente verde; mRFP, proteína fluorescente roja monomérica.

En estudios previos a este trabajo de tesis, se había descartado la capacidad de suprimir el silenciamiento local de las proteínas de CPsV. Estos ensayos fueron llevados a cabo empleando el sistema de estudio que emplea *N. benthamiana* 16c y los inductores tipo *hairpin* y *sense* para GFP. Es por esto que decidimos evaluar la supresión del silenciamiento local en otro sistema. Este consiste en expresar GFP en hojas de *N. benthamiana* wt, en el que la sobreexpresión por agroinfiltración induce el silenciamiento a través de RDR6 y por mRNAs aberrantes. Es de esperar que los niveles de inductor sean más bajos que en el sistema *N. benthamiana* 16c-*hairpin*-GFP, permitiendo observar variaciones más sutiles en la supresión. De esta manera se podría observar el efecto de proteínas supresoras débiles, como podría ser el caso de las proteínas de los ophiovirus. Por otro lado, para obtener un mayor nivel de expresión de las proteínas en estudio y darle ventaja respecto a la degradación del mRNA-GFP. Esto es, se agroinfiltran las proteínas candidatas, y un día después se agroinfiltra una construcción que exprese GFP-ER, analizando los niveles de GFP en los días subsiguientes. Además

de la expresión de las proteínas de CPsV, se ensayaron las proteínas 25K^{MiLBVV}, CP^{MiLBVV} y 55K^{MiLBVV}. Como proteínas supresoras control se expresaron las proteínas P19 de TBSV, NSs de TSWV, y 2b de CMV, en paralelo con las proteínas de CPsV y de MiLBVV. Las primeras dos son supresoras fuertes del silenciamiento local, mientras que la 2b se utilizó como supresora débil, ya que puede presentar baja actividad supresora local. Como control negativo se utilizó el plásmido pGD (Goodin *et al.*, 2002).

Este ensayo fue llevado a cabo en cinco experimentos independientes, encontrando resultados reproducibles y comparables como los que se representan en la Figura IV.3.A y B. En éste experimento se agroinfiltraron cuatro hojas por cada proteína a ensayar. En la Figura IV.3.A, se muestran hojas representativas del efecto observado para cada construcción. A los 5 dpai se observó la fluorescencia de GFP-ER, asignándole niveles de fluorescencia arbitrarios: (+/-) bajo ; (+) moderado; (++) alto. Para expresar numéricamente el nivel de supresión, se consideró que cada hoja puede contribuir hasta un 25% al % total de supresión (100% para las 4 hojas) (Figura IV.3.B). El nivel de fluorescencia bajo se considero 0% de supresión, el moderado 12,5 % y el alto 25%. En la tabla se muestra el % de supresión total de las cuatro hojas. Los niveles de fluorescencia mostrados con el vector vacío fueron bajos en las cuatro hojas, es decir 0 % de supresión, mientras que para los controles positivos fueron de 100% para 2b, 75% para P19 y 100% para NSs. Las CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV} permitieron una expresión similar de GFP a la obtenida para el control negativo es decir 0 % de supresión (Figura IV.3.B), mientras que cuando se analizaron para 24K^{CPsV}, 54K^{CPsV}, 25K^{MiLBVV} y 55K^{MiLBVV} los niveles de fluorescencia fueron más altos que el control negativo, aunque inferiores a los mostrados por P19 y NSs. El % de supresión en estos casos fue de 87,5% para 24K^{CPsV}, 75% para 54K^{CPsV}, 63% para 25K^{MiLBVV} y 50% para 55K^{MiLBVV}.

El análisis a nivel molecular de uno de los experimentos se muestra en la Figura IV.3.C y D. Con el objeto de confirmar que la fluorescencia observada se debe efectivamente a GFP, y realizar una estimación de los niveles de GFP, se llevó a cabo un *Western blot* con extracciones de proteína de estas hojas, y se cuantificó la intensidad de las bandas GFP en el WB respecto de la misma membrana teñida con *Commassie blue* (Figura IV.3.C). Se calculó un cociente de intensidades de GFP/Commassie, con el objeto de obtener una estimación de los niveles de expresión. Los niveles de GFP para el control negativo no fueron detectables en las condiciones empleadas, dando un

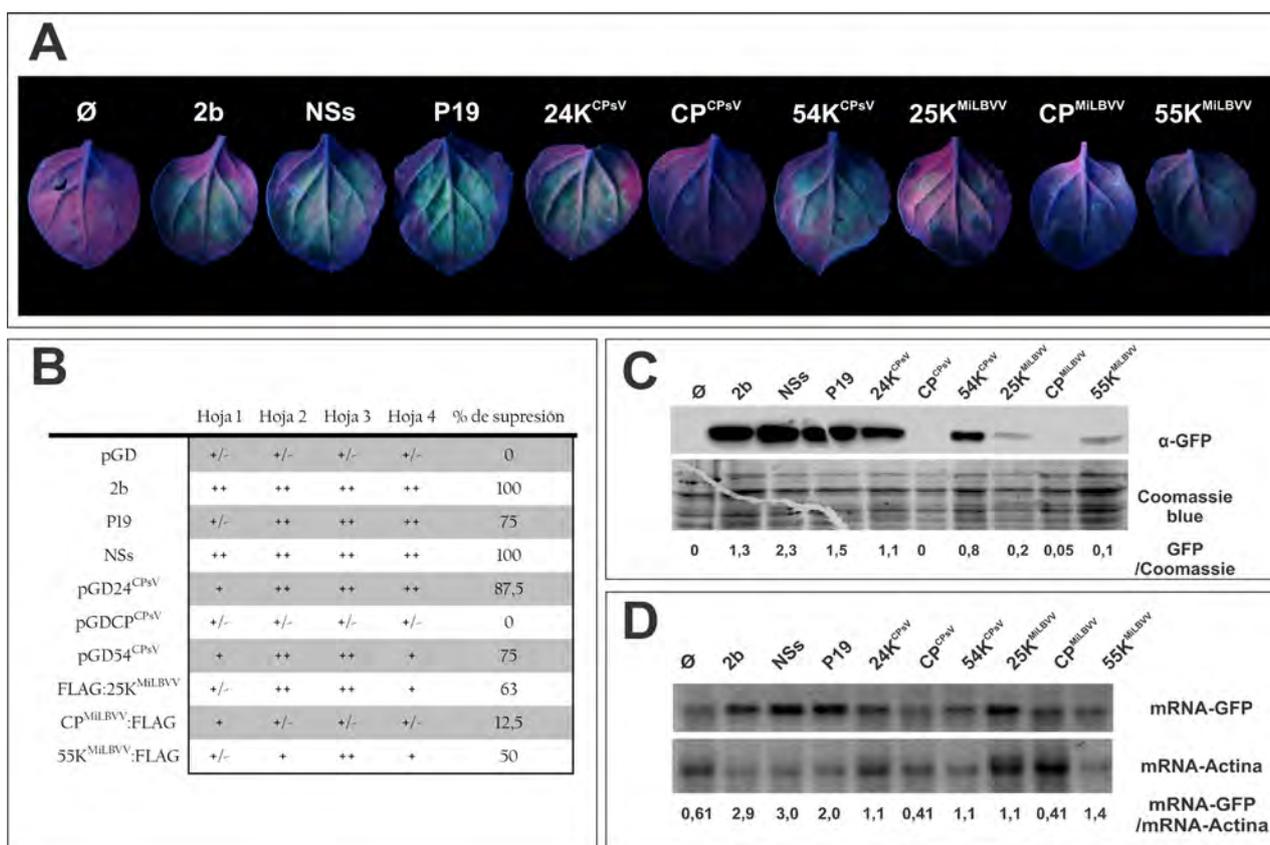


Figura IV.3. Silenciamiento local de las proteínas de CPsV y MiLBVV en *N. benthamiana wt* (A) Hojas representativas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con GFP-Er y las construcciones indicadas. (B) Niveles de fluorescencia observados en 4 hojas agroinfiltradas con la construcción indicada. El % de silenciamiento fue calculado como se indica en el texto. (C) *Western blot* de proteínas totales presentes en el tejido agroinfiltrado, revelado con el anticuerpo anti GFP (α -GFP). Como control de carga se muestra la tinción de *Coomassie blue* de la misma membrana. Se calculó la relación de intensidad de la banda de GFP respecto a la banda de mayor intensidad teñida con *Coomassie* (GFP/*Coomassie*). (D) RT-PCR semicuantitativa de RNA total de tejido agroinfiltrado con la construcción indicada, usando primers específicos de GFP y actina. mRNA-GFP/mRNA-Actina corresponde a la relación de intensidad entre las bandas de GFP y actina.

cociente GFP/*Coomassie* igual a 0. Para las proteínas 2b, P19, NSs y 24K^{CPsV} los cocientes fueron

mayores a 1. Cuando se analiza en la proteína homóloga de MiLBVV, $25K^{MiLBVV}$, el cociente fue de 0,2, inferior al encontrado para $24K^{CPsV}$ y superior al control negativo. Las CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV} , presentaron niveles no detectables y muy bajos, 0 y 0,05 respectivamente, comparables al control negativo. Para las proteínas $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$, presentaron valores del cociente GFP/Coomassie de 0,8 y 0,1 respectivamente, con lo cual también en este caso se observa una acumulación de GFP en relación al control negativo.

La acumulación de la proteína GFP es indicativa pero no suficiente para concluir que las proteínas $24K^{CPsV}$, $54K^{CPsV}$, $25K^{MiLBVV}$ y $55K^{MiLBVV}$ actúen como supresoras. Para poder arribar a esa conclusión evaluamos los niveles de mRNA-GFP y de siRNAs derivados de mRNA-GFP, esperando observar una correlación entre ellos. Como se puede observar en la Figura IV.3.D, se determinaron los niveles de mRNA-GFP por RT-PCR semicuantitativa, empleando como control de normalización el mRNA de actina. Los niveles de mRNA-GFP en el control negativo de supresión son muy bajos, el cociente mRNA-GFP/mRNA-actina fue 0,61, mientras que los controles positivos de supresión, presentaron cocientes que oscilaban entre 2 y 3. Las proteínas CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV} presentaron un valor de 0,41, es decir comparable al encontrado con el control negativo. Cuando se analizan los cocientes obtenidos para $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$, son de 1,1 y 1,4 respectivamente (Figura IV.3.D), superiores a los observados con el control negativo, pero inferiores a los controles positivos. Similarmente, las proteínas $24K^{CPsV}$ y $25K^{MiLBVV}$, resultaron con un cociente de 1,1.

Por lo tanto, de las seis proteínas estudiadas, las proteínas $24K^{CPsV}$, $25K^{MiLBVV}$, $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$ permitieron la expresión de la proteína GFP, alcanzando niveles de mRNA-GFP superiores al control negativo, disminuyendo la degradación del mismo, hecho que correlaciona con las observaciones de fluorescencia de las hojas analizadas. El análisis de los niveles de siRNAs derivados de GFP para cada tratamiento se encuentra en curso, lo que contribuirá a completar y confirmar estos resultados.

IV.3 Supresión sistémica

En este trabajo de tesis se han realizado cinco ensayos de silenciamiento sistémico independientes utilizando *N. benthamiana* 16c y *sense* GFP como inductor del silenciamiento. Se co-agroinfiltraron el inductor *sense* GFP junto con pGD- $24K^{CPsV}$, o pGD- CP^{CPsV} , o pGD- $54K^{CPsV}$ o la combinación pGD- $24K^{CPsV}$ + pGD- $54K^{CPsV}$, ésta última ensayada para determinar si hay efecto aditivo. Además, se co-agroinfiltró el inductor *sense* GFP junto con pGD y con pBIN2b, como controles negativo y positivo

de supresión, respectivamente. Para esto, se agroinfiltraron todas las hojas de plantas de cuatro hojas. A los 14 dpai se observaron las hojas superiores. El silenciamiento sistémico se evidencia por desaparición de fluorescencia verde de GFP en estas hojas. En la Figura IV.4.A se muestran plantas representativas de estos experimentos. El criterio adoptado para determinar en qué medida el silenciamiento sistémico fue establecido, se basó en la observación de la fluorescencia: verde (V), cuando todas las hojas superiores presentaban fluorescencia verde, (PV) parcialmente verde, una hoja presentaba una mancha roja, (PS) parcialmente silenciada, cuando no se observa fluorescencia verde en las nervaduras, y (S) silenciada, cuando no se observa fluorescencia verde en las nervaduras y en parénquima en al menos una hoja (Figura IV.4.A).

En la Figura IV.4.B, se muestran los cinco experimentos, con los resultados de las observaciones de fluorescencia. Los niveles de inducción del silenciamiento en el control negativo, pGD + sGFP, variaron entre 80-100 % y sólo uno de los experimentos el nivel de inducción fue del 50%. En cuatro experimentos la proteína 24K^{CPsV} presentó actividad supresora sistémica. En el caso de la proteína CP^{CPsV} que sólo fue ensayada en dos experimentos, no presentó actividad supresora en ninguno de ellos. La proteína 54K^{CPsV} mostró actividad supresora en cuatro de los cinco experimentos, como también fue observado para la proteína 2b. Dada la gran variabilidad que muestran estos experimentos, el análisis estadístico (Figura IV.B.vi) muestra que 24K^{CPsV}, 54K^{CPsV} y 24K^{CPsV} + 54K^{CPsV} no difieren significativamente del control positivo 2b, ni entre ellas, y sólo 2b difiere del control negativo de supresión pGD. Contrariamente, la proteína CP^{CPsV} difiere significativamente de 2b, y no del control negativo, por lo que CP^{CPsV} no presenta actividad supresora sistémica.

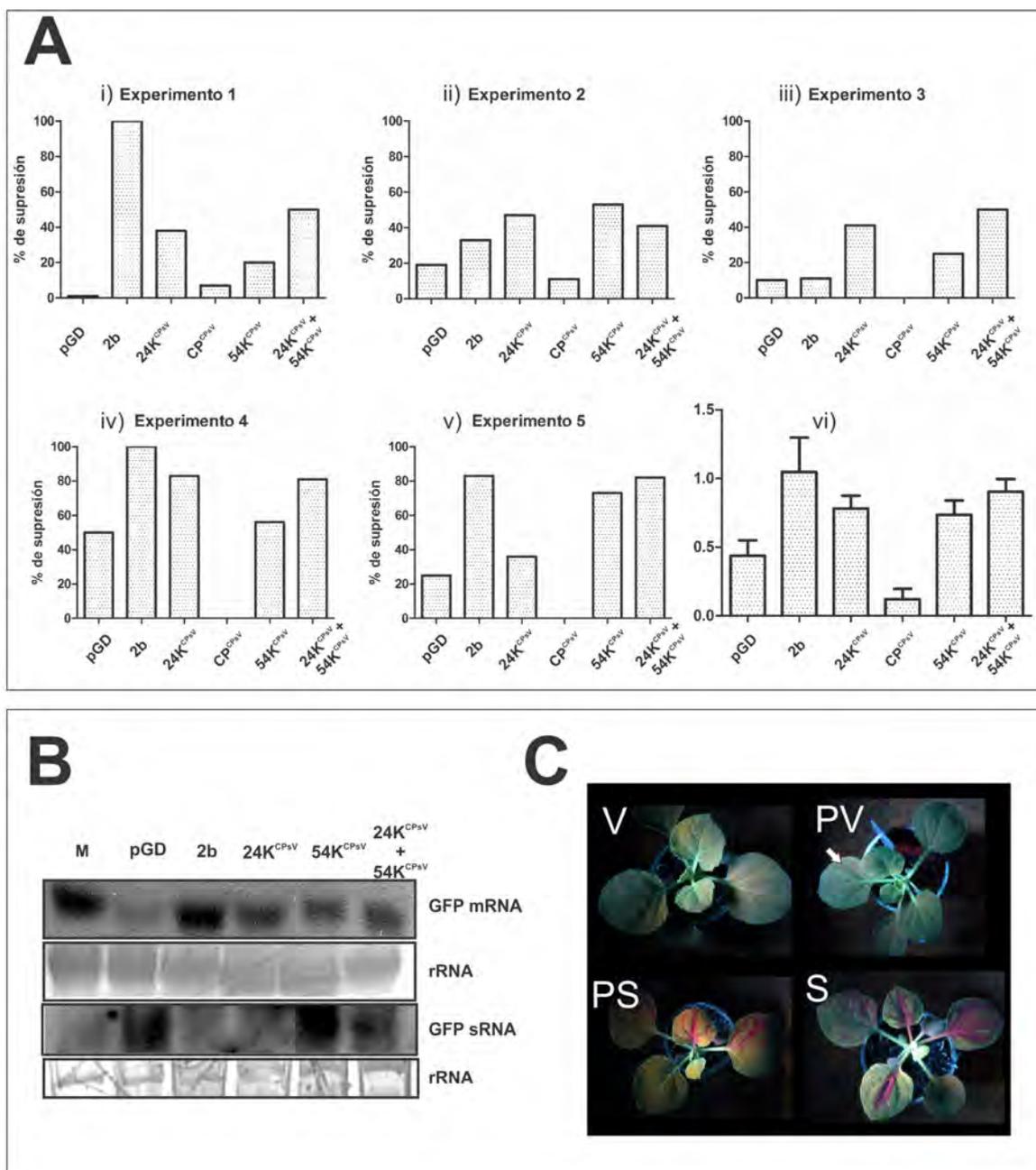


Figura IV.4. Silenciamiento sistémico de las proteínas de CPsV. (A) Se muestra el análisis de 5 experimentos (Exp. 1-5), más el análisis estadístico en donde se han juntado los cinco experimentos (vi). (B) Northern blot mostrando los niveles de mRNA y siRNA derivados de GFP, junto con los controles de carga rRNAs para cada uno de los tratamientos del Experimento 4 (A.iv). (C) Plantas de 16c fotografiadas 14 dpi bajo luz UV, mostrando silenciamiento de GFP (S), un silenciamiento parcial (PS), un silenciamiento mínimo en solo una hoja (flecha) (PV) y una supresión del silenciamiento quedando completamente verde (V).

Mediante éste análisis podemos concluir que las proteínas 24K^{CPsV} y 54K^{CPsV} individualmente, tendrían una actividad supresora débil, similar a 2b. Además, cuando ambas proteínas se co-expresan no se encuentra un efecto aditivo en la actividad supresora. Para confirmar estas observaciones, para el experimento 4, se analizó por Northern blot la acumulación de mRNA-GFP, así

como los niveles de siRNA-GFP en hojas superiores. Para esto, se extrajo RNA de un pool de hojas representativo de la observación de fluorescencia de GFP. En las plantas que expresaban las proteínas 24K^{CPsV}, 54K^{CPsV} y su combinación (el cociente de intensidades GFP/rRNA fue 2,8, 2,4 y 3,2 respectivamente), los niveles de mRNA-GFP fueron superiores al control negativo (cociente GFP/rRNA 1,4), y menor al de las plantas donde se expresó la supresora 2b (cociente GFP/rRNA 5,0) (Figura IV.4C). En este experimento, el nivel de supresión de 54K^{CPsV} fue bajo, similar al control negativo, aunque el cociente GFP/rRNA es una unidad mayor al de pGD. Los niveles de siRNA derivados de mRNA-GFP cuando se expresó la proteína 24K^{CPsV} resultaron similares a los de 2b, mientras que en las plantas que expresaban las proteínas 54K^{CPsV} y 24K^{CPsV}/54K^{CPsV} presentan niveles comparables a los del control negativo pGD. Este análisis indica que la proteína 24K^{CPsV} impediría el silenciamiento de forma sistémica.

IV.4 Localización subcelular de 24K^{CPsV}, 54K^{CPsV}, 25K^{MiLBVV} y 55K^{MiLBVV} asociada a la actividad supresora

En esta sección se muestran los resultados del análisis de la localización subcelular de las proteínas de 24K^{CPsV}, 54K^{CPsV}, 25K^{MiLBVV} y 55K^{MiLBVV}, en asociación a la actividad supresora mostrada previamente. Esta asociación entre actividad y localización, se sustenta en ejemplos de supresoras y su localización y los procesos celulares que ocurren en estas estructuras celulares. Cabe mencionar que se han encontrado otras localizaciones para estas proteínas, relacionadas con otros aspectos del ciclo viral de los ophiovirus, como se mostrarán en el Capítulo V y VI.

IV.4.1 Las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} se localizan en núcleo y citoplasma

En primer término se llevó a cabo un análisis bioinformático a fin de localizar probables señales involucradas en el direccionamiento y localización subcelular de éstas proteínas. Este nos permitirá, junto con los resultados mostrados previamente, desarrollar mutantes para estudios futuros.

Cuando se analizan las proteínas $24K^{CPsV}$ y $25K^{MiLBVV}$ en relación a su probable localización

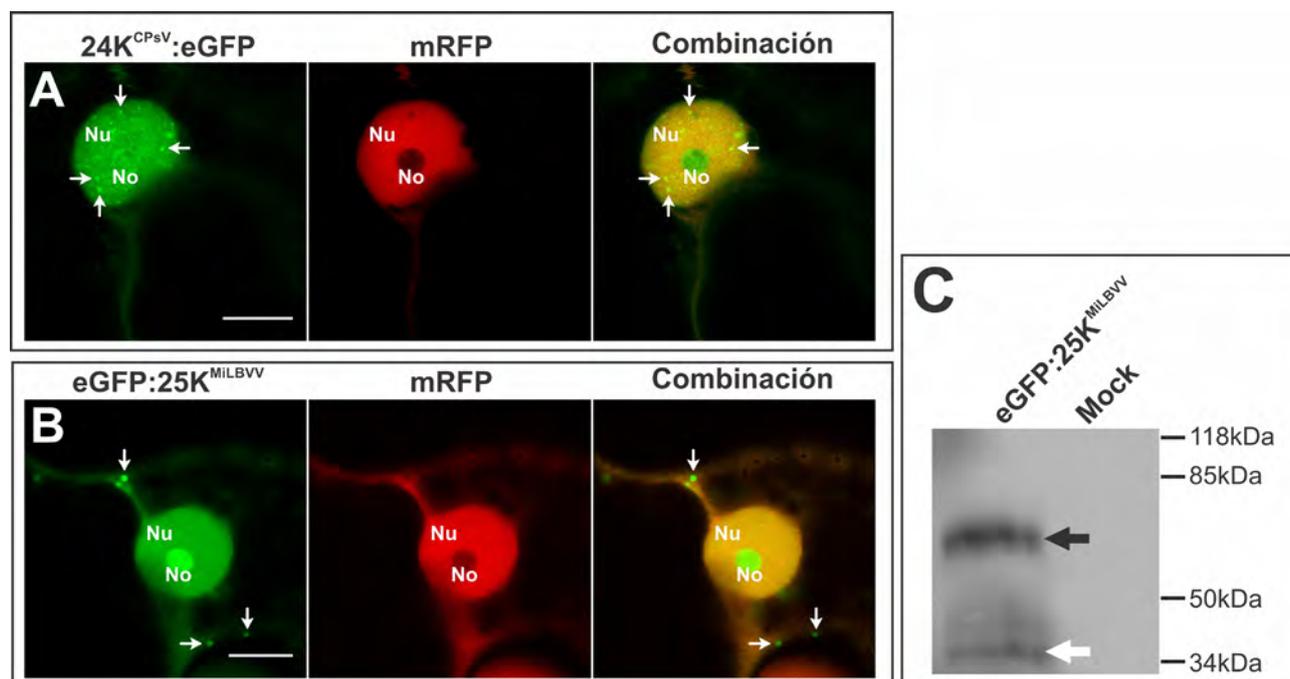


Figura IV.5. Las proteínas $24K^{CPsV}$ y $25K^{MiLBVV}$ se localizan en núcleo y citoplasma. (A) Co-expresión de $24K^{CPsV}$:eGFP con mRFP en células de *N. benthamiana* a los 3 dpi. Nu: núcleo, No: nucléolo; las flechas indican pequeños agregados en el nucleoplasma. La barra representa 10 μ m. (B) Co-expresión de eGFP: $25K^{MiLBVV}$ con mRFP en células de *N. benthamiana* a los 3 dpi.; las flechas indican agregados citoplasmáticos. La barra representa 10 μ m. (C) Western blot de extractos crudos de *N. benthamiana* expresando eGFP: $25K^{MiLBVV}$ e infiltrados con agua (Mock), revelados con anti-GFP (α -GFP). Las flechas indican las bandas inmunoreactivas.

subcelular con el servidor WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007), éste tiene como resultado que la proteína $24K^{CPsV}$ se localizaría en citoplasma, núcleo y cloroplasto ($IL^{citoplasma}$: 0,46 ; $IL^{núcleo}$: 0,31; $IL^{cloroplasto}$: 0,23), mientras que $25K^{MiLBVV}$ en citoplasma-núcleo y cloroplasto ($IL^{citoplasma}$: 0,45 ; $IL^{citoplasma\text{-núcleo}}$: 0,37; $IL^{núcleo}$: 0,13; $IL^{cloroplasto}$: 0,05). Esta última, además presenta una región con una probable señal de localización nucleolar (NoLS), cuya secuencia predicha es ${}_{35}TVISKGKNEEKSLMK_{49}$, según el servidor NoD (Scott *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2011). Estas proteínas no presentaron señal de direccionamiento a RE empleando el servidor SignalP4.0, por lo que no se expresarían por la vía secretoria (Petersen *et al.*, 2011). También se analizó la presencia de dominios GW/WG, con el servidor AGOS (Zielezinski & Karlowski, 2011), que median la interacción directa con AGO y que han sido encontrados en otras proteínas virales tales como P38 de TCV, que se caracteriza por secuestrar a AGO1 inhibiendo su acción (Azevedo *et al.*, 2010). Sólo en el caso de la

proteína 24K^{CPsV} se encontró un dominio ${}_{11}\text{NLHKWGLE}_{18}$ de baja compatibilidad para esta interacción, pero similar a la encontrada para la proteína supresora P38.

El análisis de la localización subcelular de las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} fusionadas a eGFP por CLSM mostró que co-localizaron con la proteína mRFP en citoplasma y núcleo (Figura IV.5) y hasta el momento no se han observado en cloroplastos. Se han encontrado diferencias en el patrón de localización de las mismas. Cuando se observa dentro del núcleo, la localización del marcador nuclear mRFP es diferente de la proteína 24K^{CPsV}:GFP, ya que esta última se encuentra en nucléolo (No) y en pequeños agregados en el nucleoplasma (Figura IV.5.A). Estos agregados no han sido co-localizados con marcadores de estructuras subnucleares durante este trabajo de tesis.

La proteína eGFP:25K^{MiLBVV} se localizó, al igual que su homóloga, en el nucléolo, pero nunca se observaron los pequeños agregados en el nucleoplasma, como lo hace la proteína 24K^{CPsV}:eGFP (Figura IV.5.A y B). Además de su localización nuclear, la proteína eGFP:25K^{MiLBVV} se encontraba libre en el citoplasma y en pequeños agregados o vesículas en el mismo compartimiento (Figura IV.5.B). La expresión de la proteína eGFP:25K^{MiLBVV} se analizó por *Western blot*, encontrando que el tamaño aproximado es de 63 kDa, mayor al esperado para la suma de 25 kDa + 27 kDa de la GFP (Figura IV.5.C, flecha negra). De acuerdo a la secuencia aminoacídica, el tamaño aproximado esperado de la proteína 24K^{CPsV} es de 24 kDa. Sin embargo, también se ha detectado que la proteína 24K^{CPsV}:eGFP presenta un tamaño mayor al esperado por su secuencia (Belén Borniego, tesis doctoral en curso). Además, se ha detectado en tejido infectado, se ha detectado la proteína 24K con un antisuero específico, presentando un tamaño mayor al esperado por su secuencia (Eliana Evelina Ocolotobiche, tesis doctoral en curso). Esto apoya a que las diferencias encontradas para la proteína 25K^{MiLBVV} podrían ser debidas a procesamientos postraduccionales. Además, como se muestra en la Figura IV.5.C, se detectó una banda de aproximada 36 kDa, la cual podría corresponder a un péptido del extremo N-terminal de la 25K^{MiLBVV} más GFP. La razón de la diferencia de tamaño y del probable procesamiento requiere estudios complementarios.

Con el objetivo de comenzar la caracterización de los agregados citoplasmáticos de eGFP:25K^{MiLBVV} se realizó un análisis de co-localización con marcadores de Golgi y P-bodies. El análisis *in silico* de la proteína 25K^{MiLBVV} indica que no sería procesada por la vía ER-Golgi, por lo tanto es de esperar que estos agregados no se deban a la proteína eGFP:25K^{MiLBVV} en el lumen de vesículas de Golgi. Además estos agregados se encuentran en número bajo, y dado que la fusión a eGFP es al extremo N-terminal, es de esperar que no se dirija al RE. Para descartar la posibilidad de que eGFP:25K^{MiLBVV} esté asociada a la cara citoplasmática o dentro de las vesículas de Golgi, se llevó a cabo un análisis de co-localización con el marcador Golgi-Cherry (Nelson *et al.*, 2007). Como se observa en la Figura IV.6 no existe co-localización entre el marcador y la proteína eGFP:25K^{MiLBVV}. Tanto en la Figura IV.5 como en el video IV.1, se puede observar que el número de vesículas de Golgi es mucho mayor a los agregados de eGFP:25K^{MiLBVV} y se puede observar una asociación transitoria débil entre las vesículas de Golgi y estos agregados (Video IV.1).

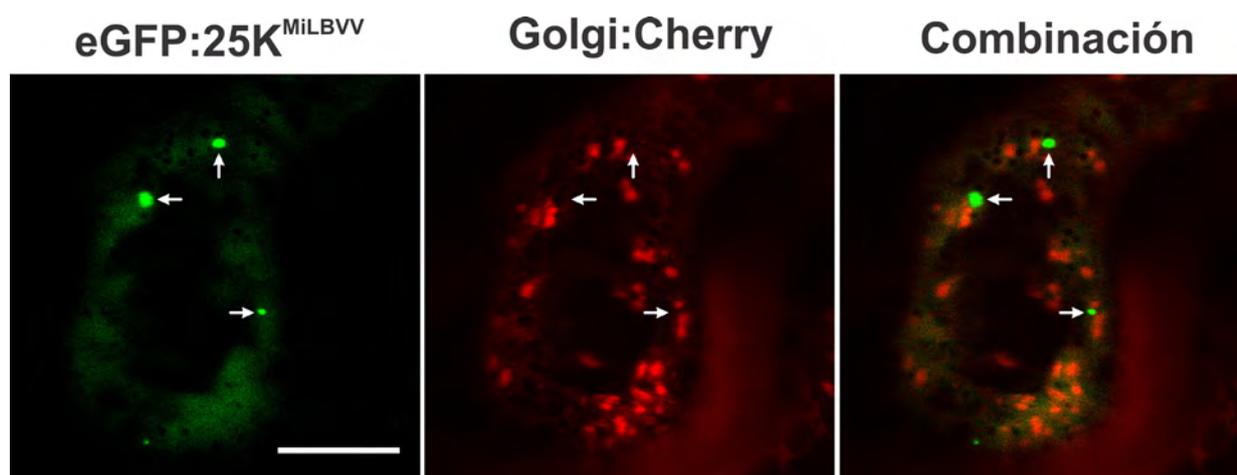


Figura IV.6. Los agregados citoplasmáticos de 25K^{MiLBVV} se asocian pero no co-localizan con vesículas de Golgi. Co-expresión de eGFP:25K^{MiLBVV} con Golgi:Cherry en células de *N. benthamiana* a los 3 dpai. Las flechas indican agregados citoplasmáticos que no co-localizan con el marcador. La barra representa 10 μ m.

Recientemente se han descrito dos tipos de gránulos celulares en plantas que cumplen diferentes funciones, los ya mencionados *processing bodies* (P-bodies), y los gránulos de stress (SGs, del inglés *Stress granules*) (Weber *et al.*, 2008), los cuales han sido relacionados con el ciclo viral de virus animales y vegetales (Lloyd, 2013; White & Lloyd, 2012). Los P-bodies son agregados citoplasmáticos donde se discrimina el destino de los mRNA, entre ellos la remoción del casquete 5' de mRNAs (CAP), su hidrólisis, o su retorno al citoplasma para traducirse. Como es de esperar, en estos agregados se encuentran muchas proteínas encargadas de la degradación de mRNA (Xu *et al.*,

2006), y procesamiento mediado por miRNA y siRNA (Rogers & Chen, 2013; Pomeranz *et al.*, 2010a; Pomeranz *et al.*, 2010b).

Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis de co-localización de la proteína eGFP:25K^{MiLBVV} con el marcador de P-bodies, *Decapping protein 1* (DCP1) (Sement *et al.*, 2013). Este marcador subcelular presenta niveles de expresión considerablemente superiores a las proteínas virales desarrolladas en este trabajo de tesis, por lo tanto para disminuir la expresión y evitar perturbar las células que la expresen, los cultivos de *A. tumefaciens* se diluyeron, disminuyendo considerablemente la expresión de DCP1. Como se puede observar en la Figura IV.7 no se encontró co-localización entre las dos proteínas. Sin embargo se puede observar una asociación transitoria entre los agregados de 25K^{MiLBVV} y los P-bodies (Figura IV.7, flechas; Video IV.2). Cabe mencionar que en este caso la asociación parece ser más estable o más fuerte que lo observado con las vesículas de Golgi. Este tipo de asociación, también ha sido observada entre SGs y P-bodies, y se cree que está relacionado con la transferencia de moléculas de RNA (Weber *et al.*, 2008). Esto es, los SGs almacenan mRNA

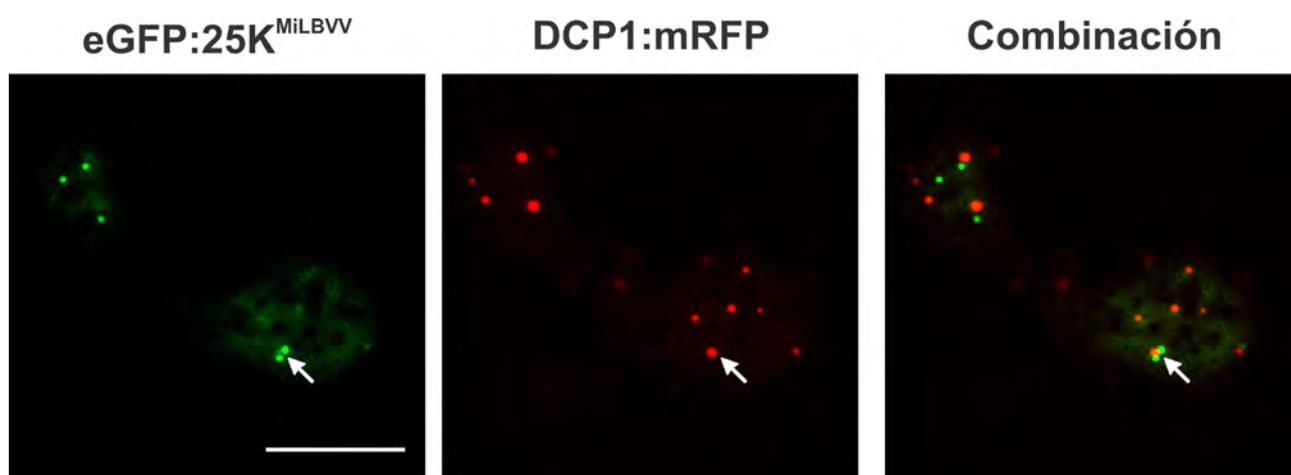


Figura IV.7. Los agregados citoplasmáticos de eGFP:25K^{MiLBVV} se asocian pero no co-localizan con P-bodies. Co-expresión de eGFP:25K^{MiLBVV} con DCP1:mRFP Golgi:Cherry en células de *N. benthamiana* a los 3 dpai. Las flechas indican agregados citoplasmáticos que no co-localizan con el marcador. La barra representa 20 μ m.

poliadenilado (poliA) arrestados en el inicio de la traducción, y durante estos contactos se transferirían a los P-bodies para ser degradados (Kedersha *et al.*, 2005; Wilczynska *et al.*, 2005). Por lo tanto, resulta de interés co-localizar la 25K^{MiLBVV} con marcadores de SGs.

En resumen, los agregados de eGFP:25K^{MiLBVV} no se encuentran en P-bodies ni en vesículas de Golgi.

IV.4.2 Las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} se localizan en núcleo, citoplasma y P-bodies

Las proteínas 54K^{CPsV}, 55K^{MiLBVV} y 50K^{LRNV} presentan dos señales de localización nuclear (NLS), y una secuencia de unión a RNA de tipo Pumillio, ya descrito previamente por Peña (2009). Estas proteínas no presentaron señal de direccionamiento a RE empleando el servidor SignalP4.0 (Petersen *et al.*, 2011). Cuando se analizan las secuencias por el servidor WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007) la proteína 54K^{CPsV} está más relacionada con proteínas de cloroplasto, nucleares y citoplasmáticas (IL^{cloroplasto}: 0,36; IL^{núcleo}: 0,36, IL^{citoplasma}: 0,18), mientras que 55K^{MiLBVV} se encuentra más relacionada con proteínas de cloroplasto, citoplasmáticas y de peroxisomas (IL^{cloroplasto}: 0,54; IL^{citoplasma}: 0,23; IL^{peroxisomas}: 0,23). La proteína 50K está relacionada con proteínas de citoplasma, cloroplasto, peroxisomas principalmente (IL^{cloroplasto}: 0,51; IL^{citoplasma}: 0,21; IL^{peroxisomas}: 0,21, IL^{núcleo}: 0,07). Además, las proteínas 54K^{CPsV}, 55K^{MiLBVV} y 50K^{LRNV} no presentan dominios de unión a AGO de tipo GW/WG empleando el servidor AGOS (Zielezinski & Karlowski, 2011).

A fin de estudiar la localización de estas proteínas *in vivo* se expresaron las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} fusionadas a proteínas fluorescentes (PF) en hojas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración. A los 2-3 días post-agroinfiltración (dpai), se observaron por CLSM, encontrando que las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} se acumulaban en diversas localizaciones. Se co-expresaron con marcadores fluorescentes de las distintas localizaciones subcelulares. Cuando se co-expresaron con mRFP libre, se encontró que las proteínas eGFP:54K^{CPsV} y eGFP:55K^{MiLBVV} co-localizaban en citoplasma y núcleo. En citoplasma se observó claramente la presencia de hebras transvacuolares citoplasmáticas (C) características de proteínas citosólicas (Figura IV.8 A y C). La localización nuclear inespecífica del marcador mRFP nos permitió localizar a 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBV} en el núcleo (Figura IV.8.A y C, Nu). Dado que el tamaño de estas proteínas es considerablemente mayor a mRFP, es de esperar que esa localización se deba a la funcionalidad de las NLS.

Cuando se ensayaron las fusiones C-terminales a eGFP también se localizaron en núcleo y citoplasma (Figura IV.8 B y D). Sin embargo se observa que la intensidad de la fluorescencia nuclear

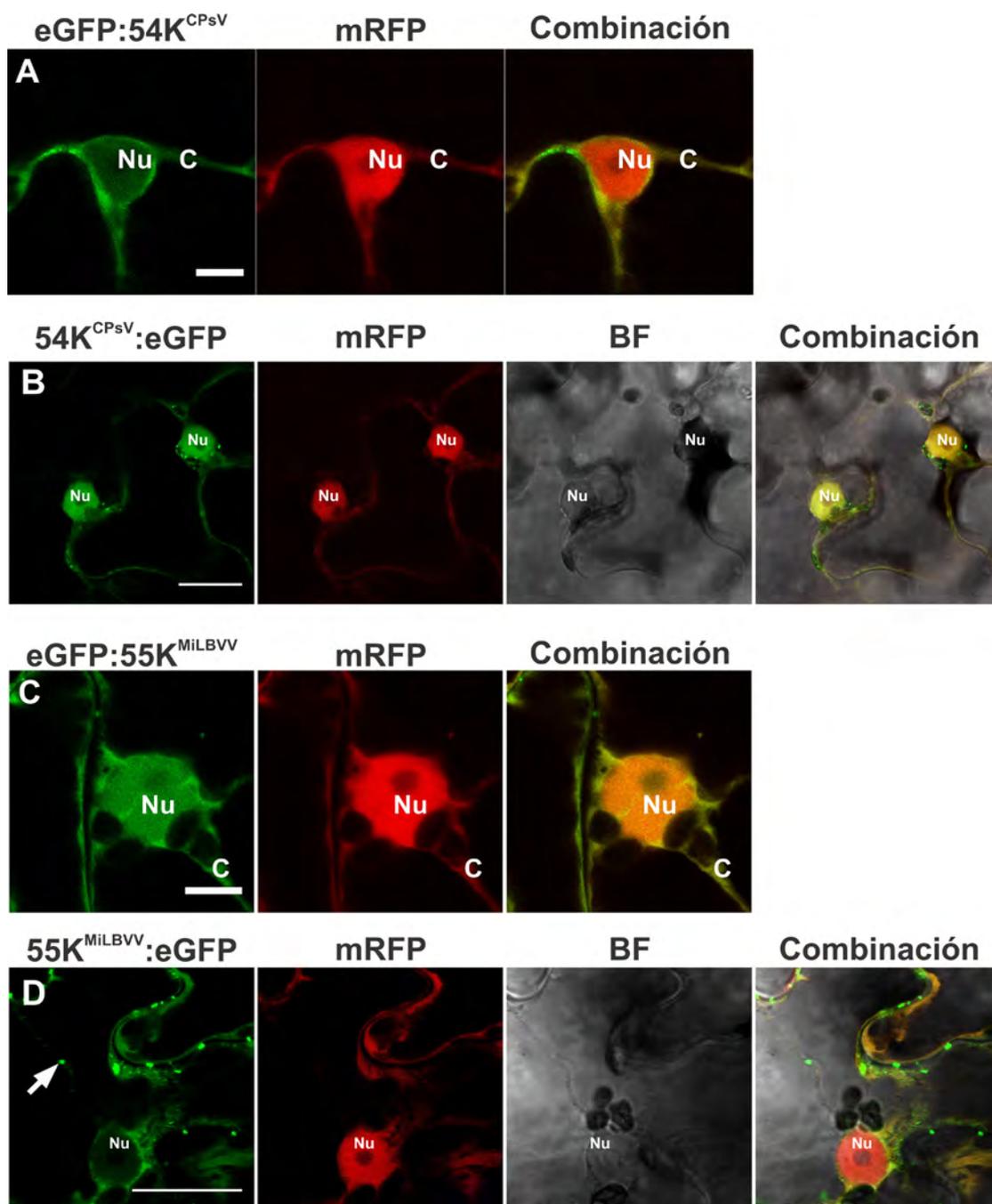


Figura IV.8. Las proteínas $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$ se localizan en núcleo y citoplasma. Co-expresión de eGFP: $54K^{CPsV}$ (A) y $54K^{CPsV}$:eGFP (B) con mRFP (marcador nuclear y citoplasmático). La barra representa 10 μm en (A) y 20 μm en (B). Co-expresión de eGFP: $55K^{MiLBVV}$ (C) y $55K^{MiLBVV}$:eGFP (D) con mRFP (marcador nuclear y citoplasmático). La barra representa 10 μm en (C) y 20 μm en (D). Nu: núcleo; C: hebra citoplasmática; BF: campo claro; la flecha en (D) indica un posible P-bodie (ver sección IV.4.2)

de la proteína $54K^{CPsV}$ fue mayor que la $55K^{MiLBVV}$ cuando se comparan las fusiones C-terminales,

mientras que si se comparan las N-terminales la proteína $55K^{MiLBVV}$ se localizaría en el núcleo en mayor proporción que la $54K^{CPsV}$ (Figura IV.8).

Para $55K^{MiLBVV}:eGFP$, además de la localización nuclear, se han observado pequeños puntos o agregados citoplasmáticos, en el centro de la célula, como se puede observar en la Figura IV.8.D (Flecha blanca). Por lo tanto, se analizó la co-localización con el marcador de P-bodies DCPI. Como se observa en la Figura IV.9, tanto $54K^{CPsV}:eGFP$ como $55K^{MiLBVV}:eGFP$, co-localizan con DCPI:mRFP. En estas condiciones se estudió el movimiento de estos P-bodies marcados como se puede apreciar en los Videos IV.3 y IV.4. Así se observó el movimiento de tipo “*stop and go*” descrito

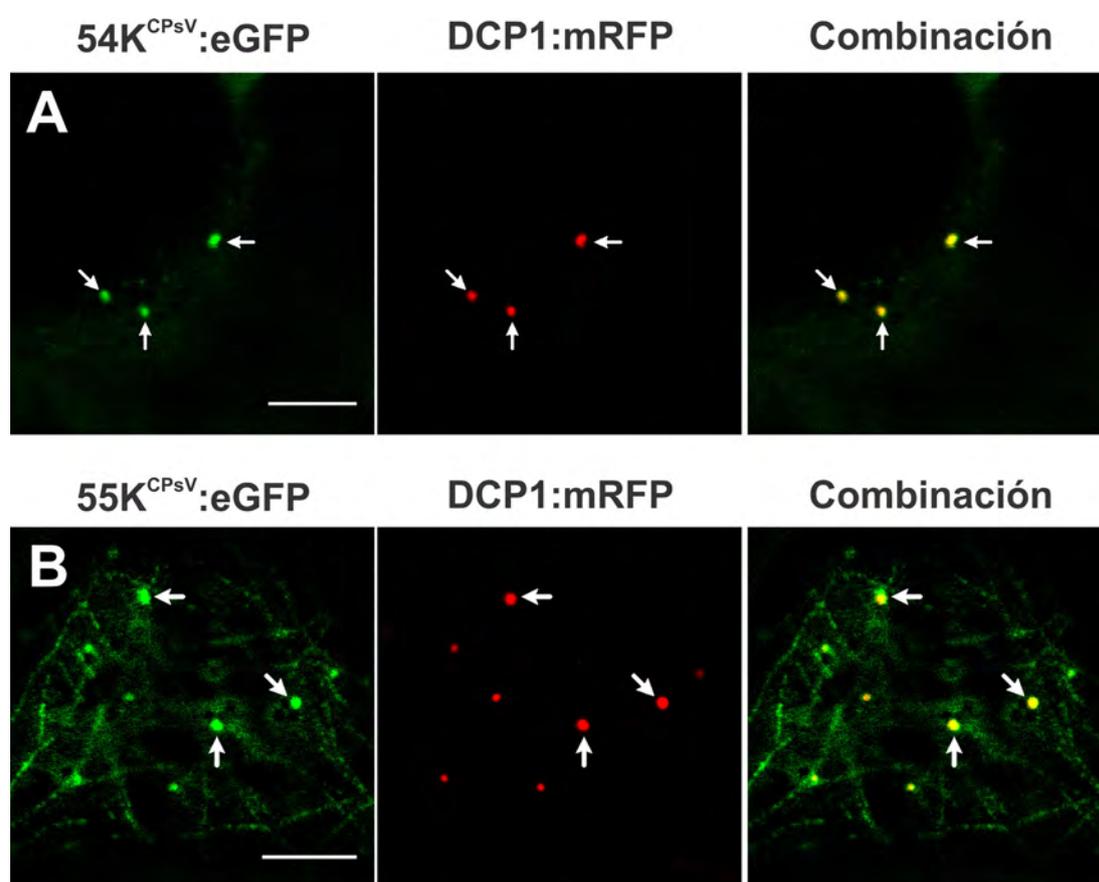


Figura IV.9. Las proteínas $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$ se localizan P-bodies. Co-expresión de $54K^{CPsV}:eGFP$ (A) y $55K^{MiLBVV}:eGFP$ (B) con DCPI:mRFP (marcador de P-bodies); las flechas indican P-bodies donde se encuentra co-localización con el marcador. La barra representa 5 μ m.

para los P-bodies en bibliografía (Hamada *et al.*, 2012). Cuando se co-expresaron las proteínas $54K^{CPsV}:eGFP$ y $55K^{MiLBVV}:eGFP$ con DCPI:mRFP, se observó claramente que co-localizan en agregados citoplasmáticos.

En resumen, las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} además de encontrarse en núcleo y citoplasma, se encuentran en P-bodies.

Conclusiones

- Las proteínas CP^{CPsV} y CP^{MiLBVV} no presentan actividad supresora local del PTGS.
- La proteína CP^{CPsV} no presentaría actividad supresora del silenciamiento sistémico.
- Las proteínas 24K^{CPsV}, 54K^{CPsV}, 25K^{MiLBVV} y 55K^{MiLBVV} presentarían actividad supresora local del PTGS.
- La proteína 24K^{CPsV} suprime el silenciamiento sistémico de GFP en *N. benthamiana* 16c
- La proteína 54K^{CPsV} presentaría actividad supresora del silenciamiento sistémico.
- La proteína 24K^{CPsV} se localiza en el citoplasma y en el nucléolo y forma agregados que se localizan en el nucleoplasma de las células epiteliales de *N. benthamiana*.
- La proteína 25K^{MiLBVV} se localiza en el citoplasma y en el nucléolo, y forma agregados que se observan en el citoplasma. Estos últimos se asocian transitoriamente pero no co-localizan con P-bodies.
- Las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} se localizan en núcleo y en el citoplasma en forma libre, y en P-bodies.

Discusión

Las proteínas supresoras virales han sido descritas para casi todos los virus de plantas. En principio las supresoras podrían actuar en cualquier punto de la cascada de silenciamiento y varían en la eficiencia de supresión. En nuestro caso hemos encontrado que las proteínas 24K^{CPsV}, 54K^{CPsV}, 25K^{MiLBVV} y 55K^{MiLBVV} de éstos ophiovirus actuarían como supresoras virales. Si bien el efecto observado es débil respecto de otras supresoras en el sistema de estudio disponible, es probable que sea suficiente para los ophiovirus en sus hospedantes naturales. Debido a que los niveles de expresión de las supresoras no son estrictamente comparables con otras supresoras conocidas, aún no podemos caracterizar las supresoras de CPsV y MiLBVV como fuertes o débiles. Esto se basa en la experiencia que hemos tenido al ensayar las actividades de éstas proteínas utilizando diferentes construcciones, donde varía el promotor, o la fusión a péptidos reporteros como FLAG. Ese decir, que es posible que durante la infección los niveles de expresión de estas proteínas fueran superiores a los obtenidos en el sistema de silenciamiento de GFP en *N. benthamiana*. Aún así, podemos especular que hasta el momento, las proteínas supresoras de los ophiovirus CPsV y MiLBVV se presentan como débiles. Por otro lado, en el ciclo viral, otra proteína puede también tener actividad supresora, como es la RdRp, que aún no ha sido ensayada para los ophiovirus, como ocurre con la polimerasa de TMV (Ding *et al.*, 2004).

El análisis de la localización subcelular de las proteínas virales nos permite plantear algunas hipótesis acerca de la función de las proteínas. Para confirmar la asociación entre la localización y la actividad determinada, una estrategia muy útil es la de generar mutantes que nos permitan poner a prueba éstas asociaciones, es decir, corroborar que la pérdida de la localización, se corresponda con la pérdida de la actividad. Hemos encontrado que las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} se localizan en nucléolo, y que en ésta última, se encuentra una probable señal de localización nucleolar (NoLS). Por lo tanto resulta de interés encontrar asociación nucléolo-supresión, como se ha estudiado para la proteína 2b de CMV o p23 de CTV. La primera, ha sido caracterizada como una supresora débil, local y sistémica (Guo & Ding, 2002) que se localiza en nucléolo presentando interacción con AGO1 y AGO4, siendo esta interacción la que recluta estas proteínas al núcleo. A través de una batería de mutantes se demostró que cuando se muta el dominio de unión a RNA se pierde la actividad supresora (Duan *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2010), y se determinó que la interacción 2b-AGO1 impide la acción *slicer* de AGO1, y que esta actividad se ve afectada cuando se muta la señal de localización en nucléolo (NoLS), mientras que no requiere el dominio de unión a dsRNA (Feng *et al.*, 2013).

La proteína p23 de *Citrus tristeza virus* (CTV) también se localiza en nucléolo, además de cuerpos de Cajal y plasmodesmos. En este caso, mediante el empleo de mutantes en la probable NoLS se encontró que la proteína p23 requiere su localización en nucléolo para la actividad supresora (Ruiz-Ruiz et al., 2013).

En otros casos se ha vinculado la localización nucleolar con el movimiento a larga distancia de los virus. Tal es el caso del ORF 3 del umbravirus *Groundnut rosette virus*, que cicla entre el núcleo y el citoplasma. Esta proteína ingresa al núcleo, se acumula en Cuerpos de Cajal, que podrían ser las mismas estructuras observadas con la proteína 24K^{CPsV}, para luego acumularse en el nucléolo, y posteriormente ser exportada al citoplasma. El tránsito del ORF 3 es indispensable para la formación de los complejos ribonucleoproteicos de movimiento viral. La proteína mayoritaria de nucléolo, la fibrilarina, participa en este proceso, e incluso es traslocada al citoplasma donde junto con el RNA viral forma el complejo de movimiento. Este complejo se puede reconstituir *in vitro* y generar así una partícula infectiva (Kim et al., 2007a; Kim et al., 2007b). Sería muy interesante caracterizar la localización nucleolar de las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} desde el punto de vista del movimiento viral.

Por otro lado, no necesariamente las proteínas supresoras deben acumularse en algún agregado o complejos que puedan ser observados. A modo de ejemplo, la proteína p19 de TBSV, se localiza libre en el citoplasma, y si bien su entrada y salida del núcleo es necesario, no se acumula en éste ni en ninguna subestructura del mismo (Canto et al., 2006).

Se ha determinado que las proteínas 24K^{CPsV} y 54K^{CPsV} presentan la capacidad de unir dsRNAs por medidas *in vitro*, mientras que no unen siRNAs (Carina Reyes, comunicación personal). Resta evaluar si esta capacidad se conserva *in vivo* y vinculada con la supresión del silenciamiento. Si este resultado está asociado a la supresión, indicaría que no actúan secuestrando siRNA, sino que podrían inhibir la acción de las DCLs, o bien inhibir la amplificación por RdR6 mencionada previamente.

Dado que no hemos podido identificar la composición de los agregados citoplasmáticos de 25K^{MiLBVV} desconocemos si están vinculados con la supresión. Sin embargo si asumimos que su homóloga actúa de forma análoga, es de esperar que esta localización no estuviera vinculada a la actividad de supresión. Por otro lado, tampoco sabemos cuál es la composición de los agregados de la proteína 24K^{CPsV} en el nucleoplasma, siendo posible que se traten de D-bodies. Los D-bodies son regiones específicas del núcleo donde los pre-miRNAs son procesados por DCL1. Esta localización correlacionaría con la des-regulación observada en plantas de *N. benthamiana* transgénicas para 24K^{CPsV} (Carina Reyes, datos no publicados). Sin embargo si empleamos el mismo razonamiento, no

es de esperar que esté asociado con la supresión observada en los ensayos de silenciamiento local y sistémico.

Las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} se han localizado en núcleo, citoplasma y P-bodies. Como se mencionó anteriormente los P-bodies se encargan del procesamiento de mRNAs endógenos, son complejos ribonucleoproteicos dinámicos, es decir que frente a diferentes condiciones de estrés aumentan en su tamaño o número. En humanos, los P-bodies están vinculados con la vía de degradación mediada por el complejo RISC que induce el clivaje de mRNA controlado por miRNA (Jakymiw *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005a; Pillai *et al.*, 2005; Sen & Blau, 2005). Recientemente se ha encontrado que las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} inhiben la función efectora del PTGS sobre el cargado de miRNAs en AGO (Carina Reyes, comunicación personal), con lo cual es posible que la localización en P-bodies esté vinculada directamente con esta actividad.

Por otro lado, los virus han explotado la función de los P-bodies para otros procesos vinculados con el ciclo viral. Hasta el momento todos los virus de plantas de polaridad negativa emplean una estrategia conocida como CAP-snatching para generar mRNA a partir de sus genomas, extrayendo el extremo 5'CAP de mRNAs endógenos e incorporándolo a los extremos 5' de los transcritos virales. Por ejemplo, la proteína N de hantavirus se une fuertemente al 5'CAP de mRNAs, se acumula en P-bodies inhibiendo la vía de decapping Dcp1a/Dcp2 y de esta manera, provee 5' CAP para la síntesis de las proteínas virales (Mir *et al.*, 2008).

Además, los P-bodies se han propuesto como complejos que facilitan la formación de complejos virales de replicación. Como ejemplo, se ha encontrado que el virus *Brome mosaic virus* posee elementos *in cis* que reclutan a los RNA genómicos a P-bodies, así como la RdRp viral, con lo cual se ha sugerido que los P-bodies también podrían estar asociados a la replicación (Beckham *et al.*, 2007). Estudios futuros permitirán conocer cuál es la función que llevan a cabo las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} en P-bodies.

Perspectivas

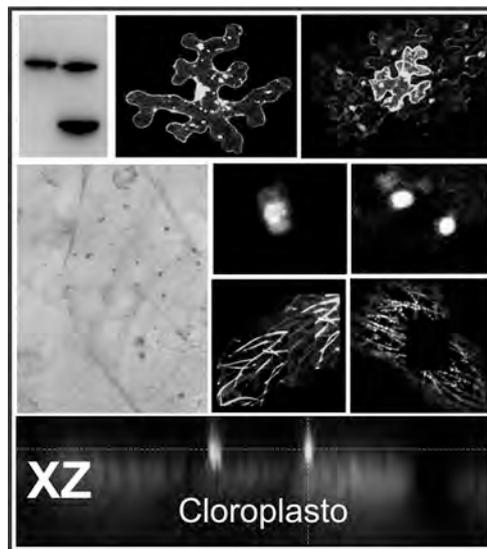
Para completar los ensayos de supresión debemos, en primer término, determinar la acumulación de siRNAs en los ensayos de supresión local, con el fin de correlacionar los niveles de mRNA-GFP con los siRNAs provenientes de GFP. En segundo término, es necesario repetir los ensayos de silenciamiento sistémico, y conveniente incluir las proteínas de MiLBVV en el mismo análisis. En resultados preliminares no hemos observado diferencias significativas de las proteínas de MiLBVV respecto al control negativo, nuestra hipótesis es que los niveles de expresión de las proteínas no son los suficientes para suprimir. Si esta fuera la razón la expresión diferencial en el tiempo de las proteínas respecto al inductor podría ayudar a ver el efecto de supresión. Sin embargo, en ensayos preliminares, en el control negativo obtuvimos niveles muy bajos de inducción del silenciamiento, es decir, a los 14 dpi, la mayoría de las plantas se observaron verdes. Por lo tanto, este ensayo todavía requiere una optimización adicional. Otra alternativa sería expresar las mismas a partir de un vector binario que presente elementos que permitan niveles de expresión superiores, tales como un promotor 35S duplicado o el leader 5' del RNA 4 de AMV.

En cuanto a la caracterización de la localización subcelular de las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV}, en particular los agregados en el nucleoplasma de 24K^{CPsV} y los agregados citoplasmáticos de 25K^{MiLBVV}, se propone, para las proteínas 24K^{CPsV}, emplear marcadores de subdominios nucleares como los cuerpos de Cajal, D-bodies, etc, y para la proteína 25K^{MiLBVV} marcadores de SGs, como eIF4E, UBPI y RBP47 (Weber *et al.*, 2008). Ya contamos con vectores en donde estas últimas proteínas se encuentran clonadas y fusionadas a PF, cedidas gentilmente por el Dr. Markus Fauth.

Como ya se ha mencionado en este capítulo en la relación localización-función, no orienta acerca de cuales mutantes puntuales generar en la NoLS de 25K^{MiLBVV} y en el posible dominio GW de 24K^{CPsV}. Si bien la localización de 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} en P-bodies no nos orienta a mutar algún dominio, es posible que el mutante que pierda la actividad supresora no se localice en P-bodies. Además, estos mutantes deberían ser analizados en su capacidad para unir RNA *in vitro*, en su actividad supresora local, y en la inhibición del cargado de miRNAs en AGO, aportando evidencias del mecanismo de acción de las supresoras de CPsV y MiLBVV.

Capítulo V

*El RNA 2 de los ophiovirus CPsV y
MiLBVV codifica la proteína de
movimiento*



Introducción

Las proteínas de movimiento (MP, del inglés *movement protein*) son variables en tamaño, secuencia y estructura, sin embargo tienen en común que facilitan el movimiento viral a la célula adyacente. Para esto, presentan actividad de unión a RNA, y se localizan en plasmodesmos (PD), en donde solas o en conjunto con otras proteínas virales y/o celulares aumentan el tamaño del poro del PD, para finalmente facilitar el pasaje del complejo viral de movimiento a la célula vecina y al resto de la planta. Los PD, estructuras únicas en el reino vegetal, son estructuras dinámicas que conectan físicamente dos células adyacentes y se encuentran involucrados en el movimiento de mRNA, proteínas y RNAs señales asociados al silenciamiento participando en el desarrollo de la planta (Haywood *et al.*, 2002; Hyun *et al.*, 2011; Nazim Uddin & Kim, 2013) (Figura V.1). En los últimos años se ha estudiado en detalle la estructura del PD, las proteínas que lo constituyen y como se regula el

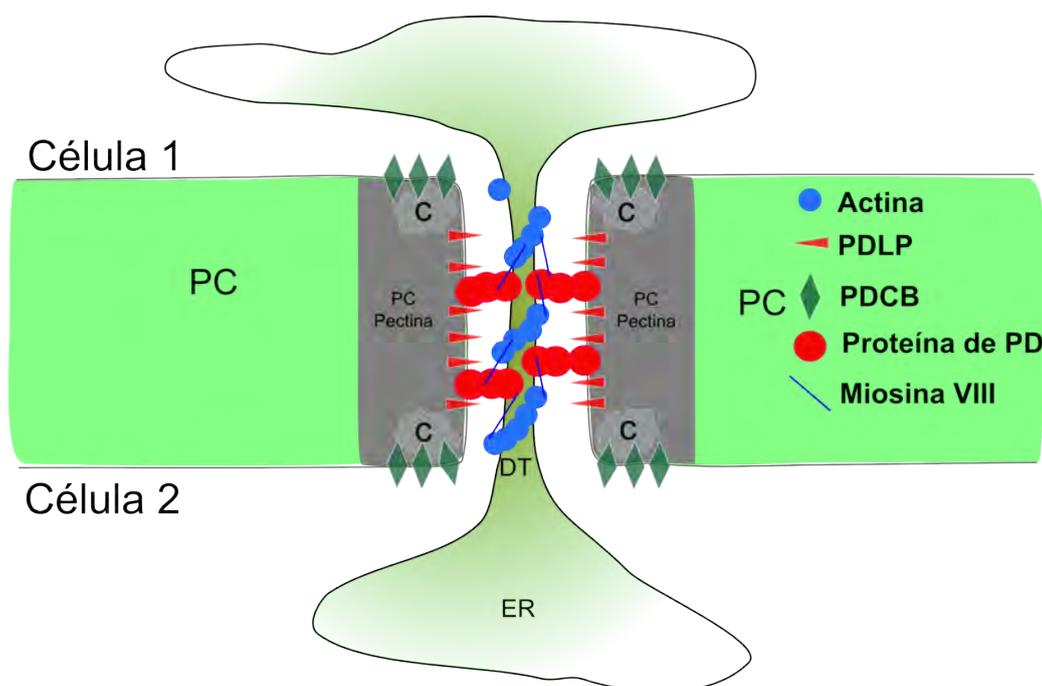


Figura V.1. Esquema de un PD simple. La región de la pared celular (PC) donde se encuentra un PD es rica en pectina (PC pectina). El PD es atravesado por una extensión del retículo endoplásmico (ER) denominada desmotúbulo (DT), además en la región del cuello se encuentran depósitos de calosa, que regulan el pasaje de moléculas entre la Célula 1 y 2. En el esquema se muestran proteínas como PDCB, *plasmodesmata callose binding protein*, PDLP, *plasmodesmata located proteins*, Actina, Miosina VII y proteína de PD, que representa las proteínas aún no identificadas o en proceso de ser identificadas.

tráfico a través de éste. En el año 2011 se obtuvo el proteoma de PD de *A. thaliana*, encontrándose 1341 proteínas, aunque se sospecha que el 35% de ellas son contaminantes citoplasmáticos. A diferencia de los proteomas de pared celular, que están enriquecidos en proteínas de esta estructura, el

proteoma de PD contiene proteínas de membrana con actividad tipo receptor, lo cual sugiere que el PD es una estructura que en su participa en diversos procesos celulares que involucran señalización célula-a-célula (Fernandez-Calvino *et al.*, 2011). A su vez los PD se clasifican por el número de canales que los constituyen, si presenta sólo un canal se denomina simple, como se observa en la Figura V.1 y con más de un canal se lo llama ramificado. Durante el desarrollo foliar ocurre una transición de los PD en relación al SEL (SEL, del inglés *size exclusion limit*), es decir, el tamaño máximo permitido que tiene que tener una proteína para poder atravesar el PD. El SEL se puede estimar de acuerdo al tamaño de las moléculas que pasan a la célula adyacente. Cuando una hoja de tabaco es joven todos los PD, denominados “sumidero”, presentan un SEL que permite el pasaje de moléculas fluorescentes de hasta 50 kDa, mientras que cuando la hoja madura el SEL disminuye. Inicialmente se estimó que en hojas maduras solo podrían pasar moléculas de 1 kDa o menor tamaño. Estos PD se denominaron “fuente” ya que pertenecen a los tejidos donde se inicia la fotosíntesis. En un estado intermedio de esta maduración foliar se puede observar que los PD fuente se encuentran en la punta de la hoja mientras que los PD sumideros están en la base de la misma (Oparka *et al.*, 1999). Posteriormente, el valor del SEL de hojas fuente fue corregido, ya que había sido determinado con una técnica que cerraba rápidamente los PD, disminuyendo el SEL notablemente. El valor aceptado actualmente es de al menos 27 kDa, similar al tamaño de GFP, aunque este valor se ve afectado por diversas razones: la especie, las condiciones de crecimiento (de invernadero o *in vitro*), el estado fisiológico y la maduración de la hoja. (Brunkard *et al.*, 2013; Crawford & Zambryski, 2000; Crawford & Zambryski, 2001; Liarzi & Epel, 2005). Es por estas razones que para estimar el SEL es indispensable contar con controles.

Los estudios más relevantes de la regulación del tráfico a través de los PD han sido llevados a cabo en detalle utilizando mutantes defectivos en el desarrollo, alterando el tráfico de proteínas a través de los PD. Sin embargo, las proteínas ausentes en los mutantes con este fenotipo se localizan normalmente en plástidos, mitocondrias, núcleo y/o citoplasma, pero ninguno de ellos en PD (Benitez-Alfonso *et al.*, 2009; Burch-Smith *et al.*, 2011; Crawford & Zambryski, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007; Stonebloom *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012). Es decir que la regulación del tráfico intercelular ocurre de forma global intracelularmente involucrando a toda la célula, además de factores locales del PD (Brunkard *et al.*, 2013). Por otro lado se han empleado MPs como herramienta para este análisis, dado que aumentan el SEL, y así permitieron ampliar el conocimiento de los factores que regulan la apertura o el cierre del PD (Niehl & Heinlein, 2011).

En el Capítulo VI se describirán con más detalle los mecanismos de movimiento viral. A modo introductorio, y para la comprensión de este capítulo, el mecanismo por el cual las MPs aumentan el SEL es diferente si el movimiento viral ocurre mediante el descrito como “guiados por túbulos”, o por el mecanismo “no guiados por túbulos”. La MP de TMV (MP^{TMV}, ó proteína 30K), participa en el movimiento no guiado por túbulos de éste virus, presentando además varias actividades. Provoca la llegada de una 1,3- β -glucanasa que degrada los depósitos de calosa que se encuentran en el cuello del PD, llevando a la dilatación del poro; la MP^{TMV} presenta actividad de corte de filamentos de actina, una de las proteínas componentes del desmotúbulo (DT) del PD. Esto último permite relajar la tensión y la estabilidad entre la membrana y el DT, pero sin remover el DT (Su *et al.*, 2010). En el caso de los virus que se mueven guiados por túbulos, se caracterizan por alterar considerablemente la estructura del PD. Desplazan el DT y forman un túbulo compuesto por monómeros de MP. Los dominios de la MP expuestos hacia la luz de este túbulo interactúan con las partículas virales para moverlas a la célula adyacente (Niehl & Heinlein, 2011).

V.1. Identificación de proteínas de movimiento

A fin de determinar cuál de las proteínas virales presenta la función de movimiento, y para el caso de virus con genoma a RNA positivo, se emplean estrategias de genética reversa. Esto es, se construyen clones infectivos, que pueden ser mutados en el o los genes que se sospecha tengan la función de movimiento y se analiza la pérdida de esta función. Además se estudia si la proteína candidata se localiza en el PD, si posee la capacidad de aumentar el SEL, de unir RNA y facilitar el movimiento del virus a la célula adyacente y al resto de la planta.

V.1.1 Localización en PD

La localización de una proteína viral en el PD, la asocia con el movimiento viral. Ésta observación suele obtenerse por inmunomicroscopía electrónica de tejido infectado, así como por microscopía de fluorescencia empleando fusiones traduccionales a proteínas autofluorescentes.

V.1.2 Modificación del SEL

En cuanto a la característica de las MPs de aumentar el SEL, los primeros consistían en inyectar dextranos marcados en una célula aislada en la región de la hoja donde se expresaba la proteína

candidata, evaluando si estos dextranos difundían a las células adyacentes, lo cual indicaba que el poro del PD se encontraba dilatado (Poirson *et al.*, 1993; Wolf *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1989). Actualmente se emplea la difusión de la proteína GFP, la cual se expresa en células aisladas en presencia de la probable MP. La GFP difunde de forma deficiente a células adyacentes en hojas maduras cuando el SEL no se ve alterado. Mientras que la presencia de GFP en células vecinas se ve facilitada si el PD modifica su SEL por presencia de la MP (Bayne *et al.*, 2005; Satoh *et al.*, 2000). En estos casos se suele observar un patrón en gradiente de fluorescencia donde la célula central, con mayor fluorescencia, es la transformada. El gradiente se va disipando a medida que se aleja de la misma. Este tipo de movimiento célula-a-célula se denominó movimiento de proteínas no dirigido (*non-target movement*) (Crawford & Zambryski, 2000).

V.1.3. Capacidad NCAP

Otra propiedad que se estudia en las proteínas candidatas a ser MPs, es su capacidad para moverse a sí mismas a las células adyacentes, denominada actividad o capacidad NCAP (NCAP, del inglés *non-cell autonomous protein*). Esta actividad puede determinarse usando la MP fusionada a una proteína fluorescente como GFP, expresandola en células aisladas (Haywood *et al.*, 2002; Howard *et al.*, 2004; Satoh *et al.*, 2000). Se analiza si es capaz de moverse a las células adyacentes, formando un clúster de células en donde la célula central, es la transformada. En este caso el gradiente de fluorescencia se encuentra disipado, y la fluorescencia de las células adyacentes y la central es similar. Este tipo de movimiento célula-a-célula se denominó movimiento dirigido de proteínas (*target movement*) (Crawford & Zambryski, 2000).

V.1.4. *Trans*-complementación de virus defectivos en el movimiento

Dentro de los virus negativos multipartitos, la genética reversa no resulta una estrategia factible o simple ya que la polimerasa viral debe estar presente en el virión para que éste sea infectivo. Esto impide realizar ensayos con RNA genómicos que lleven mutaciones con pérdida de función. Por lo tanto, las estrategias que se utilizan actualmente para determinar la función de los genes de virus negativos, y en particular el gen que codifica la MP, se basan en ensayos de complementación en *trans* (transcomplementación). En estos ensayos se emplea un virus con genoma a RNA de polaridad (+), defectivo en la función de movimiento. Esta estrategia no debería necesariamente brindar la información que se busca, ya que la MP a ensayar debería reemplazar a la MP del virus empleado, en un mecanismo que no necesariamente es el mismo al del virus defectivo, y más aún si éstos virus no

están relacionados. Sin embargo, ha funcionado en varios casos, y en la bibliografía se encuentran diversos ejemplos en donde las MPs de virus negativos pueden complementar a virus positivos como TMV y PVX, lo que también evidencia la capacidad de las MPs para llevar a cabo ésta función en otros contextos virales (Xiong *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; Morozov *et al.*, 1997). Tal es el caso de virus tan alejados como TMV y TSWV. La MP de TSWV, un virus negativo que se mueve por el mecanismo de túbulos, es capaz de facilitar el movimiento célula-a-célula y a larga distancia de un TMV defectivo en la MP, aún cuando el mecanismo de movimiento de TMV es no-guiado por túbulos (Lewandowski & Adkins, 2005). Más adelante en éste Capítulo se mencionarán otros ejemplos donde en ensayos de transcomplementación se utiliza un virus-vector de PVX defectivo en el movimiento.

V.2. MPs de los ophiovirus

Los virus LRNV, CPsV y MiLBVV codifican en el RNA 2 una proteína cuyo tamaño aproximado es de 50 kDa (50K^{LRNV}), 54 kDa (54K^{CPsV}) y 55 kDa (55K^{MiLBVV}), respectivamente. Resultados previos de nuestro laboratorio, aportaron evidencias respecto a la localización subcelular de la proteína 54K^{CPsV} en el contexto de la infección de CPsV. Estos resultados se obtuvieron por fraccionamiento subcelular con el posterior análisis por *Western blot*. Esta proteína fue detectada en la fracción soluble del citoplasma, y en alguna de las fracciones enriquecidas en núcleo/cloroplasto, pared celular y fracción microsomal (Peña, 2009). Cuando estas observaciones fueron realizadas no se contaba con marcadores de las diferentes fracciones subcelulares, impidiendo su confirmación. En el trabajo de tesis del Dr. Peña, se intentó estudiar la localización subcelular de la proteína 54K^{CPsV} por inmunomicroscopía electrónica pero debido probablemente al bajo título del suero y baja acumulación viral no se obtuvieron resultados positivos. En el mismo trabajo, mediante ensayos de transcomplementación, mencionados previamente, utilizando el virus mutante defectivo en el movimiento, PVX-GUS BspI, se encontraron las primeras evidencias de que las proteínas 24K^{CPsV} y 54K^{CPsV} podrían estar involucradas en el movimiento viral (Peña, 2009).

En este trabajo de tesis se utilizaron fusiones traduccionales de las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} a proteínas fluorescentes y se determinó la localización subcelular de ambas mediante observación por microscopía confocal y mediante co-localizaciones con marcadores específicos de organelas y estructuras celulares de interés. También se realizaron los ensayos de transcomplementación de PVX-GUS BspI con el objeto de confirmar resultados previos con las proteínas de CPsV, y se

extendieron estos mismos ensayos a las proteínas CP^{MiLBVV} y 55K^{MiLBVV} comparando los resultados entre éstos virus de la familia *Ophioviridae*.

Objetivos

Identificar y caracterizar cuál/es de la/s proteínas de CPsV y MiLBVV poseen la función de movimiento viral célula-a-célula.

Resultados

En esta sección se muestran los resultados del estudio que permitió identificar a la MP de CPsV y de MiLBVV. En particular su localización subcelular, junto al análisis *in vivo* de la actividad de movimiento y la capacidad de modificar el SEL del PD, nos permitió evidenciar cuál de las proteínas de CPsV y de MiLBVV actúan como MP.

V.1. Análisis de la expresión de las fusiones de las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV}

En este capítulo se utilizan las fusiones traduccionales mostradas previamente en los Capítulos III (Figura III.1) y Capítulo IV (Figura IV.2). La expresión de las proteínas de fusión se corroboró por *Western blot* utilizando anticuerpos monoclonales específicos anti eGFP y mRFP. En la Figura V.2.A se observan los resultados de este análisis para las fusiones de 54K^{CPsV} a eGFP. La fusión a eGFP en el extremo N-terminal presenta una única banda de aproximadamente 82 kDa, el cual coincide con el tamaño esperado para la proteína fusionada. Para la fusión C-terminal, se observa la banda de tamaño esperado de 82 kDa, y además se encuentra otra banda reactiva de aproximadamente 50 kDa, la cual correspondería al péptido que contiene el extremo C-terminal de la proteína 54K^{CPsV} fusionada a GFP, habiendo perdido un fragmento de aprox. 32 kDa. Este último no se observa dado que se reveló con anti-GFP. Éste clivaje podría ocurrir en la célula *in vivo*, o durante la extracción de las proteínas totales, aún en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF, Pepstatina A, Leupeptina, Inhibidor de Tripsina de huevo, Tripsina de huevo de soja). Si éste fuera el caso, para evitar, o al menos disminuir, el clivaje durante la preparación, la extracción se realizó directamente en buffer de siembra para geles de proteínas (SDS-PAGE) e inmediatamente la muestra fue calentada a 100 °C por 5 min. Aún así, bajo éstas condiciones, la banda de aprox. 50 kDa se volvió a encontrar en intensidades comparables a las observadas en la Figura V.1.A. Por lo tanto, es probable que este clivaje ocurra dentro de la célula. El mismo resultado se observó cuando se analizó la fusión 54K^{CPsV}:mRFP, y también en el caso de la fusión 54K^{CPsV}:FLAG (Belén Borniego, tesis doctoral en curso) con un tamaño equivalente con lo observado con las fusiones a eGFP. Es de hacer notar que, las tres fusiones se clivan cuando el marcador se encuentra en el extremo C-terminal, y al menos para eGFP cuando se fusiona al N-terminal, la proteína de fusión no se cliva (FLAG y mRFP en el N-terminal no han sido ensayadas). Aun más, al revisar los resultados de los *Western blot* obtenidos por Peña en nuestro laboratorio, se encontró que la proteína 54K^{CPsV} extraída de hojas infectadas (de un hoppedante diferente a *N. benthamiana*), también muestran tres bandas, producto de un clivaje (Peña,

2009; Robles Luna *et al.*, 2013; Figura V.2.B). En esa membrana, revelada con un suero anti-54K, sólo en las calles donde se sembró extracto de hojas infectadas con CPsV se observa la banda de la proteína 54K^{CPsV}, y dos bandas de menor peso molecular, una de aprox. 35 kDa y otra de aprox 20 kDa, que podrían ser el producto de un clivaje similar al observado con las proteínas fusionadas. Esto

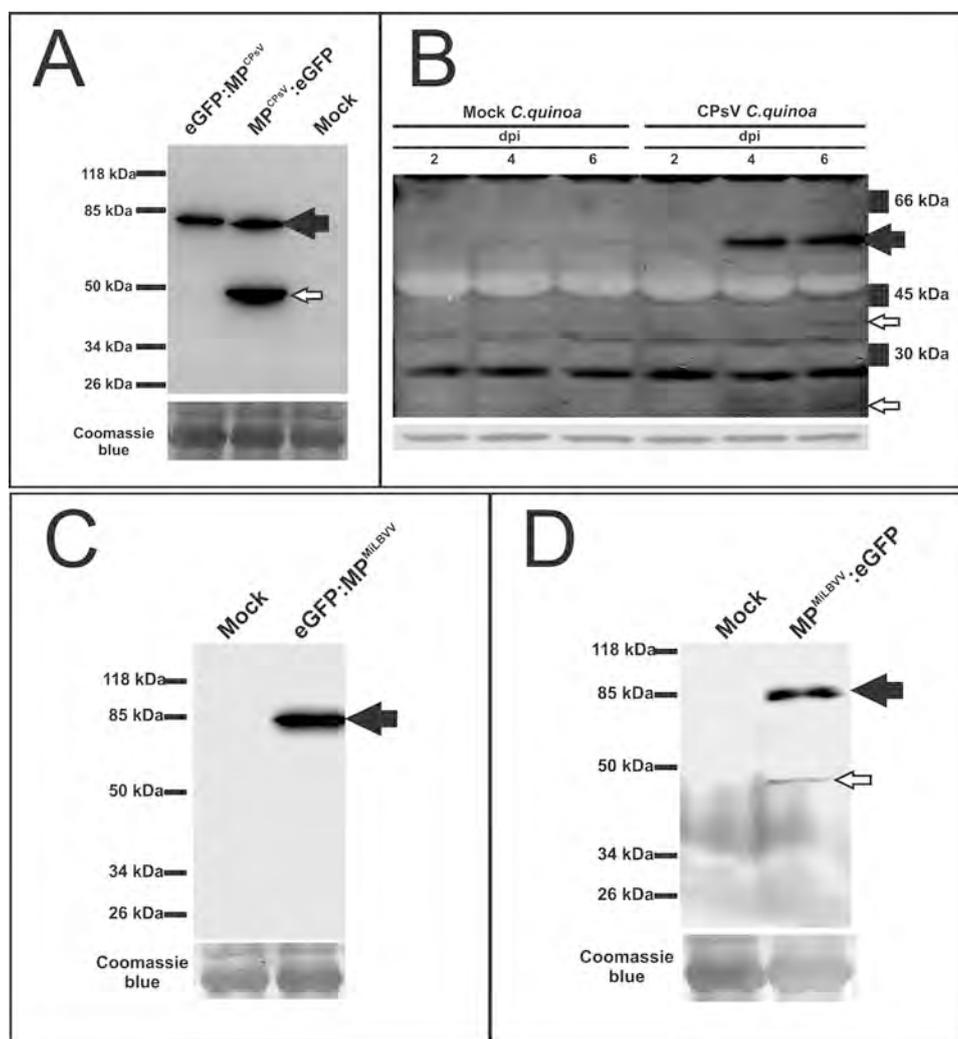


Figura V.2. Análisis de la expresión de las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV}. (A) Western blot de extracto de proteínas totales de: (A) hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con eGFP:54K^{CPsV}, 54K^{CPsV}:eGFP y agua (Mock), reveladas con el anticuerpo anti-GFP. (B) *C. quinoa* inoculadas con CPsV, o con buffer (Mock) a los 2, 4 y 6 dpi, revelado con el suero anti-54K (tomada de Peña, 2009). La flecha negra indica la banda del tamaño esperado (~54K), y las flechas blancas las bandas inmunoreactivas de menor peso molecular. (C) Hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con eGFP:55K^{MiLBVV}, 55K^{MiLBVV}:eGFP y agua (Mock), reveladas con el anticuerpo anti-GFP. La flecha blanca indica una banda diferencial entre ambas extracciones de muy baja intensidad. En los paneles inferiores se muestra el control de carga utilizado en cada western blot, teñido con Coomassie blue.

indicaría que durante el ciclo viral podría ocurrir un procesamiento de ésta proteína, teniendo algún rol en la infección.

El estudio de las fusiones traduccionales de la proteína $55K^{MiLBVV}$, se llevó a cabo por la misma técnica (Figura V.2.C y D). Las bandas correspondientes a $eGFP:55K^{MiLBVV}$ y $55K^{MiLBVV}:eGFP$ presentaron un tamaño aproximado de 83 kDa que concuerda con lo esperado. En el caso de la $55K^{MiLBVV}$, se observa algo similar a lo que ocurre con la proteína $54K^{CPsV}:eGFP$, aunque el clivaje de la $55K^{MiLBVV}:eGFP$ ocurre en mucha menor proporción. Similarmente, no se observa este procesamiento cuando eGFP se encuentra en el extremo N-terminal. En este caso no contamos con un análisis de la expresión de la $55K^{MiLBVV}$ en el contexto de la infección, para observar si el clivaje ocurre también en su hospedante natural, ya que carecemos de un suero específico para esta proteína, y de un aislamiento de MiLBVV libre de LBVaV.

V.2. Análisis bioinformático de las proteínas codificadas en el RNA 2 de CPsV y MiLBVV

Como se mencionó en el Capítulo IV, las proteínas $54K^{CPsV}$, $55K^{MiLBVV}$ y $50K^{LRNV}$ presentan señales de localización nuclear, una secuencia de unión a RNA de tipo Pumillio, y no presentan señal de direccionamiento a RE. Además, ambas están relacionadas con proteínas de cloroplasto y citoplasmáticas, mientras que sólo $54K^{CPsV}$ se asocia a proteínas nucleares, y $55K^{MiLBVV}$ y $50K^{LRNV}$ a proteínas de peroxisomas.

Posteriormente al trabajo de esta tesis, el Dr. David Karlin, Inglaterra, mediante evidencias bioinformáticas hizo un aporte significativo al estudio de éstas proteínas. Encuentra por homología de secuencia y estructura secundaria, que las proteínas de los ophiovirus, $54K^{CPsV}$, $55K^{MiLBVV}$ y $50K^{LRNV}$ se agrupan, dentro de la “superfamilia 30K” de MPs (David Karlin, comunicación personal). Como antecedente, éste mismo análisis fue aplicado por el Dr. Karlin a la proteína P4, de *Raspberry leaf blotch*, que vincula a ésta proteína con la “superfamilia 30K”, que luego fue confirmado mediante evidencias biológicas (Yu *et al.*, 2013).

V.3. Localización subcelular de las proteínas $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$ asociadas con la actividad de movimiento viral

En los siguientes puntos se detalla el análisis de las proteínas $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$, utilizando las mismas proteínas fusionadas a PF, y marcadores de compartimientos subcelulares. Las localizaciones que se muestran a continuación han sido asociadas con la actividad de movimiento viral.

V.3.1 Localización en cloroplastos

Los cloroplastos participan de varios procesos celulares entre los que se encuentra la comunicación intercelular. Los virus pueden utilizar a los cloroplastos como parte de su mecanismo de transporte o como sitios de replicación. Para el caso de los ophiovirus cuando se observaron las fusiones

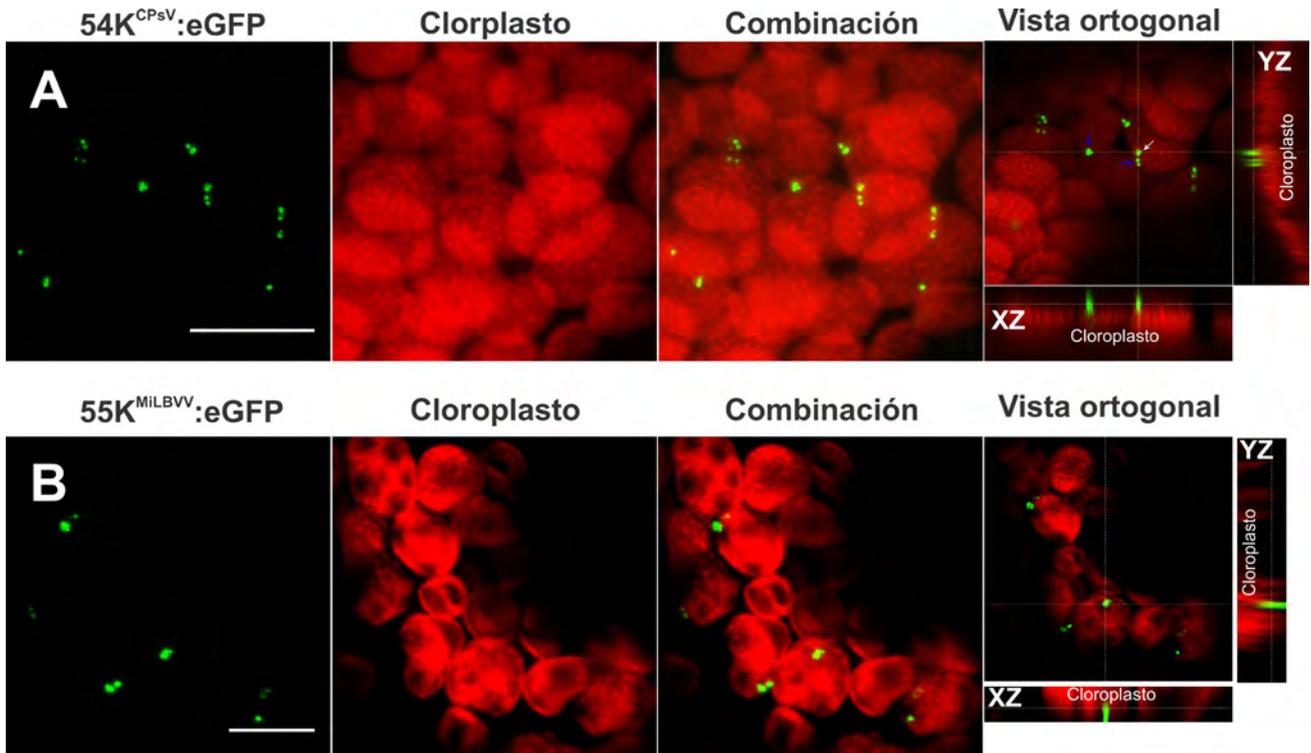


Figura V.3. Localización en cloroplastos. Análisis 3D de $54K^{CPsV}:eGFP$ y $55K^{MiLBVV}:eGFP$ en células del mesófilo de *N. benthamiana*. Se muestran las proyecciones máximas de $54K^{CPsV}:eGFP$ (A), de $55K^{MiLBVV}:eGFP$ (B) y de cloroplastos por autofluorescencia de la clorofila (A y B) y la combinación de ambos canales. El análisis de la vista ortogonal se muestra en el panel de la derecha (planos YZ) e inferior (plano XZ), indicando la región que comprende el cloroplasto. Las líneas punteadas indican el sitio de corte e intersección de los planos. La barra representa 10 μm .

traduccionales al extremo C-terminal, se observaron agregados de las proteínas $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$ cercanos a cloroplastos (Figura V.3). Para determinar si estos agregados se encontraban en la superficie o dentro de los cloroplastos se llevó a cabo un análisis 3D de estas estructuras en células de mesófilo, ya que éstas poseen gran número de cloroplastos. Para el análisis de estas estructuras de gran espesor, se tomaron imágenes sucesivas en el eje z y para facilitar su observación todas las fotos se apilaron en una única imagen (proyección máxima) tanto para la proteína $54K^{CPsV}:eGFP$ (Figura V.3.A) como para $55K^{MiLBVV}:eGFP$ (Figura V.3.B). Estas mismas imágenes se apilaron, sin efectuar la proyección máxima, reconstruyendo el cloroplasto junto con los agregados. El análisis de los planos

ortogonales XZ e YZ muestra que existe un solapamiento parcial de la fluorescencia roja de clorofila con la verde de GFP, es decir que los agregados de $54K^{CPsV}::eGFP$ y de $55K^{MiLBVV}::eGFP$ se encuentran en la superficie de los cloroplastos.

V.3.2 Localización en microtúbulos

Dentro de la maquinaria celular que los virus de plantas pueden utilizar o incluso alterar su dinámica, se encuentra la red de microtúbulos (MT). La asociación de proteínas virales a los MT es una indicación de que ésta red podría ser aprovechada por el virus para su movimiento célula-a-célula. En el caso de los ophiovirus, se observaron filamentos tanto para la proteína $54K^{CPsV}$ como para $55K^{MiLBVV}$, cuando se encontraban fusionadas a PF al extremo N- y también al C-terminal, en la región cortical de las células epiteliales de *N. benthamiana* (Figura V.4.A y B). En numerosas observaciones realizadas notamos que $55K^{MiLBVV}$ se encontró más frecuente que $54K^{CPsV}$ en MT. Con el objeto de identificar estos filamentos, éstas proteínas se co-expresaron con la subunidad α -tubulina fusionada a mRFP, marcador de MT (Van Damme *et al.*, 2004). Como se muestra en la Figura V.4.C y D existe una co-localización entre el marcador y las proteínas virales, confirmando la acumulación de las proteínas $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$ en MT.

Con el objetivo de determinar si la acumulación de las proteínas virales en MT se debe al movimiento

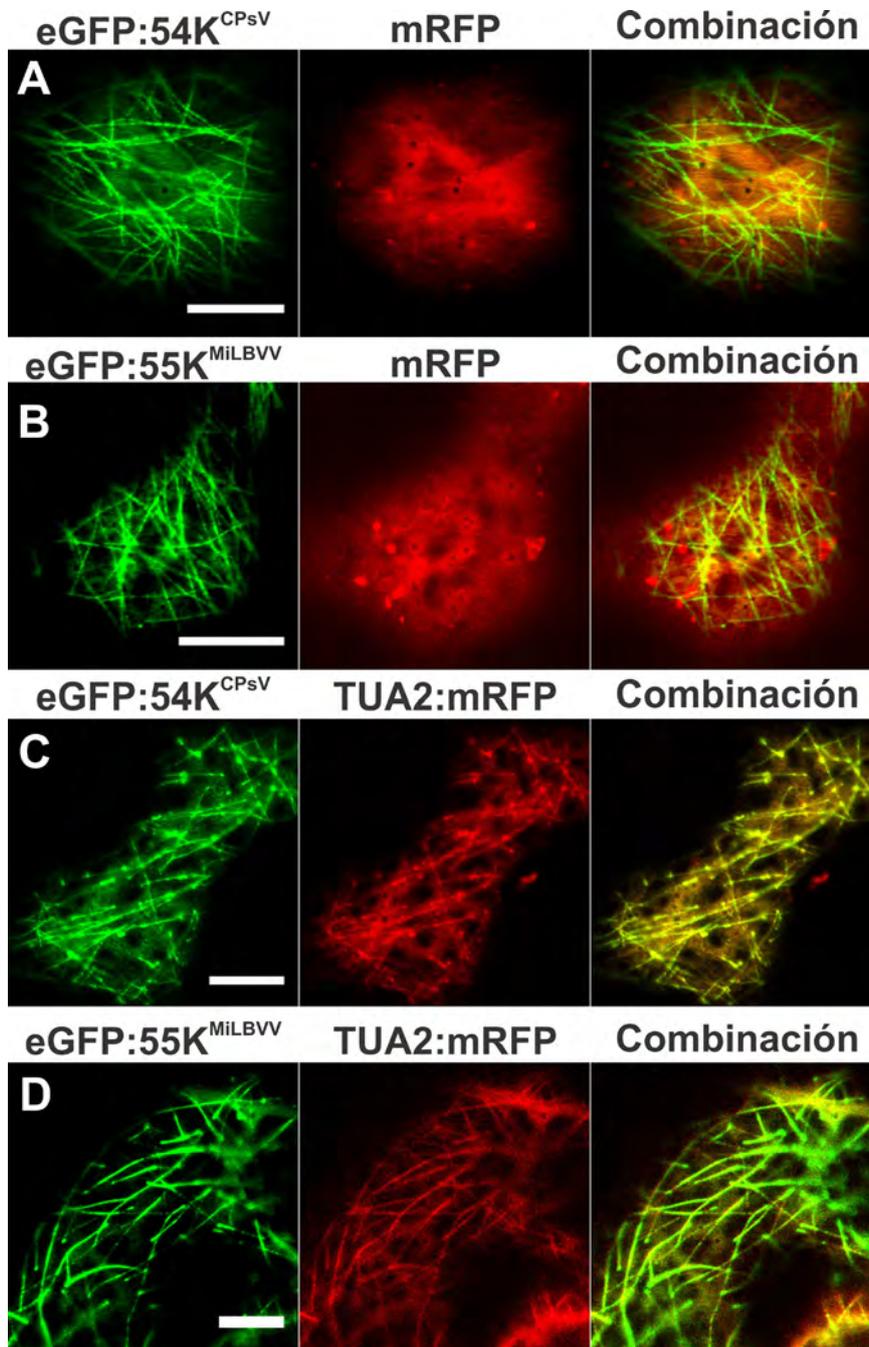


Figura V.4. Localización subcelular en el plano cortical de las 54K^{CPsV} and 55K^{MiLBVV} fusionadas a PF. Co-expresión de eGFP:54K^{CPsV} (A) o eGFP:55K^{MiLBVV} (B) con mRFP libre a los 3 dpai en células epidérmicas de *N. benthamiana*. Co-expresión de eGFP:54K^{CPsV} (C) o eGFP:55K^{MiLBVV} (D) con TUA2:mRFP a los 3 dpai en células epidérmicas de *N. benthamiana*. La barra representa 10 μ m. TUA2:mRFP: α -tubulina fusionada a mRFP.

de la proteína a lo largo del MT, o si las proteínas virales se recambian entre el MT y otro compartimiento como podría ser el citoplasma, se llevó a cabo un ensayo de recuperación de las

fluorescencia (FRAP) de MT marcados con la proteína $55K^{MiLBVV}:eGFP$. De acuerdo al patrón de recuperación de la fluorescencia, éste ensayo permite discriminar entre éstas alternativas. Si la proteína se mueve a lo largo del MT, en la zona fotoblanqueada la fluorescencia debería recuperarse desde los extremos de los filamentos del MT, debido a un movimiento sobre la superficie del MT, mientras que si lo hacen desde el citoplasma, la fluorescencia debería recuperarse en todo el filamento al mismo tiempo. Por ejemplo, un ensayo realizado con la MP^{TMV} y con la proteína endógena *Microtubule-associated protein 65*, MAP65-5 (Ashby *et al.* 2006) mostró un patrón de recuperación uniforme indicando que habría un recambio con éstas proteínas presentes en el citoplasma. Cuando este ensayo se realizó con $55K^{MiLBVV}$ la intensidad de la fluorescencia en la región fotoblanqueada cayó al 7% y luego de 16 min se recupera al 25% (Figura V.5.A y B). Esta recuperación se observa en forma uniforme y al mismo tiempo, en todos los filamentos de la zona fotoblanqueada, por lo que interpretamos que ocurre un recambio de la proteína $55K^{MiLBVV}$ localizada en el MT por la proteína citoplasmática, o que sería poco probable que la $55K^{MiLBVV}$ se mueva a lo largo del MT.

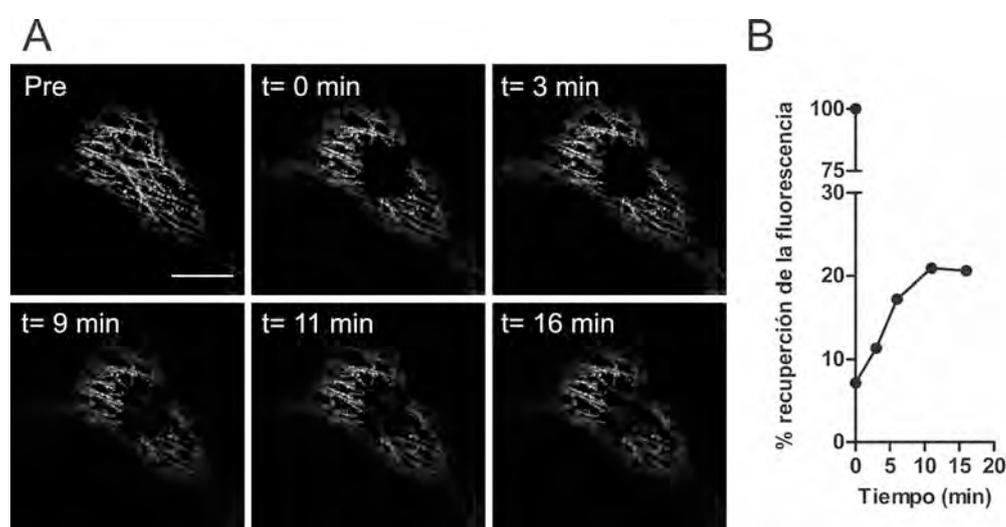


Figura V.5. Acumulación de la proteína $55K^{MiLBVV}$ en MT. FRAP de MT marcados con la proteína $55K^{MiLBVV}:eGFP$. (A) Imágenes de microtúbulos marcados con $55K^{MiLBVV}:eGFP$, antes del fotoblanqueo y después de 0, 3, 9, 11 y 16 minutos de tiempo de recuperación. (B) Curva de recuperación de la fluorescencia en relación a la intensidad de fluorescencia de la región blanqueada corregida a la pérdida de fluorescencia por el blanqueo debido a la toma de las imágenes. La barra representa 10 μ m.

V.3.3 Localización en plasmodesmos

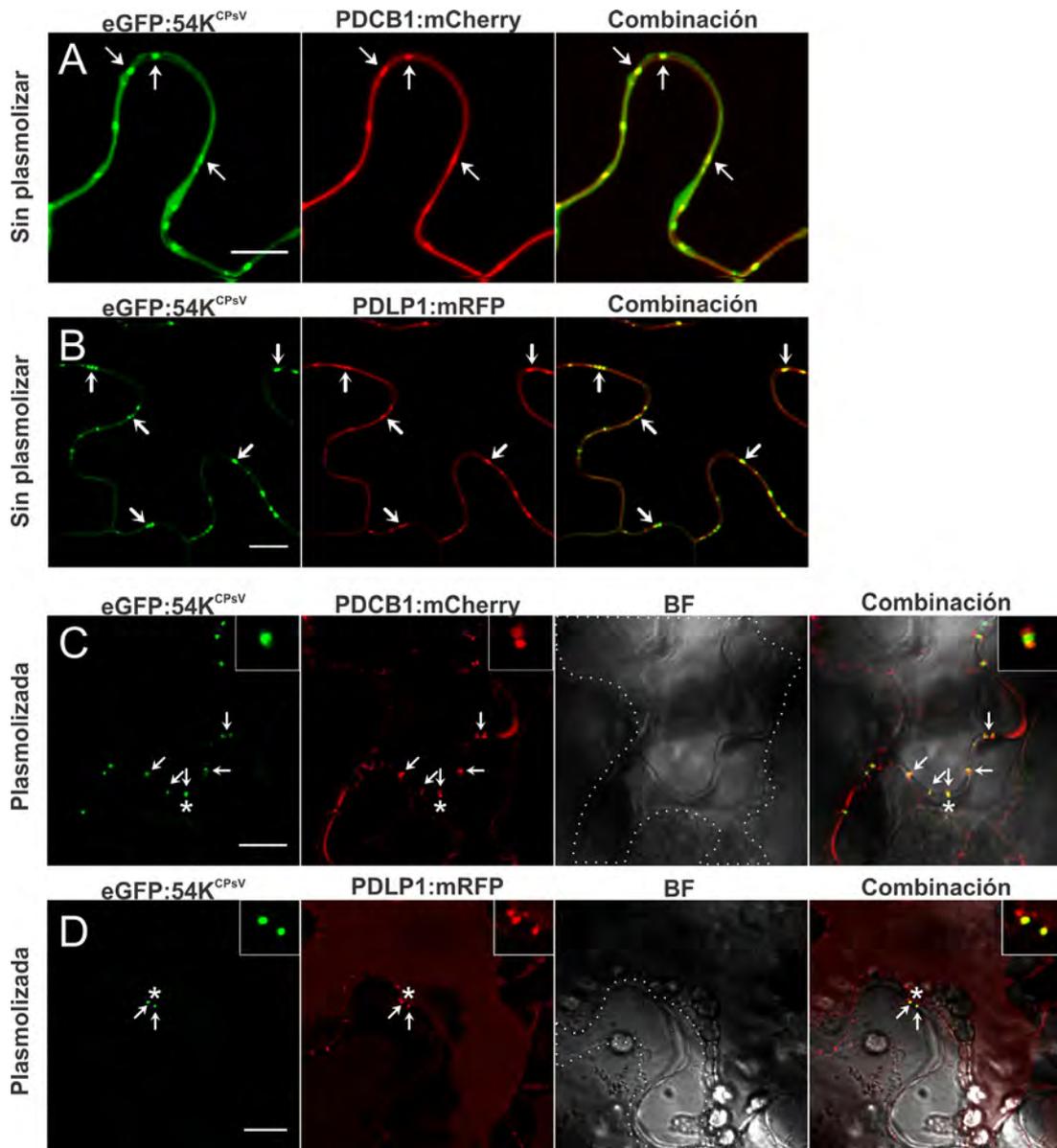


Figura V.6. La proteína $54K^{CPsV}$ se localiza en el canal del PD. (A, B) Co-expresión de $eGFP:54K^{CPsV}$ con $PDCB1:mCherry$ y $PDLP1:mRFP$, respectivamente, en células de *N. benthamiana* a los 3 dpi. (C, D) se observan las mismas co-localizaciones pero en células plasmolizadas por infiltración con glicerol 30%. La barra representa 10 μm ; las flechas señalan los PD; el área formada por la línea de puntos en la imagen de campo claro (BF) representa la pared celular expuesta luego de la plasmólisis; los asteriscos indican la región en la que se hizo zoom, mostrado en el recuadro superior derecho de C y D.

Cuando se observa la pared de células epiteliales se visualizan con claridad puntos o agregados inmóviles en el 80-90 % de las células que expresan las fusiones de $54K^{CPsV}$ y $55K^{MiLBVV}$ con todas las fusiones probadas. Para identificar la localización subcelular se empleó el marcador de PD,

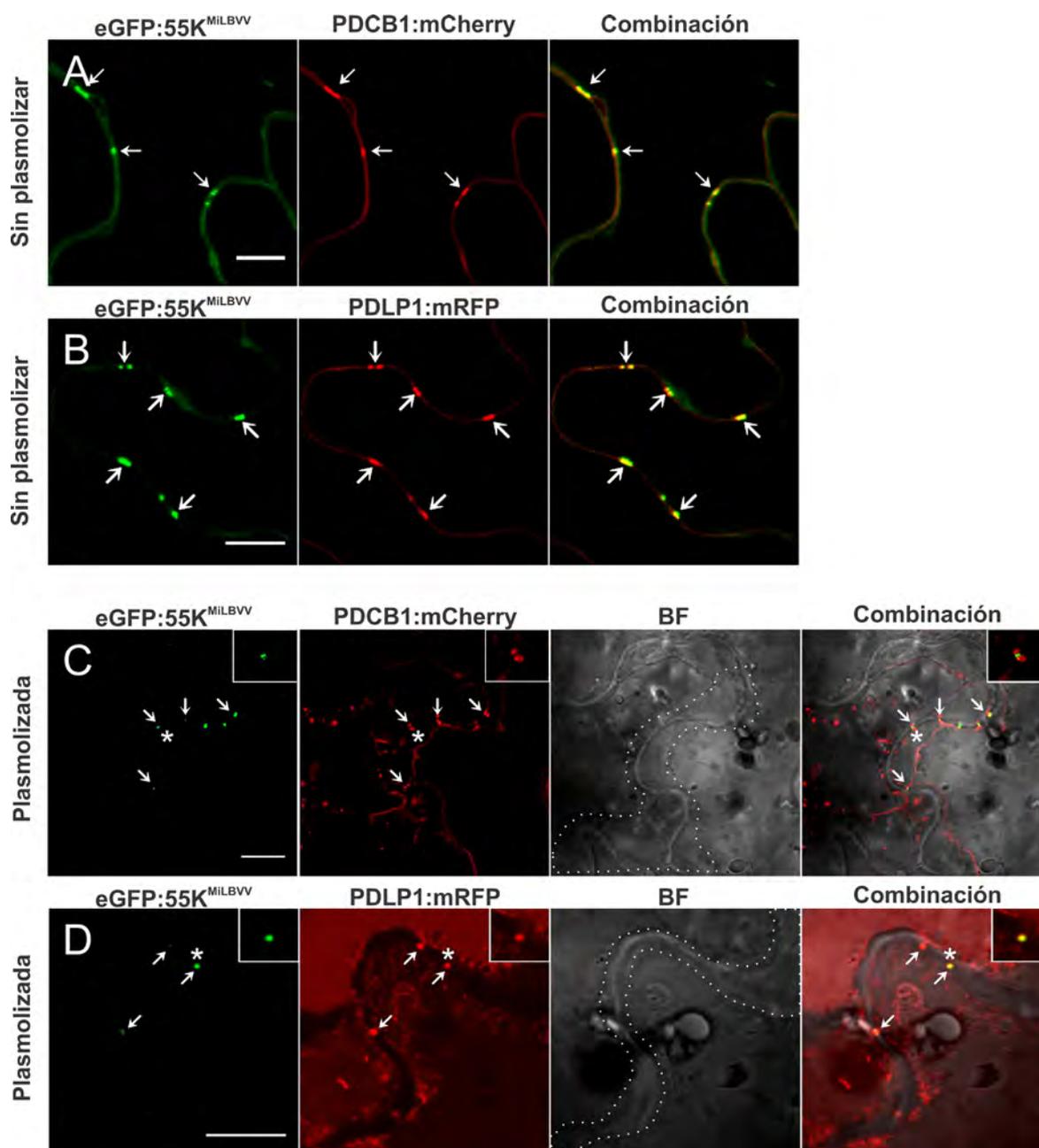


Figura V.7. La proteína $55K^{MiLBVV}$ se localiza en el canal del PD. (A, B) Co-expresión de $eGFP:55K^{MiLBVV}$ con PDCB1:mCherry y PDLP1:mRFP, respectivamente, en células de *N. benthamiana* a los 3 dpai. (C, D) se observan las mismas co-localizaciones pero en células plasmolizadas por infiltración con glicerol 30%. La barra corresponde a $= 10 \mu m$; las flechas señalan los PD; el área formada por la línea de puntos en la imagen de campo claro representa la pared celular expuesta luego de la plasmólisis; los asteriscos indican la región a la que se hizo zoom, la cual se muestra en el recuadro superior derecho de C y D.

Plasmodesmata callose binding protein 1 PDCB1:mRFP (Simpson *et al.*, 2009). Este marcador subcelular se acumula en el cuello del PD donde existen depósitos de calosa (Simpson *et al.*, 2009). Como representativo de estos ensayos, se muestran imágenes de la co-localización del marcador y las proteínas $eGFP:54K^{CPsV}$ (Figura V.6.A) y $eGFP:55K^{MiLBVV}$ (Figura V.7.A). Con el objeto de

determinar si las proteínas quedan retenidas en pared celular y en plasmodesmos (PD), las células fueron plasmolizadas, haciendo que la membrana plasmática se retraiga y deje expuesta la pared celular. De esta manera, se observó claramente que la fluorescencia de eGFP:54K^{CPsV} (Figura V.6.C, recuadro superior) y de eGFP:55K^{MiLBVV} (Figura V.7.C, recuadro superior) se localiza entre la fluorescencia del marcador, a los lados del PD. Dado que éste se acumula en el cuello del PD, este resultado indicaría que las proteínas eGFP:54K^{CPsV} o eGFP:55K^{MiLBVV} se acumulan dentro del canal del PD. Para confirmar esta observación se empleó otro marcador que pertenece a la familia de proteínas denominada *Plasmodesmata located protein* (PDLP) (Thomas *et al.*, 2008). Estas proteínas se acumulan en PD en subdominios dentro del canal del PD (Maule *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). La co-localización entre las proteínas eGFP:54K^{CPsV} (Figura V.6.B) y eGFP:55K^{MiLBVV} (Figura V.7.B) con PDLPI corroboró la primera observación. Cuando las células son plasmolizadas, observamos que la fluorescencia roja del marcador se encuentra en la misma región que la fluorescencia verde de las proteínas virales. Por lo tanto, podemos concluir que eGFP:54K^{CPsV} y eGFP:55K^{MiLBVV} se acumulan en el canal del PD, sugiriendo fuertemente que éstas proteínas están involucradas en el movimiento célula-a-célula de estos ophiovirus.

V.4. Análisis de la capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para transportar proteínas y RNA a la célula vecina en *N. benthamiana*

V.4.1. Capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para transportar proteínas a la célula vecina

Como se mencionó anteriormente, las MPs de virus de plantas poseen la capacidad de ampliar el SEL del PD, es decir aumentar la sección del poro que conecta ambas células (Derrick *et al.*, 1992; Poirson *et al.*, 1993; Vaquero *et al.*, 1994; Wolf *et al.*, 1989), lo que es esencial para el movimiento célula-a-célula del virus.

Para determinar si las proteínas de CPsV y MiLBVV poseen esta capacidad se realizaron ensayos denominados “gating” de GFP (ver Materiales y Métodos) en los que se incluyeron todas las proteínas virales, excepto la RdRp, esto es: 24K^{CPsV}, 25K^{MiLBVV}, CP^{CPsV}, CP^{MiLBVV}, 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV}, cuyas construcciones ya han sido descritas previamente.

Para eso, como control negativo se expresó GFP citosólica en células aisladas, junto con el vector vacío pGD y la proteína supresora P19 en una mitad de la hoja, mostrando que en las condiciones experimentales ensayadas el estado fisiológico de las células corresponde a hojas fuente. Es decir, la condición de este ensayo es que las hojas deben tener células que funcionen como “fuente”, y así la proteína GFP se encuentre sólo en células aisladas, es decir, sólo en aquellas células que fueron transformadas. En nuestro caso, el 87% (13 de 15) de los foci expresaban GFP en una célula aislada, y

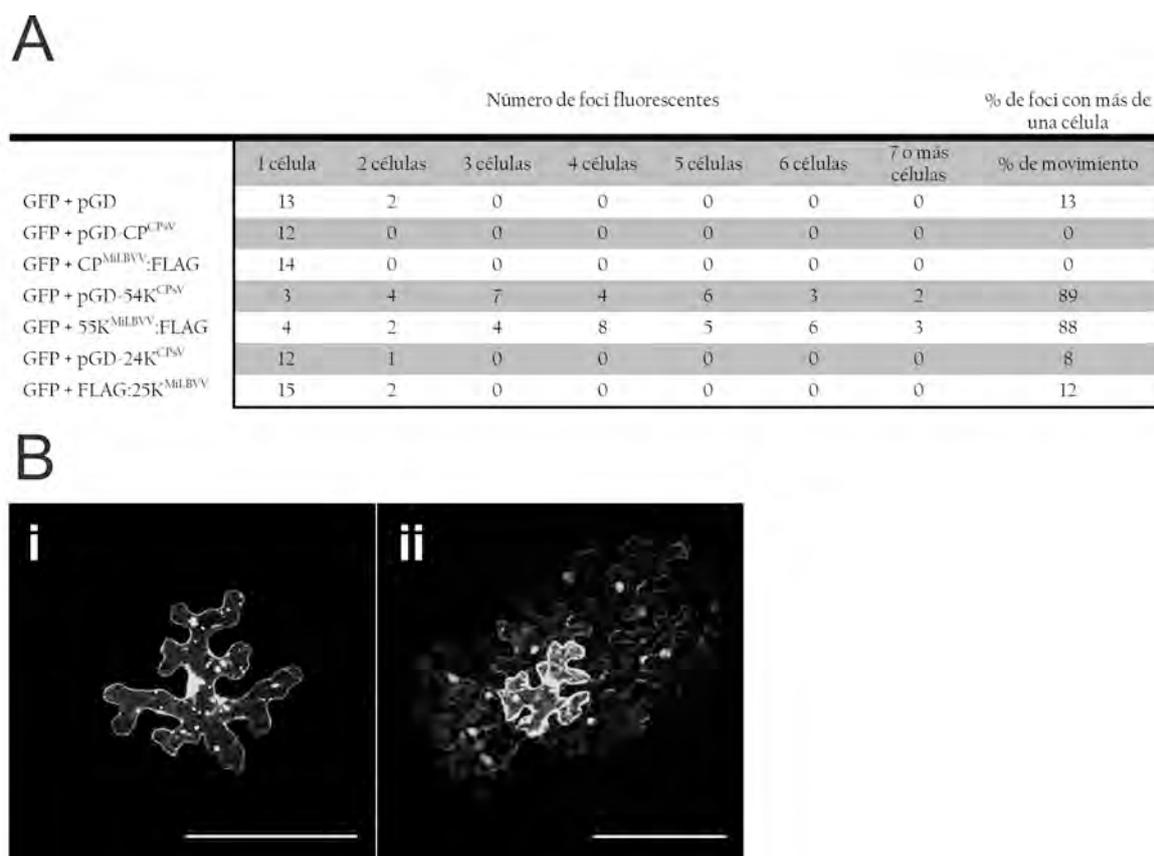


Figura V.8. Capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para transportar proteínas a la célula vecina. Ensayo de *gating* de GFP en hojas de *N. benthamiana*. (A) Tabla: número de foci encontrados para un número de células determinado, y para cada proteína viral ensayada, el % de foci fluorescentes con dos o más células fue determinado respecto al total de foci (B) Imágenes representativas de una célula aislada (i) y de un grupo con más de 7 células (ii). La barra corresponde a 150 μ m.

sólo en el 13% de los foci contados, GFP se encontró en sólo dos células adyacentes (Figura V.8.A y B(i)). Realizando el ensayo en estas condiciones, cuando se co-expresó GFP citosólica con 24K^{CPsV}, 25K^{MiLBVV}, CP^{CPsV} ó CP^{MiLBVV} en una mitad de la hoja, se observó el mismo patrón que el control negativo (Figura V.8.A y B(i)). Por lo tanto podemos concluir que ninguna de estas proteínas facilita el pasaje de GFP a células adyacentes. La fluorescencia de GFP fue observada en grupos de 2 a 7 células en el 88% y 89% de los foci observados para las hojas donde se expresaron 54K^{CPsV} y

55K^{MiLBVV}, respectivamente (Figura V.8.A y B(ii)). En la Figura V.8.B(ii) se muestra un foco representativo en donde una célula central presenta alta intensidad de fluorescencia y las células adyacentes una intensidad más baja, con un gradiente continuo hacia las células más alejadas, indicando que la célula central es la que fue transformada, y que de ésta se produjo el pasaje de la proteína GFP. Estos resultados indican que las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} inducen un aumento en el SEL.

V.4.2. Capacidad NCAP de las proteínas de CPsV y MiLBVV

Para determinar si las proteínas en estudio poseen la capacidad denominada NCAP, se realizaron ensayos similares a los de la sección anterior, pero utilizando las fusiones eGFP:54K^{CPsV} (82 kDa), eGFP:55K^{MiLBVV} (83 kDa), CP^{CPsV}:eGFP (76 kDa), CP^{MiLBVV}:eGFP (76 kDa), 24K^{CPsV}:eGFP (63 kDa) y eGFP:25K^{MiLBVV} (63 kDa). En estas fusiones, al llevar GFP puede ser observada su capacidad de movilizarse a la célula vecina. El tamaño de estas proteínas excede el SEL en hojas fuente o sumidero, por lo tanto, impediría movilizarse por difusión a la célula vecina, a menos que presenten capacidad NCAP.

En nuestros ensayos se observaron focos con 2 o más células en el 76% y 77% de los focos observados para las hojas donde se expresaron eGFP:54K^{CPsV} y eGFP:55K^{MiLBVV}, respectivamente (Figura V.9.A y B(i)). La presencia de estas proteínas en la célula fue evidenciada por los PD marcados en estos mismos focos. Se observa un gradiente desde la célula central a las contiguas, si bien este parece ser menos pronunciado que el observado en la Figura V.8.B (ii). Las fusiones C-terminales también presentaron este patrón. Por el contrario, en las condiciones experimentales ensayadas, las proteínas CP^{CPsV}:eGFP, CP^{MiLBVV}:eGFP, 24K^{CPsV}:eGFP y eGFP:25K^{MiLBVV}, no presentaron esta capacidad de NCAP dado que sólo se observaron en células aisladas (Figura V.9.B (ii) y (iii), respectivamente).

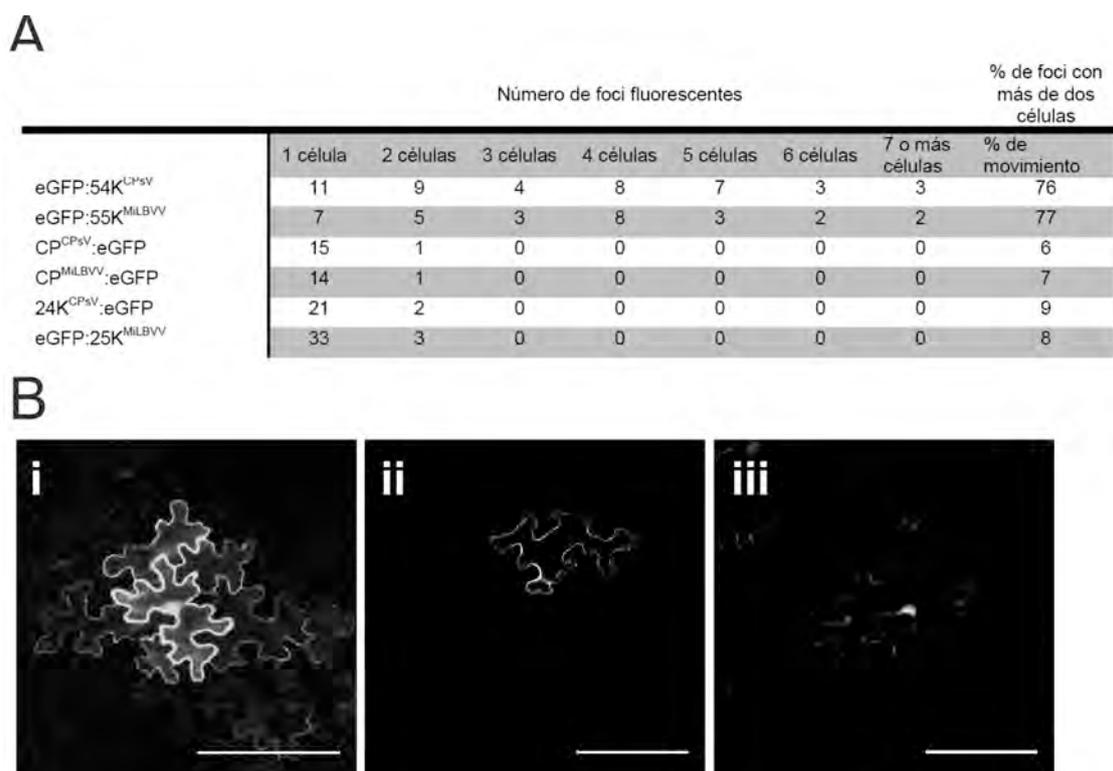


Figura V.9. Capacidad NCAP de las proteínas eGFP:54K^{CPsV}, CP^{CPsV}:eGFP, CP^{MiLBVV}:eGFP, 24K^{CPsV}:eGFP y eGFP:25K^{MiLBVV}. Ensayo de *gating* de GFP en hojas de *N. benthamiana*: (A) Tabla: número de foci encontrados para un número de células determinado, y para cada proteína viral ensayada, el % de foci fluorescentes que tienen dos o más células en relación al total de foci para cada una de las muestras (B) Imágenes representativas de una célula aislada (i) y de un grupo con más de 7 células (ii). La barra corresponde a 150 μ m (B) Imágenes representativas de un grupo de más de 7 células expresando eGFP:54K^{CPsV} (i); células aisladas de CP^{CPsV}:eGFP (ii); o de eGFP:25K^{MiLBVV} (iii). La barra corresponde a 150 μ m.

V.4.3. Capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para transportar RNA a la célula vecina

La capacidad de NCAP observada con las fusiones eGFP:54K^{CPsV}, eGFP:55K^{MiLBVV} y la de difundir la GFP que presentan éstas proteínas virales, podría explicarse por el pasaje de la proteína GFP o del mRNA del cual se sintetiza. Para explorar esta hipótesis se empleó una proteína variante de GFP que contiene un péptido de retención en el retículo endoplásmico (GFP-Er). El direccionamiento a este compartimiento subcelular impide la llegada de la proteína al PD y su difusión a la célula vecina. Sin embargo, no impediría que el mRNA presente en el citoplasma pueda ser transportado a través del PD. Por lo tanto éste ensayo permite determinar si la molécula que difunde a la célula vecina se trata del mRNA o de la proteína (Oparka et al., 1999). Así, se substituyó la GFP citosólica por GFP-Er en un ensayo como el descrito previamente. Para ambas proteínas, 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV}, la fluorescencia observada se encontró en células aisladas, así como también para el control de vector vacío (Figura V.10.A y B), indicando éstas proteínas no facilitan el movimiento de este mRNA. En vista de estos resultados, se propuso ampliar el análisis a todas las combinaciones de proteínas

virales, determinando si alguna de ellas podría facilitar el movimiento del mRNA de GFP-Er. Se ensayaron las proteínas de MiLBVV y combinaciones como se indica: CP^{MiLBVV}; 25K^{MiLBVV}; 55K^{MiLBVV} + 25K^{MiLBVV}; 55K^{MiLBVV} + CP^{MiLBVV}; 25K^{MiLBVV} + CP^{MiLBVV}; 25K^{MiLBVV} + 55K^{MiLBVV} + CP^{MiLBVV}; y lo mismo para las proteínas de CPsV: CP^{CPsV}; 24K^{CPsV}; 54K^{CPsV} + 24K^{CPsV}; 54K^{CPsV} + CP^{CPsV}; 24K^{CPsV} + CP^{CPsV}; 24K + 54K^{CPsV} + CP^{CPsV}. En ninguno de estos casos se observó foci con 2 o más células expresando GFP-Er de forma diferencial al control de vector vacío.

Por lo tanto podríamos concluir que sólo las proteínas codificadas en el RNA 2 de los ophiovirus CPsV y MiLBVV facilitan el pasaje de la proteína GFP, y de ellas mismas a células adyacentes.

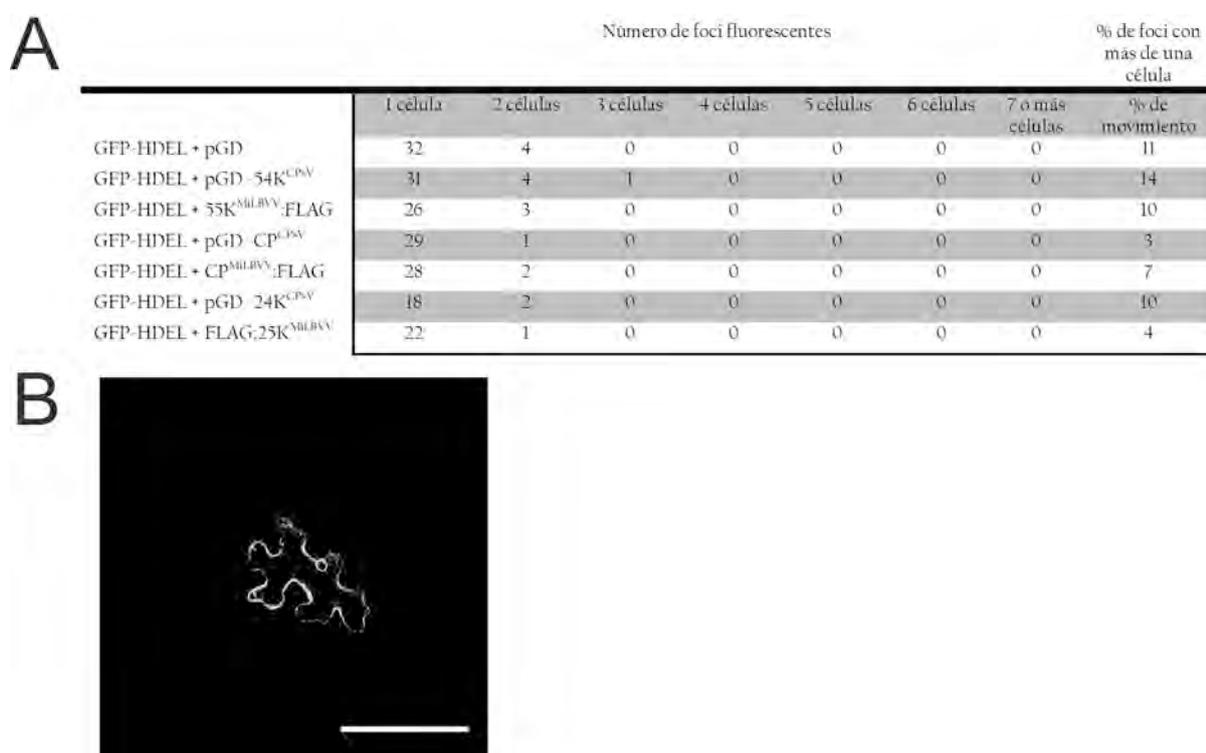


Figura V.10. Capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para transportar mRNA-GFP a la célula vecina en *N. benthamiana*. Ensayo de *gating* de mRNA de GFP-Er. (A) número de foci encontrados para un número de células determinado, y para cada proteína viral ensayada, el % de foci fluorescentes que tienen dos o más células respecto al total de foci. (B) Imágenes representativas de un cluster de una célula aislada (i). La barra corresponde a 150 μ m.

V.5. Capacidad de las proteínas de CPsV y MiLBVV para *trans*-complementar el movimiento célula-a-célula de PVX.GUS-BspI en *N. benthamiana*

Como se mencionó en la Introducción, para la identificación de MPs de virus negativos, como herramienta de estudio se utilizan ensayos biológicos de transcomplementación de virus positivos deficientes en el movimiento. Resultados previos a este trabajo de tesis sugerían que la proteína

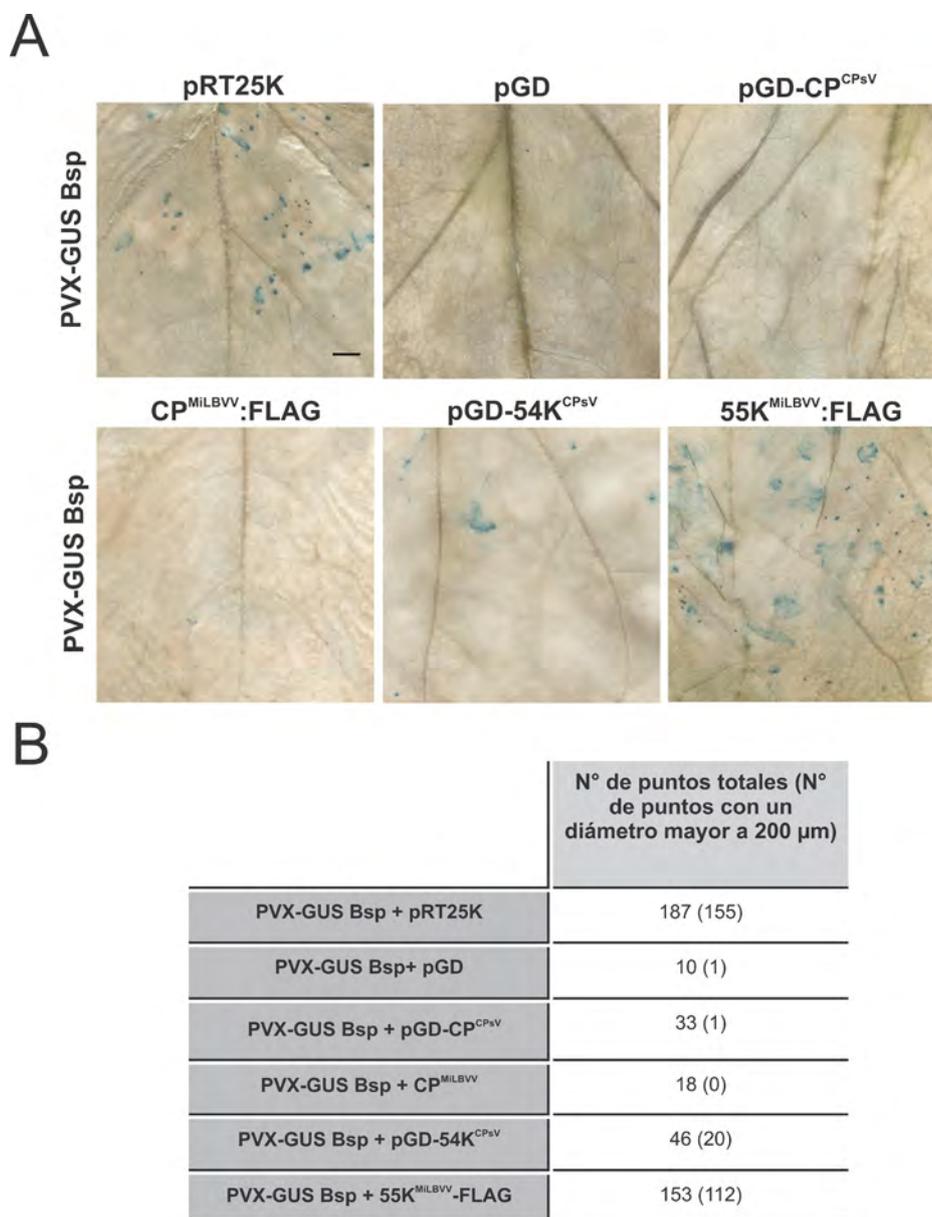


Figura V.II. *Trans*-complementación de PVX.GUS-Bsp por las proteínas 54K^{CPsV} and 55K^{MILBVV} (A) Imágenes representativas de hojas de *N. benthamiana* bombardeadas con DNA de la construcción indicada, reveladas por tinción histoquímica para el marcador GUS. (B) Número de puntos encontrados para cada construcción co-bombardeada con PVX.GUS-Bsp, y análisis del número de puntos con un diámetro superior a 200 μm (entre paréntesis). La barra corresponde a 2 mm.

54K^{CPsV} trans-complementaba un mutante de movimiento del virus *Potato virus X* (PVX) (Peña, 2009). PVX pertenece a la familia *Potexviridae* de virus de plantas de polaridad positiva. Su estrategia de movimiento célula-a-célula requiere de tres proteínas, codificadas por el que se denomina *triple*

gene box (TGB), junto con la proteína de cubierta. Por técnicas de DNA recombinante se generó un virus vector mutante, PVX.GUS-BspI, que presenta una delección en el gen de la proteína 25K, que lo hace deficiente en el movimiento célula-a-célula (Morozov *et al.*, 1997). Este virus-vector puede multiplicarse en una célula, pero no se mueve a la célula adyacente. Sin embargo, si en la misma célula se expresa en *trans* la proteína 25K de PVX, homóloga y funcional, se restablece el movimiento. Como fuera mencionado éste vector ha sido empleado en la identificación de varias MPs, aún para virus que poseen estrategias de movimiento diferentes, sean sus genomas de polaridad positiva o negativa, restaurando el movimiento célula-a-célula de PVX (Xiong *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; Morozov *et al.*, 1997).

Éste sistema fue empleado para obtener otra evidencia acerca de la función de movimiento célula-a-célula de las proteínas de CPsV y MiLBVV. Con este fin se co-bombardearon hojas de *N. benthamiana* con partículas de oro recubiertas de DNA plasmídico de pPVX.GUS-BspI junto con pRT25K (control positivo) o pGD (control negativo) o con los plásmidos que expresan las proteínas CP^{CPsV}, CP^{MiLBVV}, 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV}. En la Figura V.11.A se muestran los sitios de infección de PVX, a 2 días post bombardeo (dpb), que se visualizaron mediante ensayo histoquímico GUS (β -glucuronidasa). Cuando pPVX.GUS-BspI fue precipitado en los microproyectiles junto con el vector vacío pGD (Goodin *et al.*, 2002) y bombardeado en hojas de *N. benthamiana* sólo se observó un número muy bajo de puntos, cuyo diámetro correspondía a células aisladas. Al bombardear hojas con pPVX.GUS-BspI junto con la construcción que expresa la proteína homóloga p25 (pRT25K), control positivo, el número y tamaño fueron los esperados, un número alto de puntos con diámetro mayor a 200 μ m (155/189), tal como describe Morozov y colaboradores (1997). Cuando se bombardeó con pPVX.GUS-BspI y los plásmidos disponibles para expresar 54K^{CPsV} o 55K^{MiLBVV} (pGD-54K^{CPsV} o pGWB-55K^{MiLBVV}:FLAG) encontramos que 20 de 46 y 112 de 153 presentaban un diámetro mayor a 200 μ m (Figura V.11.B). No sería correcto analizar las diferencias observadas entre las proteínas 54K^{CPsV} o 55K^{MiLBVV}, dado que se expresan de diferentes plásmidos. No se observaron puntos con un diámetro mayor a 200 μ m cuando se co-bombardearon pPVX.GUS-BspI junto con CP^{CPsV} o CP^{MiLBVV} (Figura V.11.A y B).

Por lo tanto estos resultados aportan una evidencia funcional de que las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} complementan a este virus PVX mutante en el movimiento célula-a-célula.

Conclusiones

- Las proteínas codificadas en el RNA 2 de CPsV y MiLBVV fusionadas en el C-terminal se localizan en la superficie de los cloroplastos formando agregados.
- Las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} se encuentran dentro del canal del PD.
- Las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} se acumulan en MT y esta última se recambia con la proteína soluble citoplasmática.
- Las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} aumentan el SEL de los PD.
- Las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} presentan actividad de NCAP, mientras que el resto de las proteínas virales de ambos virus no lo hacen.
- Las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} individualmente o en combinación con las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} y/o CPs no son capaces de mover el mRNA de GFP-Er a una célula vecina.
- Las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} transcomplementan al virus mutante PVX en el movimiento célula-a-célula, mientras que las CPs no lo hacen.

Discusión

Las proteínas de movimiento son muy variables en tamaño, estructura y secuencia aminoacídica. En el estudio de las proteínas de los ophiovirus las primeras evidencias, obtenidas en nuestro laboratorio, indicaban que la proteína MP^{CPsV} se encontraban en citoplasma y al menos una de las fracciones enriquecidas en núcleo/cloroplasto, pared celular o microsomas (Peña, 2009). En este trabajo de tesis se determina que las proteínas codificadas en el RNA 2 de CPsV y MiLBVV, se localizan en PD, MT, cloroplastos, además de núcleo, citoplasma y P-bodies, estas últimas tres mostradas en el Capítulo IV.

Muy probablemente la proteína 54K^{CPsV} se cliva parcialmente *in vivo* tanto durante la infección en *C. quinoa*, y en *N. benthamiana* como 54K^{CPsV}:eGFP, fuera del contexto de la infección, mientras que 55K^{MiLBVV}:eGFP se cliva en mucha menor proporción. Por lo expuesto en este Capítulo, este clivado no parece afectar ninguna de las localizaciones, ni actividades de las mismas analizadas aunque es de hacer notar que tanto la clivada como la no clivada están presentes. Este clivado podría estar participando en algún proceso del ciclo viral, o como se verá en el Capítulo VI podría estar relacionada con la capacidad de MP^{CPsV} formar túbulos en PD. El clivado de proteínas se ha descrito en potyvirus, que sintetizan una única poliproteína que es clivada por proteasas virales generando polipéptidos con distintos roles en el ciclo viral (Riechmann *et al.*, 1992). En virus negativos, se ha encontrado que la proteína Pc2 del tenuivirus *Rice stripe virus* (RSV) se cliva para dar los péptidos Pc2-N y Pc2-C, ambos con capacidad para traslocarse al RE. Se cree que estos dos péptidos cumplirían un rol similar a las glicoproteínas Gn y Gn de los tospovirus, las cuales están vinculadas a la interacción virus-vector (Zhao *et al.*, 2012). Por la probable función de los péptidos que resultan del clivaje de la proteína 54K^{CPsV} sería interesante primero, confirmar este procesamiento durante la infección, y luego investigar sus roles.

De acuerdo a nuestras observaciones ambas proteínas MP forman agregados que se localizan en la superficie de los cloroplastos. La localización en cloroplastos ha sido descrita para varias proteínas virales y ha sido asociada con procesos como replicación. En virus negativos como *Rice stripe virus* (RSV), la proteína NSvc4 se localiza en cloroplastos, pero no se ha descrito la relación de esta localización con el ciclo viral (Xu & Zhou, 2012). En los potyvirus la proteína integral 6K induce la formación de vesículas en los sitios de exportación de RE (Wei & Wang, 2008), que luego se fusionan con las membranas de los cloroplastos para formar fábricas virales en donde ocurre la replicación (Wei *et al.*, 2010).

Los cloroplastos así como las mitocondrias, en conjunto con los PD y el núcleo participan en una comunicación intracelular que regula la funcionalidad y estructura de los PD. A modo de ejemplo, ISE1 (*increased size exclusion limit 1*) es una proteína que se localiza en mitocondrias, y está señalada como una DEAD-box RNA helicasa. Los mutantes *isel* presentan un aumento en el transporte de GFP a través de PD, demostrando que la mitocondria también participa en la función del PD (Stonebloom *et al.*, 2009). Similarmente, ISE2, se localiza en el estroma de los cloroplastos y es una DEVH box helicasa, que presenta homología con RNA helicasas que actúan en la degradación de RNA y por lo tanto en la expresión génica, regulando así la estructura y función de los PD (Kobayashi *et al.*, 2007). Tal es así que tanto los mutantes *isel* como *ise2* tienen alterada la expresión de genes vinculados a diversos procesos celulares, especialmente el desarrollo de plástidos, aumentando la producción de PD e incrementando el transporte (Burch-Smith *et al.*, 2011). La relación cloroplasto-PD también se observa en la interacción planta-patógeno. El movimiento de los tobamovirus se ve afectado por proteínas de cloroplasto, como se muestra cuando se silencia la ATP sintasa o la RubisCo activasa, lo que aumenta el movimiento de TMV (Bhat *et al.*, 2013). Contrariamente, el silenciamiento de la subunidad menor de la RuBisCO retrasa el movimiento de tomato mosaic tobamovirus (Zhao *et al.*, 2013).

Por todo lo expuesto, es de interés analizar cuál es la relación de las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} o sus agregados, con la localización en la superficie de los cloroplastos, y en el contexto de la infección.

El aumento del SEL por parte de las MPs de los ophiovirus, fue confirmado no sólo por la habilidad que presentan éstas proteínas de facilitar el pasaje de GFP a la célula vecina, sino también por la capacidad de las fusiones N- y C-terminal de 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} de favorecer su propio movimiento a la célula vecina, lo cual se ha demostrado para varias MPs (Lucas, 2006; Niehl & Heinlein, 2011). Esta actividad NCAP, fue descrita para proteínas celulares, como el factor de transcripción *KNOTTED1* (KNI) (Lucas *et al.*, 1995), el cual se encuentra involucrado en controlar el destino celular en el meristema (Jackson & Hake, 1997).

Otro aspecto muy importante de las NCAPs es que en algunas de ellas se ha determinado la propiedad de movilizar RNA a la célula adyacente. Por ejemplo, KNI facilita el movimiento de su propio mRNA, mientras que otras proteínas como *Cucurbita maxima phloem protein* (CmPP16) facilita el movimiento de RNA célula-a-célula, independientemente de su secuencia (Xoconostle-Cazares *et al.*, 1999). En el caso de las MPs en general, si bien las MP pueden unir ssRNA *in vitro* de forma inespecífica, en la célula, el RNA que es transportado al PD es el viral. La especificidad de unión en el contexto viral podría explicarse por la presencia de otras proteínas virales que favorezcan el

reconocimiento de secuencias o estructuras que podría adoptar el RNA viral durante su replicación. En este trabajo de tesis se abordó esta pregunta mediante ensayos en los que se logró diferenciar el movimiento de la proteína GFP, del movimiento de su mRNA, confirmando que las MPs de los ophiovirus son capaces de moverse a sí mismas pero no el mRNA-GFP-Er. Incluso en presencia de las proteínas virales 24K^{CPsV}, 25K^{MiLBVV} y las CPs, es decir que no son capaces *in vivo*, de realizar el transporte de un RNA inespecífico. Además, aún no se cuenta con la expresión de la RdRp viral que podría ser esencial en este proceso. Por lo tanto este resultado podría deberse a la ausencia de la RdRp, como también de los RNAs genómicos conteniendo secuencias de reconocimiento y unión que faciliten el movimiento de RNA.

Como la estrategia de genética reversa no se ha establecido para CPsV ni para MiLBVV, la utilización de la *trans*-complementación utilizando un vector viral mutante como PVX o TMV resulta una estrategia alternativa para identificar MPs. Esta herramienta se ha empleado en varias ocasiones para identificar proteínas de movimiento de virus negativos. Tal es el caso de NSvc4 de RSV (Xiong *et al.*, 2008), la proteína P3 de Rice yellow stunt rhabdovirus (RYSV) (Huang *et al.*, 2005) y la proteína S6 de Rice dwarf virus (Li *et al.*, 2004). Por lo tanto, la actividad de movimiento de las proteínas de 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV}, en el contexto de la infección viral, fue analizada mediante *trans*-complementación de un mutante de PVX incapaz de moverse célula-a-célula. En paralelo al trabajo de esta tesis, el Dr. Eduardo Peña, mediante ensayos similares a los realizados para PVX, demostró que las proteínas 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} también son capaces de complementar el movimiento de TMV (Robles Luna *et al.*, 2013), confirmando la función de estas proteínas. Además, al mismo tiempo que se publicaban estos resultados, Hiraguri y colaboradores, demostraron en un ensayo similar que la proteína 55K^{MiLBVV} y no la 25K^{MiLBVV} ni la CP^{MiLBVV}, *trans*-complementa a un virus mutante de ToMV (Hiraguri *et al.*, 2013), aportando una evidencia más a los resultados expuestos en este Capítulo.

Los ensayos de *trans*-complementación no aportan evidencias acerca del mecanismo por el cual la proteína ensayada pudo complementar la función que carece el virus mutante. Si bien el mecanismo de movimiento de PVX se conoce en detalle, no existen estudios enfocados a determinar o explicar el mecanismo de complementación, que además, ocurre con MPs de virus significativamente distantes, como se mencionó previamente. Por lo tanto, podría especularse que existe cierta flexibilidad en los mecanismos de movimiento de los virus, tendientes a adaptarse a diferentes hospedantes y condiciones (Niehl & Heinlein, 2011).

Sabiendo que las MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} están involucradas en el movimiento de estos ophiovirus, podemos esperar que las proteínas codificadas en la misma posición genómica de otros ophiovirus,

actúen como MPs. Este sería el caso de la proteína 50K de *Lettuce ring necrosis virus*, codificada en el RNA 2, la cual como ya se ha mencionado, también pertenece a la superfamilia 30K.

El mecanismo por el cual los ophiovirus se replican y mueven intercelularmente sus genomas hacia el PD no se conoce y requiere ensayos complementarios. Hasta el momento, hemos encontrado que las proteínas MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} se acumulan a lo largo de microtúbulos. Además, resultados preliminares de fraccionamiento subcelular de hojas de cítrico infectado indicarían que está asociada a membranas ya que se detecta en la fracción microsomal (Peña, 2009). La MP^{TMV}, cuyo movimiento fue complementado por MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} (Robles Luna *et al.*, 2013), se localiza en los complejos de replicación (VRCs, del inglés *viral replication complexes*) que se forman tempranamente en el RE (Heinlein *et al.*, 1998; Mas & Beachy, 1999). Por lo tanto, algunos aspectos del mecanismo de movimiento de este virus son interesantes de tener en cuenta. Los VRCs de TMV se encuentran anclados a los microtúbulos y son enviados a PD a través de un movimiento lateral por el RE utilizando el sistema de actina/miosina (Heinlein *et al.*, 1995; Heinlein *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2005; Niehl *et al.*, 2012a; Niehl *et al.*, 2012b; Padgett *et al.*, 1996; Peña & Heinlein, 2012). La capacidad de la MP^{TMV} de interactuar con los microtúbulos correlaciona con la eficiencia de movimiento de TMV, ya que mutantes de la MP que han perdido la capacidad de acumularse en MT también muestran menor eficiencia en el movimiento del virus (Boyko *et al.*, 2000; Peña & Heinlein, 2012; Lebourier & Hirth, 1966). Además de TMV, MPs de otros virus también han mostrado una relación entre la asociación con MT y su actividad de movimiento. Algunos ejemplos son: la MP de Tomato mosaic virus Ob (Padgett *et al.*, 1996), la CP de PVX (Serazev *et al.*, 2003), la proteína TGBl de Potato mop-top pomovirus (Wright *et al.*, 2010), y la proteína Hsp70 de beet yellows closterovirus (Karasev *et al.*, 1992). A diferencia de estos virus, las MPs de *Grapevine fanleaf virus* o *Cowpea mosaic virus* MPs dependen del sistema de secreción, ya que el tratamiento con Brefeldina A (inhibidor del sistema de secreción), inhibe la formación de túbulos en el PD (Laporte *et al.*, 2003; Pouwels *et al.*, 2002). Sin embargo, el uso de drogas que despolimerizan los MTs (oryzalina) evita el direccionamiento correcto de los túbulos de MP (Laporte *et al.*, 2003). Utilizando estas mismas estrategias de estudio, resulta interesante estudiar cuál es la vía por la cual las MPs de los ophiovirus llegan a PD, y si comparten o no el mecanismo de MPs de virus conocidos.

Por lo tanto, contamos con fuertes evidencias de que 54K^{CPsV} y 55K^{MiLBVV} son las proteínas de movimiento de CPsV y MiLBVV, que en adelante serán nombradas como MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV}.

Perspectivas

De acuerdo a nuestras observaciones las proteínas MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} se clivan aparentemente dentro de la célula, y la MP^{CPsV} en mucha mayor proporción. La funcionalidad, si así fuera, de este procesamiento no se ha estudiado hasta el momento. Es por esta razón que en el futuro habría que confirmar este procesamiento, y sería muy interesante analizar la función de los péptidos generados. Para esto, se propone identificar el sitio de clivado y utilizar ésta información para el diseño de mutantes que sólo expresen cada uno de los péptidos, y de mutantes que no se cliven, para estudiar las implicancias de esta mutación en la función de la proteína (localización subcelular, llegada al PD, unión a MT, transcomplementación, etc).

La localización de las MPs en cloroplastos amplía nuestro espectro de estudio en relación a la función que cumplen estas proteínas. El estudio de las implicancias de esta localización en el ciclo viral reviste especial interés. Como se mencionó en la Discusión esta localización podría estar afectando el SEL del PD, donde podría ocurrir la replicación viral. Para este estudio es necesario generar mutantes que pierdan esta localización y llevar a cabo una caracterización exhaustiva de los mismos empleando los ensayos funcionales mencionados anteriormente. Con el objetivo de analizar si se observan alteraciones en los cloroplastos debido a la infección con CPsV, se propone comparar la estructura de los mismos entre células infectadas y sanas al microscopio electrónico.

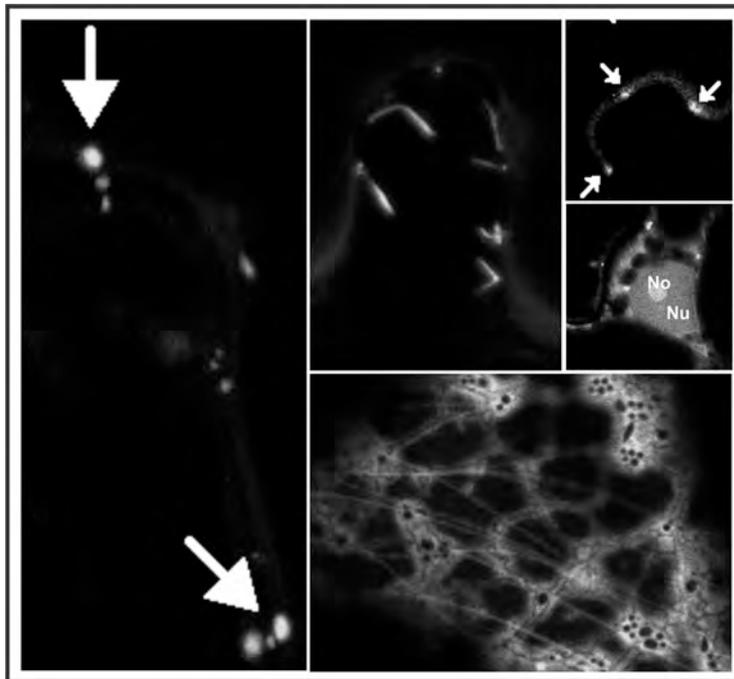
Si bien estas proteínas se localizan en PD, es de interés conocer los componentes celulares que asisten al direccionamiento de las MPs a esta localización. Una estrategia de estudio es analizar el tráfico de estas proteínas en condiciones tales que las vías conocidas de direccionamiento, tales como la vía secretoria, MTs, sistema actina/miosina, se vean afectadas. Es claro que tanto la MP^{CPsV} como la MP^{MiLBVV} interactúan directa o indirectamente con MTs dada su localización en los mismos y además es muy probable que exista un recambio con la proteína citosólicas, lo cual sugiere que las MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} tendrían la propiedad de comportarse como MAPs. Para confirmar esto se propone el estudio de la interacción directa entre las MPs y α -tubulina, la estabilización de los MTs debido a la unión de las MPs, además de realizar estudios de resistencia a drogas despolimerizantes como olizarin.

Sería de interés comenzar el estudio de la necesidad de los MTs en el movimiento célula-a-célula de los ophiovirus. En *C. quinoa* CPsV y MiLBVV generan lesiones necróticas por respuesta hipersensible (HR) de 3 mm de diámetro en promedio. Es por lo tanto el sistema adecuado con el que contamos en el laboratorio, dado que en *N. benthamiana* da una infección asintomática, para estudiar las implicancias de los MTs, red de actina, sistema de secreción, etc, en el movimiento viral célula-a-

célula. La medida del tamaño de las lesiones en relación a drogas que afecten estas estructuras celulares permitirá analizar la relación que existe entre ellas. Estos resultados derivarán en el estudio del mecanismo de movimiento de los ophiovirus, que contribuirá en última instancia, al conocimiento de mecanismos celulares de movimiento de RNA y proteínas en plantas.

Capítulo VI

Primeros estudios del mecanismo de movimiento de CPsV y MiLBVV



Introducción

VI.1 Mecanismos de movimiento viral

Como se mencionó en el Capítulo V los virus utilizan canales regulables que conectan dos células adyacentes a fin de infectar a la célula vecina. El pasaje de las partículas virales a la célula adyacente, al floema y de éste a una célula de otra hoja, es la consecuencia de un intrincado mecanismo en donde las proteínas virales se expresan de forma diferencial en el tiempo y en el tejido infectado, interaccionando entre ellas y con proteínas celulares del hospedante. Teniendo en cuenta que los virus utilizan la maquinaria celular, explotando estas vías endógenas para mover los complejos ribonucleoproteicos virales a la célula adyacente y a toda la planta (Niehl & Heinlein, 2011), el estudio del mecanismo movimiento viral reviste especial interés ya que puede ser utilizado como herramienta para develar mecanismos celulares aún desconocidos o proteínas celulares involucradas en estos procesos.

Si bien todos los virus se mueven célula-a-célula, el mecanismo de movimiento difiere entre ellos. Estos mecanismos se han clasificado en dos grandes grupos, basándose en el tipo de modificación que las MP generan en los PD. Como se esquematiza en la Figura VI.1, un grupo de virus se caracterizan por no modificar la estructura del PD considerablemente, no remueven los desmotúbulos (DT), y se denomina “no-guiado por túbulos”. En otro grupo de virus, se observa una alteración considerable en la estructura de los PD, remueven los DT y éstos son reemplazados por un túbulo formado por subunidades de MP. A este mecanismo se lo denomina “guiado por túbulos”. Ejemplos de virus a RNA de simple cadena que emplean la estrategia de guiado por túbulos son los como-, nepo-, olea-, alfamo-, bromo-, tospo- y trichovirus; (Grieco *et al.*, 1999; Ritzenthaler *et al.*, 1995; Storms *et al.*, 1995; van der Wel *et al.*, 1998; van Lent *et al.*, 1991; Wiczorek & Sanfacon, 1993), y a DNA de doble cadena, los caulimovirus (Cheng *et al.*, 1998; Kitajima *et al.*, 1969; Perbal *et al.*, 1993), siendo los más estudiados son *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (Amari *et al.*, 2010; Amari *et al.*, 2011; Laporte *et al.*, 2003; Pouwels *et al.*, 2002) *Cowpea mosaic virus* (CPMV) (van Lent *et al.*, 1991; Wellink *et al.*, 1993) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Kormelink *et al.*, 1994; Storms *et al.*, 1995). Si bien el mecanismo de algunos de ellos se ha estudiado parcialmente, caben resaltar los resultados *in planta* obtenidos para la MP^{GFLV} que evidencian la necesidad de una proteína celular. La localización de MP^{GFLV} en PD y la formación de estas estructuras tubulares es dependiente de la presencia de un receptor, el cual pertenece a la familia de proteínas denominadas *plasmodesmata located protein* (PDLP) (Amari *et al.*, 2010; Amari *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2008). Se ha observado que la MP^{GFLV} requiere de un sistema de

secreción funcional para la formación de los túbulos, mientras que el citoesqueleto no es necesario para que ocurra ésta formación. Sin embargo, el correcto direccionamiento de los túbulos de MP^{GFLV} al PD es dependiente del citoesqueleto (Laporte *et al.*, 2003; Pouwels *et al.*, 2002).

Los virus que utilizan el transporte no guiado por túbulos son los tobamo-, diantho-, beny-, tobra-, tombus-, y hordeivirus. El ejemplo emblemático de virus que no se mueven por túbulos y que la función de movimiento se encuentra en una sola proteína es el caso de TMV. Dado que no remueven el DT, emplean diversas estrategias para aumentar el poro del PD y permitir el movimiento viral. En

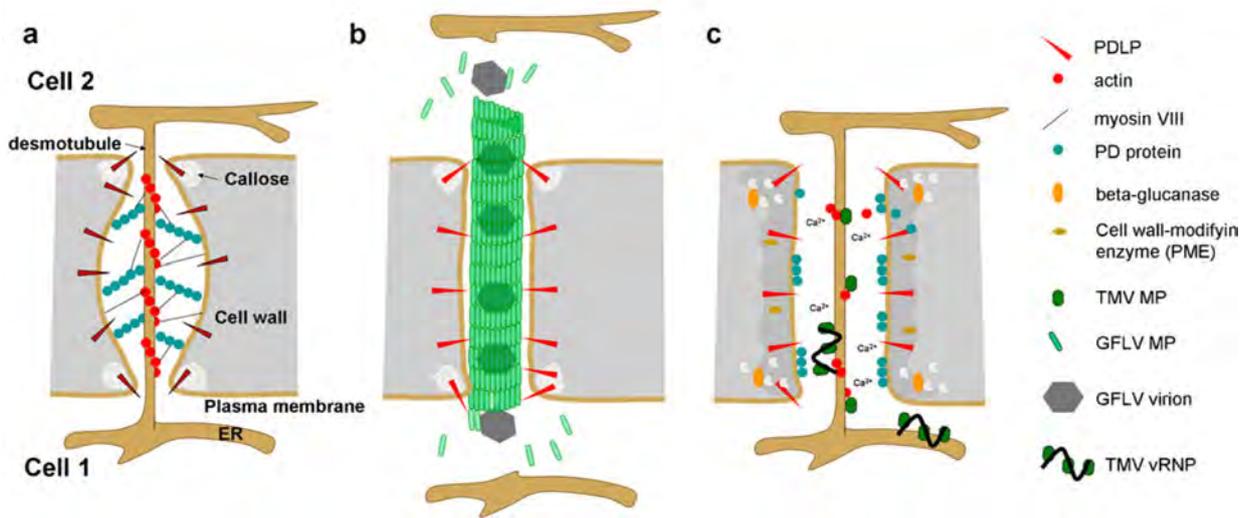


Figura VI.1. Mecanismos de movimiento célula-a-célula de virus de plantas. (a) Se esquematiza un PD simple, descrito en el Capítulo V. (b) Mecanismo de virus “guiados por túbulos”, como es el caso de GFLV. Se muestra la remoción del DT y la formación de túbulo por el que los viriones pasan de la Célula 1 a la Célula 2. (c) Mecanismo de TMV, “no guiado por túbulos”. Se debilita la estructura del plasmodesmo por la acción de β -glucanasas que degradan depósitos de calosa, además la MP^{TMV}, corta los filamentos de actina, relajando la tensión generada por proteínas del PD y la membrana plasmática, el tamaño del poro aumenta y se facilita el movimiento de las ribonucleoproteínas de TMV.

el caso de la MP^{TMV}, se sabe que posee actividad “severing” o “corte” de actina, componente proteico del canal del PD (Su *et al.*, 2010), disminuyendo la rigidez del PD. También se ha observado una correlación favorable entre el movimiento de TMV y la expresión de 1,3 β -glucanasas en PD (Guenoune-Gelbart *et al.*, 2008). Estas enzimas degradan los depósitos de calosa en el cuello del PD y facilitan la dilatación del PD, así como también el flujo de iones Ca⁺⁺ y depleción local de ATP, activando enzimas de la pared celular que disminuyen su rigidez (Citovsky *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2005; Tucker & Boss, 1996). Dentro de este grupo también se encuentran los poty- y potexvirus los cuales requieren de tres proteínas para su movimiento, cuya secuencia se encuentra solapada conocida como *Triple gene block* (TGB). Estas tres proteínas junto con la CP son requeridas para el movimiento

de PVX. TGB1 es una RNA helicasa ((Kalinina *et al.*, 2002)), supresora del silenciamiento (Voinnet *et al.*, 2000), y un activador traduccional (Atabekov *et al.*, 2000). Una interacción específica de TGB1 con las subunidades de CP en el extremo 5', facilita el desensamblado de los viriones facilitando el acceso del ribosoma (Atabekov *et al.*, 2000; Rodionova *et al.*, 2003). Dado que la CP es requerida para el movimiento y que se ha detectado en PD en tejido infectado (Rodionova *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 1998; Chapman *et al.*, 1992; Oparka *et al.*, 1996) se propone que lo que se transporta es RNA viral parcialmente encapsidado en cuyo extremo se encuentra unido TGB1 (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). TGB1 se localiza y aumenta el SEL del PD en tejido infectado (Howard *et al.*, 2004; Samuels *et al.*, 2007). Sin embargo no se direcciona al PD cuando se expresa sola. Las otras dos proteínas del TGB, TGB2 y TGB3, reclutan a TGB1 al PD (Erhardt *et al.*, 2000; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010)). TGB2 y 3 son pequeñas proteínas transmembrana que co-localizan con gránulos derivados de ER (Ju *et al.*, 2005; Krishnamurthy *et al.*, 2003; Samuels *et al.*, 2007) y en cuerpos periféricos formados por TGB3 (Lee *et al.*, 2010; Schepetilnikov *et al.*, 2005). TGB2 y 3 interaccionan de forma heteróloga (Lee *et al.*, 2010), y además TGB3 es la responsable de permitir el direccionamiento de TGB1 y 2 al PD (Lee *et al.*, 2010; Schepetilnikov *et al.*, 2005; Solovyev *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2011).

VI.2 Mecanismo de movimiento de los ophiovirus

En lo que respecta a los virus de la familia *Ophioviridae* se desconoce la estrategia de movimiento célula-a-célula. Si bien las investigaciones mostradas en el Capítulo V mostraron que la proteína codificada en el RNA 2 de los ophiovirus es la MP, el avance en el conocimiento del mecanismo requiere profundizar estos estudios, esto es, el rol de cada proteína en el mecanismo de movimiento, sus dominios, modificaciones postraduccionales, interacción con proteínas celulares y otras virales, vías de transporte intracelular para llegar al PD, etc. Además, es deseable que estos estudios se realicen en el contexto de la infección viral. Por tratarse de virus negativos, el estudio de los ophiovirus es limitado por la ausencia de la genética reversa, y por ende la posibilidad de realizar ensayos en el hospedante natural u otro experimental en el que pueda moverse e infectar. No existen herramientas como por ejemplo una biblioteca de mutantes de *C. sinensis* y *L. sativa*, que permitan abordar algunos interrogantes, y realizar estos ensayos. Es por esto que se recurre a plantas modelo como *A. thaliana* o *N. benthamiana*. En el caso de *A. thaliana*, en nuestro laboratorio sólo se han realizado algunos ensayos de infección con CPsV, y hasta el momento han resultado negativos (Belén Borniego, comunicación personal). En cambio, *N. benthamiana* es hospedante de ambos virus, aunque difieren en su comportamiento. MiLBVV es capaz de infectar sistémicamente a *N. benthamiana*

(Roggero *et al.*, 2000) mientras que para CPsV es un hospedante local, sin manifestar síntomas, y quedando su infección latente acotada a la zona inoculada (Timmer *et al.*, 1978; Reyes *et al.*, 2009). Además, al ser un hospedante asintomático, complica la detección de CPsV, que debe realizarse por RT-PCR partiendo de aquellas regiones de tejido que fueron inoculadas.

En este capítulo, se describe el avance realizado en algunos aspectos del mecanismo de los ophiovirus, mediante expresión ectópica en *N. benthamiana* de las MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV}, marcadores subcelulares, y proteínas celulares que intervienen en el mecanismo de movimiento de otros virus de plantas más estudiados, y con los cuales se compara.

Objetivos

Aportar evidencias que permitan conocer el mecanismo que poseen los ophiovirus MiLBVV y CPsV para el movimiento célula-a-célula.

Resultados

En este capítulo se muestran resultados del estudio del comportamiento de las MPs de CPsV y MiLBVV, la formación de estructuras tubulares en PD, identificando un posible receptor de las MPs de estos ophiovirus, y analizando la intervención de proteínas celulares en el movimiento, y de otras virales como las CPs, y las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV}.

VI.1. Evidencias acerca del tipo de mecanismo que poseen los ophiovirus para el movimiento célula-a-célula

VI.1.1. La MP^{CPsV}:eGFP forma túbulos en el PD

En el Capítulo V se demostró la localización en PD de las MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} por expresión ectópica en hojas de *N. benthamiana*. Una diferencia distintiva entre ellas es la capacidad de la MP^{CPsV}, de formar túbulos en los PD. Esta característica se observó sólo cuando la MP^{CPsV} estaba fusionada a PF (eGFP y mRFP) en el extremo C-terminal (Figura VI.2). Este hecho fue observado en repetidas

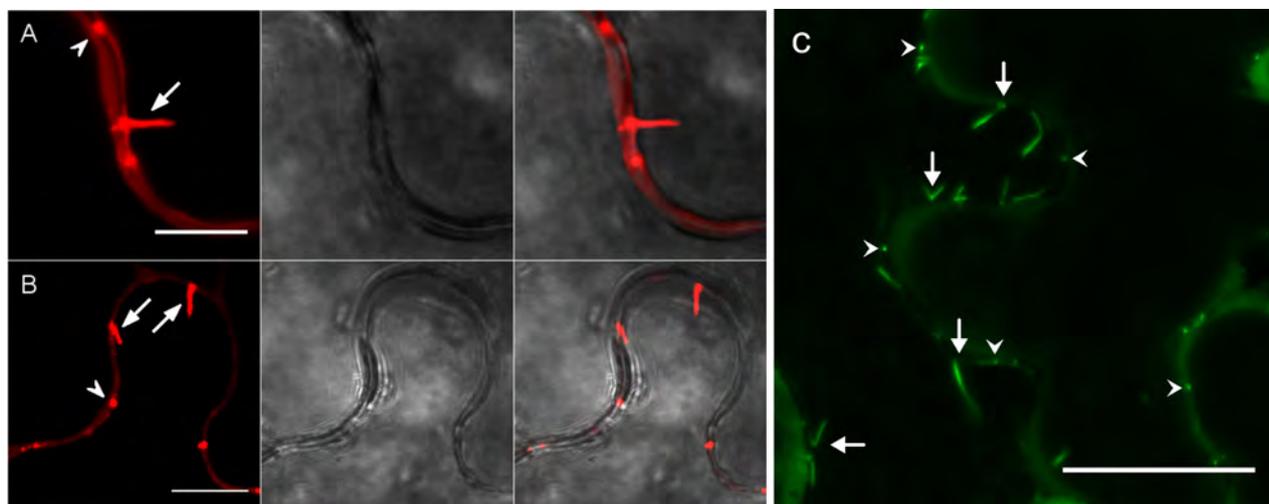


Figura VI.2. La proteína 54K^{CPsV} forma túbulos en PD. (A, B) La proteína 54K^{CPsV}:mRFP co-expresada con P19 forma túbulos en PD. La barra en (A) representa 10 μm y en (B) 15 μm . (C) 54K^{CPsV}:eGFP fue agroinfiltrada 12 hs después que la proteína P19. La barra representa 20 μm . Las flechas completas en (A), (B) y (C) indican PD donde se observan túbulos formados por la proteína 54K^{CPsV}:eGFP o 54K^{CPsV}:mRFP; las flechas incompletas indican PD sin túbulos.

ocasiones en diferentes equipos que fueron utilizados a lo largo de 3 años de trabajo. Además, una observación importante que se encontró fue que el número de túbulos por célula, y el número de

células con túbulos es bajo si se co-agroinfiltra la MP^{CPsV}:eGFP con la proteína supresora P19. Mientras que si la P19 se agroinfiltra 12 hs antes que la proteína MP^{CPsV}:eGFP, el número de células con túbulos y la cantidad de túbulos por célula aumenta notablemente, como se muestra en la Figura VI.1.C. Esto indica que la formación de túbulos podría depender de una masa crítica de MP^{CPsV}:eGFP en la célula de *N. benthamiana*.

Dentro de los mecanismos de movimiento célula-a-célula, ésta sería la primera evidencia por la cual podríamos postular que CPsV se movería guiado por túbulos.

VI.1.2. La MP^{MiLBVV}:eGFP no forma túbulos en el PD

En lo que respecta a la MP^{MiLBVV}, con todas las construcciones desarrolladas en este trabajo de tesis, no hemos observado este tipo de estructuras, aún cuando frecuentemente la densidad de PD marcados, o número de PD/célula, ha sido mayor que el encontrado con la MP^{CPsV}. Esta observación se obtuvo cuando se co-infiltró con P19 o cuando ésta fue agroinfiltrada 12 hs antes. Si bien este hecho no apoya el mecanismo guiado por túbulos, tampoco lo descarta, ya que existen otros factores que pueden afectar la formación de estas estructuras, como se discutirá mas adelante. Por otro lado, tenemos otros resultados que apoyan la formación de túbulos, como se describirán en éste capítulo.

VI.1.3. Interacciones homólogas de MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} en el PD

Una de las características de las MPs que emplean la estrategia de túbulos es la interacción homóloga en los PD, ya que el túbulo está formado por subunidades de MP. Así, se ha encontrado interacción homóloga en la MP^{GFLV} y la MP^{CaMV}, dos proteínas que han mostrado la formación de túbulos en PD, mientras que la MP^{TMV}, que emplea la estrategia de movimiento no guiado por túbulos, no presenta interacción homóloga (Amari *et al.*, 2010). Por lo tanto, se analizó la interacción homóloga de las MPs de los ophiovirus mediante la técnica de FLIM, ya descrita.

Como se observa en la Figura VI.3, cuando sólo se expresa la proteína eGFP:MP^{CPsV} localizada en el PD, el τ es 2,47 ns (DS= 0,04, N=3, n=65; Figura VI.3.A y E). Como se observó en el Capítulo V, en el ensayo de co-localización de las MPs con el marcador de PD, PDCB1, las MPs no tendrían una localización en el cuello del PD, sino que se acumulan dentro del PD. Por lo tanto, realizamos un ensayo de interacción con PDCB1, esperando un resultado negativo de interacción, y que al mismo

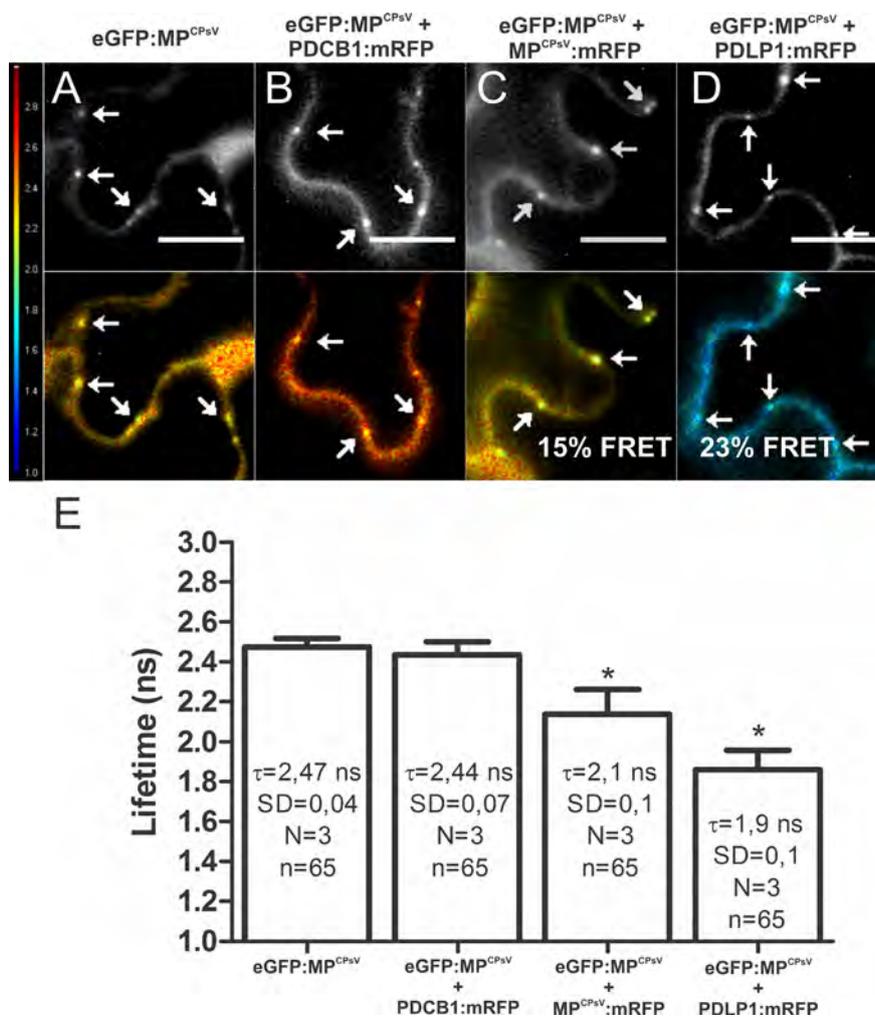


Figura VI.3. Interacción homóloga de MP^{CPsV}, y con PDCB1 y PDL1 *in vivo*. Análisis por FRET-FLIM de las proteínas fusionadas a PF en células epidérmicas de *N. benthamiana*. (A) Cuando sólo se expresa eGFP:MP^{CPsV}, (B) con PDCB1:mCherry; (C) con MP^{CPsV}:mRFP; y (D) con PDL1:mRFP. En la parte superior de cada panel se muestra la intensidad de fluorescencia y en la parte inferior las imágenes de tiempo de vida de fluorescencia. La escala de color se encuentra a la izquierda, los valores van desde 1 ns (azul) a 3 ns (rojo). La barra corresponde a 10 μ m. (E) Análisis estadístico de los tiempos de vida de la fluorescencia: τ , tiempo de vida de la fluorescencia (ns); DS, desviación estándar; n, número de células analizadas; N, número de experimentos independientes. Los asteriscos representan una diferencia significativa con un $p < 0.01$ comparada cuando sólo se expresa la proteína eGFP:MP^{CPsV}.

tiempo, pueda usarse como control negativo del ensayo de interacción homóloga. Así, cuando se co-expresó eGFP:MP^{CPsV} con PDCB1:mRFP el τ fue de 2,44 ns (DS= 0,07, N=3, n=69; Figura. VI.3.B y E),

sin diferencias significativas respecto al obtenido cuando sólo se expresa la eGFP:MP^{CPsV}, indicando que no interaccionan, a pesar de encontrarse en alta concentración en la misma región de la célula. El resultado no difiere del τ de eGFP:MP^{CPsV}, por lo tanto como control negativo de la interacción se tomó el τ obtenido al expresar sólo la proteína eGFP:MP^{CPsV}. Cuando se co-expresó eGFP:MP^{CPsV} con MP^{CPsV}:mRFP el τ fue de 2,1 ns (DS= 0,1, N=3, n=76; Figura VI.3.C y E), presentando diferencias significativas con el control ($p<0,01$), con un %FRET del 15% para el par MP^{CPsV}-MP^{CPsV}. Esto indica que en el PD existe interacción entre las subunidades de MP^{CPsV}.

El mismo esquema experimental fue llevado a cabo con la proteína MP^{MiLBVV}. Cuando sólo se expresó eGFP:MP^{MiLBVV}, el τ fue de 2,24 ns (DS=0,09; N=3; n=43; Figura VI.4.A y E). Cuando se co-expresó con PDCBI:mRFP, el τ resultó de 2,28 ns (DS=0,08, N=3; n=43; Figura VI.4.B y E), es decir sin diferencias significativas ($p<0,01$), indicando que tampoco existe interacción de MP^{MiLBVV} con PDCBI, tal como se esperaba. Cuando se co-expresó con su proteína homóloga MP^{MiLBVV}:mRFP el τ fue 2,04 ns (DS=0,09; N=3; n=43; Figura VI.4.C y E), presentando diferencias significativas ($p<0,01$), dando un 9% de FRET para el par MP^{MiLBVV}-MP^{MiLBVV}. Esto indica que en el PD existe interacción entre las subunidades de MP^{MiLBVV}.

Estos resultados muestran que ambas MPs presentan interacción homóloga en el PD, hecho que nos inclina a pensar en un mecanismo guiado por túbulos, aunque en el caso de MP^{MiLBVV} no se han observado estas estructuras.

VI.1.4. Interacciones de MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} con PDLPI en PD

Amari y colaboradores (2010) proponen a las proteínas PDLPIs como receptoras de las MPs de virus que emplean la estrategia de túbulos. Por lo tanto, se analizó la interacción de las MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} con PDLPI *in planta* por la técnica de FLIM. En la Figura VI.3.D y E se muestra que cuando eGFP:MP^{CPsV} se co-expresó con PDLPI:mRFP el τ fue de 1,9 ns (DS= 0,1, N=3, n=53;), siendo significativamente menor que el τ del control eGFP:MP^{CPsV} (2,47 ns) en tres experimentos independientes ($p<0,01$). En este ensayo se obtuvo un 23% FRET para el par MP^{CPsV}-PDLPI. Esto indica que la proteína MP^{CPsV}, dentro del PD, no sólo se encuentra interaccionando consigo misma, sino también con la proteína PDLPI.

En la co-expresión con PDLPI:mRFP, el τ de eGFP:MP^{MiLBVV} fue de 1, 86ns (DS=0,09; N=3; n=43) mostrando también diferencias significativas ($p < 0,01$) con el τ (2,24 ns) de MP^{MiLBVV} cuando se

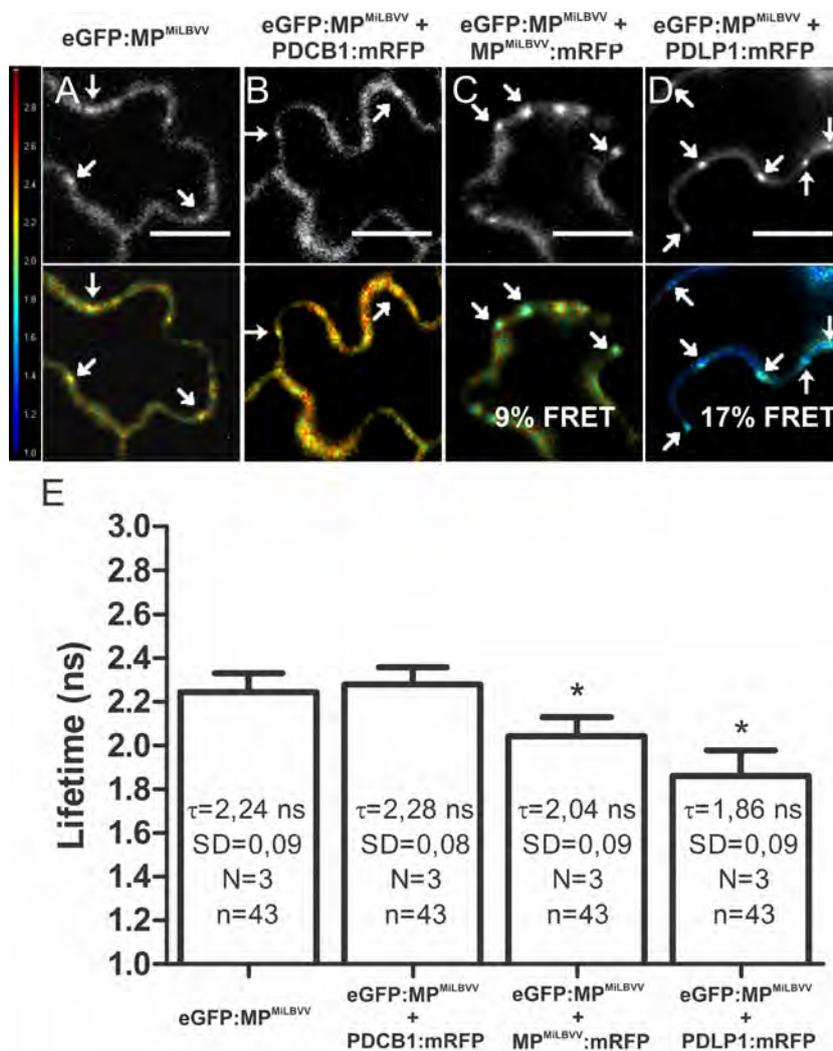


Figura VI.4. Interacción homóloga de MP^{MiLBVV}, y con PDCBI y PDLPI *in vivo*. Análisis por FRET-FLIM de las proteínas fusionadas a PF en células epidérmicas de *N. benthamiana*. (A) Cuando sólo se expresa eGFP:MP^{MiLBVV}, (B) con PDCB1:mCherry; (C) con MP^{MiLBVV}:mRFP; y (D) con PDLPI:mRFP. En la parte superior cada panel se muestra la intensidad de fluorescencia y en la parte inferior las imágenes de tiempo de vida de fluorescencia. La escala de color se muestra a la izquierda, los valores van desde 1 ns (azul) a 3 ns (rojo). La barra corresponde a 10 μ m. (E) Análisis estadístico de los tiempos de vida de la fluorescencia: τ , tiempo de vida de la fluorescencia (ns); DS, desviación estándar; n, número de células analizadas; N, número de experimentos independientes. Los asteriscos representan una diferencia significativa con un $p < 0.01$ comparada cuando sólo se expresa la proteína eGFP:MP^{MiLBVV}.

expresa sola (Figura VI.4.D y E), dando 17% FRET. Es decir que la MP^{MiLBVV} interacciona con sí misma y con PDLPI dentro del PD.

Como se ve en la Figura VI.3.D y Figura VI.4.D en la región de membrana plasmática donde no hay PD, se puede encontrar que ambas proteínas co-localizan. Cuando se realizaron mediciones en esas regiones, se encontró que el τ fue menor al encontrado en PD, indicando mayor interacción fuera del PD. Este hecho podría explicarse por la sobreexpresión de PDLPI en las condiciones ensayas. La familia de proteínas PDLP, emplea la vía de secreción para llegar a su destino final, el PD, y como se expresa bajo el control del promotor 35S y junto con la supresora PI9, alcanza altos niveles de expresión, y se acumula en la membrana plasmática. Sin embargo, bajo las mismas condiciones, los niveles de expresión de PDCBI fueron comparables a las de PDLPI, y aún así PDCBI, aunque co-localizan con estas proteínas, no interacciona con las MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} . Por lo tanto, podemos concluir que existe interacción de las MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV} con PDLPI, lo que apoya que ambos ophiovirus pudieran utilizar este receptor en su mecanismo de movimiento, y que en principio, el mecanismo sería el guiado por túbulos.

VI.2. Participación de CPs, 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} en el movimiento de CPsV y MiLBVV

VI.2.1. Rol de la CP en el movimiento viral

La participación de la CP en el movimiento viral de los ophiovirus aún no había sido abordada. Hasta el momento sabíamos que las proteínas CP^{CPsV} y MP^{CPsV} se co-expresan temporalmente y comparten la localización citoplasmática durante la infección (Peña, 2009). Con el objeto de comenzar el estudio de la relación entre CP y movimiento, analizamos la interacción entre las MPs y las CPs, la re-localización de las CPs por sus respectivas MPs, y el movimiento célula-a-célula de la CP facilitado por las MPs.

-Las CPs de CPsV y MiLBVV interaccionan con sus respectivas MPs en el citoplasma de N. benthamiana

Dada la co-localización citoplasmática de las CPs y MPs descrita durante la infección, por el Dr. Peña (2009) es posible que estas proteínas, interactúen *in vivo*, aún fuera del contexto de la infección. Para esto, hemos empleado dos técnicas independientes que prueban la existencia de una interacción entre las CPs y las MPs.

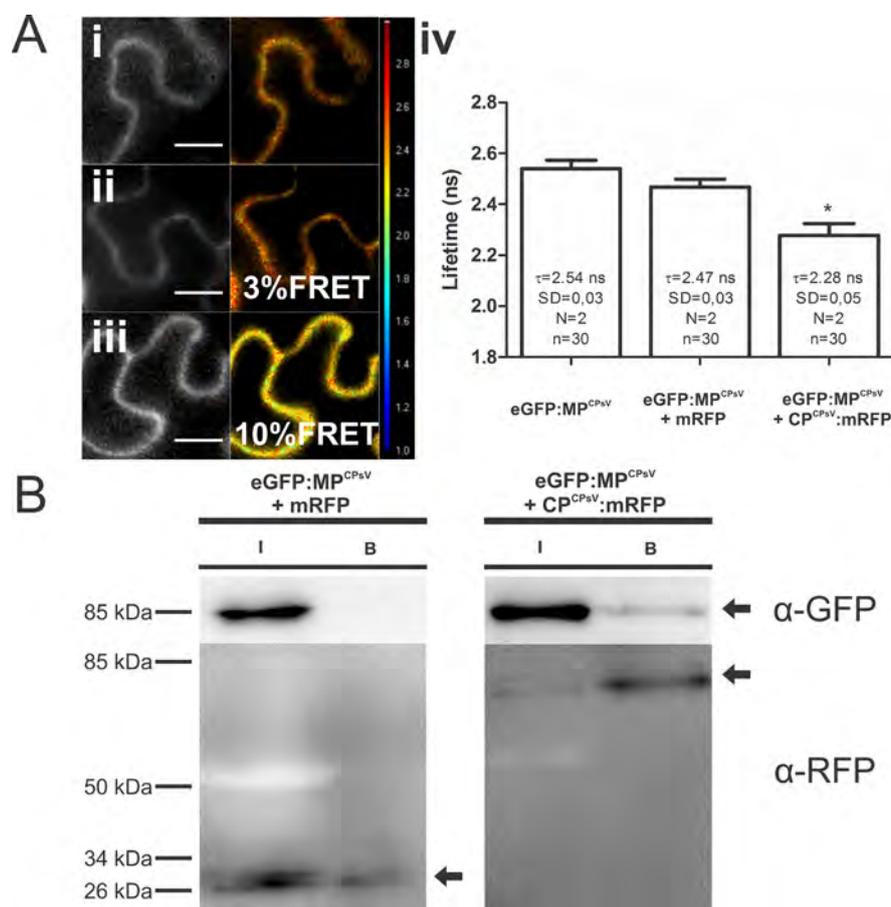


Figura VI.5. La CP^{CPsV} interacciona *in vivo* con MP^{CPsV} . (A) Análisis por FRET-FLIM de las proteínas fusionadas a PF en células epidérmicas de *N. benthamiana*. (i) Cuando sólo se expresa $eGFP:MP^{CPsV}$, o con (ii) mRFP; (iii) $CP^{CPsV}:mRFP$. En la parte izquierda de cada panel se muestra la intensidad de fluorescencia y en la parte derecha las imágenes de tiempo de vida de fluorescencia. La escala de color se muestra a la izquierda, los valores van desde 1 ns (azul) a 3 ns (rojo). La barra corresponde a 10 μm . (iv) Análisis estadístico de los tiempos de vida de la fluorescencia: τ , tiempo de vida de la fluorescencia (ns); DS, desviación estándar; n, número de células analizadas; N, número de experimentos independientes. Los asteriscos representan una diferencia significativa con un $p < 0.01$ comparada cuando sólo se expresa la proteína $eGFP:MP^{CPsV}$. (B) Análisis por Western blot de co-immunoprecipitación de extractos de proteínas totales de hojas que expresan $eGFP:MP^{CPsV}$ junto con mRFP, (membrana izquierda) o $eGFP:MP^{CPsV}$ junto con $CP^{CPsV}:mRFP$ (membrana derecha), revelados con anti-GFP (α -GFP) (paneles superiores) o anti-RFP (α -RFP) (paneles inferiores); I: extracto crudo; B: fracción unida.

Mediante FLIM se determinó el τ cuando sólo se expresó la proteína eGFP:MP^{CPsV}, siendo de 2,54 ns (DS=0,03; n=30; N=2; Figura VI.5.A (i) y (iv)), mientras que al co-expresarse con mRFP el τ dió 2,47

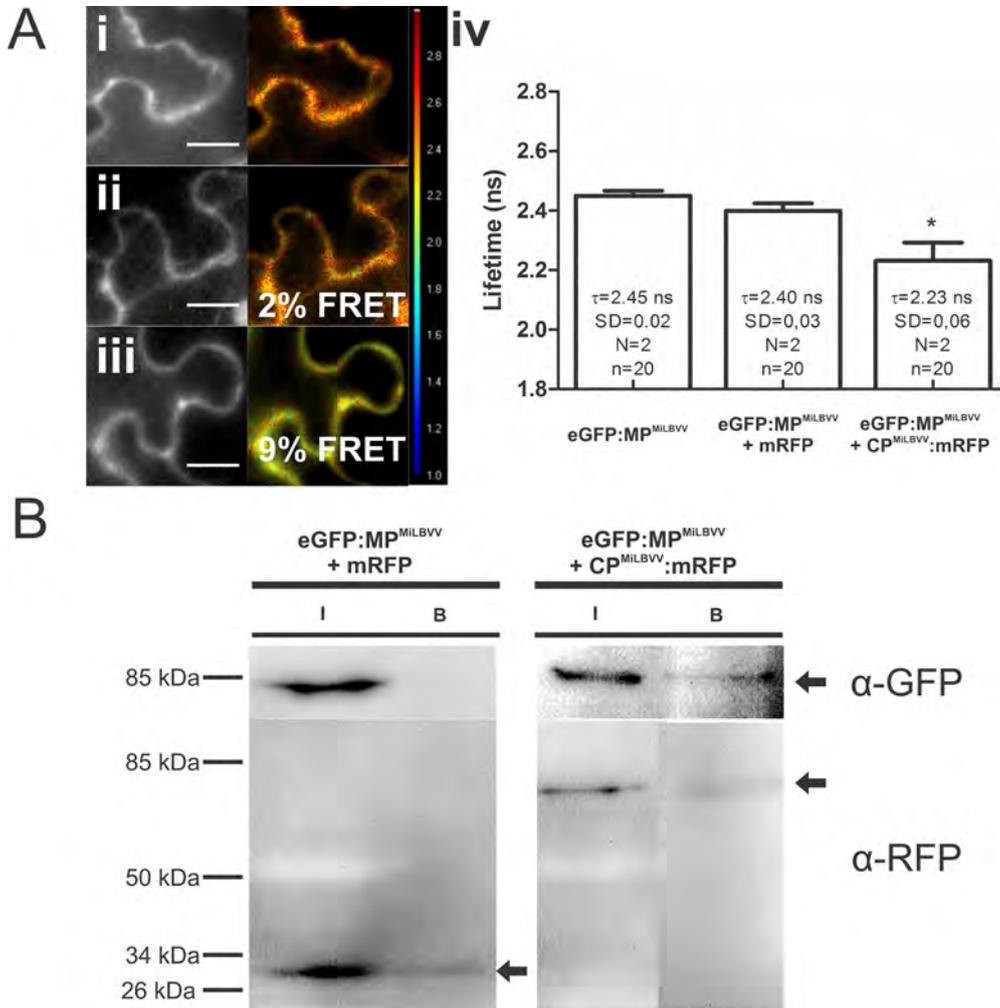


Figura VI.6. La CP^{MiLBVV} interacciona *in vivo* con MP^{MiLBVV} (A) Análisis por FRET-FLIM de las proteínas fusionadas a PF en células epidérmicas de *N. benthamiana*. (i) Cuando sólo se expresa eGFP:MP^{MiLBVV}, o con (ii) mRFP; (iii) CP^{MiLBVV}:mRFP. En la parte izquierda de cada panel se muestra la intensidad de fluorescencia y en la parte derecha las imágenes de tiempo de vida de fluorescencia. La escala de color se muestra a la izquierda, los valores van desde 1 ns (azul) a 3 ns (rojo). La barra corresponde a 10 μ m. (iv) Análisis estadístico de los tiempos de vida de la fluorescencia: τ , tiempo de vida de la fluorescencia (ns); DS, desviación estándar; n, número de células analizadas; N, número de experimentos independientes. Los asteriscos representan una diferencia significativa con un $p < 0.01$ comparada cuando sólo se expresa la proteína eGFP:MP^{MiLBVV}. (B) Análisis por Western blot de co-immunoprecipitación de extractos de proteínas totales de hojas que expresan eGFP:MP^{MiLBVV} junto con mRFP, (membrana izquierda) o eGFP:MP^{MiLBVV} junto con CP^{MiLBVV}:mRFP (membrana derecha), revelados con anti-GFP (α -GFP) (paneles superiores) o anti-RFP (α -RFP) (paneles inferiores); I: extracto crudo; B: fracción unida.

ns (DS=0,03 ; n=30; N=2; Figura VI.5.A (ii) y (iv)). Esta proteína, al distribuirse en núcleo y citoplasma, se empleó como control negativo de la interacción. Cuando se co-expresó eGFP:MP^{CPsV} con CP^{CPsV}:mRFP, el τ fue de 2,28 ns (DS=0,05; n=30; N=2; Figura VI.5.A (iii) y (iv)), dando un

%FRET del 10% para este par $MP^{CPsV}-CP^{CPsV}$, mientras que el control con mRFP fue de 3 %. La segunda evidencia de la existencia de estas interacciones se obtuvo de ensayos de co-inmunoprecipitación de las proteínas virales expresadas ectópicamente en *N. benthamiana* como fusiones a proteínas fluorescentes. Con este objetivo se co-expresaron las proteínas eGFP:MP^{CPsV} y CP^{CPsV}:mRFP. Como control negativo se empleó la co-expresión con mRFP. Como se observa en la co-expresión de MP^{CPsV}:eGFP con mRFP libre se muestra que ambas proteínas se encuentran en la fracción cruda, pero mRFP sólo se encuentra en la fracción unida, mostrando que no hay interacción con el control mRFP (Figura VI.5.B, membrana izquierda). Cuando se co-expresan MP^{CPsV}:eGFP con sus respectivas CPs se observa una banda en la fracción unida correspondiente a las MP:eGFP (Figura VI.5.B, membrana derecha).

El mismo esquema experimental se llevo a cabo con la proteína MP^{MiLBVV}. Cuando sólo se expresa esta proteína el τ es de 2,45 ns (DS=0,02; n=20; N=2; Figura VI.6.A (i) y (iv)). Cuando se co-expresa con el control negativo mRFP el τ es de 2,40 ns (DS=0,03; n=20; N=2; Figura VI.6.A (i) y (iv)), mientras que cuando se co-expresó con CP^{MiLBVV}:mRFP fue de 2,23 ns (DS=0,03; n=20; N=2; Figura VI.6.A (iii) y (iv)). En este caso el %FRET fue de 9% para el par $MP^{MiLBVV}-CP^{MiLBVV}$, mientras que fue de 2% para el control mRFP. Los ensayos de co-inmunoprecipitación se llevaron a cabo de manera similar que con la MP^{CPsV}. Se analizaron las co-expresiones eGFP:MP^{MiLBVV} junto con mRFP, y eGFP:MP^{MiLBVV} con CP^{MiLBVV}:mRFP. En el primer par, solo se detectó mRFP en la fracción unida, estando ambas proteínas en el extracto crudo (Figura VI.6.B, membrana izquierda). En el segundo par, ambas proteínas se encontraron en el extracto crudo y en la fracción unida (Figura VI.6.B, membrana derecha).

Por lo tanto, estos resultados confirman que las proteínas codificadas en el RNA 2 de los ophiovirus CPsV y MiLBVV interaccionan con su respectivas CPs en el citoplasma de *N. benthamiana*.

-Las CPs de CPsV y MiLBVV no son reclutadas por sus respectivas MPs al PD

Dada la interacción MP-CP observada en el punto anterior, decidimos analizar si esta interacción permitía la re-localización de las CP, si bien la CP^{CPsV} se acumula en citoplasma durante la infección (Capítulo III; Peña, 2009), es posible que niveles no detectables en los fraccionamientos realizados por el Dr. Peña en su trabajo de tesis, sean observados mediante CLSM en una co-expresión de las MPs junto con las CPs. En particular es interesante la posibilidad de que las CPs sean reclutadas a los PD, evidencia que vincularía a las CP con el movimiento viral. Los resultados de este análisis

indicaron que las CPs permanecieron en el citoplasma, aún en presencia de las MPs, esto es, no son reclutadas a ninguna de las localizaciones analizadas donde se encuentran las MPs (Figura VI.7). Por otro lado, tampoco se observaron cambios en la distribución de las MPs en la célula por presencia de las CPs.

-Las CPs de CPsV y MiLBVV no son transportadas célula-a-célula por sus respectivas MPs

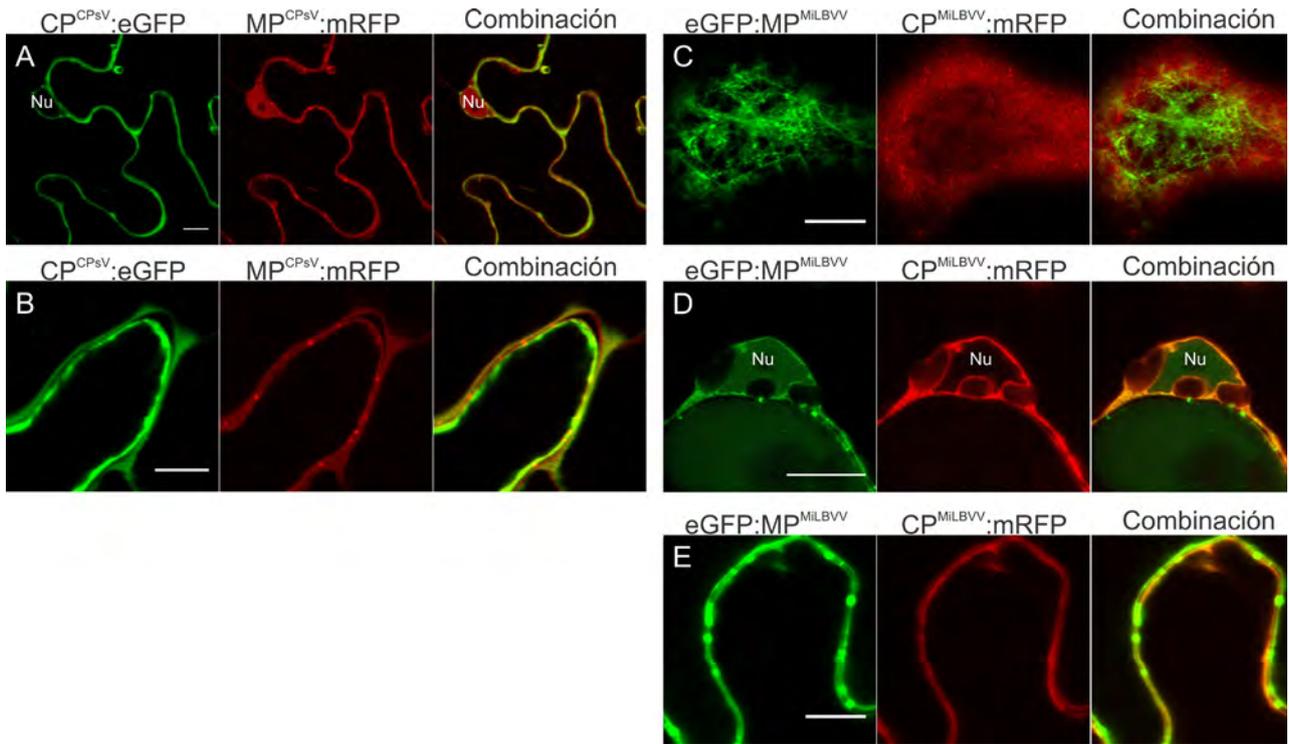


Figura VI.7. Las CPs no son reclutadas por sus respectivas MPs a otra localización subcelular. (A) Plano cortical de una célula expresando eGFPMP^{MiLBVV} acumulada en MTs y CP^{MiLBVV};mRFP. (B) Plano medio de una célula expresando MP^{CPsV};mRFP en citoplasma, núcleo y PD y CP^{CPsV};eGFP en citoplasma. (C) Plano medio de una célula expresando MP^{CPsV};mRFP en citoplasma y PD y CP^{CPsV};eGFP en citoplasma. (D) Plano medio de una célula expresando eGFP:MP^{MiLBVV} en núcleo y CP^{MiLBVV};mRFP en citoplasma. (E) Plano medio de una célula expresando eGFPMP^{MiLBVV} acumulada en PD y CP^{MiLBVV};mRFP en citoplasma. La barra representa 10 μm; Nu: núcleo.

El reclutamiento de una proteína a una localización diferente a la que se encuentra cuando se expresa sola, podría llevar a que ésta se acumule en una nueva localización, y por ende permitir su observación. Si bien las MPs de los ophiovirus en estudio, no reclutan las CPs al PD, es decir, no se acumulan en el PD, esto no implica que no faciliten su movimiento a la célula adyacente. Una observación que apoya esta hipótesis es la realizada en los ensayos de *gating* de GFP (Capítulo V). No se observó acumulación de GFP libre en PD pero ésta proteína sí difundía a la célula adyacente. Es por esto, que llevamos a cabo un análisis de la capacidad de las MPs de CPsV y MiLBVV para facilitar el movimiento célula-a-célula de sus respectivas CPs, mediante ensayos de *gating*, teniendo

en cuenta la limitación de que la fusión de la CPs a GFP poseen un tamaño de alrededor de 80kDa, lo que podría afectar el resultado. Cuando se expresaron solamente CP^{CPsV}:eGFP y CP^{MiLBVV}:GFP se observó que la fluorescencia de estas proteínas se encontraba contenida principalmente en células

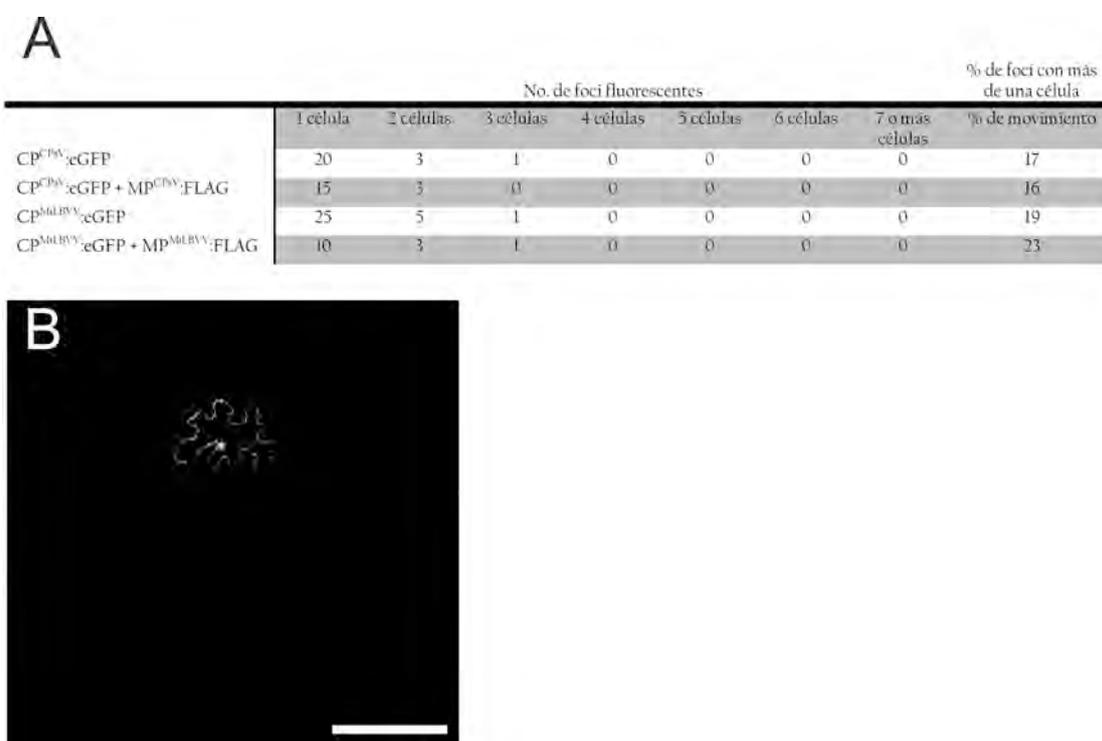


Figura V.8. Las CPs:eGFP de CPsV y MiLBVV no son transportadas célula-a-célula por sus respectivas MPs. (A) Tabla, se muestra la mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* infiltrada en hojas de *N. benthamiana* y el número de células que formaban los foci fluorescentes. Se calculó el % de foci fluorescentes que tienen más de una célula en relación a las muestras analizadas. (B) Imágenes representativas de un foci de 1 célula aislada. La barra representa 150 μ m.

asiladas (Figura VI.8.A y B), es decir que éstas proteínas no son capaces de pasar a la célula adyacente por sí mismas. La expresión en conjunto con las MPs no mostró un comportamiento diferente, las CPs:eGFP se expresaban en células aisladas y no se movieron a la célula adyacente en presencia de las MPs (Figura VI.8.A y B). Este resultado indica que las MPs no son capaces de movilizar a la CPs fusionadas a PF, expresadas ectópicamente en *N. benthamiana*.

VI.2.2. Rol de las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBV} en el movimiento viral de los ophiovirus

Como se mostró en el Capítulo IV tanto las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} como las MP^{CPsV} y MP^{MiLBVV}, son supresoras virales, además de la función de las MPs como tal. El estudio de la co-expresión de las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} reviste especial atención dada la dependencia que

existe entre los procesos de supresión del silenciamiento y movimiento viral (Niehl & Heinlein, 2011). En el Capítulo IV, se describió que las proteínas $24K^{CPsV}$ y $25K^{MiLBVV}$ se localizan en nucleoplasma, en nucléolo y citoplasma. En el caso de la $24K^{CPsV}$ se observan pequeños agregados en el nucleoplasma, y en el caso de $25K^{MiLBVV}$ agregados citoplasmáticos móviles, cuya naturaleza desconocemos. Como se discutió en ese capítulo la localización en el nucleoplasma se ha asociado tanto con la función de supresión como la de movimiento viral.

Como se observa en la Figura VI.9, las proteínas $24K^{CPsV}$ y $25K^{MiLBVV}$ también se localizan en filamentos en la región cortical de la célula. Probablemente estos filamentos se traten de MT (Ver más adelante en este Capítulo), pero no fueron co-localizados con marcadores durante este trabajo de tesis, para confirmar ésta observación. La localización en MTs, como ya se discutió en el Capítulo V, ha sido asociada con el movimiento viral como el de TMV (Niehl *et al.*, 2013).

Para avanzar en el rol de las proteínas $24K^{CPsV}$ y $25K^{MiLBVV}$ en el movimiento viral, se estudió la localización de estas proteínas en presencia de las MPs respectivas, realizando observaciones en el tiempo que permitan registrar el comportamiento de estas proteínas.

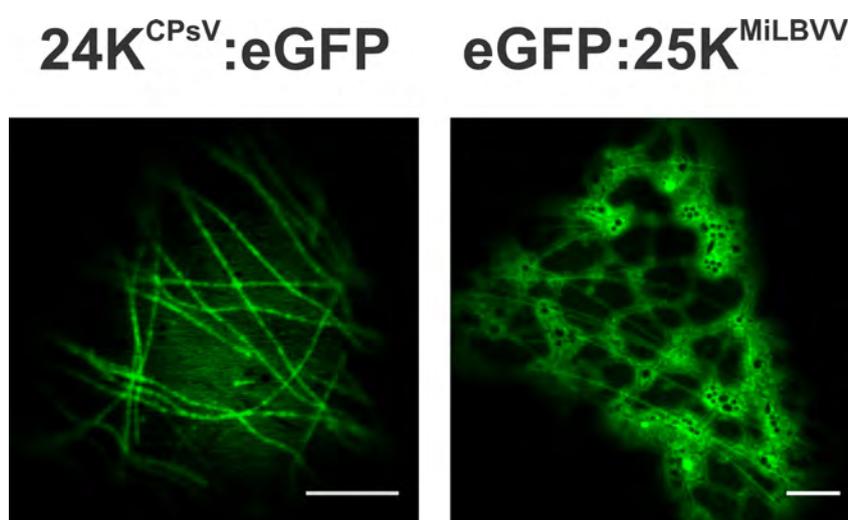


Figura VI.9. Las proteínas $24K^{CPsV}$ y $25K^{MiLBVV}$ se acumulan en filamentos. (A) Región cortical de una célula expresando $24K^{CPsV}$:eGFP. (B) Región cortical de una célula expresando eGFP: $25K^{MiLBVV}$. La barra representa 5 μ m.

-La proteína 24K^{CPsV} no es reclutada por la MP^{CPsV} a otros compartimientos celulares

Como se mostró en el Capítulo V, la proteína MP^{CPsV} se localiza en PD, MT, cloroplastos, citoplasma y núcleo, mientras que la proteína 24K^{CPsV} se localiza en nucléolo, en agregados nucleoplásmicos y

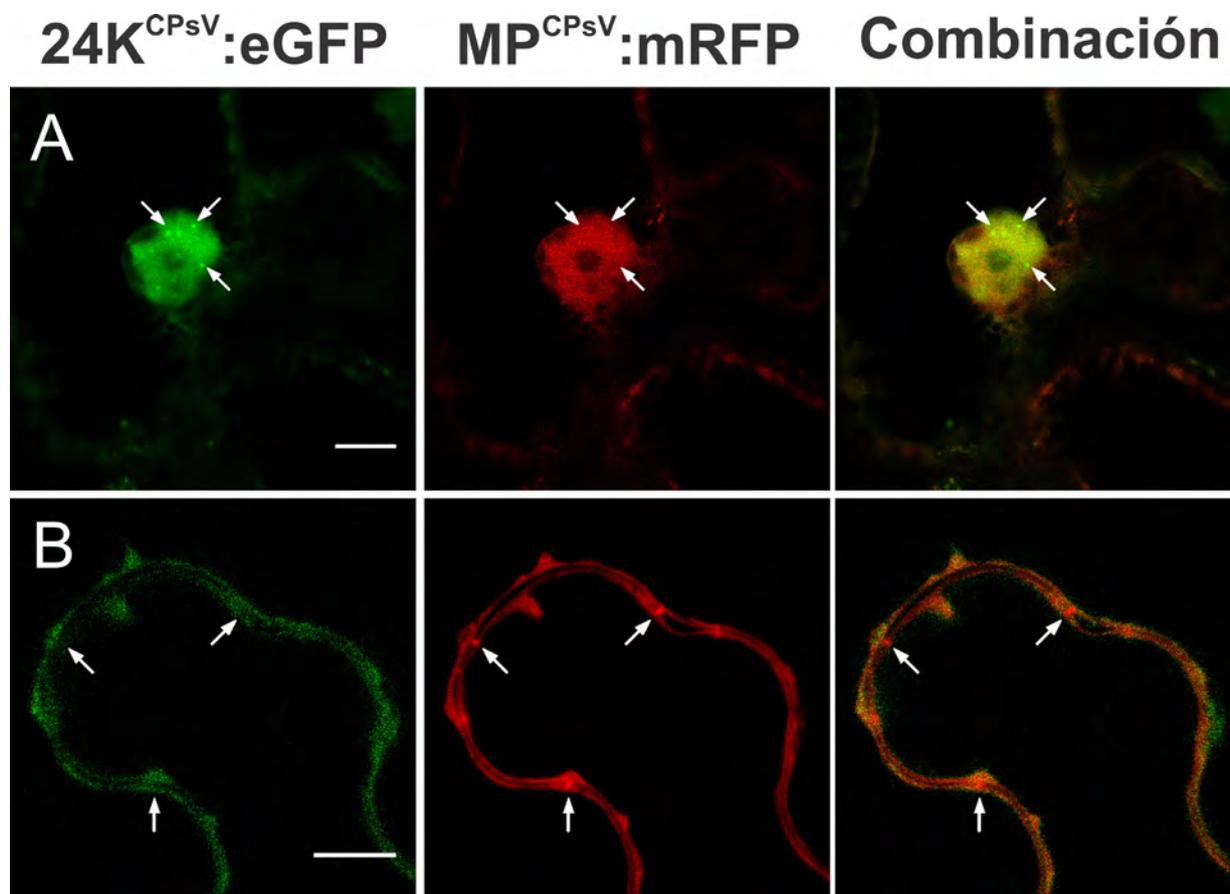


Figura VI.10. Localización de 24K^{CPsV}:eGFP en presencia de MP^{CPsV}:mRFP. (A) Región media de una célula expresando 24K^{CPsV}:eGFP y MP^{CPsV}:mRFP, las flechas indican agregados nucleoplásmicos. (B) Región media de una célula expresando 24K^{CPsV}:eGFP y MP^{CPsV}:mRFP, las flechas indican PD. La barra representa 10 μ m.

citoplasma (Capítulo IV), en donde se observan los filamentos en la región cortical. El análisis de la co-expresión de estas proteínas en células epidérmicas de *N. benthamiana* permitió observar que aunque la MP^{CPsV} y la 24K^{CPsV} comparten la localización nuclear, la MP^{CPsV} no es reclutada a los agregados que la 24K^{CPsV}:eGFP forma en el nucleoplasma (Figura VI.10.A). Por otro lado, la proteína 24K^{CPsV}:eGFP no es reclutada a PD por la MP^{CPsV}, donde ésta se localiza (Figura V.10.B). Aún no se ha estudiado la co-expresión de estas proteínas en otras localizaciones descritas para la MP^{CPsV}, como cloroplasto y MTs.

-La proteína 25K^{MiLBVV} no es reclutada por MP^{MiLBVV} a otros compartimientos celulares

Como se mostró anteriormente, la proteína MP^{MiLBVV} se localiza en MT, PD, citoplasma, cloroplasto y núcleo cuando se expresa fusionada a PF en el extremo C-terminal (Capítulo V), mientras que

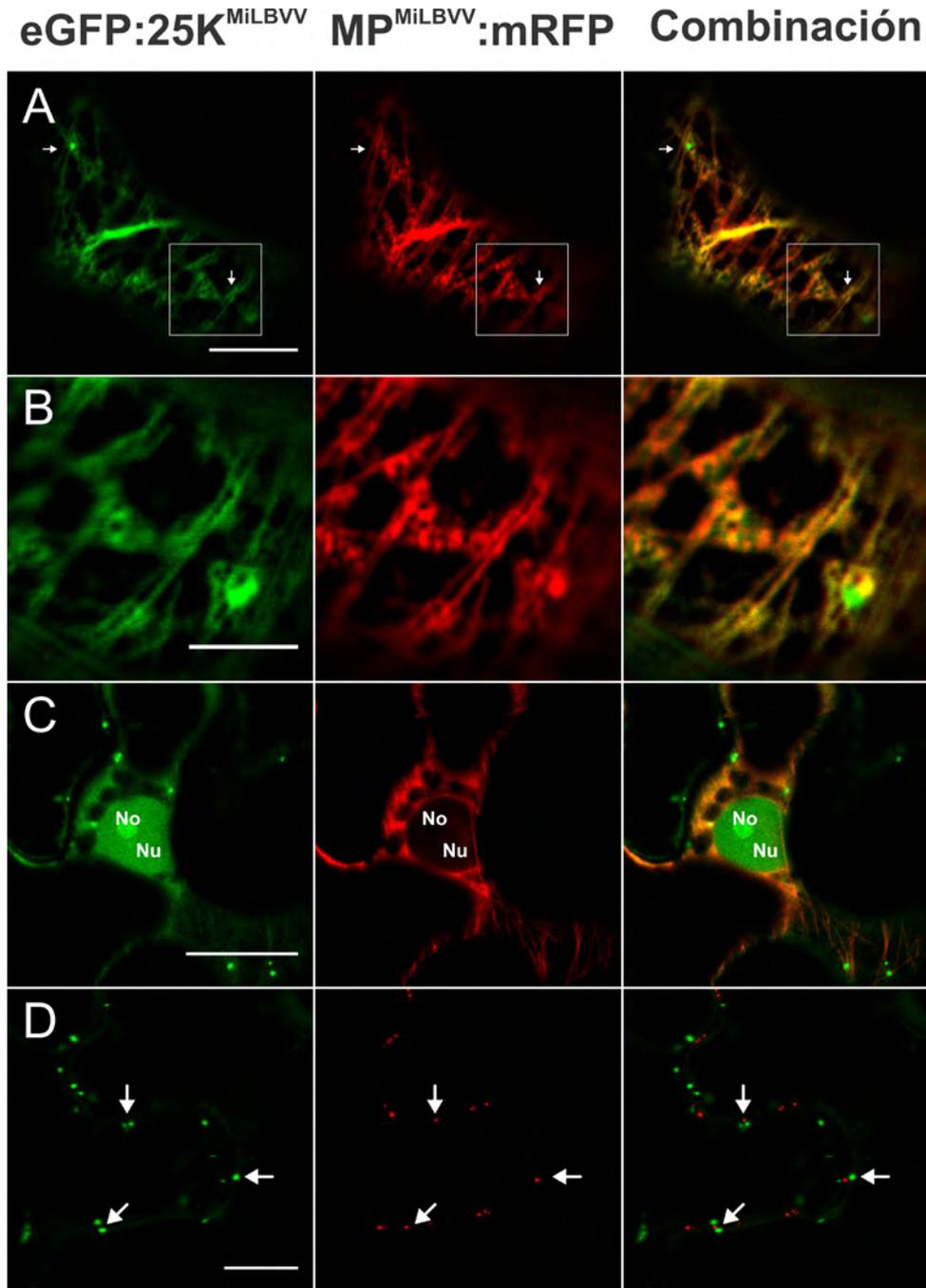


Figura VI.11. Localización de la proteína eGFP:25K^{MiLBVV} en presencia de MP^{MiLBVV}:mRFP. (A) Región cortical de una célula expresando ambas proteínas. La flechas indican MT donde se observa co-localización; la barra representa 10 μ m; el recuadro marca la región ampliada mostrada en (B), donde la barra representa 5 μ m. (C) Región media de la célula donde se observa el núcleo (Nu) y nucléolo (No), la barra representa 20 μ m. (D) Región media de una célula donde se observan PD marcados con MP^{MiLBVV} (Flechas), y agregados citoplasmáticos de eGFP:25K^{MiLBVV} en la adyacencias de los mismos, La barra representa 10 μ m.

$25K^{MILBVV}$ se localiza en nucléolo, en agregados citoplasmáticos móviles (Capítulo IV), y en filamentos en la región cortical de la célula.

Cuando se co-expresaron $eGFP:25K^{MILBVV}$ con $MP^{MILBVV}:mRFP$, se observa que $eGFP:25K^{MILBVV}$ co-localiza con $MP^{MILBVV}:mRFP$ en MT, es decir, tomando la $MP^{MILBVV}:mRFP$ como marcador de MT, podemos inferir que los filamentos observados cuando $eGFP:25K^{MILBVV}$ se expresa sola, son MTs (Figura VI.11.A y B). Esto permitiría especular que al menos en las condiciones de éste ensayo, ambas proteínas no se excluyen en esta localización. Por otro lado, la MP^{MILBVV} no altera la formación de los agregados citoplasmáticos de $25K^{MILBVV}$. Tampoco se observó una re-localización de la MP^{MILBVV} a estos agregados (Figura VI.11.A y B).

En lo que respecta a la localización nuclear, ambas proteínas se localizan en el nucleoplasma, pero sólo la $eGFP:25K^{MILBVV}$ se encuentra en nucléolo. Cuando ambas se co-expresan, no se observan cambios en la distribución de la $25K^{MILBVV}$ entre nucléolo y nucleoplasma, ni una relocalización o reclute de la $MP^{MILBVV}:mRFP$ al nucléolo (Figura VI.11.C).

Para completar todas estas co-localizaciones resta determinar si existe interacción entre estas

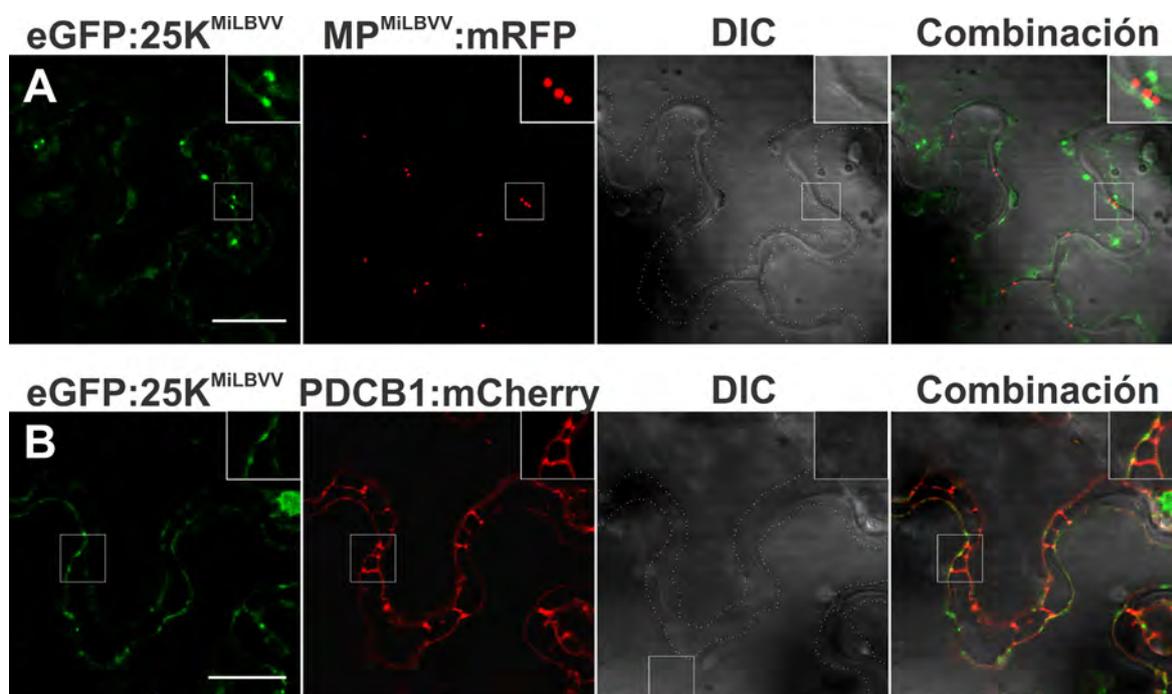


Figura VI.12. La proteína $eGFP:25K^{MILBVV}$ no se acumula en PD en presencia de la $MP^{MILBVV}:mRFP$ en células plasmolizadas. (A, B) Co-expresión de $eGFP:25K^{MILBVV}$ $MP^{MILBVV}:mRFP$ con y $PDCB1:mCherry$, respectivamente, en células de *N. benthamiana* a los 3 dpai que fueron plasmolizadas por infiltración con glicerol 30%. La barra corresponde a $\lambda = 20 \mu m$; área formada por la línea de puntos en la imagen de campo claro representa la pared celular expuesta luego de la plasmólisis; el recuadro indica la región ampliada en el borde superior derecho, donde se observan los PDs y los agregados citoplasmáticos de $eGFP:25K^{MILBVV}$.

proteínas en MT y en nucleoplasma.

En cuanto a la localización en PD, se observa que los agregados de eGFP:25K^{MiLBVV} se encuentran

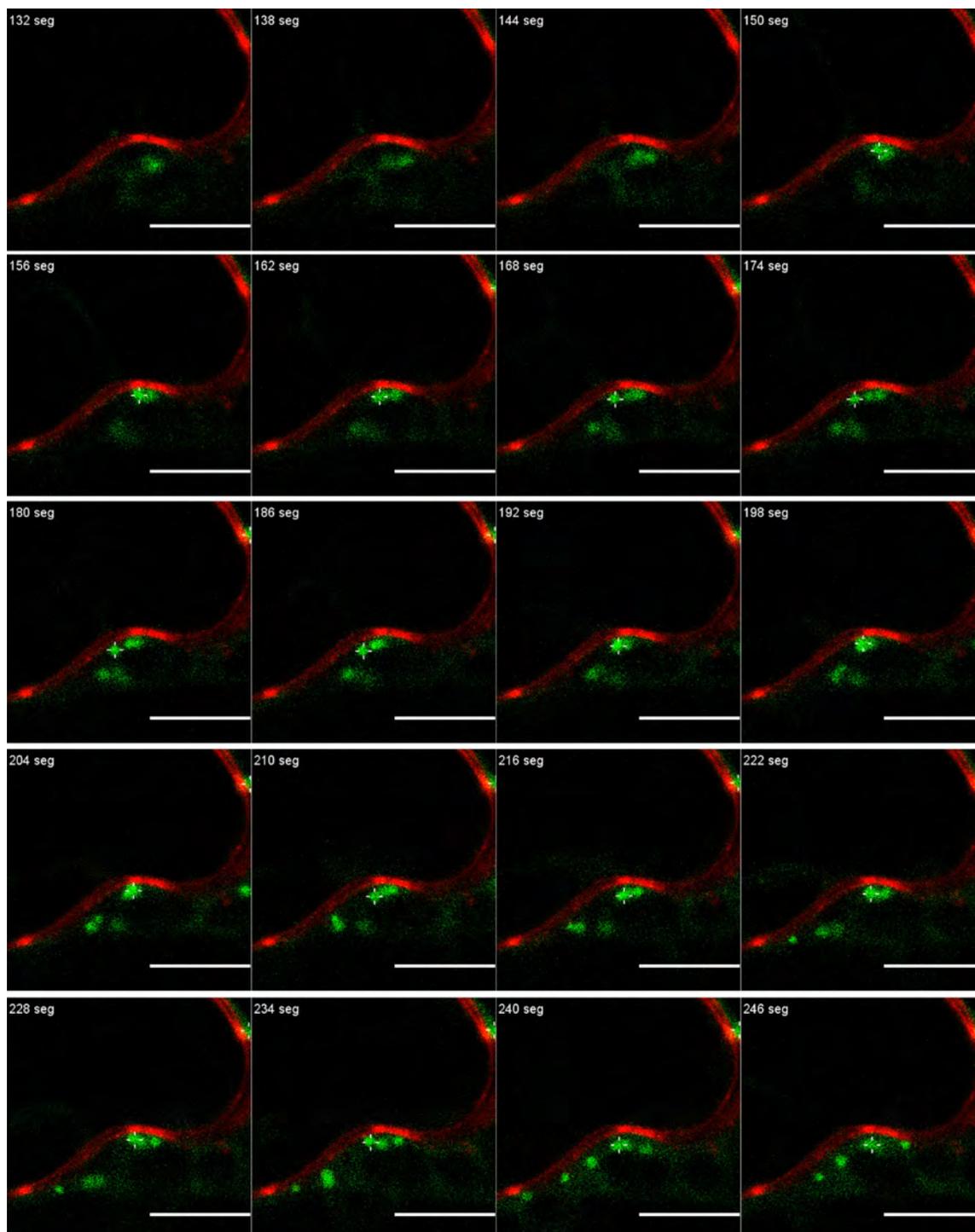


Figura VI.13. Co-expresión de eGFP:25K^{MiLBVV} y PDCB1:mCherry en hojas de *N. benthamiana*. Imágenes combinadas de los canales de GFP y RFP en el tiempo. En el borde superior derecho se indica el tiempo, la cruz indica un agregado citoplasmático de eGFP:25K^{MiLBVV}; la barra representa 5 μ m. Ver video IV.3.

próximos a PD en donde se encuentra la $MP^{MiLBVV}::mRFP$, pero no se observa que la $MP^{MiLBVV}::mRFP$ reclute a $eGFP:25K^{MiLBVV}$ al PD, es decir no se observa acumulación de $eGFP:25K^{MiLBVV}$ dentro del PD (Figura VI.11.D). Con el objetivo de corroborar que la proteína $eGFP:25K^{MiLBVV}$ no se encuentra dentro del PD, se aplicó la técnica de plasmólisis a células expresando $eGFP:25K^{MiLBVV}$ + PDCB1:mCherry (Figura VI.12.A), y $eGFP:25K^{MiLBVV}$ + $MP^{MiLBVV}::mRFP$ (Figura VI.12.B). Cuando se retrae la membrana plasmática no se observa fluorescencia verde de la $25K^{MiLBVV}$ en el PD, en ninguno de los dos casos, sino que ésta queda en el citoplasma de la célula (Figura VI.12.A y B, recuadro superior derecho), demostrando que ésta proteína no se encuentra en el PD.

- Los agregados citoplasmáticos de $eGFP:25K^{MiLBVV}$ se mueven en el citoplasma hasta anclarse en el PD cuando está presente la MP^{MiLBVV}

Los agregados citoplasmáticos que forma la proteína $eGFP:25K^{MiLBVV}$ son móviles, y éste movimiento puede ser registrado *in vivo* cuando se expresa en células epiteliales de *N. benthamiana*. Este movimiento es similar al descrito por Hamada *et al.*, (2012), denominado “*stop and go*”. Esto es, se mueven en el citoplasma, recorriendo una distancia corta, luego hacen una pausa, y vuelven a iniciar su movimiento, y así, en forma repetitiva, se trasladan por toda la célula (Video VI.1). Este movimiento es característico de diversas organelas tales como, mitocondrias, peroxisomas, P-bodies, e incluso en los virus como ocurre con los VRCs de TMV, y los agregados de MP^{TMV} (Hamada *et al.*, 2012; Boyko *et al.* 2007; Sambade *et al.*, 2008).

Cuando se observa el plano medio, los agregados citoplasmáticos de $eGFP:25K^{MiLBVV}$ salen y entran al plano confocal observado, aquellos que permanecen en este plano, se mueven por el citoplasma cercano a la pared, ocasionalmente se detienen, pero en unos segundos retoman el movimiento (Video VI.2).

A fin de determinar si los agregados se detienen en PD, la proteína $eGFP:25K^{MiLBVV}$ se co-expresó con el marcador de PD, PDCB1:mCherry. Con la presencia de ésta proteína, se observa que algunos agregados se encuentran cercanos a los PD, pero no parecen anclarse en esta localización, ya que retoman su movimiento (Figura VI.13; Video VI.3).

Como se muestra en la Figura VI.II.D, en los PD donde se encuentra $MP^{MiLBVV}:mRFP$, también se observan los agregados citoplasmáticos en las cercanías de los mismos. Para corroborar que hubiera una dependencia con la presencia de $MP^{MiLBVV}:mRFP$, se analizó el movimiento de estos agregados en el tiempo, analizando el patrón de movimiento. Como se observa en la Figura VI.14 y el Video.VI.4, luego de moverse en las adyacencias de un PD, los agregados citoplasmáticos se detienen y se anclan junto al PD donde $MP^{MiLBVV}:mRFP$ se localiza, es decir, una vez que se acercan a la

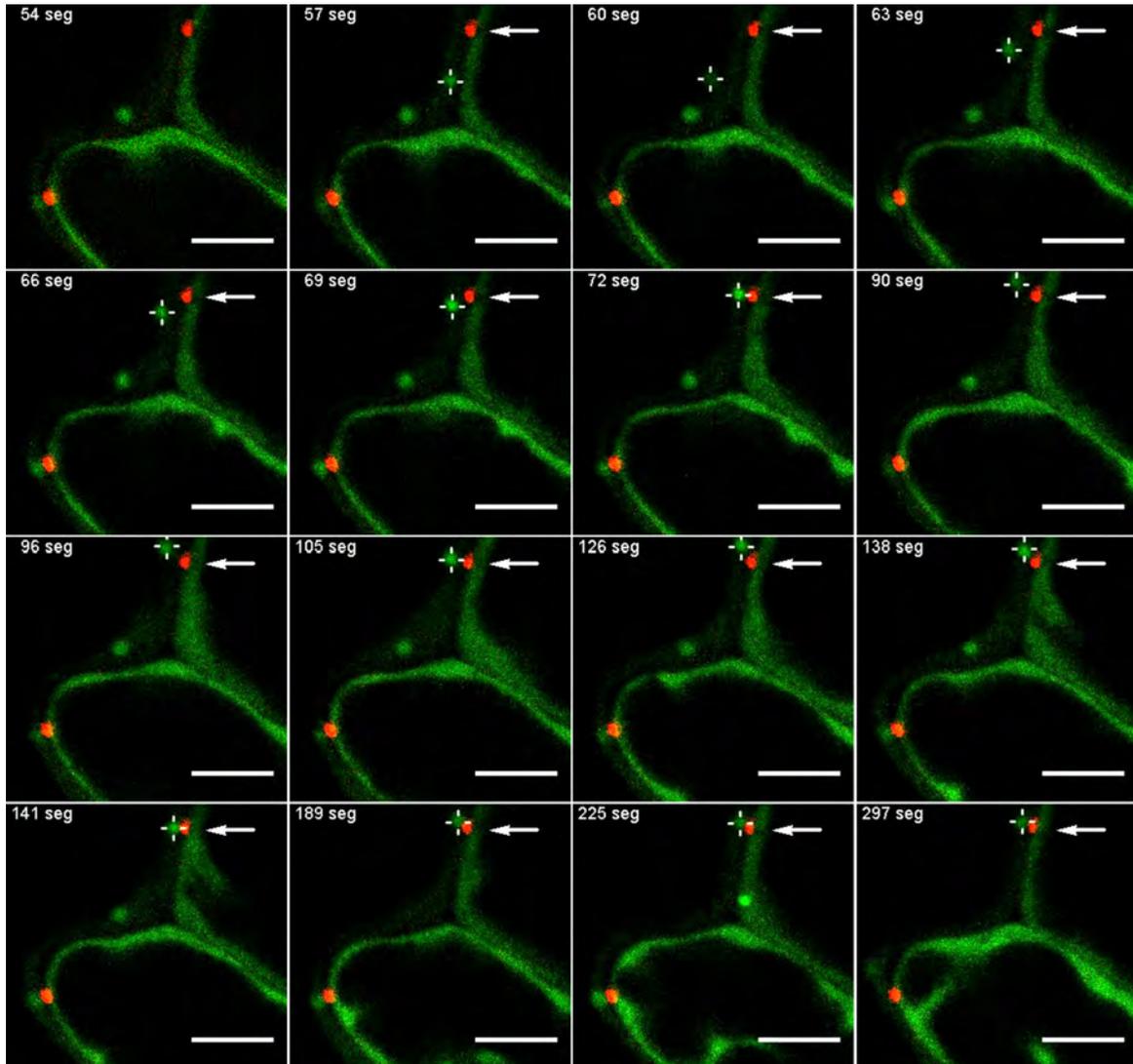


Figura VI.14. Co-expresión de $eGFP:25K^{MiLBVV}$ y $MP^{MiLBVV}:mRFP$ en hojas de *N. benthamiana*. Imágenes combinadas de los canales de GFP y RFP en el tiempo. En el borde superior derecho se indica el tiempo, la flecha indica un PD marcado con $55K^{MiLBVV}:mRFP$, mientras que la cruz indica un agregado citoplasmático de $eGFP:25K^{MiLBVV}$; la barra representa 5 μm . Ver video VI.4

MP^{MiLBVV} no retoman el movimiento durante un tiempo prolongado. Esto se observó repetidamente en al menos cuatro observaciones independientes, lo que permite especular que exista interacción

específica entre MP^{MiLBVV} y $25K^{MiLBVV}$ con o sin la intervención de otras proteínas celulares, que podrían formar parte de estos agregados.

- Las proteínas $eGFP:25K^{MiLBVV}$ y $24K^{CPsV}:eGFP$ se mueven a la célula adyacente en presencia de sus respectivas MP^{MiLBVV}

En el Capítulo V determinamos que las MPs aumentan el SEL del PD, facilitando el pasaje de GFP (28 kDa). Sabemos que este límite máximo, es igual o menor a 75 kDa, ya que las CPs no difunden a la célula adyacente en estas condiciones, pero no medimos el aumento neto del SEL. Por lo tanto,

A

	No. de foci fluorescentes							% de foci con más de una célula
	1 célula	2 células	3 células	4 células	5 células	6 células	7 células	
$eGFP:25K^{MiLBVV}$	20	3	1	0	0	0	0	17
$eGFP:25K^{MiLBVV} + MP^{MiLBVV}:FLAG$	2	0	3	3	2	0	0	80
$24K^{CPsV}:eGFP$	25	5	1	0	0	0	0	19
$24K^{CPsV}:eGFP + MP^{CPsV}:FLAG$	7	2	2	4	0	0	0	53

B

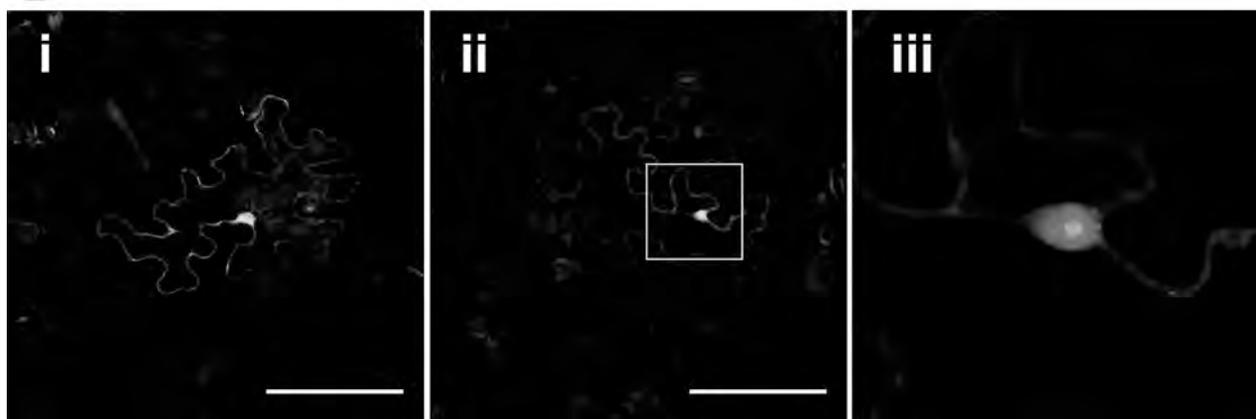


Figura V.15. “Gating” de $eGFP:25K^{MiLBVV}$ y $24K^{CPsV}:GFP$ por sus respectivas MPs. (A) Tabla, se muestra la mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* infiltrada en hojas de *N. benthamiana* y el número de células que formaban los foci fluorescentes. Se calculó el % de foci fluorescentes que tienen más de una célula en relación a las muestras analizadas. (B) (i) Imágenes representativas de un foci de 1 célula asilada, (ii) de más de una célula (iii) el núcleo de la célula central recuadrada en (ii), donde se observa el patrón de $eGFP:25K^{MiLBVV}$. La barra en (i) y (ii) representa 150 μm

durante la infección de $MiLBVV$ y $CPsV$, las proteínas $25K^{MiLBVV}$ o $24K^{CPsV}$ podrían moverse a la célula adyacente tanto por difusión, como asistidas por las MPs. Como primera aproximación decidimos determinar si las MPs son capaces de facilitar la difusión de $eGFP:25K^{MiLBVV}$ (63 kDa) y de $24K^{CPsV}:eGFP$ a la célula adyacente. En estos ensayos, cuando sólo se expresan la proteína

eGFP:25K^{MiLBVV} o la 24K^{CPsV}:eGFP, la fluorescencia se observó principalmente en células aisladas (Figura VI.15.A y B (i)), en concordancia con lo obtenido en el Capítulo V (Figura V.9). Mientras que cuando se co-expresaron con la MP^{MiLBVV} o MP^{CPsV}, respectivamente, se observaron foci fluorescentes de más de una célula (Figura VI.15.A y B(ii) (iii)), con un 80% de movimiento para eGFP:25K^{MiLBVV} y 50% para 24K^{CPsV}:eGFP. Dado que hasta el momento no se cuenta con una proteína control que posea un tamaño similar a la eGFP:25K^{MiLBVV}, no podemos aseverar que el pasaje sea asistido, aunque podemos sospechar que por ser cercano al límite máximo del SEL modificado por las MP de CPsV y MiLBVV, el resultado obtenido corresponda a un transporte asistido.

Conclusiones

- La MP^{CPsV} forma túbulos en PD cuando se la expresa ectópicamente en *N. benthamiana* mientras que no se observan túbulos con la MP^{MiLBVV}.
- Ambas MPs interaccionan *in vivo* en el PD entre ellas y con la proteína PDLPI, conocida por actuar como receptor de MPs que se mueven por el mecanismo guiado por túbulos
- Las MPs y sus respectivas CPs interaccionan en el citoplasma de células epiteliales de *N. benthamiana*, cuando se expresan ectópicamente.
- La interacción de las proteínas MPs y CPs fusionadas a PF en el citoplasma no re-localiza las CPs, ni tampoco facilita el movimiento de las mismas a la célula adyacente.
- La MP^{CPsV} no re-localiza a la proteína 24K^{CPsV} al PD y esta última no recluta a la MP^{CPsV} a los agregados nucleares.
- La MP^{CPsV} facilitaría el movimiento de la proteína 24K^{CPsV} a la célula adyacente.
- La MP^{MiLBVV}:mRFP no re-localiza a eGFP:25K^{MiLBVV} al PD, y esta última no recluta a la MP^{MiLBVV} al nucléolo ni a los agregados citoplasmáticos.
- La MP^{MiLBVV} facilitaría el movimiento de eGFP:25K^{MiLBVV} a la célula adyacente.
- La proteína eGFP:25K^{MiLBVV} forma agregados que poseen un movimiento *stop and go*, en el citoplasma de *N. benthamiana*
- Los agregados de eGFP:25K^{MiLBVV} se anclan en los PD cuando en ellos se acumula la MP^{MiLBVV}:mRFP.

Discusión

En este capítulo se muestran las primeras evidencias del movimiento de los ophiovirus. En primer término la formación de túbulos de MP^{CPsV} en PD, fácilmente observables por CLSM, aporta fuertes evidencias de que la estrategia de movimiento de CPsV es guiada por túbulos. Por el contrario, la MP^{MiLBVV} no mostró estas estructuras, aunque igualmente no podemos descartar que MiLBVV también emplee la estrategia de túbulos, dado que es posible que los túbulos sean más pequeños que los de la MP^{CPsV} y por lo tanto no se observen por microscopía óptica. Otra explicación posible es que la adición de la PF afecte la formación de túbulos, como ha sido observado para la MP^{CaMV} (Amari *et al.*, 2010). Cabe confirmar que los túbulos formados por MP^{CPsV}:GFP o MP^{CPsV}:mRFP no se traten de un posible artefacto generado por la presencia de P19, aunque no para MP^{MiLBVV}, por lo que éste ensayo será confirmado como se describe en las perspectivas.

Otras evidencias apoyan la estrategia de movimiento guiado por túbulos para los ophiovirus. La interacción homóloga de las MPs, y de éstas con PDLPI, son dos hechos observados también para virus que utilizan éste mecanismo, como son GFLV y CaMV. Un experimento que apoya la intervención de PDLPI en el movimiento, es la incapacidad de estos virus de formar túbulos y moverse en *A. thaliana* con un “triple knock out” de los tres genes *pdlp1/pdlp2/pdlp3*, observando que el movimiento viral se encontraba retrasado (Amari *et al.*, 2010). Para el caso de los ophiovirus, realizar este ensayo permitiría corroborar el requerimiento de PDLP, pero hasta el momento no contamos con un protocolo de infección de *A. thaliana* para CPsV o MiLBVV.

El movimiento viral dependiente de la CP se ha encontrado en varios virus (Niehl & Heinlein, 2011). Los virus pueden moverse célula-a-célula en forma de viriones, o como complejos ribonucleoproteicos. Aquellos que se mueven como viriones, necesitan de la CP para el ensamblaje de la partícula, y por ende son dependientes de la CP para moverse, como es el caso de GFLV o CPMV. Además, en este último se ha encontrado que la región C-terminal de la MP es la responsable de la interacción MP-virión, y la delección de este dominio genera túbulos de MP vacíos, mientras que con la proteína MP salvaje se encuentran llenos de viriones (Lekkerkerker *et al.*, 1996, Belin *et al.*, 1999). Es decir que en este caso la interacción CP-MP, a través de este dominio C-terminal de la MP, es indispensable para el movimiento célula-a-célula. Los virus que se mueven como complejos ribonucleoproteicos presentan diferencias en cuanto a la necesidad de la CP. Por ejemplo la CP de TMV es dispensable para el movimiento célula-a-célula, pero es indispensable para la infección sistémica de la planta (Holt & Beachy, 1991). Otro ejemplo de movimiento CP-dependiente proviene

de los virus que emplean las proteínas TGB. Mientras que el movimiento célula-a-célula de hordeiviruses y potexvirus depende de TGB MPs, solo los potexvirus como es el caso de PVX, requieren de la CP junto con TGB para moverse a la célula adyacente. Sin embargo, no se conoce aún si PVX se mueve como viriones o como complejos ribonucleoproteicos (Chapman *et al.*, 1992; Foster *et al.*, 1992; Sit & AbouHaidir, 1993).

En el caso de los ophiovirus, hemos detectado interacción entre las MPs y las CPs de CPsV y MiLBVV. Esta interacción podría estar vinculada a cualquier función que desempeñan durante el ciclo viral, por ejemplo: formación del complejo de replicación/transcripción, movimiento viral, etc. En nuestros estudios, la asociación MP-CP, sin embargo, no llevó a una relocalización de estas proteínas ni tampoco a un pasaje de la fusión CP:eGFP célula-a-célula, por lo tanto, como desconocemos las implicancias de ésta interacción citoplasmática CP-MP, no podemos relacionar directamente la CP con el movimiento viral. Hay que tener en cuenta que las condiciones en las que se midió esta interacción pueden diferir de las que ocurren en la célula infectada. Además, la CP se ensayó fusionada a PF, aumentando su tamaño, y modificando quizás su estructura, y por otro lado, ni el resto de las proteínas virales ni el RNA genómico están presentes, por lo cual estos resultados negativos deben ser tomados con cautela.

En este sentido las observaciones, por microscopía electrónica, de los PD en tejido infectado ayudarían a determinar si el virus se mueve como virión. Aún así, podría tratarse de una observación difícil de realizar en cortes ultrafinos ya que las partículas poseen un diámetro de 3 nm. Probablemente, por esta razón los viriones sólo han sido observados en extractos de purificaciones de partículas, y nunca *in situ* en tejido infectado (García, 2012). Por otro lado, como su nombre lo indica, los ophiovirus poseen estructuras muy enrolladas y sinuosas, tomando diversas conformaciones, abiertas o circulares, y cerradas o lineales, por lo que se puede esperar que en el pasaje por el PD, si fuera como virión, lo hicieran en una conformación adecuada para tal fin, y quizás observable con el microscopio electrónico. Por lo tanto, estos estudios deben continuarse y optimizarse.

Si bien desconocemos la composición de los agregados de eGFP:25K^{MiLBVV}, las evidencias encontradas involucrarían a esta proteína en el movimiento de MiLBVV. Esto se sustenta por el anclaje de estos agregados en PD, y la difusión de eGFP:25K^{MiLBVV} por parte de MP^{MiLBVV} a la célula adyacente. Este pasaje podría ocurrir por simple difusión, es decir la MP^{MiLBVV} aumenta el SEL a 60 kDa ó por un transporte específico que pueda reflejar parte del mecanismo de movimiento. Para responder a éste interrogante debemos contar con una proteína de un tamaño similar a eGFP:25K^{MiLBVV}, que no afecte a la MP^{MiLBVV} y realizar el mismo ensayo.

Se ha encontrado que las proteínas TGB2 y TGB3 de PVX forman en los PD, cuerpos membranosos derivados de retículo endoplásmico donde se encuentra el genoma viral y la replicasa viral, los que se han propuesto como sitios de replicación. Estos hechos permitieron generar un modelo en donde TGB1 recluta la CP al PD, mientras que el complejo TGB2/3, replicasa y vRNA generan las copias del genoma viral, todo en las cercanías del PD (Tilsner *et al.*, 2013). Estos cuerpos membranosos de TGB2/3 observados para PVX resultan similares a los observados para eGFP:25K^{MiLBVV} al microscopio confocal, con lo cual sería interesante determinar la composición de estos agregados y comparar con los resultados obtenidos para PVX.

Perspectivas

Con el objetivo de confirmar que los túbulos que forma la MP^{CPsV} en *N. benthamiana*, también los hace en su hospedante natural, llevaremos a cabo observaciones de PD de *Citrus sinensis* infectado con CPsV mediante CLSM, y analizando también la estructura de los PD y la presencia de viriones en el mismo mediante ME. Lo mismo se realizará con la MP^{MiLBVV}, una vez que se separe de LBVaV presente en las plantas infectadas con MiLBVV-LP2.

En relación a los túbulos formados por MP^{CPsV}:GFP o MP^{CPsV}:mRFP y con el objetivo de descartar un posible artefacto generado por P19, haremos un ensayo similar pero con otras supresoras virales tales como NSs, 2b y 24K^{CPsV}.

La MP^{CPsV} fusionada a PF al C-terminal se cliva en un fragmento de aproximadamente 50 kDa, mientras que tanto la N-terminal a eGFP y todas las fusiones a PF N- y C-terminales de la MP^{MiLBVV}, no se clivan apreciablemente (Capítulo V). Relacionando con lo expuesto en este Capítulo, las primeras dos son las únicas que se han encontrado formando túbulos en PD. Por lo tanto, es de especial interés analizar la posible correlación entre el clivado y la formación de túbulos. Para esto, se analizarán los mutantes propuestos en el Capítulo V, aplicando los mismos ensayos (ensayos funcionales), y los mostrados en este capítulo (formación de túbulos).

La llegada de MP^{GFLV} al PD, es dependiente de su receptor PDLPI. La vía por la que PDLPI se direcciona al PD es conocida, requiere de la red de actina, un sistema de secreción funcional y las miosinas XI-K y XI-2 (Thomas *et al.*, 2008; Amari *et al.*, 2011). Por lo tanto, se propone analizar el direccionamiento intracelular de las MPs en relación a componentes celulares como la red de actina, MT, sistema de secreción, utilizando mutantes dominantes negativos de miosinas. Estos resultados serán contrastados con los descriptos para PDLPI, a fin de correlacionar la dependencia de las MPs con la presencia de PDLPI en PD.

Una evidencia biológica que sustente este rol para PDLPI en el movimiento de los ophiovirus será obtenida si contamos con la infección de *A. thaliana* con CPsV y/o MiLBVV, y en ese caso podría utilizarse el triple mutante de *A. thaliana* en los genes *pdlp1/pdlp2/pdlp3*.

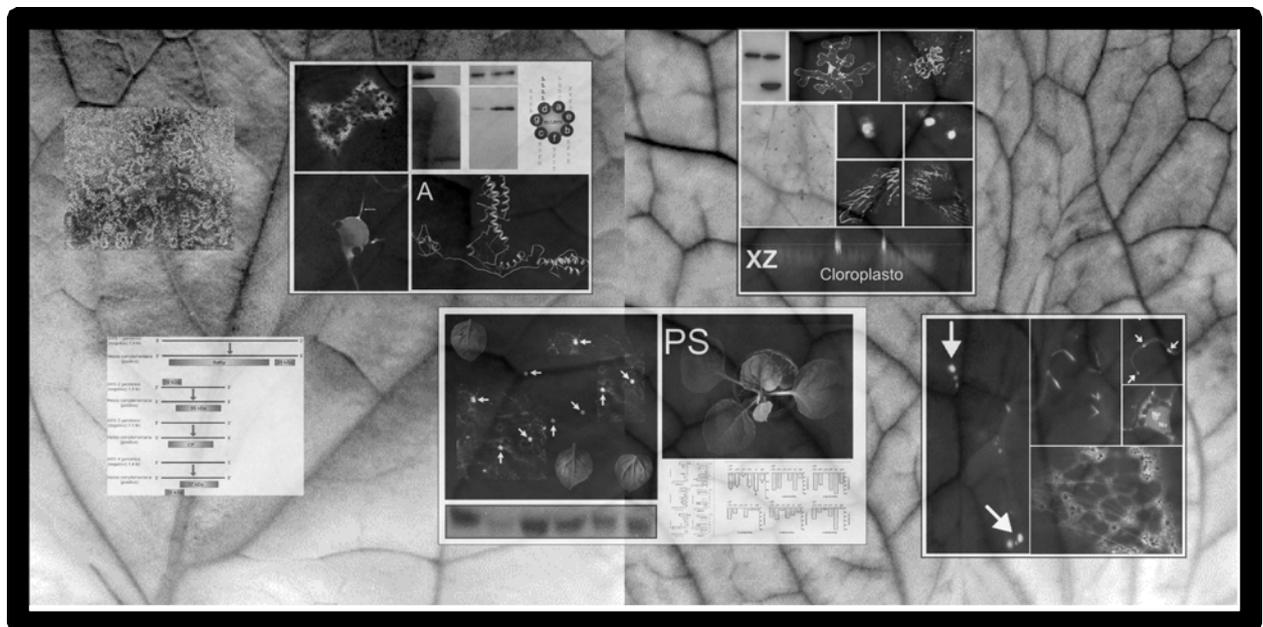
Para confirmar que las MPs permite el movimiento asistido de eGFP:25K^{MiLBVV} y 24K^{CPsV}:eGFP, estamos desarrollando una construcción de control. Esta construcción llevaría dos GFP en tandem eGFP-GFP (2X-GFP) que presenta un tamaño similar ligeramente inferior a eGFP:25K^{MiLBVV}. Es de esperar que si el transporte de eGFP:25K^{MiLBVV} es asistido y no por difusión, la proteína 2X-GFP no difunda a las células adyacentes en presencia de MP^{MiLBVV} mientras que eGFP:25K^{MiLBVV} si lo haga. Además nos interesaría analizar la interacción proteína-proteína entre MP^{MiLBVV} y eGFP:25K^{MiLBVV}.

Dado que la proteína 25K^{MiLBVV} estaría vinculada al movimiento célula-a-célula, reviste especial interés el estudio de los agregados citoplasmáticos. En primer término nos proponemos la observación de estos agregados en células infectadas mediante ME, ya que nos aportara evidencias morfológicas de los mismos, orientando la identificación de los constituyentes y confirmando la existencia de los mismos durante la infección. Además, sería interesante determinar si en estos agregados se encuentra el RNA genómico, u otros RNAs virales, ya que esto permitiría avanzar en el conocimiento del ciclo viral. Como primera aproximación esperamos inmunoprecipitar la eGFP:25K^{MiLBVV} expresada en *N. benthamiana* e identificar las proteínas y los RNAs que se encuentren en el inmunoprecipitado, por SDS-PAGE y/o secuenciación.

En relación con lo anterior, nos proponemos el desarrollo de un replicón reportero que nos permita avanzar en algunos aspectos del movimiento célula-a-célula de RNA viral. Para eso estamos desarrollando una construcción que exprese un RNA transcrito que contenga el ORF de GFP-ER, y en los extremos, las secuencias 3' y 5' UTR del RNA 3 de MiLBVV con el objeto de conservar las secuencias que probablemente estén involucradas en el reconocimiento del RNA viral por la proteínas homólogas. Al expresar esta construcción en células aisladas junto a las proteínas virales (separadas o combinadas) en todas las células, se analizará el movimiento de RNA. Se espera encontrar fluorescencia GFP en las células vecinas, sólo si este RNA es transportado en presencia de alguna/s de la/s proteínas virales. En principio la MP podría estar involucrada, de acuerdo a las evidencias encontradas hasta el momento. Esto nos permitirá encontrar otros componentes del complejo de movimiento de los ophiovirus, además de la MP. En particular podríamos abordar la dependencia del movimiento de este replicón con las proteínas CP^{MiLBVV} y 25K^{MiLBVV}.

Capítulo VII

Conclusiones y discusión



Funciones de las proteínas de CPsV y MiLBVV

-Se demostró que las CP de los ophiovirus CPsV y MiLBVV se localizan en el citoplasma e interaccionan *in vivo* entre ellas. Esta interacción CP-CP podría estar mediada por un dominio de cierre de leucinas, que se encuentra incluido en un dominio que presenta homología en su estructura terciaria con la proteína TFIIB, la cual se une a secuencias TATA de DNA en eucariotas. Teniendo en cuenta el modelo 3D generado para CP^{MiLBVV} se proponen ciertos aminoácidos involucrados en la unión CP-RNA

-Las proteínas 24K^{CPsV}/25K^{MiLBVV} y las MPs presentan actividad supresora del PTGS local. 24K^{CPsV}/25K^{MiLBVV} se localizaron en agregados nucleoplásmicos y citoplasmáticos, pudiendo estar asociados a la actividad supresora. Las MPs se localizan en P-bodies, y dado que en estos agregados ribonucleoproteicos ocurre el procesamiento o degradación de mRNAs éste podría ser un sitio donde ejerzan su función supresora.

-Hemos identificado a la MP de los ophiovirus CPsV y MiLBVV y caracterizamos varias de sus actividades. Estas proteínas se localizan dentro del canal del PD, en cloroplastos y MT. Presentan la capacidad NCAP y de aumentar el SEL del PD. Confirmamos la funcionalidad como MP en el contexto de la infección de un virus mutante en el movimiento.

-Las MP^{CPsV} forma túbulos en PD, mientras que las dos MPs en estudio presentan interacción homóloga y con PDLPI en PD, evidencias que sugieren que los ophiovirus se mueven célula-a-célula empleando el mecanismo guiado por túbulos. Las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} son transportadas por las MPs a la célula vecina, y los agregados citoplasmáticos de 25K^{MiLBVV} se anclan en los PD donde se encuentra la MP^{MiLBVV}. Esto vincula las proteínas 24K^{CPsV} y 25K^{MiLBVV} al movimiento viral. Si bien detectamos interacciones MP-CP, esta no re-localiza a la CP a otro compartimento celular ni la transporta a la célula adyacente.

Discusión general

Los estudios realizados en este trabajo de tesis tienen como objetivo conocer las funciones de las proteínas virales de los ophiovirus. Estos estudios aportaron al conocimiento de las funciones que llevan a cabo durante el ciclo viral, acercándonos a conocer su mecanismo. Con las evidencias encontradas en este trabajo de tesis, no puedo dejar de proponer un mecanismo, intentando integrar éstas evidencias, probablemente con más preguntas y/o contradicciones, que certezas.

Los virus ingresan a la célula por diversas vías, y en el caso de MiLBVV, está mediada por el parásito intracelular obligado *O. brassicae*. Una vez dentro de la célula ocurre el desensamblado de la partícula viral, la cual está conformada por unidades de CP unidas fuertemente a cada RNA genómico, y en el caso de los virus negativos, la RdRp viral en el extremo 3' del mismo. Esta última replica el genoma generando la hebra positiva, que será el molde para después sintetizar nuevos RNAs virales, y a su vez generar los mRNAs para la síntesis de proteínas, actividad encontrada *in silico* en todas las RdRp de los ophiovirus (Naum *et al.*, 2003).

El estudio del mecanismo por el cual los ophiovirus transcriben su genoma, generando o no mRNAs con 5' CAP y cola poliA se encuentra en estudio (Eliana Ocolotobiche, tesis en curso). Se podría especular que emplean el mecanismo de CAP-snatching, como la mayoría de los virus negativos de plantas. En este sentido la RdRp y/o la CP podrían secuestrar el 5' CAP de mRNAs celulares e incorporarlos a los mRNAs virales. La localización encontrada para la CP apoyaría esta suposición dado que el CAP-snatching ocurre en el citoplasma. La MP, que también podría ser parte de la partícula viral, y se localiza en P-bodies, podría unir 5'CAP de mRNAs celulares. Una vez que el virus es capaz de expresar todas sus proteínas, la CP protegería el RNA viral de la degradación, la proteína 24K^{CPsV}/25K^{MiLBVV} contribuiría a suprimir el silenciamiento intra- e intercelular, dada su localización en nucléolo, en agregados nucleoplásmicos o citoplasmáticos, libre en citoplasma o núcleo. La MP se direcciona a cloroplastos y a PDs donde interacciona con PDLP. Allí se acumula, modificando el PD, donde forma túbulo de subunidades de MP, que removerían el DT. Además, la MP se transporta a la célula adyacente junto con la proteína 24K^{CPsV}/25K^{MiLBVV}. Este transporte permitiría que en la célula vecina se inicie la supresión del PTGS. Por otro lado, la proteína 24K^{CPsV}/25K^{MiLBVV} también estaría vinculada al movimiento viral, de tal manera que en los agregados citoplasmáticos (que podrían tratarse de SGs), podrían encontrarse los complejos de replicación, que se moverían hacia el PD. Es decir que una vez que comienza a replicarse y transcribirse, los RNAs virales se acumularían en los mismos para luego ser transportados. El contacto entre P-bodies y SGs y las proteínas virales asociadas (MP y 24K^{CPsV}/25K^{MiLBVV}) proveerían a los SGs con 5' CAPs.

Para finalmente anclarse en las inmediaciones de los PD y así mover el complejo de movimiento o el virión a la célula adyacente.

Dentro de este mecanismo, los MTs y los cloroplastos no han sido incluidos. Los MTs podrían contribuir al movimiento de los VRCs para llegar al PD. El movimiento de *stop and go*, requiere de MTs para el pausado de los mismos, que en este mecanismo favorecería el contacto P-bodies-SGs. La red de actina también se utiliza en el movimiento *stop and go*, es dependiente de la misma, y sería necesaria para el movimiento de los VRCs. Además, si se confirma que PDLP actúa como receptor de las MPs de los ophiovirus, entonces la llegada al PD y la acumulación de las MPs en PD dependerá del sistema de secreción y del sistema actina/miosina. Por lo tanto, cambios o alteraciones que se provoquen en MTs, actina, miosina, y en el sistema de secreción deberían afectar el movimiento célula-a célula de los ophiovirus.

Leyendas de videos

-Capítulo IV

Video IV.1. Co-expresión de eGFP:25K^{MiLBVV} con Golgi:Cherry. Se observa una región cortical de una célula de *N. benthamiana* expresando estas proteínas. El mismo video se combinaron los dos canales de fluorescencia y se repite dos veces, en la segunda repetición se indica con una cruz el movimiento de un agregado citoplasmático de eGFP:25K^{MiLBVV} que se asocia transitoriamente con las vesículas de Golgi. En la esquina superior izquierda se muestra el tiempo transcurrido durante el video, el cual se reproduce a siete fotos por segundo, la barra representa 10 μm .

Video IV.2. Co-expresión de eGFP:25K^{MiLBVV} con DCPI:mRFP. Se observa una región cortical de una célula de *N. benthamiana* expresando estas proteínas. En este video se combinaron los dos canales de fluorescencia. Se observan dos agregados citoplasmáticos de eGFP:25K^{MiLBVV} que se asocia de forma estable a los P-bodies marcados con DCPI:mRFP. En la esquina superior izquierda se muestra el tiempo transcurrido durante el video, el cual se reproduce a siete fotos por segundo, la barra representa 5 μm .

Video IV.3. Co-expresión de 54K^{CPsV}:eGFP con DCPI:mRFP. Se observa una región cortical de una célula de *N. benthamiana* expresando estas proteínas. En este video se observan cuatro P-bodies marcados con 54K^{CPsV}:eGFP y DCPI:mRFP. Se indica con una cruz el movimiento de los mismos. En la esquina superior izquierda se muestra el tiempo transcurrido durante el video, el cual se reproduce a siete fotos por segundo, la barra representa 5 μm .

Video IV.4. Co-expresión de 55K^{MiLBVV}:eGFP con DCPI:mRFP. Se observa una región cortical de una célula de *N. benthamiana* expresando estas proteínas. En este video se observan tres P-bodies marcados con 55K^{MiLBVV}:eGFP y DCPI:mRFP. Se indica con una cruz el movimiento de los mismos. En la esquina superior izquierda se muestra el tiempo transcurrido durante el video, el cual se reproduce a siete fotos por segundo, la barra representa 5 μm .

-Capítulo IV

Video VI.1. Expresión de eGFP:25K^{MiLBVV} en *N. benthamiana*. Se observa la región cortical de una célula de *N. benthamiana* expresando eGFP:25K^{MiLBVV}. Se indica con una cruz el movimiento “stop and go” de los agregados citoplasmáticos de eGFP:25K^{MiLBVV}. En la esquina superior izquierda se muestra el tiempo transcurrido durante el video, el cual se reproduce a siete fotos por segundo, la barra representa 10 μm .

Video VI.2. Expresión de eGFP:25K^{MiLBVV} en *N. benthamiana*. Se observa la región media de una célula de *N. benthamiana* expresando eGFP:25K^{MiLBVV}. Se observa como los agregados citoplasmáticos de eGFP:25K^{MiLBVV} entran y salen del plano confocal y los que permanecen no se anclan a ninguna región en particular. En la esquina superior izquierda se muestra el tiempo transcurrido durante el video, el cual se reproduce a siete fotos por segundo, la barra representa 10 μm .

Video VI.3. Co-expresión de eGFP:25K^{MiLBVV} con PDCB1:mCherry. Se observa una región media de una célula de *N. benthamiana* expresando estas proteínas. A diferencia del video VI.2 en este caso los PD se encuentran marcados con PDCB1:mCherry. Se observan que los agregados citoplasmáticos de eGFP:25K^{MiLBVV} se mueven cerca de los PD pero sin anclarse en los mismos. Se indica con una cruz el movimiento de los mismos. En la esquina superior izquierda se muestra el tiempo transcurrido durante el video, el cual se reproduce a siete fotos por segundo, la barra representa 10 μm .

Video VI.4. Co-expresión de eGFP:25K^{MiLBVV} con MP^{MiLBVV}:mRFP. Se observa una región media de una célula de *N. benthamiana* expresando estas proteínas. En este caso los PD se encuentran marcados con MP^{MiLBVV}:mRFP. Se observan dos PD donde los agregados citoplasmáticos de eGFP:25K^{MiLBVV} se anclan. El video se repite dos veces, en la segunda repetición se indica un PD con una flecha y el movimiento de un agregados citoplasmático. con una cruz. En la esquina superior izquierda se muestra el tiempo transcurrido durante el video, el cual se reproduce a siete fotos por segundo, la barra representa 5 μm .

Biobliografía

- Ahlquist, P., French, R., Janda, M. & Loesch-Fries, L. S. (1984). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7066-7070.
- Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer, J., Thomas, C. L., Heinlein, M., Mely, Y., Maule, A. J. & Ritzenthaler, C. (2010). A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog* **6**, e1001119.
- Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V. V. & Ritzenthaler, C. (2011). Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. *PLoS Pathog* **7**, e1002327.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. & Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13079-13084.
- Asurmendi, S., Berg, R. H., Koo, J. C. & Beachy, R. N. (2004). Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1415-1420.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M. A., Lagrange, T. & Voinnet, O. (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* **24**, 904-915.
- Barcala Tabarozzi, A. E., Peña, E. J., Dal Bo, E., Robles Luna, G., Reyes, C. A. & Garcia, M. L. (2010). Identification of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *Lettuce big-vein associated virus* infecting *Lactuca sativa* with symptoms of lettuce big-vein disease in Argentina. *Plant Pathology* **59**, 1160-1161.
- Baulcombe, D. C. & Molnar, A. (2004). Crystal structure of p19—a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem Sci* **29**, 279-281.
- Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E. & Baulcombe, D. C. (2007). The Ploverovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* **17**, 1609-1614.
- Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y. & Baulcombe, D. C. (2005). Cell-to-cell movement of *Potato Potexvirus X* is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **44**, 471-482.
- Beckham, C. J., Light, H. R., Nissan, T. A., Ahlquist, P., Parker, R. & Noueiry, A. (2007). Interactions between brome mosaic virus RNAs and cytoplasmic processing bodies. *Journal of virology* **81**, 9759-9768.
- Belin, C., Schmitt, C., Gaire, F., Walter, B., Demangeat, G. & Pinck, L. (1999). The nine C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *J Gen Virol* **80** (Pt 6), 1347-1356.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. & Baulcombe, D. C. (1999). The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**, 781-792.
- Benitez-Alfonso, Y., Cilia, M., San Roman, A., Thomas, C., Maule, A., Hearn, S. & Jackson, D. (2009). Control of Arabidopsis meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3615-3620.
- Beñatena, H. P. & Portillo, M. M. (1984). Natural spread of psorosis in sweet orange seedlings. In *Proc 9th Conf of IOCV*, pp. 159-164. Edited by T. Garnsey S. M., L. W. and Dodds, J. A. Riverside, Clifornia, USA.
- Bhat, S., Folimonova, S. Y., Cole, A. B., Ballard, K. D., Lei, Z., Watson, B. S., Sumner, L. W. & Nelson, R. S. (2013). Influence of host chloroplast proteins on Tobacco mosaic virus accumulation and intercellular movement. *Plant Physiol* **161**, 134-147.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. (2007). The Ploverovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* **17**, 1615-1621.
- Bos, L. & Huijberts, N. (1996). Lettuce ring necrosis, caused by a chytrid-borne agent distinct from *Lettuce big-vein virus*. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 867-873.

- Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P. & Heinlein, M. (2000). Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. *Nat Cell Biol* 2, 826-832.
- Brandner, K., Sambade, A., Boutant, E., Didier, P., Mely, Y., Ritzenthaler, C. & Heinlein, M. (2008). Tobacco mosaic virus movement protein interacts with green fluorescent protein-tagged microtubule end-binding protein 1. *Plant Physiol* 147, 611-623.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L. & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185-1190.
- Brodersen, P. & Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22, 268-280.
- Brunkard, J. O., Runkel, A. M. & Zambryski, P. C. (2013). Plasmodesmata dynamics are coordinated by intracellular signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 16, 614-620.
- Bucher, E., Sijen, T., De Haan, P., Goldbach, R. & Prins, M. (2003). Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of virology* 77, 1329-1336.
- Burch-Smith, T. M., Brunkard, J. O., Choi, Y. G. & Zambryski, P. C. (2011). Organelle-nucleus cross-talk regulates plant intercellular communication via plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E1451-1460.
- Burgyan, J. (2008). Role of silencing suppressor proteins. *Methods Mol Biol* 451, 69-79.
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E. T., Sit, T. L. & Lommel, S. A. (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol* 39, 419-460.
- Campbell, R. N. (1962). Relationship between the lettuce big-vein virus and its vector, *Olpidium brassicae*. *Nature (Lond)* 195, 675-677.
- Campbell, R. N. (1996). Fungal transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 34, 87-108.
- Campbell, R. N., Grogan, R. G. & Purcifull, D. E. (1961). Graft transmission of big vein of lettuce. *Virology* 15, 82-85.
- Canto, T., Uhrig, J. F., Swanson, M., Wright, K. M. & MacFarlane, S. A. (2006). Translocation of Tomato bushy stunt virus P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity. *Journal of virology* 80, 9064-9072.
- Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G. & Zambryski, P. (1990). The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* 60, 637-647.
- Citovsky, V., McLean, B. G., Zupan, J. R. & Zambryski, P. (1993). Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev* 7, 904-910.
- Crawford, K. M. & Zambryski, P. C. (2000). Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr Biol* 10, 1032-1040.
- Chao, J. A., Lee, J. H., Chapados, B. R., Debler, E. W., Schneemann, A. & Williamson, J. R. (2005). Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2. *Nat Struct Mol Biol* 12, 952-957.
- Chapman, E. J. & Carrington, J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* 8, 884-896.
- Chapman, M. R. & Kao, C. C. (1999). A minimal RNA promoter for minus-strand RNA synthesis by the brome mosaic virus polymerase complex. *J Mol Biol* 286, 709-720.
- Chapman, S., Hills, G., Watts, J. & Baulcombe, D. (1992). Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology* 191, 223-230.
- Chellappan, P., Vanitharani, R. & Fauquet, C. M. (2005). MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10381-10386.
- Chen, Y. & Varani, G. (2005). Protein families and RNA recognition. *FEBS J* 272, 2088-2097.
- da Graça, J., Lee, R., Moreno, P., Civerolo, E. & Derrick, K. (1991). Comparison of citrus ringspot, psorosis, and other virus like agents of citrus. *Plant Disease* 75, 4.
- Danós, E. (1990). La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. In *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, International Foundation for Science (IFS) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) edn, pp. 265-277.

- Derrick, K. S., Brlansky, R. H., Lee, R. F., Timmer, L. W., Garnsey, S. M. & Nguyen, T. K. (1988). Two components associated with the citrus ringspot virus. In *Procl0 th Conf IOCV*, pp. 340-342. Edited by L. W. Timmer, Garnsey, S. M. and Navarro, L. Riverside, California, USA.
- Derrick, K. S., Lee, R. F., Hewitt, B. G., Barthe, G. A. & V., d. G. J. (1991). Characterization of Citrus Ringspot Virus. In *11 th Conf IOCV IOCV*. Edited by R. H. Brlansky, R. F. Lee & T. L. W. Orlando, USA.
- Derrick, P. M., Barker, H. & Oparka, K. J. (1992). Increase in Plasmodesmatal Permeability during Cell-to-Cell Spread of *Tobacco Rattle Virus* from Individually Inoculated Cells. *Plant Cell* 4, 1405-1412.
- Derrien, B., Baumberger, N., Schepetilnikov, M., Viotti, C., De Cillia, J., Ziegler-Graff, V., Isono, E., Schumacher, K. & Genschik, P. (2012). Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci US A* 109, 15942-15946.
- Diaz-Pendon, J. A., Li, F., Li, W. X. & Ding, S. W. (2007). Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19, 2053-2063.
- Ding, S. W. & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- Ding, X. S., Liu, J., Cheng, N. H., Folimonov, A., Hou, Y. M., Bao, Y., Katagi, C., Carter, S. A. & Nelson, R. S. (2004). The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 583-592.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-6145.
- Duan, C. G., Fang, Y. Y., Zhou, B. J., Zhao, J. H., Hou, W. N., Zhu, H., Ding, S. W. & Guo, H. S. (2012). Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Cell* 24, 259-274.
- Fang, Y. & Spector, D. L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol* 17, 818-823.
- Fauquet, C. M. & Fargette, D. (2005). International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology* 2, 64.
- Fawcett, H. S. (1932). New angles on treatment of bark diseases of citrus. *California Citrograph* 17, 406-408.
- Fawcett, H. S. & Klotz, L. J. (1938). Types and symptoms of psorosis and psorosis-like diseases of citrus. *Phytopathology* 28, 670.
- FEDERCITRUS (2013). La Actividad Citrícola Argentina 2013: Federación Argentina del Citrus.
- Fernandez-Calvino, L., Faulkner, C., Walshaw, J., Saalbach, G., Bayer, E., Benitez-Alfonso, Y. & Maule, A. (2011). Arabidopsis plasmodesmal proteome. *PLoS One* 6, e18880.
- Forster, R. L., Beck, D. L., Guilford, P. J., Voot, D. M., Van Dolleweerd, C. J. & Andersen, M. T. (1992). The coat protein of white clover mosaic potyvirus has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. *Virology* 191, 480-484.
- Fry, P. R. (1958). The relationship of *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang. to the big-vein disease of lettuce. *N Z J Agric Res* 1, 301-304.
- Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y. & Watanabe, Y. (2007). Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 48, 1243-1253.
- Fukunaga, R. & Doudna, J. A. (2009). dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J* 28, 545-555.
- García-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Brempelis, K. J. & Carrington, J. C. (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* 22, 481-496.
- García, M. L. (2012). Ophiioviruses: State of the Art, Viral Genomes - Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions. In *Viral Genomes - Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions*, pp. 69-88. Edited by M. L. Garcia & V. Romanowski: InTech.
- García, M. L., Dal Bo, E., Grau, O. & Milne, R. G. (1994). The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J Gen Virol* 75 (Pt 12), 3585-3590.

- García, M. L., Grau, O. & Sarachu, A. N. (1991). Citrus psorosis is probably caused by a bipartite ssRNA virus. *Res Virol* **142**, 303-311.
- Garnsey, S. & Timmer, L. W. (1988). Local lesion isolate of ringspot virus induces psorosis bark scaling. In *Proc 10 th Conf IOCV*, pp. 334-339. Edited by L. W. Timmer, Garnsey, S. M. and Navarro, L. Riverside, California, USA.
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V. & Gafni, Y. (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 157-161.
- Gonzalez, I., Martinez, L., Rakitina, D. V., Lewsey, M. G., Atencio, F. A., Llave, C., Kalinina, N. O., Carr, J. P., Palukaitis, P. & Canto, T. (2010). Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 294-303.
- Goodin, M. M., Dietzgen, R. G., Schichnes, D., Ruzin, S. & Jackson, A. O. (2002). pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **31**, 375-383.
- Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T. & Masuta, C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol* **48**, 1050-1060.
- Grieco, F., Castellano, M. A., Di Sansebastiano, G. P., Maggipinto, G., Neuhaus, J. M. & Martelli, G. P. (1999). Subcellular localization and in vivo identification of the putative movement protein of olive latent virus 2. *J Gen Virol* **80** (Pt 5), 1103-1109.
- Grogan, R. G., Zink, F. W., Hewitt, W. B. & Kimble, K. A. (1958). The association of Olpidium with the big-vein disease of lettuce. *Phytopathology* **48**, 292-296.
- Guenoune-Gelbart, D., Elbaum, M., Sagi, G., Levy, A. & Epel, B. L. (2008). Tobacco mosaic virus (TMV) replicase and movement protein function synergistically in facilitating TMV spread by lateral diffusion in the plasmodesmal desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 335-345.
- Guo, H. S. & Ding, S. W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* **21**, 398-407.
- Guogas, L. M., Filman, D. J., Hogle, J. M. & Gehrke, L. (2004). Cofolding organizes alfalfa mosaic virus RNA and coat protein for replication. *Science* **306**, 2108-2111.
- Hamada, T., Tominaga, M., Fukaya, T., Nakamura, M., Nakano, A., Watanabe, Y., Hashimoto, T. & Baskin, T. I. (2012). RNA processing bodies, peroxisomes, Golgi bodies, mitochondria, and endoplasmic reticulum tubule junctions frequently pause at cortical microtubules. *Plant Cell Physiol* **53**, 699-708.
- Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A. & Burgyan, J. (2003). In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of virology* **77**, 6082-6086.
- Haywood, V., Kragler, F. & Lucas, W. J. (2002). Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**, S303-325.
- Heinlein, M., Epel, B. L., Padgett, H. S. & Beachy, R. N. (1995). Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270**, 1983-1985.
- Heinlein, M., Padgett, H. S., Gens, J. S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B. L. & Beachy, R. N. (1998). Changing patterns of localization of the Tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* **10**, 1107-1120.
- Hemmes, H., Lakatos, L., Goldbach, R., Burgyan, J. & Prins, M. (2007). The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA* **13**, 1079-1089.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. & Voinnet, O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* **22**, 4523-4533.
- Holt, C. A. & Beachy, R. N. (1991). In vivo complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plants. *Virology* **181**, 109-117.

- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35, W585-587.
- Howard, A. R., Heppler, M. L., Ju, H. J., Krishnamurthy, K., Payton, M. E. & Verchot-Lubicz, J. (2004). Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology* 328, 185-197.
- Huang, Y. W., Geng, Y. F., Ying, X. B., Chen, X. Y. & Fang, R. X. (2005). Identification of a movement protein of rice yellow stunt rhabdovirus. *Journal of virology* 79, 2108-2114.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuče, B. A., de Castro, E., Lachaize, C., Langendijk-Genevaux, P. S. & Sigrist, C. J. (2008). The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res* 36, D245-249.
- Hull, R. (2002). Chapter 8 - Virus Replication. In *Matthews' Plant Virology (Fourth Edition)*, pp. 293-372. Edited by R. Hull. London: Academic Press.
- Hyun, T. K., Uddin, M. N., Rim, Y. & Kim, J. Y. (2011). Cell-to-cell trafficking of RNA and RNA silencing through plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 101-116.
- Incarbone, M. & Dunoyer, P. (2013). RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci*.
- Ishikawa, K., Maejima, K., Komatsu, K., Netsu, O., Keima, T., Shiraishi, T., Okano, Y., Hashimoto, M., Yamaji, Y. & Namba, S. (2013). Fig mosaic emaravirus p4 protein is involved in cell-to-cell movement. *Journal of General Virology* 94, 682-686.
- Ivanov, K. I. & Makinen, K. (2012). Coat proteins, host factors and plant viral replication. *Curr Opin Virol* 2, 712-718.
- Jackson, D. & Hake, S. (1997). Morphogenesis on the move: cell-to-cell trafficking of plant regulatory proteins. *Curr Opin Genet Dev* 7, 495-500.
- Jagger, I. C. & Chandler, N. (1934). Big vein, a disease of Lettuce. *Phytopathology* 24, 1253-1256.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J. C., Fritzler, M. J. & Chan, E. K. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7, 1267-1274.
- Karasev, A. V., Kashina, A. S., Gelfand, V. I. & Dolja, V. V. (1992). HSP70-related 65 kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein. *FEBS Lett* 304, 12-14.
- Kawakami, S., Watanabe, Y. & Beachy, R. N. (2004). Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6291-6296.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E. & Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169, 871-884.
- Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4, 363-371.
- Kim, S. H., Macfarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Ryabov, E. V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J. W. & Taliansky, M. (2007a). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11115-11120.
- Kim, S. H., Ryabov, E. V., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J. W. & Taliansky, M. (2007b). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J* 26, 2169-2179.
- Kitajima, E. W., Lauritis, J. A. & Swift, H. (1969). Fine structure of zinnial leaf tissues infected with dahlia mosaic virus. *Virology* 39, 240-249.
- Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 531-535.
- Kobayashi, K., Otegui, M. S., Krishnakumar, S., Mindrinos, M. & Zambryski, P. (2007). INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 encodes a putative DEVH box RNA helicase involved in plasmodesmata function during Arabidopsis embryogenesis. *Plant Cell* 19, 1885-1897.
- Kormelink, R., Garcia, M. L., Goodin, M., Sasaya, T. & Haenni, A. L. (2011). Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus research* 162, 184-202.

- Kormelink, R., Storms, M., Van Lent, J., Peters, D. & Goldbach, R. (1994). Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* 200, 56-65.
- Krylov, D. & Vinson, C. R. (2001). Leucine Zipper. In *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kurihara, Y., Takashi, Y. & Watanabe, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12, 206-212.
- Kuwata, S., Kubo, S., Yamashita, S. & Doi, Y. (1983). Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 49, 246-251.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., Lopez-Moya, J. J. & Burgyan, J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25, 2768-2780.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. & Burgyan, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J* 23, 876-884.
- Laporte, C., Vetter, G., Loudes, A. M., Robinson, D. G., Hillmer, S., Stussi-Garaud, C. & Ritzenthaler, C. (2003). Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of *Grapevine fanleaf virus* movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* 15, 2058-2075.
- Larocca, L. (1985). La citricultura en la provincia de Entre Ríos. In *Actas de la XVI, Jornadas Técnicas de Citricultura, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)*, pp. 42-51.
- Law, J. A. & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11, 204-220.
- Lee, J. Y., Taoka, K., Yoo, B. C., Ben-Nissan, G., Kim, D. J. & Lucas, W. J. (2005). Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and Arabidopsis recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell* 17, 2817-2831.
- Lee, J. Y., Wang, X., Cui, W., Sager, R., Modla, S., Czymbek, K., Zybaliyov, B., van Wijk, K., Zhang, C., Lu, H. & Lakshmanan, V. (2011). A plasmodesmata-localized protein mediates crosstalk between cell-to-cell communication and innate immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 3353-3373.
- Lekkerkerker, A., Wellink, J., Yuan, P., van Lent, J., Goldbach, R. & van Kammen, A. B. (1996). Distinct functional domains in the cowpea mosaic virus movement protein. *Journal of virology* 70, 5658-5661.
- Li, F. & Ding, S. W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 60, 503-531.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X., Mo, B., Zhang, F., Raikhel, N., Jiang, L. & Chen, X. (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell* 153, 562-574.
- Li, Y., Bao, Y. M., Wei, C. H., Kang, Z. S., Zhong, Y. W., Mao, P., Wu, G., Chen, Z. L., Schiemann, J. & Nelson, R. S. (2004). Rice dwarf phyto-reovirus segment S6-encoded nonstructural protein has a cell-to-cell movement function. *Journal of virology* 78, 5382-5389.
- Liang, D., Qu, Z., Ma, X. & Hull, R. (2005). Detection and localization of Rice stripe virus gene products in vivo. *Virus Genes* 31, 211-221.
- Liarzi, O. & Epel, B. L. (2005). Development of a quantitative tool for measuring changes in the coefficient of conductivity of plasmodesmata induced by developmental, biotic, and abiotic signals. *Protoplasma* 225, 67-76.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. & Parker, R. (2005a). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719-723.
- Liu, J. Z., Blancaflor, E. B. & Nelson, R. S. (2005b). The Tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol* 138, 1853-1865.
- Lot, H., Campbell, R. N., Souche, S., Milne, R. G. & Roggero, P. (2002). Transmission by *Olpidium brassicae* of Mirafiori lettuce virus and Lettuce big-vein virus, and Their Roles in Lettuce Big-Vein Etiology. *Phytopathology* 92, 288-293.

- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W. X., Falk, B. W., Dawson, W. O. & Ding, S. W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15742-15747.
- Lucas, W. J. (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**, 169-184.
- Lucas, W. J., Bouche-Pillon, S., Jackson, D. P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B. & Hake, S. (1995). Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**, 1980-1983.
- Llave, C., Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13401-13406.
- Lloyd, R. E. (2013). Regulation of stress granules and P-bodies during RNA virus infection. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 317-331.
- Mallory, A. C., Ely, L., Smith, T. H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V. B. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* **13**, 571-583.
- Martin, S., Garcia, M. L., Troisi, A., Rubio, L., Legarreta, G., Grau, O., Alioto, D., Moreno, P. & Guerri, J. (2006). Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus. *J Gen Virol* **87**, 3097-3102.
- Martinez-Turino, S. & Hernandez, C. (2011). A membrane-associated movement protein of Pelargonium flower break virus shows RNA-binding activity and contains a biologically relevant leucine zipper-like motif. *Virology* **413**, 310-319.
- Mas, P. & Beachy, R. N. (1999). Replication of *Tobacco mosaic virus* on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J Cell Biol* **147**, 945-958.
- Mas, P. & Beachy, R. N. (2000). Role of microtubules in the intracellular distribution of tobacco mosaic virus movement protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12345-12349.
- Matthews, R. E. F. & Hull, R. (2002). *Matthews' plant virology*. San Diego ; London: Academic Press.
- Maule, A. J., Benitez-Alfonso, Y. & Faulkner, C. (2011). Plasmodesmata - membrane tunnels with attitude. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 683-690.
- Meissner, C. S., Suffner, S., Schauflinger, M., von Einem, J. & Bogner, E. (2012). A leucine zipper motif of a tegument protein triggers final envelopment of human cytomegalovirus. *Journal of virology* **86**, 3370-3382.
- Merai, Z., Kerényi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. & Silhavy, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of virology* **80**, 5747-5756.
- Milne, R. G., Garcia, M. L. & Grau, O. (2000). Genus Ophiovirus. In *Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 627-631. Edited by M. H. V. van Regenmortel, Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. and Wickner, R. B. San Diego, USA: Academic Press.
- Mir, M. A., Duran, W. A., Hjelle, B. L., Ye, C. & Panganiban, A. T. (2008). Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19294-19299.
- Morikawa, T., Nomura, Y., Yamamoto, T. & Natsuaki, T. (1995). Partial characterization of virus-like particles associated with tulip mild mottle mosaic. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **61**, 578-581.
- Morozov, S., Fedorkin, O. N., Juttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D. C. & Atabekov, J. G. (1997). Complementation of a *Potato virus X* mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *J Gen Virol* **78** (Pt 8), 2077-2083.
- Nakai, K. & Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- Natsuaki, K. T., Morikawa, T., Natsuaki, T. & Okuda, S. (2002). Mirafiori lettuce virus detected from lettuce with big vein symptoms in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology* **68**, 309-312.

- Naum-Ongania, G., Gago-Zachert, S., Pena, E., Grau, O. & Garcia, M. L. (2003). Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus research* **96**, 49-61.
- Navarro, J. A., Botella, F., Maruhenda, A., Sastre, P., Sanchez-Pina, M. A. & Pallas, V. (2004). Comparative Infection Progress Analysis of Lettuce big-vein virus and Mirafiori lettuce virus in Lettuce Crops by Developed Molecular Diagnosis Techniques. *Phytopathology* **94**, 470-477.
- Navarro, L., Juárez, J., Ballester, J. F. & Pina, J. A. (1980). Elimination of Some Citrus Pathogens Producing Psorosis-like Leaf Symptoms, by Shoot-tip Grafting *in vitro*. In *Proc 8th Conf IOCV*, pp. 162-166. Edited by E. C. Calavan, Garnsey, S. M. and Timmer, L. W. Riverside, California, USA.
- Navas-Castillo, J., Moreno, P., Cambra, M. & Derrick, K. (1993). Partial purification of a virus associated with a Spanish isolate of citrus ringspot. *Plant Pathology* **42**, 339-346.
- Nazim Uddin, M. & Kim, J. Y. (2013). Intercellular and systemic spread of RNA and RNAi in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 279-293.
- Nelson, B. K., Cai, X. & Nebenfuhr, A. (2007). A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **51**, 1126-1136.
- Nellisery, J. K., Szczepaniak, R., Lamberti, C. & Weller, S. K. (2007). A putative leucine zipper within the herpes simplex virus type 1 UL6 protein is required for portal ring formation. *Journal of virology* **81**, 8868-8877.
- Newcomb, W. W., Juhas, R. M., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Burch, A. D., Weller, S. K. & Brown, J. C. (2001). The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *Journal of virology* **75**, 10923-10932.
- Niehl, A., Amari, K., Gereige, D., Brandner, K., Mely, Y. & Heinlein, M. (2012a). Control of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Fate by CELL-DIVISION-CYCLE Protein 48 (CDC48). *Plant Physiol.*
- Niehl, A., Amari, K. & Heinlein, M. (2012b). CDC48 function during TMV infection: Regulation of virus movement and replication by degradation? *Plant Signal Behav* **8**.
- Niehl, A. & Heinlein, M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* **248**, 75-99.
- Niehl, A., Pena, E. J., Amari, K. & Heinlein, M. (2013). Microtubules in viral replication and transport. *The Plant journal : for cell and molecular biology*.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Stafford, W. F., 3rd & Kim, P. S. (1989). Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science* **245**, 646-648.
- Oparka, K. J., Roberts, A. G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K. S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N. & Epel, B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**, 743-754.
- Padgett, H. S., Epel, B. L., Kahn, T. W., Heinlein, M., Watanabe, Y. & Beachy, R. N. (1996). Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **10**, 1079-1088.
- Pagni, M., Ioannidis, V., Cerutti, L., Zahn-Zabal, M., Jongeneel, C. V., Hau, J., Martin, O., Kuznetsov, D. & Falquet, L. (2007). MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res* **35**, W433-437.
- Palle, S. R., Miao, H., Seyran, M., Louzada, E. S., da Graça, J. V. & Skaria, M. (2004). Evidence for Natural Transmission of Citrus psorosis virus by an *Olpidium*-Like Fungus. In *16th Conf of the IOCV*, p. 423. Edited by M. E. Hilf, Duran-Vila, N. and Rocha-Peña, M. A. . Monterrey, Mexico.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K. E., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. (2006). F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1994-1999.
- Peña, E. J. (2009). Búsqueda y caracterización de las proteínas del virus de la Psorosis de los cítricos involucradas en el movimiento y defensa viral. In *Departamento de Ciencias Biológicas*, p. 172. La Plata, Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
- Peña, E. J. & Heinlein, M. (2012). RNA transport during TMV cell-to-cell movement. *Front Plant Sci* **3**, 193.

- Peña, E. J., Robles Luna, G., Zaneck, M. C., Borniego, M. B., Reyes, C. A., Heinlein, M. & Garcia, M. L. (2012). Citrus psorosis and Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus coat proteins localize to the cytoplasm and self interact in vivo. *Virus research* **170**, 34-43.
- Perbal, M. C., Thomas, C. L. & Maule, A. J. (1993). Cauliflower mosaic virus gene I product (P1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. *Virology* **195**, 281-285.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**, 785-786.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. & Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**, 1573-1576.
- Poirson, A., Turner, A. P., Giovane, C., Berna, A., Roberts, K. & Godefroy-Colburn, T. (1993). Effect of the *Alfalfa mosaic virus* movement protein expressed in transgenic plants on the permeability of plasmodesmata. *J Gen Virol* **74** (Pt II), 2459-2461.
- Pomeranz, M., Lin, P. C., Finer, J. & Jang, J. C. (2010a). AtTZF gene family localizes to cytoplasmic foci. *Plant Signal Behav* **5**, 190-192.
- Pomeranz, M. C., Hah, C., Lin, P. C., Kang, S. G., Finer, J. J., Blackshear, P. J. & Jang, J. C. (2010b). The Arabidopsis tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA. *Plant Physiol* **152**, 151-165.
- Pouwels, J., Van Der Krogt, G. N., Van Lent, J., Bisseling, T. & Wellink, J. (2002). The cytoskeleton and the secretory pathway are not involved in targeting the *Cowpea mosaic virus* movement protein to the cell periphery. *Virology* **297**, 48-56.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C. & Bowman Vance, V. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859-868.
- Pujol, A. R. & Beñatena, H. N. (1965). Study of psorosis in Concordia, Argentina. In *Proc of the 3rd Conf of IOCV*, pp. 170-174. Edited by W. C. Price. Gainesville, Florida, USA: University Florida Press.
- Qu, F. (2010). Antiviral role of plant-encoded RNA-dependent RNA polymerases revisited with deep sequencing of small interfering RNAs of virus origin. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1248-1252.
- Qu, F., Ye, X. & Morris, T. J. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14732-14737.
- Reichert, V. L., Choi, M., Petrillo, J. E. & Gehrke, L. (2007). Alfalfa mosaic virus coat protein bridges RNA and RNA-dependent RNA polymerase in vitro. *Virology* **364**, 214-226.
- Restrepo-Hartwig, M. A. & Carrington, J. C. (1994). The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of virology* **68**, 2388-2397.
- Ribeiro, D., Borst, J. W., Goldbach, R. & Kormelink, R. (2009). Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. *Virology* **383**, 121-130.
- Riechmann, J. L., Lain, S. & Garcia, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* **73** (Pt 1), 1-16.
- Ritzenthaler, C., Pinck, M. & Pinck, L. (1995). Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is not transiently expressed and is a stable final maturation product in vivo. *J Gen Virol* **76** (Pt 4), 907-915.
- Robles Luna, G., Peña, E. J., Borniego, M. B., Heinlein, M. & Garcia, M. L. (2013). Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology* **441**, 152-161.
- Rochon, D., Kakani, K., Robbins, M. & Reade, R. (2004). Molecular aspects of plant virus transmission by ophioidium and plasmodiophorid vectors. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 211-241.
- Rogers, K. & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* **25**, 2383-2399.
- Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A. M., Accotto, G. P., Masenga, V. & Milne, R. G. (2000). An Ophiovirus isolated from lettuce with big-vein symptoms. *Archives of virology* **145**, 2629-2642.

- Roggero, P., Lot, H., Souche, S., Lenzi, R. & Milne, R. (2003). Occurrence of Mirafiori Lettuce Virus and Lettuce Big-vein Virus in Relation to Development of Big-vein Symptoms in Lettuce Crops. *European Journal of Plant Pathology* 109, 261-267.
- Roistacher, C. N. (1993). Psorosis - a review. In *12th Conf International Org Citrus Virol IOCV*, pp. 139-162. Riverside, USA.
- Ruiz, M. T., Voinnet, O. & Baulcombe, D. C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10, 937-946.
- Sambade, A., Brandner, K., Hofmann, C., Seemanpillai, M., Mutterer, J. & Heinlein, M. (2008). Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata. *Traffic* 9, 2073-2088.
- Sánchez de la Torre, E., Riva, O., Zandomeni, R., Grau, O. & García, M. L. (1998). The top component of *Citrus psorosis virus* contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. In *Molecular Plant Pathology On-Line*.
- Sánchez de la Torre, M. E., Lopez, C., Grau, O. & Garcia, M. L. (2002). RNA 2 of *Citrus psorosis virus* is of negative polarity and has a single open reading frame in its complementary strand. *Journal of General Virology* 83 (Pt 7), 1777-1781.
- Satoh, H., Matsuda, H., Kawamura, T., Isogai, M., Yoshikawa, N. & Takahashi, T. (2000). Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubule-inducing activity of the 50 kDa movement protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* fused to green fluorescent protein. *J Gen Virol* 81, 2085-2093.
- Scott, M. S., Boisvert, F. M., McDowall, M. D., Lamond, A. I. & Barton, G. J. (2010). Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res* 38, 7388-7399.
- Scott, M. S., Troshin, P. V. & Barton, G. J. (2011). NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics* 12, 317.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. & Carrington, J. C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16, 4049-4059.
- Schnettler, E., Hemmes, H., Goldbach, R. & Prins, M. (2008). The NS3 protein of rice hoja blanca virus suppresses RNA silencing in mammalian cells. *J Gen Virol* 89, 336-340.
- Sement, F. M., Ferrier, E., Zuber, H., Merret, R., Alioua, M., Deragon, J. M., Bousquet-Antonelli, C., Lange, H. & Gagliardi, D. (2013). Uridylation prevents 3' trimming of oligoadenylated mRNAs. *Nucleic Acids Res* 41, 7115-7127.
- Sen, G. L. & Blau, H. M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7, 633-636.
- Serazev, T. V., Kalinina, N. O., Nadezhdina, E. S., Shanina, N. A. & Morozov, S. Y. (2003). Potato virus X coat protein interacts with microtubules in vitro. *Cell Biol Int* 27, 271-272.
- Simpson, C., Thomas, C., Findlay, K., Bayer, E. & Maule, A. J. (2009). An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *Plant Cell* 21, 581-594.
- Sit, T. L. & AbouHaidar, M. G. (1993). Infectious RNA transcripts derived from cloned cDNA of papaya mosaic virus: effect of mutations to the capsid and polymerase proteins. *J Gen Virol* 74 (Pt 6), 1133-1140.
- Song, L., Han, M. H., Lesicka, J. & Fedoroff, N. (2007). Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5437-5442.
- Stonebloom, S., Burch-Smith, T., Kim, I., Meinke, D., Mindrinos, M. & Zambryski, P. (2009). Loss of the plant DEAD-box protein ISE1 leads to defective mitochondria and increased cell-to-cell transport via plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17229-17234.
- Storms, M. M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J. W. & Goldbach, R. W. (1995). The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214, 485-493.

- Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X. C. & Yuan, M. (2010). *Cucumber mosaic virus* movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell* **22**, 1373-1387.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S. & Okuno, T. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Lett* **532**, 75-79.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Thomas, C. L., Bayer, E. M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L. & Maule, A. J. (2008). Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol* **6**, e7.
- Tilsner, J., Linnik, O., Louveaux, M., Roberts, I. M., Chapman, S. N. & Oparka, K. J. (2013). Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. *J Cell Biol* **201**, 981-995.
- Timmer, L. W. (1974). A Necrotic Strain of *Citrus ringspot virus* and Its Relationship to *Citrus psorosis virus*. *Phytopathology* **64**, 389-394.
- Timmer, L. W. & Garnsey, S. M. (1980). Natural spread of citrus ringspot virus in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas. In *Proc of the 8th Conf of IOCV*, pp. 167-193. Edited by G. Calavan E. C., S. M. and Timmer, L. W. Riverside, California, USA.
- Timmer, L. W., Garnsey, S. M. & McRitchie, J. J. (1978). Comparative symptomatology of Florida and Texas isolates of citrus ringspot virus on citrus and herbaceous hosts. *Plant Disease Reporter* **62**, 1054-1058.
- Torok, V. A. & Vetten, H. I. (2010). Ophiovirus associated with lettuce ring necrosis. In *European Society for Virology Meeting*, p. 282. Cernobbio, Italy.
- Torok, V. A. & Vetten, H. J. (2002). Characterisation of an ophiovirus associated with lettuce ring necrosis. In *Joint Conf Int Working Groups on Legume and Vegetable Viruses*, p. 4. Bonn, Germany.
- Tucker, E. B. & Boss, W. F. (1996). Mastoparan-Induced Intracellular Ca²⁺ Fluxes May Regulate Cell-to-Cell Communication in Plants. *Plant Physiol* **111**, 459-467.
- Vaira, A. M., Accotto, G. P., Costantini, A. & Milne, R. G. (2003). The partial sequence of RNA 1 of the ophiovirus *Ranunculus white mottle virus* indicates its relationship to rhabdoviruses and provides candidate primers for an ophiovirus-specific RT-PCR test. *Archives of virology* **148**, 1037-1050.
- Vaira, A. M., Hansen, M. A., Murphy, C., Reinsel, M. D. & Hammond, J. (2009). First report of *Freesia sneak virus* in *Freesia* sp. in Virginia, USA. *Plant Disease Report* **93**, 965.
- Vaira, A. M., Kleynhans, R. & Hammond, J. (2007). First report of *Freesia sneak virus* infecting *Lachenalia* cultivars in South Africa. *Plant Disease Report* **91**, 770.
- Vaira, A. M., Milne, R. G., Accotto, G. P., Luisoni, E., Masenga, V. & Lisa, V. (1997). Partial characterization of a new virus from *ranunculus* with a divided RNA genome and circular supercoiled thread-like particles. *Archives of virology* **142**, 2131-2146.
- Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inze, D. & Geelen, D. (2004). *In vivo* dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol* **136**, 3956-3967.
- van der Wel, N. N., Goldbach, R. W. & van Lent, J. W. (1998). The movement protein and coat protein of alfalfa mosaic virus accumulate in structurally modified plasmodesmata. *Virology* **244**, 322-329.
- van der Wilk, F., Dulleman, A. M., Verbeek, M. & van den Heuvel, J. F. (2002). Nucleotide sequence and genomic organization of an ophiovirus associated with lettuce big-vein disease. *J Gen Virol* **83**, 2869-2877.
- van Lent, J., Storms, M., van der Meer, F., Wellink, J. & Goldbach, R. (1991). Tubular structures involved in movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *Journal of General Virology* **72**, 2615-2623.
- Vaquero, C., Turner, A. P., Demangeat, G., Sanz, A., Serra, M. T., Roberts, K. & Garcia-Luque, I. (1994). The 3a protein from *Cucumber mosaic virus* increases the gating capacity of plasmodesmata in transgenic tobacco plants. *J Gen Virol* **75** (Pt II), 3193-3197.

- Venter, P. A., Marshall, D. & Schneemann, A. (2009). Dual roles for an arginine-rich motif in specific genome recognition and localization of viral coat protein to RNA replication sites in flock house virus-infected cells. *Journal of virology* **83**, 2872-2882.
- Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* **6**, 206-220.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**, 669-687.
- Voinnet, O., Lederer, C. & Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157-167.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14147-14152.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. & Baulcombe, D. C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177-187.
- Wallace, J. M. & Drake, R. J. (1968). Citrange stunt and ringspot, two previously undescribed virus diseases of citrus. In *In Proc 4th Conf IOCV*, pp. 177-183. Edited by J. F. L. Childs. Gainesville, Florida, USA: Univ. Florida Press.
- Wang, X. B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W. X., Chen, X., Yu, J. L. & Ding, S. W. (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 484-489.
- Weber, C., Nover, L. & Fauth, M. (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **56**, 517-530.
- Wei, T., Huang, T. S., McNeil, J., Laliberte, J. F., Hong, J., Nelson, R. S. & Wang, A. (2010). Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *Journal of virology* **84**, 799-809.
- Wei, T. & Wang, A. (2008). Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *Journal of virology* **82**, 12252-12264.
- Weiss, M. A. & Narayana, N. (1998). RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolymers* **48**, 167-180.
- Welker, M. W., Welsch, C., Meyer, A., Antes, I., Albrecht, M., Forestier, N., Kronenberger, B., Lengauer, T., Piiper, A., Zeuzem, S. & Sarrazin, C. (2010). Dimerization of the hepatitis C virus nonstructural protein 4B depends on the integrity of an aminoterminal basic leucine zipper. *Protein Sci* **19**, 1327-1336.
- Wellink, J., van Lent, J. W., Verver, J., Sijen, T., Goldbach, R. W. & van Kammen, A. (1993). The cowpea mosaic virus M RNA-encoded 48-kilodalton protein is responsible for induction of tubular structures in protoplasts. *Journal of virology* **67**, 3660-3664.
- White, J. P. & Lloyd, R. E. (2012). Regulation of stress granules in virus systems. *Trends Microbiol* **20**, 175-183.
- Wieczorek, A. & Sanfacon, H. (1993). Characterization and subcellular localization of tomato ringspot nepovirus putative movement protein. *Virology* **194**, 734-742.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F. & Weil, D. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcpl bodies and stress granules. *J Cell Sci* **118**, 981-992.
- Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R. & Lucas, W. J. (1991). Plasmodesmatal function is probed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *Plant Cell* **3**, 593-604.
- Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R. N. & Lucas, W. J. (1989). Movement protein of *Tobacco mosaic virus* modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* **246**, 377-379.
- Wright, K. M., Cowan, G. H., Lukhovitskaya, N. I., Tilsner, J., Roberts, A. G., Savenkov, E. I. & Torrance, L. (2010). The N-terminal domain of PMTV TGB1 movement protein is required for nucleolar localization, microtubule association, and long-distance movement. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1486-1497.
- Xiong, R., Wu, J., Zhou, Y. & Zhou, X. (2008). Identification of a movement protein of the *Tenuivirus* Rice stripe virus. *Journal of virology* **82**, 12304-12311.

- Xoconostle-Cazares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H. L., Monzer, J., Yoo, B. C., McFarland, K. C., Franceschi, V. R. & Lucas, W. J. (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* **283**, 94-98.
- Xu, J., Yang, J. Y., Niu, Q. W. & Chua, N. H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCPI1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell* **18**, 3386-3398.
- Xu, M., Cho, E., Burch-Smith, T. M. & Zambryski, P. C. (2012). Plasmodesmata formation and cell-to-cell transport are reduced in decreased size exclusion limit 1 during embryogenesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 5098-5103.
- Xu, Y. & Zhou, X. (2012). Role of Rice Stripe Virus NSvc4 in Cell-to-Cell Movement and Symptom Development in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci* **3**, 269.
- Yaegashi, H., Takahashi, T., Isogai, M., Kobori, T., Ohki, S. & Yoshikawa, N. (2007). Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol* **88**, 316-324.
- Yaegashi, H., Tamura, A., Isogai, M. & Yoshikawa, N. (2008). Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein. *Virology* **382**, 199-206.
- Yi, G., Letteney, E., Kim, C. H. & Kao, C. C. (2009a). Brome mosaic virus capsid protein regulates accumulation of viral replication proteins by binding to the replicase assembly RNA element. *RNA* **15**, 615-626.
- Yi, G., Vaughan, R. C., Yarbrough, I., Dharmiah, S. & Kao, C. C. (2009b). RNA binding by the brome mosaic virus capsid protein and the regulation of viral RNA accumulation. *J Mol Biol* **391**, 314-326.
- Yu, C., Karlin, D. G., Lu, Y., Wright, K., Chen, J. & MacFarlane, S. (2013). Experimental and bioinformatic evidence that raspberry leaf blotch emaravirus P4 is a movement protein of the 30K superfamily. *J Gen Virol* **94**, 2117-2128.
- Zanek, C. (2007). Resistencia derivada de patógeno aplicada al virus de la psorosis de los cítricos. Estudio de la expresión y localización intracelular de la proteína de cubierta viral. In *Departamento de Ciencias Biológicas*, p. 184. La Plata, Argentina: Universidad Nacional de la Plata.
- Zanek, M. C., Pena, E., Reyes, C. A., Figueroa, J., Stein, B., Grau, O. & Garcia, M. L. (2006). Detection of *Citrus psorosis virus* in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J Virol Methods* **137**, 245-251.
- Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J. & Chua, N. H. (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* **20**, 3255-3268.
- Zhao, J., Liu, Q., Zhang, H., Jia, Q., Hong, Y. & Liu, Y. (2013). The rubisco small subunit is involved in tobamovirus movement and Tm-2(2)-mediated extreme resistance. *Plant Physiol* **161**, 374-383.
- Zhao, S., Zhang, G., Dai, X., Hou, Y., Li, M., Liang, J. & Liang, C. (2012). Processing and intracellular localization of rice stripe virus Pc2 protein in insect cells. *Virology* **429**, 148-154.
- Zielezinski, A. & Karlowski, W. M. (2011). Agos—a universal web tool for GW Argonaute-binding domain prediction. *Bioinformatics* **27**, 1318-1319.

