

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Biología Vegetal



## TESIS DOCTORAL

**Localización subcelular e interacciones moleculares de la proteína 2b  
del virus del mosaico del pepino: su relevancia en la función supresora  
de silenciamiento génico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Inmaculada González Martín**

Director

Tomás Raimundo Canto Ceballos

**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I**



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**  
**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**  
GRUPO DE INTERACCIONES MOLECULARES PLANTA/VIRUS/VECTOR



---

**Localización subcelular e interacciones moleculares de la  
proteína 2b del Virus del mosaico del pepino: su relevancia en  
la función supresora de silenciamiento génico**

---

TESIS DOCTORAL

**Inmaculada Elizabeth González Martín**

Madrid, 2015

Director: Dr. Tomás Raimundo Canto Ceballos



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I

---

**Localización subcelular e interacciones moleculares de la  
proteína 2b del Virus del mosaico del pepino: su relevancia en  
la función supresora de silenciamiento génico**

---

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada  
Inmaculada Elizabeth González Martín para optar al Grado de Doctor

Vº Bº DIRECTOR DE TESIS  
Tomás Raimundo Canto Ceballos  
CIB-CSIC

LA DOCTORANDA  
Inmaculada E. González Martín

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)**

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB)

MADRID, 2015



Este trabajo ha sido realizado en el grupo Interacciones Moleculares Planta/Virus/Vector del Departamento de Biología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), con financiación de los proyectos AGL2008-0342 del entonces Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN) del Gobierno de España, del proyecto bilateral 2008RU0089 entre el CSIC y la Russian Foundation for Basic Research, y del proyecto bilateral ACI2009-0855 entre el MCINN y el Department of Science and Technology del Gobierno de la India. Inmaculada González ha disfrutado de una beca predoctoral JAE-Predoc 051 del CSIC resuelta el 18 de Junio de 2008.



Dedicado a mi Familia,  
aguas arriba y aguas abajo de *mí*.





El entusiasta andador de trochas y veredas  
persigue algo que no siempre resulta fácil de comprender.  
Vadea los arroyos,  
sufre las asperezas del piornal,  
trepa por las llambrías casi verticales,  
con fatiga,  
pero seguro de sí mismo  
y con voluntad de superación,  
que no de competitividad.  
Y así se culmina la meta,  
con la recompensa apetecida.

Manuel Rincón



## AGRADECIMIENTOS

Gracias a la familia, por entender que una vocación hay que intentar seguirla y a Juan por su apoyo incondicional. Gracias a Zoe por sonreír cada día.

Gracias a mis mentores en la investigación en la UCM, E. Pangua y S. Pajarón, con vosotros comencé en este mundo tan lleno de interrogantes y me picó el gusanillo de la investigación. Y a Mery, Elena, Ares, Sara, y Ana, mis primeros compañeros de laboratorio en la *Complu*. Gracias a los compañeros de los cursos de doctorado por compartir esos momentos, especialmente a Mery, Elena y Carol, mis amigas en esta y otras aventuras.

Gracias a todos los que han ayudado en el desarrollo de esta tesis. En primer lugar a Tomás Canto, director de esta tesis, sin él no sería posible este trabajo. A las *rusas*, Natalia Kalinina, Daria Rakitina y María Semashko por acogerme tan cálidamente en su laboratorio en el Instituto Belozersky de Moscú y sus enseñanzas en la expresión de proteínas y unión *in vitro* a RNA, especialmente a Daria, que realizó la unión al RNA de TMV y me enseñó a calcular las cinéticas de unión a 2b. A John Carr y todo su laboratorio, especialmente a Jack Westwood, que me acogieron cariñosamente en su laboratorio de la Universidad de Cambridge. Allí aprendí nuevas técnicas que, aunque no han quedado reflejadas en esta tesis, enriquecieron el *know how*. Gracias a ambos grupos la estancia en un país extraño fue muy acogedora. Gracias a Shelly Praveen, por la paz que transmite como filosofía de vida. Gracias a todos los firmantes de los artículos científicos que hemos publicado juntos, por vuestra dedicación siempre enriquecedora a mejorar el trabajo y el conocimiento. Gracias a Mónica Fontenla por las fotografías y a Maite Seisdedos por su ayuda en el microscopio confocal.

Gracias a todos los que han formado parte del grupo en el CIB durante mi estancia, José Ramón Díaz-Ruiz, responsable del grupo, y Dionisio López, doctor vinculado en el grupo, ambos hasta la jubilación; Paco Tenllado y César Llave, científicos titulares del grupo junto a Tomás Canto; y los compañeros *predoc* y *postdoc* Lucía, Lourdes, Livia, Nacho, Fran, Meme, Lóic, Gema, Irene. A mis compañeros de laboratorio, Virginia, Paula, Fátima, Bea, Patxi y Óscar. Muchos compartimos el fresquete en la cámara fría haciendo *competentes*. Y al resto de compañeros, Tamara, Mar, Aurora, Teresa, Carlos y Rafa; Sara e Iván; Héctor y Maite, gracias a todos por compartir alegrías.

Gracias al CSIC, por dotarme de una beca para llevar a cabo la tesis doctoral. Deseo que los que vienen por detrás tengan esa suerte.



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>ACRÓNIMOS DE VIRUS</b>	5
<b>SUMMARY</b>	7
<b>RESUMEN</b>	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	15
1.1. CMV	17
1.2. Silenciamiento y defensa antiviral en plantas	22
1.2.1. Detección y procesamiento de RNAs virales	26
1.2.2. Ensamblaje de RISC	27
1.2.3. Generación de siRNAs virales secundarios	30
1.3. Supresores virales de silenciamiento de RNA: mecanismos virales de interferencia con el silenciamiento génico	32
1.3.1. Unión de supresores virales a ácidos nucleicos	34
1.3.2. Interacción de supresores virales con proteínas de las rutas del silenciamiento	38
1.3.3. Interferencia de supresores virales con la amplificación de siRNAs	39
1.4. La proteína 2b	41
1.4.1. Actividad funcional de la proteína 2b	41
1.4.2. Dominios de la proteína 2b	46
1.4.3. Localización subcelular de la proteína 2b	50
1.4.4. Estructura de la forma funcional de la proteína 2b	54
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	57

<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	63
3.1. Material biológico	65
3.1.1. Plantas	65
3.1.2. Cepa Fny de CMV	65
3.1.3. Cultivos bacterianos	65
3.2. Clonaje de las construcciones plasmídicas	68
3.2.1. Mutantes de la proteína 2b de la cepa Fny de CMV	68
3.2.2. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	69
3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa	70
3.2.4. Clonaje en plásmidos binarios pROK2	70
3.2.5. Clonaje en plásmidos pQE30	74
3.2.6. Transformación de bacterias	75
3.2.7. Purificación De DNA plasmídico	76
3.2.8. Selección de clones y secuenciación	76
3.3. Expresión transitoria de genes en tejidos vegetales mediante agroinfiltración	77
3.3.1. Crecimiento e inducción de cultivos de <i>Agrobacterium</i>	77
3.3.2. Agroinfiltración de tejidos vegetales	78
3.4. Ensayo de actividad supresora de silenciamiento	79
3.4.1. Visualización de fluorescencia en tejidos vegetales	79
3.4.2. Inmunodetección de proteínas o western blot	80
3.4.2.1. Preparación de la muestra para análisis por western blot	80
3.4.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	81
3.4.2.3. Transferencia húmeda a membranas	81
3.4.2.4. Inmunodetección de proteínas por western blot	81
3.5. Visualización <i>in vivo</i> de proteínas con marcajes fluorescentes	83
3.5.1. Agroinfiltración y expresión transitoria	83
3.5.2. Infiltración de tinción DAPI	83

3.5.3. Visualización de fluorescencia <i>in vivo</i> con microscopio Confocal	84
3.6. Complementación bimolecular fluorescente	85
3.7. Unión <i>in vitro</i> de la proteína 2b a RNAs	86
3.7.1. RNAs	86
3.7.2. Expresión de proteínas en bacterias	87
3.7.3. Purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes	88
3.7.4. Renaturalización de proteínas	89
3.7.5. Cuantificación de proteínas	89
3.7.6. Unión <i>in vitro</i> de proteína a sRNAs	90
3.7.7. Cuantificación de pequeños RNAs unidos a proteínas	91
3.7.8. Cálculo de la constante de disociación y del coeficiente de Hill	92
<b>4. RESULTADOS</b>	93
4.1. Localización subcelular y actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b de CMV	95
4.1.1. Proteína 2b nativa fusionada a marcadores fluorescentes	95
4.1.2. Mutantes de la proteína 2b fusionados a marcadores fluorescentes	99
4.1.3. La proteína 2b marcada con una señal de exportación nuclear	105
4.2. Visualización <i>in vivo</i> de interacciones de la proteína 2b	112
4.2.1. Visualización de homodímeros de proteína 2b	112
4.2.2. Visualización de interacciones de la proteína 2b con proteínas argonauta	117
4.3. Unión <i>in vitro</i> de la proteína 2b a RNAs	121
4.3.1. Caracterización de las propiedades de la unión <i>in vitro</i> de proteína 2b nativa o mutante a sRNAs	123



4.3.2. Caracterización de la unión <i>in vitro</i> de las proteínas 2b o mutantes a un RNA genómico viral	131
4.4. Visualización de potenciales interacciones de la proteína 2b con otras proteínas nucleolares de la planta	134
<b>5. DISCUSIÓN</b>	141
5.1. Localización, patogenicidad y actividad supresora del silenciamiento de la proteína 2b de CMV, nativa o modificada	145
5.2. Interacciones de la proteína 2b con proteínas: Formación de homodímeros e interacción con proteínas AGO y con otras proteínas	155
5.3. Interacciones <i>in vitro</i> de la proteína 2b con RNAs	166
<b>6. CONCLUSIONES</b>	183
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	187
<b>ANEXOS</b>	211
I. Secuencias peptídicas de proteínas 2b de diferentes cepas de CMV	213
II. Oligonucleótidos utilizados en la clonación y la secuenciación de los plásmidos	214
III. Esquema de las construcciones plasmídicas	216
IV. Efectos de diversas mutaciones en las propiedades de la proteína 2b de CMV	218

## ABREVIATURAS

A	<i>Alanine</i> , aminoácido alanina
aa, aas	Aminoácido, aminoácidos
Ab	<i>Antibody</i> , anticuerpo
AGO	<i>Argonaute protein</i> , proteína Argonauta
ARR	<i>Arginine-rich regions</i> , regiones ricas en argininas
AtFib2	<i>Arabidopsis thaliana Fibrilarin 2</i> , fibrilarina 2 de <i>A. thaliana</i>
BiFC	<i>Bimolecular fluorescence complementation</i> , complementación bimolecular fluorescente
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino
BY2	<i>Bright Yellow 2</i> , células Bright Yellow 2 de tabaco
C	<i>Cysteine</i> , aminoácido cisteína
Cap	Caperuza, nucleótido de guanidina modificado del extremo 5' del mRNA
CAT3	<i>Catalase 3</i> , proteína catalasa 3
CB	<i>Cajal body</i> , cuerpo de cajal
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i> , quinasa dependiente de ciclina 2
CKII	<i>Casein kinase II</i> , caseína quinasa II
CP	<i>Coat protein</i> , proteína de cubierta o de la cápside
D	<i>Aspartic acid</i> , aminoácido ácido aspártico
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> , 4',6-diamino-2-fenilindol
DCL	<i>Dicer-like</i> , RNasa III semejante a Dicer
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
dpi	Días post agroinfiltración
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> , RNA de doble hebra
ds siRNA	<i>Double-stranded small interfering RNA</i> , pequeño RNA interferente de doble hebra
E	<i>Glutamic acid</i> , aminoácido ácido glutámico
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etilendiaminotetraacético
F	<i>Phenylalanine</i> , aminoácido fenilalanina
G	<i>Glycine</i> , aminoácido glicina
GAR	<i>Glycine- and arginine-rich domain</i> , dominio rico en glicinas y argininas
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína fluorescente verde

H	<i>Histidine</i> , aminoácido histidina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HA	<i>Hemagglutinin</i> , hemagglutinina (péptido)
HC-Pro	<i>Helper component-protease</i> , proteasa componente “helper” de <i>Potyvirus</i>
HEN-1	<i>Hua Enhancer 1</i> . RNA metil transferasa.
His	<i>Histidines</i> , Histidinas
HR	<i>Hipersensitive response</i> , respuesta hipersensible
I	<i>Isoleucine</i> , aminoácido isoleucina
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> , Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
JA	<i>Jasmonic acid</i> , ácido jasmónico
K	<i>Lysine</i> , aminoácido lisina
Kbs	Kilobases
Kd	Constante de disociación
kDa	KiloDalton
L	<i>Leucine</i> , aminoácido leucina
LB	Luria Bertani
M	<i>Methionine</i> , aminoácido metionina
MCS	<i>Multiple cloning site</i> , sitio múltiple de clonaje
MES	<i>Morpholinethanesulfonic acid</i> , ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico
miRNA	<i>Micro RNA</i> , micro RNA
mock	<i>Mock</i> , simulacro de infiltración, control negativo
MP	<i>Movement protein</i> , proteína de movimiento del virus
mRFP	<i>Monomeric red fluorescent protein</i> , proteína fluorescente roja monomérica
mRNA	<i>Messenger RNA</i> . RNA mensajero
N	<i>Asparagine</i> , aminoácido asparagina
NES	<i>Nuclear export signal</i> , señal de exportación nuclear
Ni-NTA	<i>Nicke- Nitrilotriacetic acid</i> , níquel- ácido nitrilotriacético
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i> , señal de localización nuclear
nm	Nanómetros
NoLS	<i>Nucleolar localisation signal</i> , señal de localización nucleolar
NOS	<i>Nopaline synthase</i> , nopalina sintasa

NOS TERM	<i>Nopaline synthase terminator</i> , fragmento terminador de la nopalina, sintasa
NPC	<i>Nuclear pore complex</i> , complejo de poro nuclear
nt, nts	Nucleótido, nucleótidos
OD	<i>Optical density (Absorbance)</i> , densidad óptica (Absorbancia)
ORF	<i>Open reading frame</i> , marco abierto de lectura
P	<i>Proline</i> , aminoácido prolina
PAGE-SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis</i> , electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato sódico
PAZ	Piwi/Argonaute/Zwille
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PKI	<i>Protein kinase inhibitor</i> , proteína inhibidora de kinasa
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> , fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTGS	<i>Post-transcriptional gene silencig</i> , silenciamiento génico postranscripcional
Q	<i>Glutamine</i> , aminoácido glutamina
R	<i>Arginine</i> , aminoácido arginina
rasiRNA	<i>Repeat-associated small interfering RNAs</i> , pequeños RNAs interferentes asociados a repeticiones
RdDM	<i>RNA-directed DNA methylation</i> , metilación de DNA dirigida por RNA
RDR	<i>RNA-dependent RNA polymerases</i> , polimerasa de RNA dependiente de RNA
RdRp	Ver RDR
Rgs-CaM	<i>Calmodulin-like protein</i> , proteína calmodulina
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> , complejo de silenciamiento inducido por RNA
rpm	Revoluciones por minuto
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico
RNP	<i>Ribonucleoprotein</i> , ribonucleoproteína
S	<i>Serine</i> , aminoácido serina
SA	<i>Salicylic acid</i> , ácido salicílico
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecil sulfato sódico
SGS3	<i>Suppressor of gene silencing 3</i> , supresor de silenciamiento génico 3

siRNA	<i>Small interfering RNA</i> , pequeño RNA interferente
sRNA	<i>Small RNA</i> , RNA pequeño
ss siRNA	<i>Single stranded small interference RNA</i> , pequeño RNA interferente de hebra sencilla
T	<i>Threonine</i> , aminoácido treonina
TA	<i>Tris acetate</i> , tampón tris-acetato
TAE	<i>Tris acetate-EDTA</i> , tampón tris-acetato EDTA
T-DNA	<i>Transfer DNA</i> , DNA de transferencia
TGS	<i>Transcriptional gene silencing</i> , silenciamiento génico transcripcional
tRNA	<i>Transfer RNA</i> , RNA de transferencia
UV	Ultravioleta
V	<i>Valine</i> , aminoácido valina
VIGS	<i>Viral-induced gene silencing</i> , silenciamiento génico inducido por virus
Y	<i>Tirosine</i> , aminoácido tirosina
Y2H	<i>Yeast two-hybrid system</i> , sistema doble híbrido de levaduras
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> , proteína fluorescente amarilla
sYFPC	<i>Split yellow fluorescent protein C-fragment</i> , mitad carboxilo de la proteína fluorescente amarilla
sYFPN	<i>Split yellow fluorescent protein N-fragment</i> , mitad amino de la proteína fluorescente amarilla
W	<i>Tryptophan</i> , aminoácido triptófano

## ACRÓNIMOS DE VIRUS

BCTV	<i>Beet curly top virus</i> , Virus del enrollamiento de la punta de la remolacha
BSCTV	<i>Beet severe curly top virus</i> , Virus del enrollamiento severo de la punta de la remolacha
BWYV	<i>Beet western yellows virus</i> , Virus del amarilleo occidental de la remolacha
BYV	<i>Beet yellow virus</i> , Virus del amarilleo de la remolacha
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> , Virus del mosaico de la coliflor
CIYVV	<i>Clover yellow vein virus</i> , Virus del amarilleo del trébol
CIRV	<i>Carnation italian ring-spot virus</i> , Virus de las manchas en anillo del clavel italiano
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i> , Virus del mosaico del pepino
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i> , Virus de las manchas en anillo del cimbidium
FHV	<i>Flock house virus</i> , Virus del escarabajo neozelandés
GRV	<i>Groundnut rosette virus</i> , Virus de la roseta del cacahuete
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> , Virus de la hepatitis C
HSV-1	<i>Herpes simplex virus type 1</i> , Virus del herpes simple tipo 1
IBV	<i>Infectious bronchitis virus</i> , Virus de la bronquitis infecciosa
PCV	<i>Peanut clump virus</i> , Virus del macizo del cacahuete
PoLV	<i>Pothos latent virus</i> , Virus latente del Pothos
PRRSV	<i>Porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i> , Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
PSLV	<i>Poa semilatifolius virus</i> , Virus semilatifolius de la Poa
PSV	<i>Peanut stunt virus</i> , Virus de la atrofia del cacahuete
PVA	<i>Potato virus A</i> , Virus A de la patata
PVX	<i>Potato virus X</i> , Virus X de la patata
PVY	<i>Potato virus Y</i> , Virus Y de la patata
RHBV	<i>Rice hoja blanca virus</i> , Virus de la hoja blanca del arroz
SCMV	<i>Sugarcane mosaic virus</i> , Virus del mosaico de la caña de azúcar
SPMMV	<i>Sweet potato mild mottle virus</i> , Virus del moteado suave de la batata
SV40	<i>Simian virus 40</i> , Virus simio 40
TAV	<i>Tomato aspermy virus</i> , Virus de la aspermia del tomate

TBSV	<i>Tomato Bushy Stunt Virus</i> , Virus del enanismo arbustivo del tomate
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i> , Virus del arrugamiento del nabo
TEV	<i>Tobacco etch virus</i> , Virus del grabado del tabaco
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i> , Virus del mosaico dorado del tomate
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i> , Virus del mosaico del tabaco
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i> , Virus del cascabeleo del tabaco
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i> , Virus del mosaico del nabo
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> , Virus del rizado amarillo del tomate
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> , Virus del mosaico amarillo del calabacín

## **SUMMARY**

Gene silencing is an important resistance of plants against viruses that limits their accumulation and dispersión at the celular, local and systemic levels. Plant viruses have co-evolved proteins with suppression of RNA silencing functions that can interfere this defense at different points; some viral suppressors directly bind and sequester the small RNAs (sRNAs) that direct silencing to specific sequence targets, thus preventing their incorporation into the RNA-Induced Silencing Complexes (RISCs) and their degrading action on viral RNA targets of complementary sequence. Others interact with protein components of the silencing machinery inhibiting their functions or degrading them. In some other cases, the same suppressor can acts in both manners.

*Cucumber mosaic virus* (CMV) is an RNA virus of cosmopolite distribution that causes important losses to agricultural and ornamental crops. Different phylogenetic clades have been established based on the sequence of the *2b* gene that encodes the 2b protein: subgroups IA and IB cause severe symptoms in plants while those of subgroup II are less severe. The 2b protein has silencing suppressor activity and it is a known pathogenicity determinant in this virus. Prior to this work, several research groups had postulated that its suppression of silencing activity required nuclear localization (Lucy *et al.* 2000. EMBO 19, 1672), interaction with some argonaute proteins (AGO1: Zhang *et al.* 2006b. Genes & Dev. 20, 3255) or binding to sRNAs (Goto *et al.* 2007. Plant Cell Physiol. 48, 1050). The work presented in this PhD Thesis was aimed at contributing to determine the relative importance that for silencing suppression the nuclear subcellular localization and its interaction with host factors from the silencing machinery (AGO proteins or small RNAs of viral sequence RNAs) had in a 2b protein from a subgroup IA Fny-CMV strain.

To pursue this objective we used different experimental approaches. One of them was to transiently express the 2b protein, either in its native or in modified forms in *Nicotiana benthamiana* plants through the agroinfiltration technique in order to visualize the subcellular localization in epidermal cells of protein fused to fluorescent tags *in vivo*, to perform co-localization studies with other plant proteins also tagged in



order to fluoresce, or to visualize protein-protein interactions using the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) technique, all *in vivo*. Crucially, a variant application of the agroinfiltration technique allows us also to evaluate the suppressor activities of each of our modified 2b protein constructs and thus compare them with that of the native protein. This allowed us to determine the effect of the different taggings or mutations we used in this work on the suppressor activities of the modified proteins, and to correlate our observations *in vivo* and *in vitro* with their biological activities.

We started characterizing the effects of fusions to fluorescent markers on the suppressor activities of the native 2b protein and of nine mutants affecting regions of the protein that previous works by others had described as relevant for diverse reasons. We visualized with these tagged constructs their subcellular localizations and using BiFC their interactions with proteins. On the other hand, the same nine mutants as well as the native protein were expressed in bacteria and purified to determine their abilities to bind to RNAs *in vitro*.

By performing suppression assays on the silencing of the transient expression of a co-expressed *GFP* reporter we characterized the suppressor activities of each of our constructs. All mutant constructs that had no suppressor activities accumulated also poorly in agroinfiltrated tissue. However, when expressed in the presence of a heterologous P19 suppressor from tombusvirus they accumulated to normal levels, demonstrating that those mutations did not affect the stability of the protein and that their lack of suppressor activities were not caused by their deficient accumulation for that latter reason.

These same silencing suppressor assays showed that native 2b protein fused at either termini to fluorescent or to other types of tags retained suppressor activity. This allowed us to study the subcellular distribution *in vivo* of biologically functional native protein and of the different mutants by tagging them to fluorescent markers (green fluorescent protein, GFP; monomeric red fluorescent protein, mRFP1), or to visualize interactions among proteins by BiFC also *in vivo*.

GFP- and mRFP-tagged 2b protein localized throughout the cytoplasm and nucleus and within the latter in the nucleolus and cajal bodies (CBs). This is something that had not been described previously. With regard to the mutants, three mutants with deletions affecting the nuclear localization signals (NLSs) were found mainly in the cell cytoplasm whereas deletion of a putative phosphorylation domain confined the protein to the nucleolus. The remaining mutants presented a subcellular distribution similar to that of the native 2b protein. Addition of a nuclear export signal (NES) to the protein traslocated it to the cell cytoplasm, however, this did not affect its suppressor activity. This fact demonstrated that for displaying suppressor activity in the cell the 2b protein does not require its accumulation within the nucleus.

In BiFC assays the 2b proteins fused to the amino- and carboxyl- splits of the yellow fluorescent protein interacted forming homodimers in the cytoplasm and the nucleus. All the mutants retained this property and also the ability to interact with proteins AGO1 in the cytoplasm and also AGO4 in the nucleus, excluding the nucleolus; and potentially to interact to the nuclear proteins coilin, fibrillarin and nucleolin in nuclear bodies which interaction could explain the nucleolar presence of the protein.

In *in vitro* assays the abilities of the native and mutant 2b proteins to bind to synthetic sRNAs of 21 nucleotides in length were characterized: to double-stranded siRNAs (ds siRNAs), to single-stranded siRNAs (ss siRNAs), or to a micro RNA (miRNA). The native protein was able to bind to the three RNAs at protein:RNA molar ratios of 2:1 with different affinities. The nine mutations analyzed affected these bindings differently, but overall it was found that those mutants without suppressor activities had their ability to bind those sRNAs altered, in most cases very reduced or altogether abolished. In particular no mutant without suppressor activity could bind to ds siRNAs at molar ratios that approached 2:1. Proteins with suppressor activities also binded to a long RNA (6,4 kb) but the molar ratios had no biological significance.

Therefore, although the 2b protein of Fny CMV accumulates in the nucleus and within it in the nucleolus and CBs, its suppressor of RNA silencing activity does not require this nuclear accumulation, and appears to be done by cytoplasmic protein. From the study of the interactions of a battery of nine mutants with themselves and with AGO

proteins *in vivo* or with sRNAs *in vitro* a correlation between suppressor activity and the ability to bind to sRNAs at suppressor:RNA molar ratios of 2:1 appears, in particular with regard to the binding of ds siRNAs. This suggests that homodimers of the 2b protein interfere with antiviral silencing through the sequestering of ds siRNAs of viral sequence in the cytoplasm, without excluding other possible means of action.

## RESUMEN

El silenciamiento génico es una importante resistencia de las plantas frente a los virus que limita su acumulación y su dispersión a nivel celular, local y sistémico. Los virus vegetales han desarrollado proteínas con actividad supresora del silenciamiento de RNA que pueden interferir con esta defensa en diferentes puntos; algunos supresores virales unen y secuestran directamente los RNAs pequeños (*small RNAs*, sRNAs) que dirigen el silenciamiento hacia dianas específicas previniendo su incorporación a los complejos de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISCs) y su acción degradadora de RNAs virales de secuencia complementaria, mientras que otros interactúan con componentes proteicos de la maquinaria de silenciamiento inhibiendo su función o degradándolos. En algunos casos un mismo supresor puede actuar de ambas maneras.

El Virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) es un virus de RNA ampliamente distribuido que causa importantes pérdidas en especies agrícolas y ornamentales. Se han diferenciado diferentes clados filogenéticos según la secuencia del gen *2b* que codifica la proteína 2b: los subgrupos IA y IB causan síntomas severos en plantas mientras que en el subgrupo II son más leves. La proteína 2b tiene función supresora de silenciamiento y es un conocido determinante de patogenicidad de este virus. Con anterioridad a este trabajo varios grupos de investigación habían postulado que la actividad supresora de silenciamiento de esta proteína requería de su localización nuclear (Lucy *et al.* 2000. *EMBO* 19, 1672), de su interacción con determinadas proteínas argonauta (AGO1: Zhang *et al.* 2006b. *Genes & Dev.* 20, 3255) o de su unión a sRNAs (Goto *et al.* 2007. *Plant Cell Physiol.* 48, 1050).

El trabajo que se presenta en esta tesis doctoral ha pretendido contribuir a determinar la importancia relativa que tienen en la supresión del silenciamiento antiviral la localización subcelular nuclear, y sus interacciones con factores de la maquinaria del silenciamiento antiviral (proteínas AGO o RNAs pequeños de secuencia viral) de la proteína 2b de la cepa Fny del subgrupo IA de CMV.

Para perseguir los objetivos de esta tesis utilizamos diversas aproximaciones experimentales. Una de ellas fue expresar transitoriamente en plantas de *Nicotiana benthamiana* la proteína 2b, nativa o modificada, mediante la técnica de agroinfiltración para visualizar *in vivo* la localización subcelular en células epidérmicas de construcciones de proteína 2b fusionadas a marcadores fluorescentes, realizar estudios de colocalización con otras proteínas de la planta también marcadas para fluorescer, o visualizar *in vivo* interacciones proteína-proteína mediante la técnica de complementación bimolecular fluorescente (*bimolecular fluorescence complementation*, BiFC). Crucialmente, una variante de la técnica de agroinfiltración permite también evaluar la actividad supresora de cada una de nuestras construcciones modificadas y comparar así su actividad frente a la de la proteína nativa. Esto nos permitió determinar el efecto de los diferentes marcajes o mutaciones en la actividad supresora de las proteínas modificadas, y correlacionar nuestras observaciones *in vivo* e *in vitro* con sus actividades biológicas.

Caracterizamos primero el efecto de la fusión de marcadores fluorescentes en la actividad supresora de la proteína 2b nativa y en nueve mutantes afectando a regiones de la proteína que trabajos anteriores de otros grupos habían descrito como relevantes por diversas razones. Con estas construcciones visualizamos sus localizaciones subcelulares, y mediante BiFC interacciones con proteínas. Por otro lado los nueve mutantes y la proteína nativa se expresaron y purificaron en bacteria para determinar sus capacidades de unión *in vitro* a siRNAs.

Mediante ensayos de supresión local del silenciamiento de un gen indicador *GFP*, por proteína 2b nativa o por varios mutantes, caracterizamos las actividades supresoras de cada uno ellos. Todos los mutantes sin actividad supresora se acumularon pobremente en el tejido infiltrado. Sin embargo, cuando se expresaron en presencia de un supresor heterólogo, P19 de tomosvirus, se acumularon a niveles normales, lo que demuestra que dichas mutaciones no afectaban a la estabilidad de la proteína y que su falta de actividad supresora no era debida a su deficiente acumulación por esa razón.

Mediante los mismos ensayos de supresión de silenciamiento se observó que la proteína 2b nativa fusionada a diferentes marcadores fluorescentes y de otros tipos en

cualquiera de sus extremos amino o carboxilo retenía su actividad supresora de silenciamiento. Esto nos permitió estudiar la distribución subcelular *in vivo* de la proteína nativa y la de los diversos mutantes mediante su fusión a marcadores fluorescentes (proteína verde fluorescente, *green fluorescent protein*, GFP; o proteína monomérica roja fluorescente, *monomeric red fluorescent protein*, mRFP1), o visualizar interacciones entre proteínas mediante BiFC, también *in vivo*.

La proteína 2b marcada con GFP se localizó en el citoplasma y núcleo, y dentro de éste en el nucléolo y cuerpos de cajal (*cajal bodies*, CBs), que hasta este trabajo no se había descrito. Los mutantes con deleciones en las señales de localización nuclear (*nuclear localization signals*, NLSs) sólo se encontraron en el citoplasma, mientras que la deleción de un supuesto motivo de fosforilación confinó la proteína en el nucléolo. El resto de mutantes no presentaron alteración de la localización celular respecto a la de la proteína 2b. La adición de una señal de exportación nuclear (*nuclear export signal*, NES) a la proteína 2b la traslocó al citoplasma celular aunque esto no afectó a su actividad supresora, lo que demostró que para la actividad supresora la proteína 2b no necesita acumularse en el núcleo.

En ensayos de BiFC, las proteínas 2b fusionadas a las mitades amino y carboxilo de la proteína fluorescente amarilla interaccionaron formando homodímeros en citoplasma y nucléolo. Todos los mutantes retuvieron esta propiedad así como la de interaccionar con las proteínas AGO1 en el citoplasma y AGO4 en el núcleo, excluyendo el nucléolo, y potencialmente con las proteínas nucleares coilina, fibrilarina y nucleolina en cuerpos nucleares, cuyas interacciones tal vez podrían explicar su presencia en el núcleo.

En ensayos *in vitro* se caracterizaron las propiedades de unión de la proteína 2b a RNAs pequeños sintéticos de 21 nucleótidos: de doble hebra (*double stranded siRNA*, ds siRNA), de hebra sencilla (*single stranded siRNA*, ss siRNA), o un micro RNA (miRNA). La proteína 2b nativa unió los tres RNAs a ratios molares de proteína:RNA de 2:1 con diferentes afinidades. Las nueve mutaciones analizadas afectaron a estas uniones de manera diversa, pero se observó que aquellos mutantes sin actividad supresora tenían su capacidad de unión a estos RNAs pequeños alterada, en la mayor parte de los casos

muy reducida o nula. En particular, ningún mutante sin actividad supresora unió ds siRNAs a ratios molares cercanos a 2:1. Las proteínas con actividad supresora unieron también un RNA largo (6,4 kb) aunque con una relación proteína:RNA sin significación biológica.

Por lo tanto, aunque la proteína 2b de Fny CMV se acumula en el núcleo, y dentro de éste en el nucléolo y los CBs, su actividad supresora de silenciamiento de RNA no requiere de dicha acumulación nuclear, y parece realizarse por proteína citoplásmica. Del estudio de las interacciones de una batería de mutantes consigo mismas y con proteínas AGO *in vivo* o con RNAs pequeños *in vitro* se observa una correlación entre la actividad supresora y la capacidad de unir estos últimos ratios molares supresor:RNA de 2:1, en particular ds siRNAs. Esto sugiere que homodímeros de la proteína 2b interfieren con el silenciamiento antiviral mediante el secuestro de ds siRNAs de secuencia viral en el citoplasma, sin excluir otras posibles formas de actuación.

## **1. INTRODUCCIÓN**





## 1.1. CMV

El virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) está ampliamente distribuido en todo el mundo, especialmente en regiones templadas. Infecta un amplio rango de huéspedes, tanto de especies hortícolas (pepino, melón, espinaca, apio, tomate, patata, zanahoria, etc.) en las que produce grandes pérdidas económicas, como ornamentales (crisantemo, salvia, geranio, gladiolo, margarita, tulipán, petunia, etc.) (Ferreira y Boley 1992; Palukaitis y García-Arenal 2003). Este virus se encontró por primera vez en pepinos (*Cucumis sativus*), causando síntomas de mosaico en las hojas, de ahí su nombre (Price 1934). Es transmitido por áfidos mediante transmisión no persistente (Palukaitis *et al.* 1992), y las plantas infectadas presentan síntomas de mosaico o moteado en las hojas, amarilleo, atrofia del crecimiento y deformación en hojas, flores y frutos (Fig. 1). En condiciones de laboratorio, la infección de CMV se establece fácilmente por inoculación mecánica de virus o ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, RNA) viral (Mochizuki y Ohki 2012).

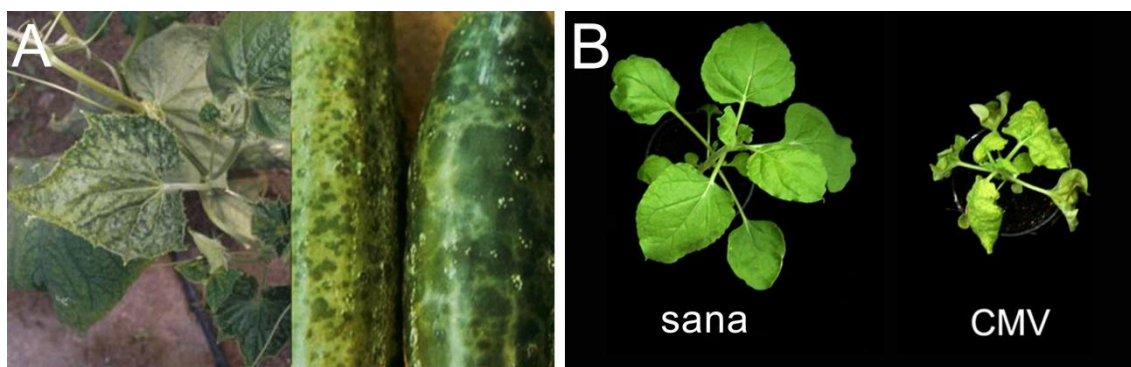


Fig. 1: Síntomas de CMV en planta. A, síntomas desarrollados por plantas de pepino infectadas con CMV (izda., Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura 2014) y frutos (dcha., [www.fitodiagnostico.com](http://www.fitodiagnostico.com)). B, planta sana de *Nicotiana benthamiana* y planta infectada con CMV. Los síntomas manifestados por las plantas infectadas pueden ser mosaico o moteado en las hojas, amarilleo, atrofia del crecimiento y deformación en hojas, flores y frutos.

CMV pertenece al género *Cucumovirus* de la familia *Bromoviridae* (Van Regenmortel *et al.* 2000) junto con el virus de la aspermyia del tomate (*Tomato aspermy virus*, TAV) y el virus de la atrofia del cacahuete (*Peanut stunt virus*, PSV) entre otros. Los *Cucumovirus*

presentan una cápsida icosaédrica de 29 nanómetros (nm) de diámetro formada por 180 subunidades proteicas, con un contenido de RNA del 18%, y tienen un genoma de RNA tripartito de hebra sencilla y sentido positivo (Palukaitis *et al.* 1992; Palukaitis y García-Arenal 2003). El RNA1 tiene un solo marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF) cuyos nucleótidos (nts) codifican la proteína 1a, relacionada con la replicación viral (Nitta *et al.* 1988; Hayes y Buck 1990) que tiene lugar en la membrana vacuolar o tonoplasto (Cillo *et al.* 2002). Esta proteína consta de un dominio metiltransferasa, relacionado con el *capping* de RNAs genómicos y subgenómicos y con la inducción de la respuesta hipersensible en tabaco (Lakshman y Gonsalves 1985), y un dominio con función helicasa (Gorbalenya *et al.* 1988; Hodgman 1988; Habili y Symons 1989; Rozanov *et al.* 1992), con actividad ATPasa y probablemente con actividad de unión a RNAs (Kadaré y Haenni 1997). El RNA2 tiene dos ORFs que solapan parcialmente y codifican las proteínas 2a, relacionada con la replicación viral (Nitta *et al.* 1988; Hayes y Buck 1990); y 2b, relacionada con el movimiento viral y la supresión del silenciamiento viral (Ding *et al.* 1994; Ding *et al.* 1995a; Jones *et al.* 1999; Li *et al.* 1999; Shi *et al.* 2003). La proteína 2a es una polimerasa de RNA dependiente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*, RDR) (Habili y Symons 1989; Poch *et al.* 1989; Bruenn 1991) que se expresa a partir del RNA2, mientras que la proteína 2b se expresa a partir del RNA subgenómico 4A (Fig. 2) (Ding *et al.* 1994; Shi *et al.* 1997) y se localiza en el núcleo y citoplasma (Lucy *et al.* 2000; Mayers *et al.* 2000). La proteína 2b presenta función supresora de silenciamiento génico postranscripcional (Li *et al.* 1999), actúa como determinante de patogenicidad, y aunque no es necesaria en la replicación de CMV o de su RNA satélite (Ding *et al.* 1995b), participa en la promoción del movimiento del virus célula-célula (Shi *et al.* 2003) y a larga distancia (Ding *et al.* 1995a; Ji y Ding 2001; Soards *et al.* 2002). Además, la proteína 2b inhibe la dispersión de la señal de silenciamiento génico e interfiere con la metilación de ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, DNA) en tejidos infectados (Guo y Ding 2002). Por lo tanto es una proteína funcionalmente diversa, que influye en el movimiento viral, en la supresión del silenciamiento de RNA y en la patogenicidad. Esta supresión de silenciamiento parece darse de forma dual, secuestrando pequeños RNAs interferentes (*small interfering RNAs*, siRNAs) (Goto *et al.* 2007) e interactuando con proteínas argonauta (*Argonaute*, AGO) de las rutas de silenciamiento (Zhang *et al.*

2006b). El RNA3 de CMV también tiene dos ORFs separados por una pequeña región no codificante, que codifican las proteínas 3a de movimiento (*movement protein*, MP) y de la cápsida (*coat protein*, CP), ambas requeridas para el movimiento viral (Suzuki *et al.* 1991; Boccard y Baulcombe 1993; Kaplan *et al.* 1995). La proteína 3a es esencial para el movimiento del virus a larga distancia en la planta y entre células (Mossop y Francki 1977; Suzuki *et al.* 1991; Boccard y Baulcombe 1993; Canto *et al.* 1997) que se ha encontrado tanto en plasmodesmos (Vaquero *et al.* 1996; Blackman *et al.* 1998) como en tejidos conductores de plantas infectadas (Blackman *et al.* 1998), y en ella se ha identificado un dominio de unión a RNAs (Vaquero *et al.* 1996; You *et al.* 1999).

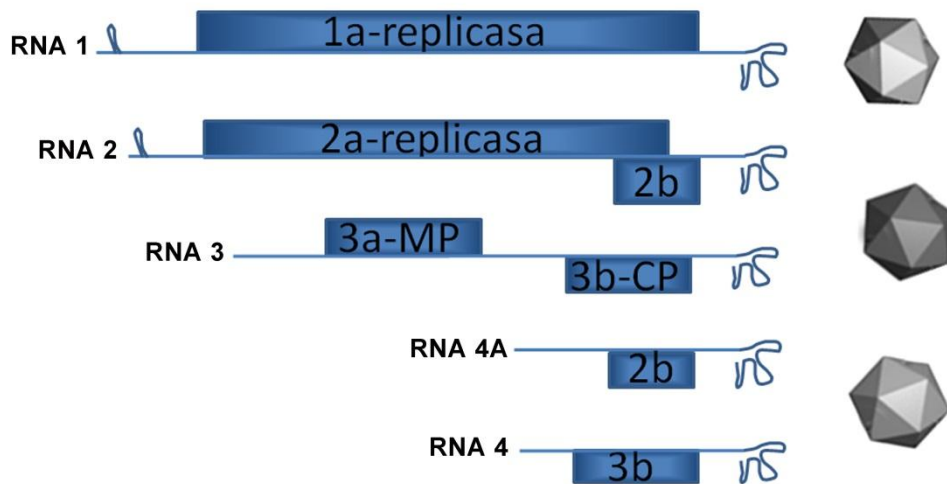


Fig. 2: Organización genómica de CMV. CMV está formado por los RNAs genómicos 1, 2 y 3; y por los subgenómicos 4A y 4 procedentes del RNA 2 y 3, respectivamente. Todos los RNAs constan de una estructura cap en el extremo 5' y una estructura de pseudolazo en el 3'. El RNA 1 tiene un ORF y codifica la proteína 1a, una subunidad de la enzima replicasa viral. Los RNAs 2 y 3 tienen dos ORFs cada uno, y codifican las proteínas 2a, y 2b, y 3a y 3b, respectivamente. La proteína 2a es la segunda subunidad de la replicasa viral y es la polimerasa de RNA viral. La proteína 2b tiene principalmente función supresora de silenciamiento de RNA. La proteína 3a es la proteína de movimiento viral (MP) y la proteína 3b es la proteína de cubierta o de la cápside (CP). Las proteínas 2b y 3b se expresan a partir de los RNAs subgenómicos 4A y 4. Figura modificada a partir de Palukaitis y García-Arenal 2003.

Los RNAs de CMV actúan como RNAs mensajeros y son traducidos directamente por la maquinaria celular a las proteínas que codifican, cada uno tiene una estructura de caperuza (cap) en el extremo 5' (Symons 1975) y una estructura en pseudolazo en el

extremo 3', similar a un RNA de transferencia (*transfer RNA*, tRNA; Rietveld *et al.* 1983). Las proteínas 1a, 2a y 3a se expresan a partir de los RNAs 1, 2 y 3; y las proteínas 2b y CP se expresan a partir de los RNAs subgenómicos 4a y 4 (Ding *et al.* 1994; Schwinghamer y Symons 1975, respectivamente), que se corresponden con la zona 3' de los RNAs 2 y 3 respectivamente (Palukaitis *et al.* 1992; Ding *et al.* 1994). Los RNAs 1, 2 y 3 del virus son encapsidados por separado (Finch *et al.* 1967; Habili y Francki 1974; Kaper y Re 1974; Francki y Hatta 1980) en cápsidas indistinguibles entre sí (Fig. 3), mientras que el RNA 4 subgenómico se encapsida con el RNA 3 (Habili y Francki 1974; Lot y Kaper 1976).

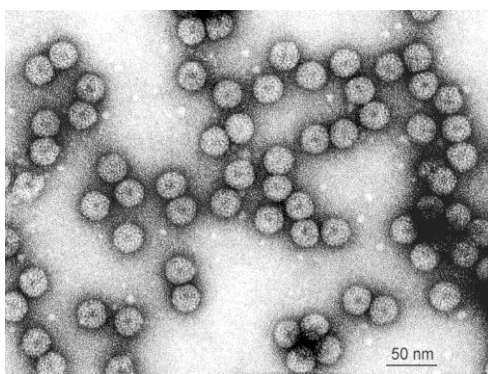


Fig. 3: Partículas de CMV. Micrografía electrónica de CMV preparada por el Dr. R.G. Milne, Consiglio Nazionale delle Ricerche. Istituto di Fitovirolgia Applicata. Italia. <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/Milne/cucumsv.htm>

Se han caracterizado numerosas cepas de CMV, que varían en características serológicas, rango de huésped, virulencia, inducción de resistencia y transmisibilidad por áfidos (Mochizuki y Ohki 2012). En función de las secuencias de RNA, las cepas se han dividido en tres subgrupos: IA, IB y II (Roossinck *et al.* 1999; Roossinck 2002). La similitud de secuencias nucleotídicas entre los subgrupos IA y IB es del 92-94%, entre los subgrupos IA y II del 74%–78%, y entre los subgrupos IB y II del 73-78% (Roossinck 2001). En general, las cepas de los subgrupos IA y IB son más virulentas que las cepas del subgrupo II (Wahyuni *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1994; Cillo *et al.* 2009) y la clasificación se ha correlacionado con la actividad de la proteína 2b en las rutas de silenciamiento de RNA (Shi *et al.* 2002; Lewsey *et al.* 2007). Los subgrupos IA y II tienen

una distribución mundial mientras que el subgrupo IB está restringido a Asia (Roossinck 2001). Nuestro trabajo se ha llevado a cabo con la proteína 2b de la cepa Fny, perteneciente al subgrupo IA de CMV. Es una cepa de alta patogenicidad que desarrolla síntomas severos en los huéspedes infectados y cuya proteína 2b está compuesta por 110 aminoácidos (aas) (Fig. 4). El subgrupo IB presenta síntomas un poco menos severos, y la proteína 2b consta de 111 aas, mientras que el subgrupo II lo forman cepas de CMV cuyas proteínas 2b constan de 100 aas, careciendo de la tercera  $\alpha$ -hélice o dominio 3 definido por Ye y colaboradores (2009). En el Anexo I se puede consultar la alineación de secuencias peptídicas de proteínas 2b de diversas cepas de CMV. Entre las proteínas 2b de cucumovirus es habitual encontrar una discordancia entre el peso molecular calculado y el detectado en SDS-PAGE, siendo mayor este último en las cepas del subgrupo II, en las cepas Fny y Q de CMV (Ding *et al.* 1994; Mayers *et al.* 2000) y en TAV (Shi *et al.* 1997), y Ding y colaboradores (1994) sugirieron que esta discordancia se debe a modificaciones postranslacionales. Mayers y colaboradores (2000) mostraron que aunque las proteínas 2b de las cepas de TAV y de los subgrupo IA y II de CMV tienen diferentes propiedades antigénicas, sus características bioquímicas y funciones son semejantes.

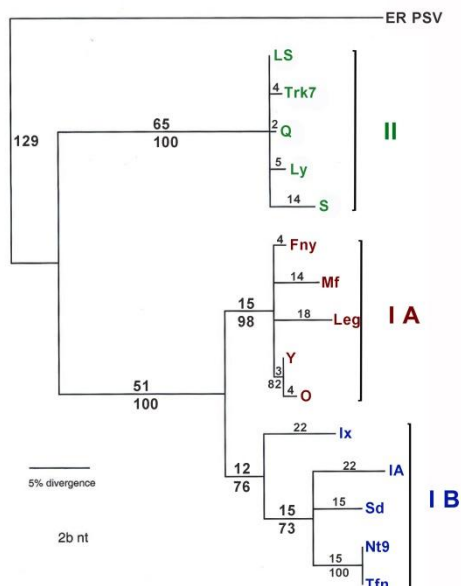


Fig. 4: Grupos formados por las cepas de CMV. Análisis filogenético basado en el ORF de la proteína 2b de CMV, modificado de Roossinck (2002). En rojo, cepas del subgrupo IA; en azul, cepas del subgrupo IB; en verde, cepas del subgrupo II. Se muestran los valores *bootstrap* bajo cada rama y las distancias, medidas en cambios en nts sobre cada rama. En el Anexo I se puede consultar la alineación peptídica de proteínas 2b de diferentes cepas de CMV.

## 1.2. Silenciamiento y defensa antiviral en plantas

Los virus de plantas son patógenos o simbiontes biótropos que necesitan tejido vivo para multiplicarse, y normalmente alcanzan un equilibrio infección/defensa sin causar la muerte de la planta. En algunos casos la infección viral cursa sin síntomas aparentes, mientras que en otros causa fenotipos patológicos resultado de la interferencia y/o competición por los recursos del huésped, afectando a su fisiología (Pallás y García, 2011). El efecto de la infección viral en la expresión génica es generalmente inhibitorio (Carthew y Sontheimer 2009), y la alteración de la expresión génica afecta a numerosos genes, tendiendo a ser mayor cuanto más severos son los síntomas que presenta la planta, ya que los genes inducidos o reprimidos participan en diferentes procesos celulares como la regulación hormonal, el ciclo celular y el transporte de macromoléculas entre otros (Pallás y García, 2011).

Uno de los mecanismos de defensa ante una infección de la planta se basa en el silenciamiento génico, que es un mecanismo de regulación de la expresión génica específico de secuencia que se observó por primera vez en plantas de petunia (van der Krol *et al.* 1990), y que posteriormente se ha descrito en protozoos, plantas, hongos y animales, con RNAs intermediarios comunes y maquinaria molecular semejante, conservada filogenéticamente (Mlotshwa *et al.* 2002; Tijsterman *et al.* 2002). En plantas el silenciamiento génico de transcritos o de RNAs virales se llamó silenciamiento génico postranscripcional, y como resultado de su acción se degrada específicamente RNAs que tienen secuencias complementarias a las de un RNA inductor (Angell y Baulcombe, 1997).

Inicialmente se creyó que el silenciamiento inducido por RNA era un mecanismo exclusivamente de defensa frente a virus y trasposones (Waterhouse *et al.* 2001), ya que se activa en la defensa frente a ácidos nucleicos extraños y funciona como mecanismo antiviral en plantas superiores (Matzke y Matzke 2004; Mello y Conte 2004; Ding y Voinnet 2007). Sin embargo, se ha visto que también participa en la regulación génica a nivel transcripcional y a nivel traduccional (Brodersen y Voinnet 2006), y forma una serie de rutas interrelacionadas que suprimen la acumulación viral y de otros patógenos, y regulan la expresión génica en el desarrollo y en respuestas a

condiciones ambientales tanto a nivel de RNA como modificando el DNA y la cromatina (Baulcombe 2004; Jones *et al.* 2006).

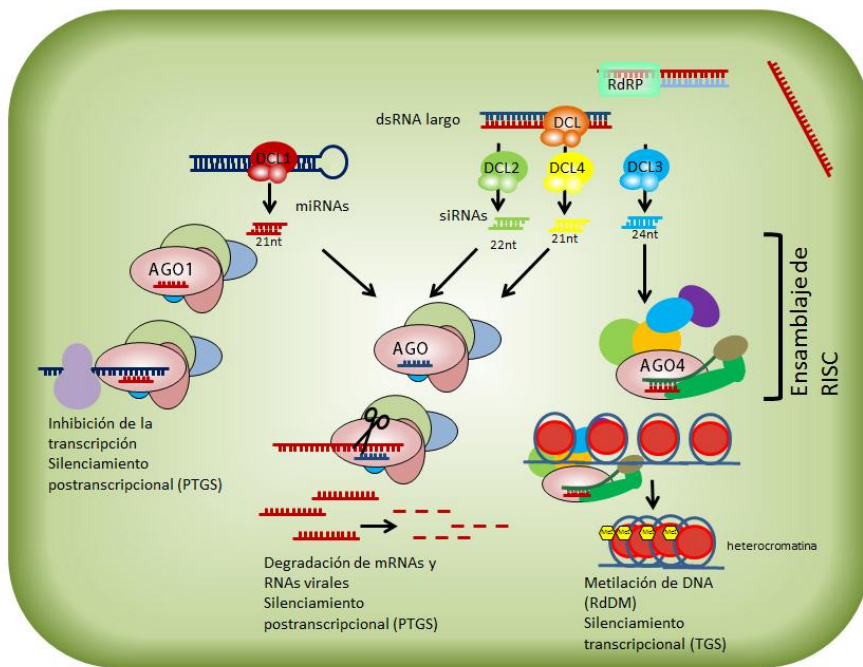
Las rutas de silenciamiento y regulación mediadas por RNAs pequeños interferentes (*small interfering RNAs*, siRNAs) dependen de una serie de procesos comunes iniciados por un RNA de doble hebra (*double-stranded RNA*, dsRNA) inductor o precursor, que es procesado a siRNAs de doble hebra de complementariedad total (*double-stranded small interfering RNAs*, ds siRNAs) de 21 a 24 pares de bases (pbs) o parcial [micro RNAs (miRNAs)] por enzimas RNAsas III semejantes a Dicer (*Dicer-like*, DCLs) (Voinnet 2001). Estas rutas no son completamente independientes unas de otras y en ellas intervienen diferentes siRNAs y miRNAs productos del procesamiento por diferentes DCLs (Fig. 5) (Baulcombe 2004). El silenciamiento es un mecanismo muy eficiente en defensa, y una vez activado por RNAs bicatenarios que la célula reconoce como aberrantes o extraños actúa contra cualquier RNA citoplásmico que presente complementariedad de secuencia con la del RNA inductor, como un sistema inmune que opera a nivel de ácido nucleico (Voinnet 2001).

En silenciamiento podemos encontrar dos procesos diferenciados: silenciamiento génico transcripcional (*transcriptional gene silencing*, TGS) y silenciamiento génico postranscripcional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS). En términos generales, el TGS inhibe o silencia la expresión del DNA, mientras que el PTGS degrada el RNA citosólico inhibiendo la traducción a proteínas. Ambos procesos median la regulación de genes endógenos en el desarrollo de la planta (Moussian *et al.* 1998). En TGS se metilan las histonas formando heterocromatina alrededor de un gen, resultando inaccesible a la maquinaria transcripcional. Es una metilación de DNA dependiente de RNAs (*RNA-directed DNA methylation*, RdDM) que permite a la célula silenciar trasposones y otros elementos repetitivos a nivel transcripcional, y regular genes importantes para el desarrollo de la planta en la respuesta a infecciones, crecimiento y desarrollo, o estrés (Mahfouz 2010). Esta RdDM tiene lugar en el núcleo (Chinnusamy y Zhu 2009; Zhang y Zhu 2011) y se descubrió inicialmente en plantas infectadas con viroides (Wassenegger *et al.* 1994). Jones y colaboradores (1998) observaron que la RdDM puede ser inducida por un virus de RNA aunque éste se replique exclusivamente en el citoplasma, y Mlotshwa y colaboradores (2002) sugirieron que citoplasma y

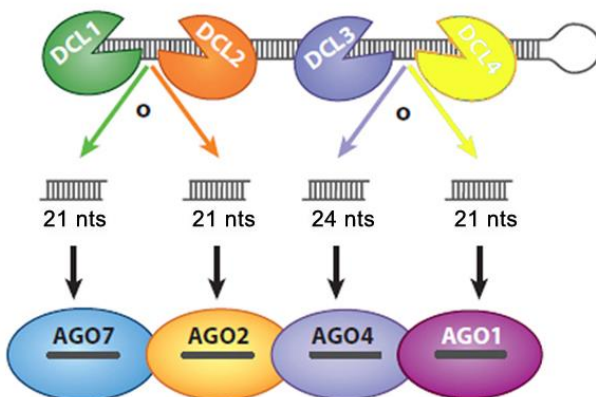


núcleo se comunican para ello de alguna forma. Por otro lado, PTGS se refiere al silenciamiento de RNAs mensajeros (*messenger RNAs*, mRNAs) o de otros tipos, que son destruidos o cuya traducción es bloqueada, previniendo así la expresión de las proteínas que codifican. Este proceso media la protección frente a ácidos nucleicos exógenos.

**A**



**B**



**C**

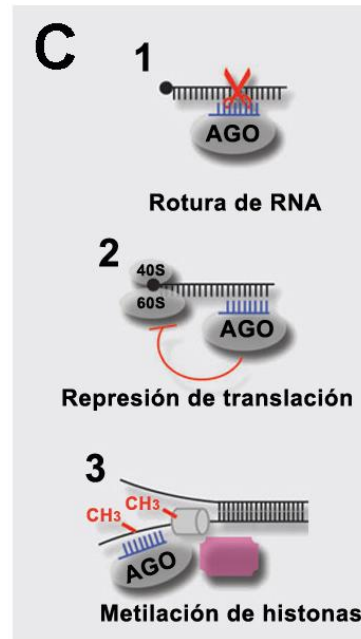


Fig. 5: Diagrama esquemático de las rutas de silenciamiento en plantas. A, Rutas de silenciamiento. El silenciamiento se puede dividir en cuatro fases. I, detección y procesamiento por DCLs de RNAs virales a siRNAs. II, Amplificación de siRNAs virales primarios y secundarios por RDRs (RdRps en la figura) de la planta. III, Ensamblaje de siRNAs y RISC, y actuación de RISC activado. IV, silenciamiento sistémico y defensa sistémica antiviral. El silenciamiento se inicia con un dsRNA exógeno, como un RNA viral, un intermediario de replicación viral o un trasposón; o endógeno, como un mRNA defectuoso al que le falta cap o la cola poli-A; o pequeños RNAs propios en el funcionamiento celular. Diferentes DCLs procesan los dsRNAs en siRNAs de 20-24 nts. Estos siRNAs nucleon el ensamblaje de RISC, cuyo efector es AGO. DCL1 participa en la biogénesis de miRNAs. DCL3 participa en la formación de siRNAs endógenos de 24 nts que inducen metilación de DNA e histonas. DCL2 y DCL4 generan siRNAs de 22 y 21 nts relacionados con la defensa frente a ácidos nucleicos extraños, como los virales. Los siRNAs sirven como molde de secuencia específico para silenciar o regular genes, trasposones y virus, y para modificar la estructura de la cromatina. AGO utiliza una sola hebra del siRNA como molde para el silenciamiento específico de secuencia. Una vez RISC encuentra la diana complementaria a este siRNA, y en función del siRNA y la proteína AGO efectora, se inhibe la transcripción, se degrada el RNA o mRNA complementario, o se metila el DNA. Figura creada a partir de Baulcombe (2004); Hutvagner y Simard (2008); Meister y Tuschl (2004); Brodersen y Voinnet (2006); Carthew y Somtheimer (2009); Zhang y Zhu (2011). B, DCLs. Las proteínas DCLs compiten por la unión a dsRNAs generando siRNAs de diversa longitud que se unirán a distintas proteínas AGO. Reproducido de (Bologna y Voinnet 2014). C, Actuación de los siRNAs. Las hebras de siRNA unidas a AGO guían el RISC en: 1, la degradación endolítica de RNA; 2, la represión de la translación; y 3, marcar la cromatina para la metilación. Reproducido de Ruiz-Ferrer y Voinnet (2009). RdDM: *RNA-directed DNA methylation*, metilación de DNA dependiente de RNA. Met: grupo Metilo en la metilación de DNA. dsRNA: *double-stranded RNA*, RNA de doble hebra. RdRp: *RNA-dependent RNA polymerase*, polimerasa de RNA dependiente de RNA. siRNA: *small-interference RNA*, pequeño RNA de interferencia. RISC: *RNA-induced silencing complex*, complejo de silenciamiento de RNA. AGO: *Argonaute*, argonauta. DCL: *dicer-like*, RNAsa III semejante a dicer.

Brodersen y Voinnet (2006) diferenciaron tres etapas en el silenciamiento: formación de dsRNAs, procesamiento de éstos en siRNAs de 20-24 nts, e inhibición de RNAs o DNAs de secuencia complementaria o parcialmente complementaria. Cerutti y Casas-Mollano (2006) identificaron en estudios bioquímicos y genéticos tres componentes proteicos principales en el silenciamiento de RNA en plantas: enzimas DCLs, proteínas AGO y RDRs. Y Baulcombe (2004) indicó que hay al menos tres rutas de silenciamiento de RNA en plantas, que no son completamente independientes unas de otras. Estas rutas se relacionan con las diferentes DCLs, siRNAs y AGOs que intervienen en el ensamblaje del complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC). La primera ruta es citoplásmica, y el dsRNA inductor puede ser un intermediario de replicación de un RNA viral; la segunda es el silenciamiento de mRNAs mediado por miRNAs, y destruye del mRNA diana o inhibe su traducción a proteínas; y la tercera está asociada a la RdDM y la supresión de la transcripción (Baulcombe 2004).

Por lo tanto, una vez que un virus invade una célula, el silenciamiento antiviral se puede dividir en cuatro pasos principales (Fig. 5). En primer lugar se detectan los dsRNAs virales, generados como intermediarios durante la replicación viral, o de la conformación secundaria de los RNAs virales, y las DCLs los procesan en siRNAs primarios. En segundo lugar, las RDRs, junto con otras proteínas, amplifican los RNAs virales generando nuevos dsRNAs virales que son procesados por DCLs en siRNAs secundarios. En tercer lugar, los siRNAs primarios y secundarios se unen a AGO, donde permanece una sola hebra monocatenaria, y se ensambla RISC que dirige la degradación de los RNAs virales con secuencias complementarias a las de estos siRNAs guía o media la metilación de ácidos nucleicos en RdDM, en función del RISC que se ensamble. Por último, la señal o señales de silenciamiento sistémico se transportan célula-célula por los plasmodesmos (Mlotshwa *et al.* 2002) y por el floema hacia el resto de la planta (Yoo *et al.* 2004), estableciendo el silenciamiento y defensa sistémica antiviral (Dunoyer *et al.* 2005; Molnar *et al.* 2010, 2011).

### **1.2.1. Detección y procesamiento de RNAs virales**

El silenciamiento se inicia a partir de precursores de dsRNA (Fig. 5), que varían en función de su longitud y origen, y que son procesados por las DCLs a siRNAs (Meister y Tuschl 2004). Estas DCLs de plantas son enzimas semejantes a las enzimas Dicer de vertebrados y levaduras. Las DCLs contienen un dominio Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ), que une un extremo del dsRNA precursor de siRNAs, con dos nts desapareados en el extremo 3'. La hebra de RNA se extiende hasta el centro procesador en que el dominio RNAsa III corta el RNA, dejando dos nts desapareados en el extremo 3'.

En *A. thaliana* hay 4 DCLs que generan siRNAs de diferente tamaño (Blevins *et al.* 2006; Bouché *et al.* 2006; Deleris *et al.* 2006; Fusaro *et al.* 2006; Diaz-Pendon *et al.* 2007) en función de la distancia entre los dominios PAZ y RNAsa (MacRae *et al.* 2006). Aunque el dsRNA viral es accesible a todas las DCLs, DCL2 y DCL4 son las que presentan más afinidad por los RNAs virales. DCL1 participa en la biogénesis de miRNAs de 21 nts (Finnegan *et al.* 2003; Papp *et al.* 2003; Xie *et al.* 2004) que se incorporan a AGO1 y su diana son mRNAs (Xie *et al.* 2004; Baumberger y Baulcombe 2005), aunque también puede actuar sobre dsRNAs (Blevins *et al.* 2006; Bouché *et al.* 2006). DCL3 genera

siRNAs de 24 nts a partir de siRNAs asociados a repeticiones (*repeat-associated small interfering RNAs*, rasiRNAs), que se incorporan a AGO4 y guían la metilación de DNA y modificación de histonas en TGS (Xie *et al.* 2004; Matzke y Birchler 2005). Esta DCL3 puede producir siRNAs virales primarios en ciertas condiciones (Wang *et al.* 2011b) y tiene un papel antiviral contra CMV (Bouché *et al.* 2006; Fusaro *et al.* 2006; Diaz-Pendon *et al.* 2007), y puede amplificar la producción de siRNAs de 21 nts de DCL4 (Diaz-Pendon *et al.* 2007). En *A. thaliana*, DCL2 y DCL4 producen siRNAs virales contra distintos virus de RNA de polaridad positiva como CMV, de forma jerárquica o redundante (Bouché *et al.* 2006; Deleris *et al.* 2006; Fusaro *et al.* 2006; Diaz-Pendon *et al.* 2007) y en función del virus inductor (Blevins *et al.* 2006). Bouché y colaboradores (2006) mostraron que en infecciones con CMV, la mayoría de siRNAs virales eran producidos por DCL4, y Deleris y colaboradores (2006) constataron que DCL2 podía suplir su actividad. Diversos autores han informado de que en plantas infectadas se encuentran principalmente siRNAs virales de 21 nts, producto de DCL4, seguidos por siRNAs de 22 nts (por debajo del 20% de siRNAs virales), producto de DCL2 (Ding 2010; Llave 2010), por lo que DCL4 actúa como sensor primario en la producción de siRNAs primarios de actividad antiviral (Xie *et al.* 2004; Bouché *et al.* 2006; Deleris *et al.* 2006; Fusaro *et al.* 2006; Bologna y Voinnet 2014). La enzima DCL4 también está implicada en la propagación del silenciamiento célula-célula (Dunoyer *et al.* 2005; Blevins *et al.* 2006) que aísla al virus en las hojas inoculadas (Deleris *et al.* 2006).

### **1.2.2. Ensamblaje de RISC**

Las moléculas de dsRNAs procesadas por las DCLs generan siRNAs que se adhieren a las proteínas AGO. Estas proteínas también tienen un dominio PAZ que une RNAs de hebra sencilla, siRNAs o miRNAs (Lingel *et al.* 2003; Song *et al.* 2003; Yan *et al.* 2003), un dominio Mid, y un dominio PIWI con acción RNasa que cataliza el corte de la hebra complementaria al siRNA, degradándola (Song *et al.* 2004; Parker *et al.* 2005). Son las efectoras del complejo RISC y por tanto un componente clave en las rutas de regulación génica en que participan los siRNAs.

En *A. thaliana* hay 10 AGOs que actúan junto con las DCLs en el procesamiento de diferentes especies de siRNAs (Dunoyer *et al.* 2007), participan en la maduración del

siRNAs eliminando su hebra no activa (Matranga *et al.* 2005; Miyoshi *et al.* 2005; Leuschner *et al.* 2006) por la norma de la asimetría (Khvorova *et al.* 2003; Schwarz *et al.* 2003), e inician la adhesión al RNA específico complementario a la hebra de siRNA que portan (Hutvagner y Zamore 2002). La proteína AGO activada con el siRNA dirige el ensamblaje de RISC y este complejo funciona como una multiproteína que reconoce y se adhiere a RNAs complementarios al siRNA que porta, catalizando su degradación o represión (Hammond *et al.* 2000; Zamore *et al.* 2000; Meister y Tuschl 2004). Meister y Tuschl (2004) comprobaron que las proteínas AGO usan unas proteínas adaptadoras que seleccionan los siRNAs y miRNAs procedentes de diferentes dsRNAs, que se ensamblan en diferentes RISCs en función de los cofactores que participan, por lo que algunos autores han diferenciado entre RISC o siRISC, que contienen siRNA, y miRISC, que contienen miRNA (Mourelatos *et al.* 2002; Carthew y Sontheimer 2009). De este modo, la diana de RISC puede ser un mRNA, un RNA viral o DNA en el caso de RdDM (Wassenegger 2000; Bender 2001; Lippman y Martienssen 2004) y el corte endonucleotídico se da en la región complementaria, unos 10 nts por delante del nt emparejado con el extremo 5' del siRNA acoplado a AGO (Elbashir *et al.* 2001).

Bologna y Voinnet (2014) definieron tres clados que contienen las diez proteínas AGO identificadas en *Arabidopsis*: AGO1, 5 y 10; AGO2, 3 y 7; y AGO4, 6, 8 y 9. La mayor parte de éstas (AGO1, 2, 3, 4, 5, 7 y 10) se han implicado en la defensa antiviral de plantas (Hamera *et al.* 2012; García-Ruiz *et al.* 2015; Wang *et al.* 2011b; Schuck *et al.* 2013; Qu *et al.* 2008; Jones *et al.* 2006; Feng *et al.* 2013; Jaubert *et al.* 2011). Bologna y Voinnet (2014) han asociado principalmente AGO4, 6 y 9 con siRNAs de 24 nts; AGO1, 2, 5 y 7 con siRNAs de 21-22 nts; y AGO7 y 10 casi exclusivamente con los miR390 y miR165/166, respectivamente; mientras que AGO8 presenta bajos niveles de expresión en *Arabidopsis* y se ha considerado un pseudogén al que aún no se ha atribuido un papel (Bologna y Voinnet, 2014).

Diversos autores han relacionado AGO1, 2 y 4 con la infección y resistencia frente a CMV (Wang *et al.* 2011b; Ye *et al.* 2009; Hamera *et al.* 2012; Diaz-Pendon *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2006b), y unen diferentes conjuntos de siRNAs virales primarios y secundarios. AGO1 se ha asociado con miRNAs y siRNAs de transgenes, siRNAs virales y trans-acting siRNAs (ta-siRNAs) (Baumberger y Baulcombe 2005; Qi *et al.* 2005; Zhang

*et al.* 2006b; Montgomery *et al.* 2008b) de 21 nts y con uridina en el extremo 5' (Mi *et al.* 2008; Takeda *et al.* 2008; Wang *et al.* 2011b), aunque recientemente también se ha observado un alto porcentaje de siRNAs de 24 nts unidos a AGO1. AGO2 toma principalmente siRNAs con adenosina en el extremo 5'. El sesgo de AGO1 y 2 por siRNAs con uracilo o adenina en 5' se ha observado también en la selección de siRNAs endógenos (Mi *et al.* 2008; Montgomery *et al.* 2008a; Takeda *et al.* 2008). Wang y colaboradores (2011b) observaron que durante la infección viral AGO1 era necesaria en el silenciamiento de siRNAs secundarios, y que las plantas defectivas en esta proteína eran hipersusceptibles a las infecciones (Morel *et al.* 2002; Qu *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2006b).

Como respuesta general de la planta frente a virus, se ha notificado un aumento en la inducción de la transcripción de AGO1 en las infecciones con CMV, con el virus de la mancha en anillo del cimbidium (*cymbidium ringspot virus*, CymRSV) y con la cepa cr del virus del mosaico del tabaco (*tobacco mosaic virus*, TMV) (Zhang *et al.* 2006b; Csorba *et al.* 2007; Havelda *et al.* 2008). Sin embargo este incremento no conllevaba un aumento en la actividad de la proteína, ya que los supresores de silenciamiento virales pueden condicionar la producción de AGO, la estabilidad de los siRNAs, la carga de siRNAs en AGO1, o la traducción, estabilidad, actividad o degradación de AGO1 (Chapman *et al.* 2004; Lakatos *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006b; Baumberger *et al.* 2007; Bortolamiol *et al.* 2007; Csorba *et al.* 2007; Azevedo *et al.* 2010; Chiu *et al.* 2010; Giner *et al.* 2010; Várallyay *et al.* 2010).

Las proteínas AGO4 y AGO6 se han asociado con la metilación de DNA e histonas (en RdDM). Li y colaboradores (2008) localizaron AGO4 en el núcleo y en los cuerpos de Cajal (*Cajal bodies*, CBs), y unos cuerpos asociados al nucléolo llamados cuerpos A-B, donde su actividad se ha relacionado con RdDM junto con otras proteínas con la misma localización (RDR2, DCL3 y la subunidad NRPD1 de la polimerasa IV con actividad polimerasa de RNA dependiente de DNA) lo que ha sugerido que en los CBs se da el silenciamiento transcripcional dependiente de siRNAs de 24 nts (Li *et al.* 2006; Li *et al.* 2008). Tras la activación con el siRNA, AGO4 recluta RISC y las metiltransferasas de DNA que metilan el DNA y forman heterocromatina (Fig. 5) (Wassenegger *et al.* 1994; Matzke *et al.* 2007; Chinnusamy y Zhu 2009; Law y Jacobsen 2010). En

*Arabidopsis* se ha identificado parte de los componentes involucrados en RdDM: DCL3, otras proteínas que reclutan la RdDM, proteínas que metilan el DNA y proteínas que remodelan la cromatina (Mahfouz 2010; Zhang y Zhu 2011). Cao y Jacobsen (2002) observaron que AGO4 y AGO6 participan en RdDM uniendo siRNAs y en el ensamblaje de enzimas metiltransferasas que catalizan la metilación *de novo* de DNA. La enzima citosina demetilasa revierte esta metilación, con lo que la expresión génica tiene un control dinámico en respuesta a señales de crecimiento y desarrollo, estrés, o infecciones. Diversos estudios han mostrado que la ruta de RdDM puede reconocer ácidos nucleicos virales, transgenes y trasposones (Kumapatla *et al.* 1998; Matzke y Matzke 1998; Voinnet *et al.* 1998), y se pueden utilizar virus para silenciar genes específicos en la planta a nivel de DNA (Kanazawa *et al.* 2011).

Wang y colaboradores (2011a) han mostrado que AGO1 puede suplir la función de AGO4 en plantas de *Arabidopsis* defectivas en *ago4*, por lo que AGO1 puede actuar de forma redundante en la regulación de RdDM (Wang *et al.* 2011a). La diversificación, especialización, solapamiento y redundancia en las rutas de silenciamiento por RNA, con sus distintas DCLs y AGOs podría por lo tanto resultar ventajosa para la planta a pesar de su coste, permitiendo regular diferencialmente unas rutas y otras, y potenciar por ejemplo la ruta de silenciamiento involucrada en la defensa antiviral sin necesidad de alterar otras rutas de silenciamiento implicadas en otros procesos endógenos, o compensar el bloqueo de una de ellas mediado por patógenos.

### **1.2.3. Generación de siRNAs virales secundarios**

Se han descrito tanto RDRs de plantas como RDRs de origen viral. Las RDRs de planta amplifican secuencias de RNA a partir de RNAs de hebra sencilla o transcritos de RNA, produciendo *de novo* intermediarios de doble cadena que sintetizan la cadena complementaria usando iniciadores o cebadores de la reacción, como los siRNAs (Ahlquist 2002). Schiebel y colaboradores (1998) caracterizaron la primera RDR vegetal en tomate, y poco después se observó que también participaban en los mecanismos de defensa antiviral frente a virus de RNA, donde juegan un papel importante en el silenciamiento. En *Arabidopsis* hay seis RDRs que intervienen en la amplificación y la diseminación del silenciamiento. Wang y colaboradores (2010) sugirieron que se

desarrollaron para participar en la biogénesis de siRNAs endógenos y en la amplificación de siRNAs virales, como mecanismo de defensa antiviral. Las RDRs vegetales no actúan sobre mRNAs, que presentan las estructuras cap y la cola Poli-A (secuencia larga de poliadenilato, formada por múltiples adeninas), sino sobre RNAs o mRNAs carentes de estas estructuras, mientras que las RDRs virales sí pueden actuar en aquellos mRNAs. Los dsRNAs generados por las RDRs son sustrato de las DCLs que generan siRNAs virales secundarios (Baulcombe 2004), y tanto DCL2 como DCL4 pueden reconocer y procesar los dsRNAs producto del sistema RDR6/supresor de silenciamiento génico 3 (*Suppressor of gene silencing 3*, SGS3) para producir siRNAs virales secundarios, a diferencia de DCL1 y DCL3, que no los pueden producir (Wang *et al.* 2011b).

La infección viral estimula la expresión de genes *rdr* en muchas plantas (Ahlquist 2002), y diversos estudios han mostrado que en *Arabidopsis* se producen siRNAs virales secundarios a consecuencia de la actividad de las RDRs del huésped frente a infecciones de virus de RNA de polaridad positiva (Diaz-Pendon *et al.* 2007; Donaire *et al.* 2008; Garcia-Ruiz *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010). Las RDRs también son inducibles por el ácido salicílico (*salicylic acid*, SA), fitohormona que dispara respuestas de defensa genéricas (Xie *et al.* 2001).

De las seis RDRs de *A. thaliana*, se ha confirmado la intervención de RDR1, 2 y 6 en la respuesta antiviral. Las restantes (RDR3, 4 y 5) no participan en la respuesta antiviral de silenciamiento o su actividad es secundaria a las de RDR1 y RDR6 (Lowery 2012). Éstas dos participan en el silenciamiento antiviral frente a virus de RNA (Yang *et al.* 2004; Schwach *et al.* 2005; Diaz-Pendon *et al.* 2007; Donaire *et al.* 2008), y RDR6, junto con DCL2 y DCL4, es la responsable de la biogénesis de siRNAs endógenos de la planta para silenciar miRNAs (Poethig *et al.* 2006; Chapman y Carrington 2007; Voinnet 2008). Wang y colaboradores (2010) han mostrado que RDR1 amplifica preferentemente la región terminal 5' de los tres RNAs de la cepa Fny de CMV, mientras que RDR6 amplifica preferentemente la región terminal 5' y el RNA 4.

Diversos estudios han mostrado que la proteína 2b de CMV suprime *in vivo* el silenciamiento de RNA dependiente de RDR6 (Diaz-Pendon *et al.* 2007; Zhang *et al.*



2008; Wang *et al.* 2011b), y en plantas defectivas en *rdr6* la infección viral se ve facilitada (Jiang *et al.* 2012). La dispersión de silenciamiento antiviral célula-célula depende de RDR2 y RDR6, aunque en su propagación a larga distancia no se da esta dependencia (Dunoyer *et al.* 2005; Schwach *et al.* 2005; Brosnan *et al.* 2007; Dunoyer *et al.* 2007; Smith *et al.* 2007; Díaz-Pendón y Ding 2008; Voinnet 2008). Se ha observado que el silenciamiento se extiende en ambos sentidos del siRNA inductor ( $3' \rightarrow 5'$  y  $5' \rightarrow 3'$ ) en plantas, mientras que en otros organismos, como nematodos, se extiende sólo en un sentido ( $3' \rightarrow 5'$ ) (Sijen *et al.* 2001; Vaistij *et al.* 2002; Petersen y Albrechtsen 2005).

### **1.3. Supresores virales de silenciamiento de RNA: mecanismos virales de interferencia con el silenciamiento génico**

La invasión de un virus induce respuestas de defensa en la planta, como el silenciamiento de RNA viral. Los virus han desarrollado supresores de silenciamiento de RNA (Li y Ding 2006; Ding y Voinnet 2007; Valli *et al.* 2009) que bloquean las rutas de silenciamiento en diferentes puntos y permiten la invasión del huésped (Anandalakshmi *et al.* 1998; Kasschau y Carrington 1998; Vance y Vaucheret 2001; Chapman *et al.* 2004; Mlotshwa *et al.* 2005; Díaz-Pendón y Ding 2008). Actualmente se han identificado más de 35 familias de supresores virales de silenciamiento de RNA en virus de plantas (Díaz Pendón y Ding, 2008; Li y Ding 2006; Pumplin y Voinnet 2013).

Jones y colaboradores (1999) mostraron que CMV prevenía el silenciamiento en plantas en nuevos tejidos no silenciados. Y Li y colaboradores (1999) demostraron que la proteína 2b de TAV tiene función supresora de silenciamiento, como corroboraron Lucy y colaboradores (2000) en la cepa Q de CMV. Los ensayos de Béclin y colaboradores (1998) con la cepa R de CMV (subgrupo II), mostraron que la proteína 2b inhibía la dispersión de la señal sistémica de silenciamiento en *Arabidopsis* y tabaco, como han observado también Mlotshwa y colaboradores (2002).

Aunque los supresores de silenciamiento tienen secuencias y funciones específicas diversas, comparten algunos mecanismos de acción y propiedades bioquímicas (Diaz-Pendón y Ding, 2008; Li y Ding, 2006; Ding y Voinnet, 2007). Unos parecen actuar uniendo y secuestrando siRNAs para inhibir el ensamblaje de RISC y la dispersión célula-célula del silenciamiento (Chapman *et al.* 2004; Lakatos *et al.* 2006; Dunoyer *et al.* 2010), lo que podría ser un mecanismo general de supresión de silenciamiento de RNA (Méraï *et al.* 2005; Lakatos *et al.* 2006; Li y Ding 2006); mientras que otros inhiben el silenciamiento interaccionando con los componentes proteicos de su maquinaria (Wu *et al.* 2010; Burgyán y Havelda 2011); y algunos supresores tienen mecanismos de actuación múltiples en varios puntos de las rutas de silenciamiento. La interrupción o supresión del silenciamiento de un modo u otro lleva eventualmente a la reducción o eliminación completa de siRNAs (Zhang *et al.* 2006b). La proteína 2b de CMV, nuestro objeto de estudio, se podría encontrar entre estos supresores de actuación múltiple, uniendo siRNAs e interaccionando con las proteínas AGO, como se discutirá más adelante.

Los supresores de silenciamiento no sólo afectan a la defensa antiviral de la planta, sino que interfieren y alteran procesos fisiológicos básicos dependientes de la regulación de la expresión génica endógena, favoreciendo las condiciones para la infección sistémica. De este modo, el virus utiliza la maquinaria de silenciamiento de la planta reprogramando la expresión génica del huésped y proporcionando un entorno celular favorable a la proliferación viral (Dunoyer y Voinnet 2005; Zhang *et al.* 2006b; Ding y Voinnet 2007; Donaire *et al.* 2008; Donaire *et al.* 2009). Esta reprogramación contribuye a la patogénesis y al desarrollo de síntomas característicos de diferentes virus (Whitham y Wang 2004; Pallás y García 2011), y se ha visto en distintos estudios que parte de los síntomas manifestados por las plantas infectadas con CMV se deben a la interferencia de los supresores con las rutas de regulación génica (Carrington y Ambros 2003; Peragine *et al.* 2004; Borsani *et al.* 2005; Du *et al.* 2014b). A continuación veremos más detenidamente diferentes mecanismos mediante los cuales los supresores virales interrumpen el silenciamiento de RNA.

### 1.3.1. Unión de supresores virales a ácidos nucleicos

Una propiedad observada en varios supresores de silenciamiento de distintas familias de virus no relacionadas es su capacidad de unión a siRNAs y dsRNAs (Fig. 6) (Bucher *et al.* 2004; Chapman *et al.* 2004; Chellappan *et al.* 2005; Lu *et al.* 2005; Mérai *et al.* 2005). La captura de siRNAs podría bloquear la señal de silenciamiento local y sistémico al impedir que el siRNA se una a AGO (Schott *et al.* 2012) bloqueando el silenciamiento.

Algunos supresores que unen RNAs son las proteínas 2b de *Cucumovirus*, P14 de *Aureusvirus*, P15 del virus del macizo del cacahuete (*Peanut clump virus*, PCV), P19 de *Tombusvirus*, P21 de *Closterovirus*, AC4 de *Geminivirus*, B2 de *Nodavirus* y la proteasa componente “helper” de *Potyvirus* (*helper component-protease*, HC-Pro) del virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) (Goto *et al.* 2007; Rashid *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008; Silhavy *et al.* 2002; Vargason *et al.* 2003; Chapman *et al.* 2004; Lakatos *et al.* 2004; Chellapman *et al.* 2005; Lu *et al.* 2005; Mérai *et al.* 2005; García-Ruíz *et al.* 2015).

Los supresores de silenciamiento unen diferentes tipos de RNAs, la proteína P19 del virus de las manchas en anillo del clavel italiano (*Carnation italian ring-spot virus*, CIRV) y del virus del enanismo arbustivo del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV), unen siRNAs de 21 nts con extremos romos o con dos nts desapareados en los extremos 3' (Silhavy *et al.* 2002; Vargason *et al.* 2003; Ye *et al.* 2003), otros supresores como HC-Pro del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV), P21 del virus del amarilleo de la remolacha (*Beet yellows virus*, BYV) y p122 de TMV, unen *in vitro* siRNAs con dos nts desapareados en los extremos 3' (Lakatos *et al.* 2006; Csorba *et al.* 2007). HCPro de TuMV une *in vivo* siRNAs de 21 y 22 nts (García-Ruíz *et al.* 2015); y otros supresores, como B2 del virus del escarabajo neozelandés (*Flok house virus*, FHV) y P14 del virus latente del Pothos (*Pothos latent virus*, PoLV) unen dsRNAs independientemente de su tamaño. En virus animales se ha visto que los supresores de silenciamiento pueden impedir el acceso de las DCLs a los dsRNAs, inhibiendo la generación de siRNAs (Chao *et al.* 2005; Lu *et al.* 2005; Aliyari *et al.* 2008) aunque no se ha observado tal hecho en virus vegetales.

Chen y colaboradores (2008) observaron que la proteína 2b de TAV unía siRNAs independientemente de su secuencia por medio de residuos con carga positiva situados en la primera  $\alpha$ -hélice, algunos de ellos formando parte de las señales de localización nuclear (*Nuclear localisation signal*, NLS) y el motivo de fosforilación, que también participa en el reconocimiento de la hélice de RNA. Duan y colaboradores (2012) mostraron que en la cepa SD (subgrupo IB) de CMV las dos primeras  $\alpha$ -hélices de la proteína 2b, en que se encuentran las NLSs y el motivo de fosforilación, son necesarias en la unión a siRNAs de 21 nts, aunque sólo la primera es necesaria en la unión a siRNAs de 24 nts y RNAs largos. Estos mismos autores confirmaron que las NLSs y la señal de localización nucleolar (*Nucleolar localisation signal*, NoLS) forman parte de la estructura de unión a RNAs de la proteína. Rashid y colaboradores (2008) por otro lado observaron que la mitad amino de la proteína 2b de TAV (aas 1-71) une *in vitro* siRNAs, miRNAs y RNAs de hebra sencilla en ensayos de espectroscopía; y Chen y colaboradores (2008) observaron la unión preferente a siRNAs de 21 nt, siRNAs de hebra sencilla de 21 y 30 nts y miRNAs *in vitro* con diferente afinidad. Goto y colaboradores (2007) mostraron que la proteína 2b de la cepa CM95R (subgrupo IA) de CMV unía *in vitro* siRNAs y miRNAs, como las proteínas P19 de tombusvirus y P21 de BYV. En este estudio, la proteína 2b mostró más afinidad por el siRNA que por el miRNA, mientras que P19 tuvo semejante afinidad por ambos; y en un estudio posterior, Hamera y colaboradores (2012) observaron que la proteína 2b de la cepa SD (subgrupo IB) de CMV unía *in vivo* siRNAs y miRNAs.

En algunos casos en que se ha observado unión *in vitro* a siRNAs, ésta no se ha demostrado *in vivo* (Schott *et al.* 2012). Y en ocasiones distintos grupos de investigación han obtenido resultados diferentes que se podrían deber a diferencias en las técnicas o en las cepas de virus utilizadas. En el caso de la proteína 2b de CMV, algunos autores han propuesto que su mecanismo de supresión de silenciamiento es la unión y secuestro de siRNAs (Wang *et al.* 2004; Goto *et al.* 2007; Rashid *et al.* 2008; Kanazawa *et al.* 2011; Duan *et al.* 2012; Hamera *et al.* 2012), mientras que otros han propuesto que su modo de acción se basa en la interacción e inhibición de proteínas AGO (Mérai *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006b).

La utilización de plantas de *Arabidopsis* defectivas en *dcls* ha permitido discriminar el efecto de la actividad de algunos supresores en diferentes rutas de silenciamiento. Así, se ha visto que la proteína p38 del virus del arrugamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV) inhibe la acumulación de siRNAs de 21 nts dependientes de DCL4 (Deleris *et al.* 2006) y que la proteína 2b de CMV suprime el silenciamiento inhibiendo la acumulación de siRNAs virales de 21, 22 y 24 nts (productos de DCL4, DCL2 y DCL3, respectivamente) (Bouché *et al.* 2006; Fusaro *et al.* 2006; Díaz-Pendón *et al.* 2007), lo que es compatible con la actividad bloqueadora de RdDM e inhibición de la dispersión de la señal de silenciamiento célula-célula que se ha visto en esta proteína (Guo y Ding 2002).

La unión de las proteínas supresoras a RNAs de diferentes tipos interrumpe el silenciamiento tanto al unir dsRNA, impidiendo la actuación de las DCLs que generan siRNAs, como al unir siRNAs, impidiendo que éstos se unan a AGO. También interfieren con la dispersión de la señal de silenciamiento, ya que los siRNAs de 21 y 22 nts están implicados en la dispersión local y sistémica del silenciamiento en plantas infectadas (Díaz-Pendón *et al.* 2007).

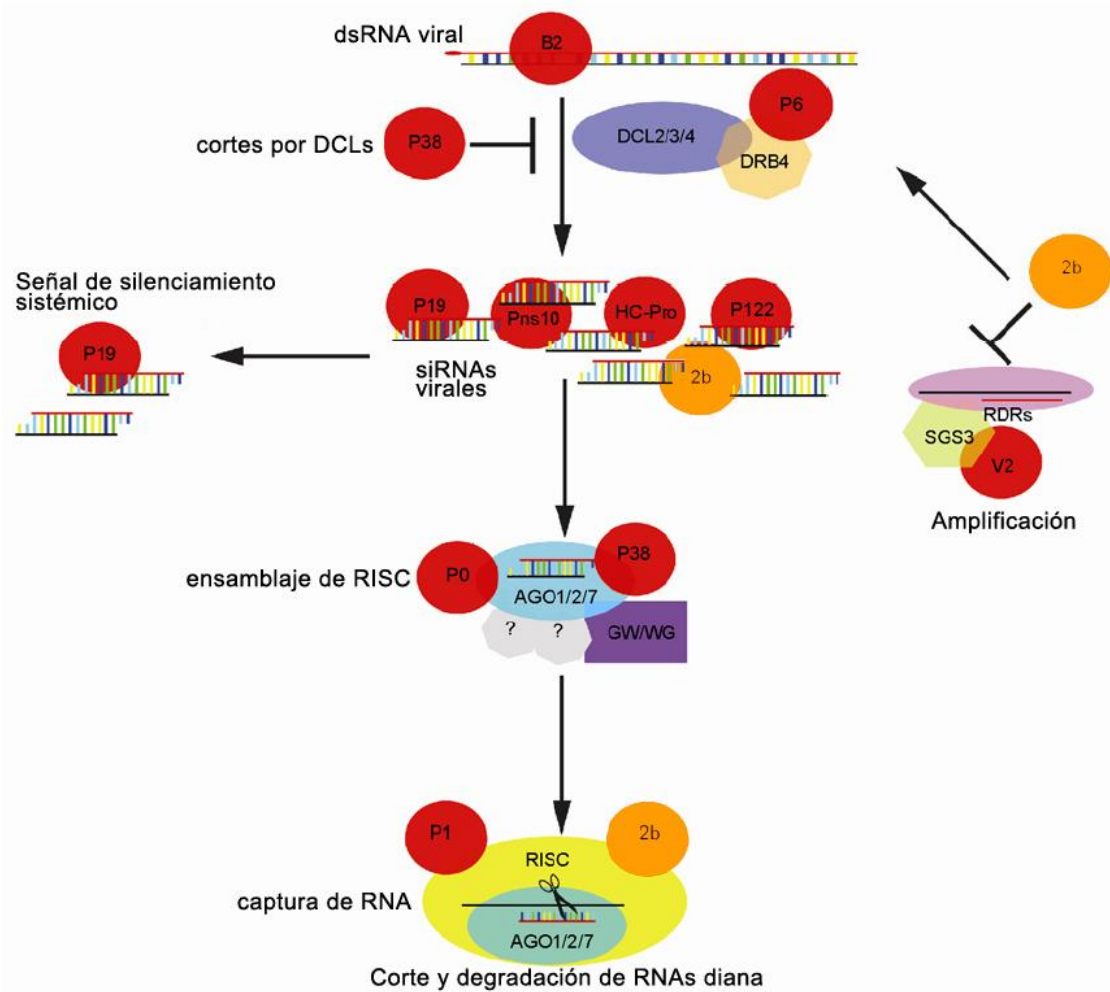


Fig. 6: Actividades de supresores de silenciamiento virales en las rutas de silenciamiento. El esquema muestra la supresión del silenciamiento de RNA por diferentes supresores de silenciamiento virales. En las rutas de silenciamiento los dsRNAs virales son detectados y degradados a siRNAs por enzimas DCLs (DCL2/3/4), con actividad RNasa III. El siRNA viral resultante se une a proteínas AGO, y se ensambla el RISC. Este RISC, utilizando una de las hebras del siRNA como molde, degrada RNAs virales diana. Las RDRs del huésped y otros cofactores como SGS3 amplifican la señal de silenciamiento generando siRNAs secundarios y dispersando el silenciamiento a tejidos sistémicos de la planta. Los supresores virales de silenciamiento podrían actuar uniendo siRNAs, previniendo el ensamblaje de diferentes efectores o inhibiendo su función, o uniéndose al dsRNA inductor, como la proteína B2 de FHV. Las proteínas P38 de TCV y P6 de CaMV actúan a nivel de las DCLs. Otras proteínas supresoras inhiben el silenciamiento secuestrando siRNAs, como P19 de CymRSV, de CIRV y de TBSV, HC-Pro de TEV, P122 de TMV y 2b de CMV. Mientras que otras proteínas actúan a nivel del RISC, actuando sobre la proteína AGO e inhibiendo la formación del complejo, como las proteínas P0 de BWYV, P38 de TCV y P1 de SPMV, o actuando sobre el complejo ya formado. Algunas proteínas interfieren la amplificación de siRNAs secundarios, inhibiendo la actividad de las RDR, como la proteína 2b de CMV, o inhibiendo el cofactor de RDR, SGS3, como la proteína V2 de TYLCV. Algunas proteínas supresoras actúan a varios niveles de la ruta de silenciamiento, como la proteína 2b de CMV que une siRNAs (Goto *et al.* 2007), interacciona con AGO (Zhang *et al.* 2006b) y actúa a nivel de las RDRs, ya que el virus defectivo en la proteína 2b, CMVΔ2b recobra la infectividad en plantas *rdr6* y la acumulación de siRNAs virales se reduce (Wang *et al.* 2011b), lo que sugiere que la proteína 2b inhibe específicamente la amplificación de siRNAs virales secundarios dependientes de RDR6, que son esenciales en la defensa antiviral. Figura modificada a partir de Jiang y colaboradores 2012.

### 1.3.2. Interacción de supresores virales con proteínas de las rutas del silenciamiento

Los supresores de silenciamiento también interaccionan con elementos proteicos de las rutas de silenciamiento (Fig. 6). Algunos ejemplos son las proteínas 2b de las cepas Fny y SD (subgrupos IA y IB, respectivamente) de CMV que se unen a AGO1 inhibiendo su actividad (Zhang *et al.* 2006b; Feng *et al.* 2013); las proteínas P38 de TCV y P1 del virus del moteado suave de la batata (*Sweet potato mild mottle virus*, SPMMV) que mimetizan los motivos GW/WG de proteínas endógenas de la planta que interaccionan con AGO1, uniendo competitivamente AGO1 para inhibir su actividad (Azevedo *et al.* 2010; Giner *et al.* 2010); las proteínas P0 del virus del amarilleo occidental de la remolacha, (*Beet western yellows virus*, BWYV) y P25 del virus X de la patata (*Potato virus X*, PVX) que promueven la degradación de AGO1 (Chiu *et al.* 2010; Baumberger *et al.* 2007; Bortolamiol *et al.* 2007); y otras proteínas supresoras, como P19 de CIRV, P21 de BYV y HC-Pro de TEV, que unen siRNAs potencialmente previniendo que éstos se unan a AGO (Chapman *et al.* 2004; Lakatos *et al.* 2006). Jamous y colaboradores (2011) comprobaron que el supresor de silenciamiento HC-Pro del virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) inhibía *in vitro* la actividad metilasa de la enzima HUA ENHANCER1 (HEN1), lo que conlleva una reducción general de la acumulación de sRNAs en la planta (Boulet *et al.* 2003; Li *et al.* 2005).

Algunas proteínas supresoras pueden interaccionar con o afectar a varias proteínas AGO, como la proteína P25 de PVX, que interacciona con AGO1, AGO2, AGO3 y AGO4 (Chiu *et al.* 2010) y la proteína 2b de CMV, que interacciona con al menos AGO1 y AGO4 (Zhang *et al.* 2006b; Ye *et al.* 2009; Hamera *et al.* 2012; Feng *et al.* 2013). Zhang y colaboradores (2006b) demostraron la interacción de la proteína 2b de CMV con AGO1, inhibiendo su actividad degradadora y posteriormente, Hamera y colaboradores (2012) confirmaron la interacción *in vivo* con AGO4 mediante co-inmunoprecipitación, que nosotros habíamos visualizado anteriormente también *in vivo*, como veremos más adelante. Posteriormente a la publicación de nuestros resultados, estos autores propusieron que la proteína 2b de la cepa SD (subgrupo IB) de CMV compite con AGO4

por la unión a siRNAs además de interactuar con AGO4, suprimiendo así la metilación mediada por esta proteína (Hamera *et al.* 2012).

Bisaro (2006) observó que algunos supresores de silenciamiento de virus de DNA interfieren la ruta de metilación de DNA. En diversos estudios se ha observado que las proteínas AL2 del virus del mosaico dorado del tomate (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV) y L2 del virus del enrollamiento de la punta de la remolacha (*Beet curly top virus*, BCTV) inhiben TGS interaccionando e inactivando la adenosina kinasa del huésped (Wang *et al.* 2003; Wang *et al.* 2005); mientras que la proteína C2 del virus del enrollamiento severo de la punta de la remolacha (*Beet severe curly top virus*, BSCTV) interacciona con la proteína S-adenosil-metionina decarboxilasa del huésped, previniendo así modificaciones epigenéticas en el genoma viral (Zhang *et al.* 2011).

### **1.3.3. Interferencia de supresores virales con la amplificación de siRNAs**

Durante la replicación, los virus de RNA de polaridad positiva producen intermediarios de doble cadena a partir de los que se generan siRNAs virales primarios y secundarios. Las proteínas RDR1, RDR2 y RDR6 de la planta reconocen los RNAs virales y producen dsRNAs y siRNAs virales secundarios, esenciales en la defensa antiviral (Garcia-Ruiz *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011b). He aquí otro punto sensible que pueden bloquear los virus, ya que las plantas en las que la función de RDR1 o RDR6 está comprometida presentan mayor susceptibilidad a algunos virus de RNA (Mourrain *et al.* 2000; Xie *et al.* 2001; Yang *et al.* 2004; Qu *et al.* 2005; Schwach *et al.* 2005; Donaire *et al.* 2008). Distintas líneas de investigación han mostrado que la proteína 2b de CMV inhibe la actividad de las RDRs (Diaz-Pendon *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2008; Wang *et al.* 2011b) y Zhang y colaboradores (2008) han mostrado que las proteínas 2b de TAV y HC-Pro del virus del mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) inhiben la acumulación del mRNA de la RDR6 del huésped. La dispersión intercelular de la señal de silenciamiento depende de RDR6 (Schwach *et al.* 2005), por lo que si la proteína 2b inhibe la función de RDR6, se facilita la infección.

Wang y colaboradores (2011b) han observado que el virus CMV $\Delta$ 2b (cepa Fny), deficiente en la proteína supresora 2b, requiere la actividad de RDR6 para ser



silenciado y otras proteínas de *Arabidopsis* como SGS3 para la formación de siRNAs virales secundarios. Estos autores y Voinnet (2008) han relacionado SGS3 con RDR6 y con DCL4 en la ruta de silenciamiento. En plantas de *Arabidopsis* que presentan comprometido *sgs3*, CMV $\Delta$ 2b causa síntomas severos (Wang *et al.* 2011b). En el mismo sentido, la proteína supresora de silenciamiento V2 de la cepa Israel del virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow curl leaf geminivirus*, TYLCV), interfiere la amplificación de siRNAs virales secundarios al interactuar con la proteína SGS3 (Mourrain *et al.* 2000; Peragine *et al.* 2004; Zrachya *et al.* 2007; Glick *et al.* 2008; Kumakura *et al.* 2009).

Diaz-Pendón y colaboradores (2007) propusieron que la proteína 2b inhibía la producción de siRNAs secundarios dependientes de RDRs inducibles por SA, como RDR1, ya que en presencia de 2b no se detectan siRNAs virales producto de esta RDR. Se han propuesto dos mecanismos que podrían explicarlo: por interacción de la proteína 2b con AGO1, que inhibiría la actividad de AGO1 (Zhang *et al.* 2006b), esencial en la amplificación de silenciamiento dependiente de RDR; o uniendo siRNAs y su precursor de dsRNA, inhibiendo la producción de siRNAs secundarios, como se ha visto en la proteína B2 del FHV (Chao *et al.* 2005; Lu *et al.* 2005). Otras proteínas como P6 del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) inhiben el silenciamiento interactuando con la proteína DBR4, necesaria para la producción de siRNAs de 21 nts dependientes de DCL4 (Haas *et al.* 2008); o el supresor de silenciamiento HC-Pro de SCMV, que podría inhibir la función de DCL3, afectando así a la acumulación de siRNAs de 24 nts (Zhang *et al.* 2008).

Las infecciones de plantas de *Arabidopsis* deficientes en *rdrs* con virus deficientes en la supresión de silenciamiento, han mostrado que la resistencia a distintos virus de RNA de sentido positivo depende de la producción de siRNAs virales secundarios producto de RDR1, RDR2 y RDR6 (Mourrain *et al.* 2000; Xie *et al.* 2001; Diaz-Pendon *et al.* 2007; Donaire *et al.* 2008; Garcia-Ruiz *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011b), y distintas líneas de investigación han mostrado que la proteína 2b de CMV suprime la formación de siRNAs virales secundarios producto de las RDRs (Diaz-Pendon *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2008; Wang *et al.* 2011b). Wang y colaboradores (2010) han demostrado que RDR1 y RDR6 tienen un papel esencial en la amplificación de siRNAs

virales y el silenciamiento viral en la infección con la cepa Fny de CMV deficiente en la proteína 2b en plantas de *Arabidopsis* (CMV $\Delta$ 2b). En esos ensayos, observaron que la pérdida de *rdr1* incrementaba la acumulación viral de forma significativa, mientras que la pérdida de *rdr2* o *rdr6* era apenas perceptible, por lo que RDR1 y RDR6 pueden cumplir funciones distintas (Wang *et al.* 2010). Además, RDR1, es inducible por SA, mientras que RDR6 no lo es (Xie *et al.* 2001; Yu *et al.* 2003). Ambas sintetizan dsRNA que DCL2 y DCL4 procesan en siRNAs virales secundarios, amplificando la señal de silenciamiento antiviral, aunque RDR1 amplifica preferentemente siRNAs de la región 5' de los tres RNAs virales de CMV, mientras RDR6 amplifica el siRNAs del resto (Wang *et al.* 2010).

## **1.4. La proteína 2b**

### **1.4.1. Actividad funcional de la proteína 2b**

Los primeros estudios de la proteína 2b de *Cucumovirus* se centraron en la función de la proteína. Ding y colaboradores (1995b) mostraron que ésta no era necesaria para la replicación del genoma viral. Este grupo introdujo, en la cepa Q (subgrupo II), un codón de terminación al inicio de la secuencia de 2b que previno la traducción de la proteína, originando el virus CMV $\Delta$ 2b. La ausencia de expresión de 2b atenuó la infección en *Nicotiana glutinosa* e inhibió la infección sistémica en pepino, aunque continuó infectando *Nicotiana* (Ding *et al.* 1995a) y observaron que CMV $\Delta$ 2b no inducía síntomas en *N. tabacum*, *N. benthamiana* o *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Sin embargo, Lewsey y colaboradores (2009) observaron más tarde que sí podía inducir síntomas severos similares a CMV en el ecotipo C24.

Inicialmente se identificaron las proteínas 2b de CMV y TAV como supresores de PTGS (Li *et al.* 1999) y como determinantes de movimiento viral a larga distancia (Ding *et al.* 1995a; Ji y Ding 2001), y se observó que aumentaba la patogenicidad viral en *N. benthamiana* al expresarla desde un vector viral heterólogo (Lucy *et al.* 2000). Ding y colaboradores (2006) observaron, en un estudio en que reemplazaron el gen 2b de la

cepa Q (subgrupo II) de CMV con el de la cepa V de TAV, que el híbrido resultante presentaba mayor virulencia que las cepas parentales, y determinaron que 2b era un determinante de virulencia (Ding *et al.* 1996). Y Shi y colaboradores (2002) observaron que esto mismo sucedía al reemplazar el gen 2b de la cepa Q (subgrupo II) con el de la cepa WAI (subgrupo IA) de CMV, por lo que sugirieron que la proteína 2b también determinaba la especificidad de huésped (Shi *et al.* 2002). Diversos autores han relacionado la severidad de los síntomas de las plantas infectadas con CMV con la acumulación viral (Gal-On *et al.* 1994; Ding *et al.* 1996; Du *et al.* 2007), pero estudios posteriores han mostrado que 2b no es el único determinante de patogenicidad de CMV y que las diferencias en la expresión de síntomas no se deben a diferencias en la acumulación viral, ya que en cepas con síntomas atenuados o con variaciones que afectan a la expresión de síntomas pero no a la acumulación viral, la sustitución puntual de un solo aa de la proteína 2b puede afectar a la virulencia (Shi *et al.* 2002; Lewsey *et al.* 2009 y consultar Anexo IV). Varios ejemplos son la mutación puntual del aa<sup>41</sup> en el motivo de fosforilación de la cepa Pepo (subgrupo IA) que genera el aislado 36R37 con virulencia atenuada respecto a la de la cepa Pepo (Kobori *et al.* 2005); la mutación puntual del aa<sup>46</sup> de la cepa CM95R (subgrupo IA) que genera la cepa CM95, que inhibe la unión a siRNAs y la actividad supresora de silenciamiento (Goto *et al.* 2007); las mutaciones puntuales en los aa<sup>40</sup> y aa<sup>42</sup> de la cepa Fny, que suavizan los síntomas en la planta sin afectar a la acumulación viral (Lewsey *et al.* 2009); y la sustitución puntual del aa<sup>18</sup> de la cepa M1 (subgrupo IA), que atenúa sus síntomas (Maneechoat *et al.* 2015).

Entre las funciones que se han sugerido para la proteína, encontramos que Mayers y colaboradores (2000) sugirieron que la mitad amino de la proteína, que contiene las NLSs y una región de la proteína enriquecida en argininas (*arginine rich region*, ARR), podría unir DNAs y RNAs, y que ésta podría ser la principal actividad de la proteína (Mayers *et al.* 2000). Esta línea ha sido estudiada en diferentes grupos de investigación (Duan *et al.* 2012; Hamera *et al.* 2012) y, junto con nuestros resultados, sugiere que la unión a siRNAs a determinadas relaciones molares correlaciona con la actividad supresora de silenciamiento. Lucy y colaboradores (2000) sugirieron que la proteína 2b era un competidor en el transporte nuclear o en la regulación transcripcional, y Guo y

Ding (2002) sugirieron que interfería con la metilación de DNA. Diversos grupos han comprobado que la proteína 2b inhibe el silenciamiento local y sistémico en plantas transgénicas (Jones *et al.* 1999; Guo y Ding 2002), y Qi y colaboradores (2004) también observaron que podía suprimir el silenciamiento a nivel unicelular en protoplastos. Diversos estudios han demostrado que la proteína 2b de cucumovirus interrumpe las defensas de la planta mediadas por SA (Ji y Ding 2001; Mayers *et al.* 2005; Shang *et al.* 2011) y ácido jasmónico (*jasmonic acid*, JA) (Westwood *et al.* 2014) e induce tolerancia a la sequía en *A. thaliana* y *N. benthamiana* infectadas con la cepa Fny (subgrupo IA) (Westwood *et al.* 2013).

Otras líneas de investigación han sugerido que la proteína 2b actúa interaccionando con proteínas pertenecientes a la maquinaria del silenciamiento como las proteínas AGO1 (Zhang *et al.* 2006b) y AGO4 (Hamera *et al.* 2012; Feng *et al.* 2013), y un grupo ha observado que inhibe la expresión de AGO4 (Ye *et al.* 2009). En los últimos años se ha observado la interacción de diferentes proteínas supresoras de silenciamiento con AGO, como la proteína P0 de *Poliiovirus*, que interacciona con AGO1 libre (no formando parte de RISC) mediando su degradación (Pazhouhandeh *et al.* 2006; Baumberger *et al.* 2007; Csorba *et al.* 2009), y la proteína P38 de TCV que interacciona con AGO directamente, lo que puede impedir que se unan siRNAs (Schott *et al.* 2012). Nuestros datos y otros estudios recientes han mostrado la interacción de la proteína 2b de la cepa Fny (subgrupo IA) con las proteínas AGO1 y AGO4 de *A. thaliana* (Zhang *et al.* 2006b; Hamera *et al.* 2012; Feng *et al.* 2013).

Las diferencias entre los síntomas causados por diferentes cepas de virus se han atribuido a diferencias en la interacción entre sus supresores virales de silenciamiento y la ruta de miRNAs (Zhang *et al.* 2006b; Shimura y Pantaleo 2011). La ruta de los miRNAs, además de actuar como mecanismo de defensa, participa en procesos celulares básicos de la planta. Lewsey y colaboradores (2007) compararon el efecto en la expresión de síntomas de la proteína 2b de las cepas Fny (subgrupo IA, expresión de síntomas severos) y LS (subgrupo II, síntomas leves) en *Arabidopsis*, y como se ha visto, esta proteína perturba las rutas de miRNAs, e inhibe la actividad de proteínas del huésped por interacción directa (Inaba *et al.* 2011; Lewsey *et al.* 2007; Lewsey *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2006b). Un estudio reciente ha mostrado que la proteína 2b de la

cepa Fny (subgrupo IA) afecta a las rutas de miRNA mientras que las de las cepas LS y Q (subgrupo II) no lo hacen, explicando así las diferencias sintomáticas entre diversas cepas de los subgrupos I y II de CMV (Du *et al.* 2014b). Las plantas transgénicas que expresan la proteína 2b de la cepa Fny muestran un fenotipo semejante a las plantas mutantes miR159ab (Allen *et al.* 2007), y Du y colaboradores (2014b) han observado que la expresión de la proteína 2b de la cepa Fny en plantas transgénicas de *Arabidopsis* aumenta la acumulación del miR159 y miR159\* maduro, como consecuencia de la estabilización del dúplex miR159/miR159\* unido a los complejos de 2b de la cepa Fny (Goto *et al.* 2007; Duan *et al.* 2012; Hamera 2012). Esta estabilización previene que miR159 active RISC y, al no activarse el complejo aumentan los transcritos de genes *Gibberellin-regulated myb domain protein-like* MYB33 y MYB65 (diana de miR159), al no ser degradados. Por tanto, la expresión de síntomas en plantas infectadas con la cepa Fny, reside en la perturbación de los niveles del miR159, y según los autores esto puede ser extensible a otras cepas del subgrupo I de CMV (Du *et al.* 2014b). Tanto la cepa Fny como la cepa LS suprimen el silenciamiento, por lo que el estudio de este grupo indica que las cepas severas de CMV desarrollan síntomas por la inhibición de la ruta de miRNAs, una función que es independiente de la supresión de silenciamiento mediada por siRNAs (Mochizuki y Ohki 2012).

Mourrain y colaboradores (2000) han observado que CMV se acumula más en plantas de *Arabidopsis* mutantes deficientes de *rdr6*. Díaz-Pendón y colaboradores (2007) han observado que durante la infección de CMV $\Delta$ 2b en *Arabidopsis*, la mayoría de los siRNAs virales son generados por RDR1 y han asociado la expresión de 2b con la reducción de la acumulación de siRNAs virales. Otros genes que participan en la amplificación del silenciamiento dependiente de RDR son *sgs3* (Mourrain *et al.* 2000), *ago1* (Morel *et al.* 2002), o *sde3* (Dalmay *et al.* 2001), que contribuyen a la biogénesis de siRNAs secundarios de CMV (Díaz-Pendón *et al.* 2007). Las mutaciones en *rdr1*, *rdr2* o *rdr6* en *Arabidopsis* no varían la acumulación de siRNAs virales en las infecciones cursadas por otros virus de RNA de polaridad positiva como TCV, el virus del cascabeleo del tabaco (*Tobacco rattle virus*, TRV) o tobamovirus (Blevins *et al.* 2006; Deleris *et al.* 2006), y Zhang y colaboradores (2008) han observado que las proteínas 2b de TAV y HC-Pro de SCMV inhiben la acumulación del mRNA de RDR6. Como la

dispersión de la señal de silenciamiento intercelular depende de RDR6 (Schwach *et al.* 2005), la proteína 2b podría inhibir la función de RDR6 para favorecer la infección sistémica del virus.

En un estudio posterior, Wang y colaboradores (2011b) han demostrado que CMV $\Delta$ 2b, requiere de la actividad de RDR6 para ser silenciado. En la generación de siRNAs virales secundarios de CMV $\Delta$ 2b participan las proteínas SGS3, relacionada con RDR6 en la ruta de silenciamiento (Voinnet 2008), y DCL4 (Wang *et al.* 2011b), y en plantas que tienen comprometido *sgs3*, CMV $\Delta$ 2b causa síntomas severos (Wang *et al.* 2011b). Se ha visto que la proteína supresora V2 de TYLCV también interfiere la amplificación de siRNAs virales secundarios al interactuar con SGS3 (Mourrain *et al.* 2000; Peragine *et al.* 2004; Zrachya *et al.* 2007; Glick *et al.* 2008; Kumakura *et al.* 2009).

Díaz-Pendón y colaboradores (2007) propusieron que el supresor 2b inhibe la producción de siRNAs secundarios dependientes de RDRs inducibles por SA, como RDR1 (Yu *et al.* 2003), ya que en presencia de 2b no se detectan siRNAs virales producto de esta RDR. Propusieron dos mecanismos que podrían explicarlo: por interacción de la proteína 2b con AGO1, que inhibiría la actividad de AGO1 (Zhang *et al.* 2006b), siendo AGO1 esencial en la amplificación de silenciamiento dependiente de RDR; o uniendo siRNAs y su precursor de dsRNA, inhibiendo así la producción de siRNAs secundarios, como se ha visto en la proteína B2 de FHV (Chao *et al.* 2005; Lu *et al.* 2005). Otras proteínas como P6 de CaMV inhiben el silenciamiento interactuando con la proteína DBR4, necesaria para la producción de siRNAs de 21 nts dependiente de DCL4 (Haas *et al.* 2008). Y el supresor de silenciamiento HC-Pro de SCMV parece inhibir la función de DCL3, afectando así a la acumulación de siRNAs de 24 nts (Zhang *et al.* 2008).

Además de interactuar con elementos de la maquinaria de silenciamiento, se ha encontrado que las proteínas 2b de TAV y CMV y otros supresores interactúan con otras proteínas celulares. De este modo, Nakahara y colaboradores (2012) han observado que los supresores de silenciamiento HC-Pro de TuMV y del virus del amarilleo del trébol (*Clover yellow vein virus*, CIYVV), así como 2b de TAV y de CMV de las cepas HL (subgrupo IB), Y (IA), CM95 (IA) y CM95R (IA) interactúan con la

calmodulina rgs-CaM de tabaco. Takabatake y colaboradores (2007) observaron que esta proteína de tabaco se expresaba en la respuesta hipersensible (*hypersensitive response*, HR) frente a TMV (Takabatake *et al.* 2007), y en diferentes estudios se ha observado la interacción *in vitro* específica de rgs-CaM con los supresores de silenciamiento virales HC-Pro de TEV, de TuMV y de CIYVV, y con el supresor 2b de CMV y de TAV (Anandalakshmi *et al.* 2000; Nakahara *et al.* 2012), reconociendo sus dominios de unión de dsRNA. En todos los casos los supresores actuaron como un inhibidor competitivo de la unión de siRNA, e interfirieron la actividad de las proteínas supresoras; al interactuar con 2b, ésta última no puede unir siRNAs, y el complejo formado (calmodulina/2b) es degradado por la célula vía autofagia (Nakahara *et al.* 2012). Estos autores han demostrado que las mutaciones que afectan a la afinidad de la proteína 2b por los siRNAs también afectan a la interacción con rgs-CaM.

Inaba y colaboradores (2011) y Masuta y colaboradores (2012) encontraron que las proteínas 2b de las cepas Y, HL (subgrupos IA y IB, respectivamente), y Q y M (subgrupo II) de CMV interactuaban con la proteína catalasa 3 (CAT3) de *A. thaliana*. Esta interacción se localiza en los 40 aas de la mitad carboxilo de 2b (Inaba *et al.* 2011), en que predominan las cargas negativas. CAT3 cataliza la descomposición de la especie reactiva peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que participa en respuestas de resistencia a patógenos induciendo la muerte celular como HR, en agua y oxígeno (Noctor y Foyer 1998; Foreman y Tang 2003; Peng *et al.* 2005). La interacción 2b/CAT3 trasloca CAT3 del citoplasma al núcleo induciendo la muerte celular. Las proteínas 2b de las cepas del subgrupo II de CMV reducen la actividad de CAT3 tan eficientemente como la cepa Y (IA) (Masuta *et al.* 2012), y se cree que la necrosis en hojas infectadas con CMV se debe a un descenso de la actividad de CAT3 resultado de la interacción 2b/CAT3, por lo que Masuta y colaboradores opinan que la interacción podría favorecer a CMV, ya que no previene la dispersión de CMV.

#### **1.4.2. Dominios de la proteína 2b**

El gen *2b* se encuentra en todos los cucumovirus secuenciados (Ding *et al.* 1994) solapando con la porción 3' terminal del ORF *2a*, en distinto marco de lectura (siempre ORF+1 respecto a *2a*) (Ding *et al.* 1995b), aunque no se encuentra en otros virus

próximos filogenéticamente como bromovirus o alfamovirus. El gen *2b* tiene un origen híbrido: la parte que solapa con *2a* se ha podido generar por sobre-escritura (*overprinting*), mientras que la región no solapante, que corresponde al dominio terminal carboxilo de la proteína (16 aa, conservado en todos los cucumovirus) es tan antigua como *2a* y similar a la secuencia terminal de proteínas *2a* bromovirales, probablemente originada por la inserción de un nucleótido en la secuencia de *2a* que cambió su marco de lectura al de *2b* (Ding *et al.* 1995a). La proteína *2b* está compuesta por entre 95 y 111 aas, presentando en el subgrupo I diez u once aas más que en el subgrupo II (Ding *et al.* 1994; Ye *et al.* 2009; ver Anexo I). Shi y colaboradores (2002) consideran que la diferencia en la virulencia entre ambos subgrupos es resultado de las diferencias entre sus respectivos genes *2b* (Shi *et al.* 2002).

Aunque CMV se replica y acumula en el citoplasma, la proteína *2b* de cucumovirus se localiza predominantemente en el núcleo (Lucy *et al.* 2000; Mayers *et al.* 2000; Wang *et al.* 2004). Esta proteína presenta en la mitad amino dos NLSs en el subgrupo I de CMV, y una sola NLS en el subgrupo II de CMV (Lucy *et al.* 2000). Las NLSs del subgrupo I, <sup>22</sup>KKQRRR<sup>27</sup> y <sup>33</sup>RRER<sup>36</sup>, son ricas en argininas (R) y están contenidas en la ARR que proporciona lugares de unión a ácidos nucleicos (Mayers *et al.* 2000). La proteína *2b* también presenta una NoLS que Duan y colaboradores (2012) han localizado entre los aas 13-37 de la proteína en la cepa SD (subgrupo IB) de CMV. La secuencia NoSL consenso se ha encontrado en otras proteínas virales y celulares que se localizan en el nucléolo (Boyne y Whitehouse 2006; Rajamaki y Valkonen 2009), y su presencia en la proteína sugiere que ésta presenta alguna función nucleolar (Taliensky *et al.* 2010). Wang y colaboradores (2004) observaron que en la cepa Fny (subgrupo IA) de CMV, una sola de las NLSs podía traslocar la proteína al núcleo aunque la delección de una de las mismas afectaba a su actividad (Wang *et al.* 2004).

Lucy y colaboradores (2000) informaron de que la proteína *2b* de la cepa Q (subgrupo II) presenta unos motivos conservados en todos los *Cucumovirus* y que potencialmente son lugares de fosforilación, sustrato de las enzimas caseína quinasa II (CKII) (S/TxxD/E) (en <sup>9</sup>TNVE<sup>12</sup> y <sup>40</sup>SPSE<sup>43</sup> en la cepa Fny, y <sup>9</sup>STAD<sup>12</sup> y <sup>40</sup>SPSE<sup>43</sup> en la cepa Q) y quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) (en <sup>40</sup>SP<sup>41</sup> en las cepas Fny y Q) (Lucy *et al.* 2000). Ding y colaboradores (1994) mostraron que el motivo de fosforilación es importante en el



movimiento a larga distancia en plantas de pepino y tabaco. La combinación de NLSs y motivos de fosforilación constituyen un motivo llamado CcN, que se ha relacionado en otras proteínas con la regulación de la localización nuclear mediada por fosforilación (Jans 1995; Jans y Hubner 1996). La existencia de un CcN potencial en la proteína 2b de *Cucumovirus* sugiere que ésta podría moverse entre el citoplasma y el núcleo de forma controlada por su estado de fosforilación, como se ha visto en el virus 40 del simio (*simian virus 40, SV40*) (Xiao *et al.* 1996).

La mitad carboxilo de la proteína contiene un dominio que Ye y colaboradores (2009) han denominado dominio tres o tercera alfa-hélice en la cepa SD (subgrupo IB), <sup>63</sup>SELIEMYHH<sup>71</sup> (que en la cepa Fny corresponde a <sup>63</sup>SELTGSCRH<sup>71</sup>, ver Anexo I) y que los autores han relacionado con la actividad supresora y la inhibición de la transcripción de AGO4. Las cepas del subgrupo II de CMV, que muestran menor patogenicidad sobre el huésped, carecen de este dominio; y la delección del mismo en la cepa SD disminuye la actividad supresora de la proteína (Ye *et al.* 2009).

La proteína 2b también presenta un dominio terminal amino y un dominio terminal carboxilo, que en la cepa Fny corresponden a los aas 1-17 y 95-110, respectivamente. Ambos se han implicado en la inducción de síntomas (Lewsey *et al.* 2009) y son necesarios para sobrepasar la resistencia inducida por SA en la planta (Zhou *et al.* 2014). El dominio terminal amino está muy conservado dentro de los subgrupos I y II de CMV, aunque varía entre ambos. En este extremo, Chen y colaboradores (2008) han localizado en la proteína ortóloga de TAV un motivo de cremallera de leucinas, que participa en la formación de dímeros de dímeros. Nemes y colaboradores (2014) han determinado que los primeros aminoácidos de la proteína (aas 1-3), aunque no participan en la conexión entre dímeros, se localizan en el centro de unión a siRNAs del tetrámero de 2b y, aunque no son esenciales en la actividad supresora, son necesarios en el movimiento célula-célula. Y Ye y colaboradores (2009) observaron en la cepa SD (subgrupo IB) de CMV que los aas 1-8, que sólo varían en un aa respecto a la cepa Fny, son muy importantes en la inducción de síntomas, y que la sustitución de estos aas en la cepa Q (asintomática, subgrupo II) por los de la cepa SD formando una proteína quimera, aumenta la actividad supresora respecto a la cepa Q. Por lo que este dominio de la proteína parece que participa en diversas actividades. Por otro lado, el dominio

terminal carboxilo está ausente en algunos cucumovirus como TAV. Ding y colaboradores (1994) observaron que en CMV éste era necesario en la expresión de síntomas en plantas de tabaco e importante en el movimiento a larga distancia. Diferentes estudios han asociado este dominio terminal carboxilo con la toxicidad en la expresión de la proteína en bacterias (Mayers *et al.* 2000; Goto *et al.* 2007; Dong *et al.* 2015; Sueda *et al.* 2010); y recientemente, dentro de esta región de la proteína, Gellért y colaboradores (2012) han relacionado el motivo <sup>95</sup>DDTD<sup>98</sup>, conservado en CMV, con la estabilidad de la proteína 2b en la formación de tetrámeros en estudios de dinamismo molecular, por la unión divalente a iones de magnesio. Sin embargo, las deleciones en este dominio terminal no afectaron a la actividad supresora de silenciamiento, dependiente de la unión a siRNAs como muestran nuestros datos y los de Chen y colaboradores (2008). Estos autores utilizaron la fracción con los aas 1-69 de la proteína 2b de TAV en estudios de cristalografía y revelaron la formación de dímeros y tetrámeros unidos a siRNAs, y el estudio más reciente de Dong y colaboradores (2015) utiliza la fracción de proteína 2b con los aa 1-61 de la cepa Fny de CMV y observan la formación de dímeros, tetrámeros y oligómeros de 2b, por lo que esa fracción de la proteína parece más relacionada con la inducción de síntomas que con la actividad supresora de silenciamiento.

Nemes y colaboradores (2014) en un estudio reciente en la cepa Fny han confirmado que los aas contenidos en las NLSs y el dominio de fosforilación de la proteína 2b son necesarios en la actividad supresora de la proteína, junto con los aa contenidos entre las posiciones <sup>10</sup>NVE<sup>12</sup> y <sup>55</sup>LPF<sup>57</sup>. De estos nuevos dominios implicados en la actividad supresora, el primero contiene V<sup>11</sup>, que en la proteína 2b de TAV es I<sup>11</sup> y se había relacionado anteriormente con la cremallera de leucinas (Chen *et al.* 2008); y la segunda región contiene una L<sup>55</sup> que Xu y colaboradores (2013) han sugerido indispensable en la formación de dímeros de 2b. Además de estas regiones implicadas en la actividad supresora, Nemes y colaboradores (2014) han identificado dos nuevos motivos en 2b relacionados con el movimiento célula-célula, <sup>1</sup>MEL<sup>3</sup> y <sup>70</sup>RHV<sup>72</sup>, en el dominio terminal amino y en la mitad carboxilo de la proteína, respectivamente, esenciales en su actividad supresora.

### 1.4.3. Localización subcelular de la proteína 2b

Inicialmente Shi y colaboradores (1997) mostraron, en estudios de fraccionamiento celular de tejidos infectados con TAV, que la proteína 2b se acumulaba en una fracción insoluble que sólo podía ser solubilizada en condiciones desnaturalizantes de dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*, SDS) y urea. Pero su estudio no pudo determinar la localización de la proteína más allá de la observación de que, junto con la proteína, aparecían paredes celulares, núcleo, citoesqueleto y membranas. Mayers y colaboradores (2000), en un estudio de fraccionamiento posterior, mostraron que la proteína 2b de la cepa Fny de CMV se localizaba principalmente en el núcleo, aunque no pudieron determinar si se encontraba en su interior o en su superficie. Aun así propusieron dos posibles modelos de actuación de la proteína 2b en la supresión de silenciamiento, no mutuamente excluyentes. En el primero la proteína 2b unía DNA o proteínas reguladoras en el núcleo, previniendo la expresión de las proteínas involucradas en la iniciación de PTGS, o inhibiendo la expresión de genes relacionados con la defensa. En el segundo modelo sugirieron que las ARR de la región amino de la proteína 2b podrían unir dsRNAs, como la proteína N de los virus bacteriófagos lambda, 21 y P22 (Lazinski *et al.* 1989). En este caso, la unión 2b/dsRNAs los protegería de la acción de enzimas DCLs (Mayers *et al.* 2000). Por lo tanto ya Mayers y colaboradores sugirieron una doble funcionalidad para las NLSs, más allá de marcar la localización subcelular de la proteína; y Wang y colaboradores (2004) sugirieron que la región ARR unía RNAs. Nuestros resultados, junto con otros autores, como discutiremos más adelante, refuerzan esta teoría.

Ya en estudios de microscopía, Lucy y colaboradores (2000), en un estudio contemporáneo a Mayers y colaboradores, mostraron la localización celular de 2b de la cepa Q (subgrupo II) de CMV. En este estudio expresaron la proteína 2b marcada con GFP en sistemas libres de virus, en suspensiones celulares de células de tabaco Bright Yellow 2 (BY2); y también expresaron 2b de forma persistente en plantas, utilizando PVX como vector. En ambos casos localizaron la proteína en el núcleo. Sus resultados correlacionaron la acumulación nuclear de la proteína 2b con su actividad supresora de silenciamiento, y la supresión de silenciamiento con la determinación de

virulencia. También observaron que una mutación puntual en la NLS no afectaba a la localización ni la actividad supresora de la proteína, mientras que sustituciones o deleciones de mayor extensión sí lo hacían (Lucy *et al.* 2000).

Diversos estudios han sugerido que en el subgrupo II de CMV la proteína 2b presenta una acumulación nuclear más marcada que en el subgrupo I (Duan *et al.* 2012; Wang *et al.* 2004; Lucy *et al.* 2000; Du *et al.* 2014a). Du y colaboradores (2014a) han observado que en la cepa LS (subgrupo II) de CMV la proteína 2b tiene una distribución predominantemente nuclear, pero no nucleolar. La acumulación nuclear de la proteína 2b, como nosotros y otros autores han comprobado, no es suficiente para que la proteína presente actividad supresora de silenciamiento, y recientemente Du y colaboradores (2014a) han propuesto una relación entre la localización de la proteína, la patogenicidad del virus y la actividad supresora de silenciamiento, presentando mayor virulencia las cepas con mayor presencia nuclear, y menor virulencia las cepas con menor presencia nuclear aunque en éstas se encuentra mayor actividad supresora de silenciamiento

En plantas transgénicas que expresan supresores de silenciamiento virales se han asociado las alteraciones fenotípicas con la perturbación de la regulación de dianas de mRNAs del huésped (Zhang *et al.* 2006b; Jay *et al.* 2011), y Du y colaboradores (2014a) han comprobado en plantas de *Arabidopsis* que la traslocación forzada de la proteína 2b de la cepa Fny (subgrupo IA) al núcleo disminuye la perturbación de las funciones del miRNA. Este último estudio es el más reciente que ha tratado la localización subcelular de la proteína 2b de CMV y, utilizando las cepas Fny y LS de CMV, ha mostrado que tanto la presencia citoplásmica como nuclear de la proteína son necesarias para el virus, regulando el equilibrio entre la acumulación viral y el daño a la planta y maximizando el beneficio para el virus,. También han asociado la localización nuclear con la virulencia de la cepa, y la actividad supresora de silenciamiento con la unión a siRNAs en el citoplasma (Du *et al.* 2014a).

La localización de 2b en el núcleo hace pensar que la proteína desempeñe alguna actividad en el mismo. En el núcleo se encuentra el nucléolo y también los CBs (Ramón y Cajal 1903), estos últimos son estructuras dinámicas que se mueven, se fusionan y se

separan en el núcleo y nucléolo (Boudonck *et al.* 1999; Platani *et al.* 2000). Ambas subestructuras tienen un papel en el silenciamiento de RNA en plantas (Li *et al.* 2006; Pontes *et al.* 2006) y contienen diversas proteínas y pequeños RNAs (Cioce y Lamond 2005) que se han relacionado con la maduración de RNA y el ensamblaje de complejos relacionados con la transcripción (Collier *et al.* 2006), con la regulación del ciclo celular y con las respuestas a estreses de origen variado (Cioce y Lamond 2005; Boulon *et al.* 2010). Los CBs están enriquecidos en la proteína coilina, de función desconocida, y fibrilarina, mientras que como componente principal del nucléolo encontramos fibrilarina y nucleolina (Chen *et al.* 2002). Recientemente se ha empezado a estudiar la relación entre proteínas nucleares y proteínas virales (Semashko *et al.* 2012a y 2012b) y Greco (2009) y Taliansky y colaboradores (2010) han mostrado que el núcleo y el nucléolo juegan un papel importante en algunas infecciones virales en humanos, animales y plantas, mientras que Kim y colaboradores (2007) han observado que el nucléolo y algunas proteínas nucleolares participan en los ciclos de algunos virus animales y vegetales, aunque la función de estas proteínas y el tráfico nucleolar en las infecciones virales es poco conocido. Se sabe que las proteínas que se localizan en el nucléolo están implicadas en el crecimiento y ciclo celular (Pederson 1998; Carmo-Fonseca *et al.* 2000; Olson *et al.* 2000), y la interacción de proteínas virales con estas proteínas nucleolares podría explicar su presencia en el nucléolo y el uso de funciones nucleolares que dirigen alteraciones en la transcripción celular y la alteración del ciclo celular, que facilitan la replicación viral. Debido a nuestras observaciones sobre la localización nucleolar y en CBs de la proteína 2b hemos analizado de modo preliminar una potencial interacción de la misma con las proteínas nucleares coilina, fibrilarina y nucleolina, que también se encuentran en el nucléolo y los CBs, mediante BiFC.

Aún no se conoce la función de la coilina, que se ha relacionado con la formación de los CBs (Isaac *et al.* 1998; Hebert y Matera 2000; Semashko *et al.* 2012b) y unes ácidos nucleicos (Bellini y Gall 1998). Los niveles de coilina determinan el tamaño (Collier *et al.* 2006) y número de los CBs (Shpargel *et al.* 2003), y su presencia es necesaria en su formación en *A. thaliana*, aunque no es esencial en la supervivencia de la planta (Collier *et al.* 2006). Boudonck y colaboradores (1999) han especulado que esta proteína tenga función de transporte, y también Bellini y Gall (1999) propusieron que,

en asociación con la fibrilarina, podrían formar parte de un sistema de transporte entre citoplasma y núcleo que involucre el citoplasma, nucléolo y CBs.

La fibrilarina es una proteína muy conservada evolutivamente (Reichow *et al.* 2007) que se ha relacionado con el procesamiento de RNA ribosómico. Contiene un dominio terminal amino rico en glicina y arginina (*glycine- and arginine-rich domain*, GAR), con cargas positivas, con el que interacciona con otras proteínas celulares (Nicol *et al.* 2000; Jones *et al.* 2001) y virales (Yoo *et al.* 2003; Kim *et al.* 2007); y otras regiones de unión a RNAs (Rakitina *et al.* 2011). La interacción con fibrilarina podría ser una propiedad común a varias proteínas virales en diferentes grupos taxonómicos: se ha observado su interacción con algunas proteínas de virus animales como la nucleocápsida del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV) (Chen *et al.* 2000; Hiscox 2002; Yoo *et al.* 2003; Hiscox 2007), aunque se desconoce su papel en las infecciones. También se ha observado su interacción con factores de virus de plantas que podrían utilizar la fibrilarina en el movimiento viral, el ensamblaje de ribonucleoproteínas (*ribonucleoproteins*, RNPs), y probablemente para combatir las defensas del huésped (Taliensky *et al.* 2010). Varios ejemplos son la interacción con la proteína multifuncional VPg del virus A de la patata (*Potato virus A*, PVA) (Rajamaki y Valkonen 2009) o con la proteína ORF3 del virus de la roseta del cacahuete (*Groundnut rosette virus*, GRV), cuyo ciclo incluye una fase en el nucléolo en que participan los CBs. En este último caso la interacción participa en la formación de RNPs y es indispensable para la propagación viral a larga distancia en la planta (Kim *et al.* 2007).

La nucleolina también contiene un dominio GAR y un motivo de unión a RNA (Lapeyre *et al.* 1987). Se cree que los *Adenovirus* podrían afectar al nucléolo porque es allí donde se da la biogénesis de rRNA, y su interrupción podría liberar recursos para la biogénesis de mRNA de *Adenovirus* (Matthews 2001). Chen y colaboradores (2002) han documentado la interacción de la proteína N del virus de la bronquitis infecciosa (*Infectious bronchitis virus*, IBV), con la fibrilarina y la nucleolina; y Shimakami y colaboradores (2006) han informado de su interacción de la proteína no estructural NS5B del virus animal de la hepatitis C (*Hepatitis C virus*, HCV), indispensable en la replicación viral. Se ha documentado la redistribución de la fibrilarina hacia el

citoplasma consecuencia de la infección viral de *Coronavirus* (Chen *et al.* 2002) y *Adenovirus* (Puvium-Dutilleul y Christensen 1993), aunque aún no se conoce la razón de esta redistribución, también documentada en la nucleolina en infecciones con virus animales (Waggoner y Sarnow 1998; Matthews 2001). Yang y colaboradores (1994) piensan que esta redistribución podría evitar la interferencia de la proteína con la replicación viral, ya que actúa como represor de la transcripción.

#### **1.4.4. Estructura de la forma funcional de la proteína 2b**

Se ha caracterizado la estructura de varias proteínas supresoras de silenciamiento y se ha visto que muchas de ellas actúan formando parte de complejos o agregados, estables o transitorios, necesarios para su acción funcional. Estos agregados pueden estar formados por dos o más proteínas iguales, formando homodímeros como la proteína P19 de *Tombusvirus*, que secuestra siRNAs de 21 nts de doble cadena evitando que se unan al complejo RISC (Vargason *et al.* 2003; Ye *et al.* 2003) o la proteína NS3 del virus hoja blanca del arroz (*Rice hoja blanca virus*, RHBV) que también forma dímeros que unen siRNAs (Yang *et al.* 2011). Algunos supresores de silenciamiento pueden unir dsRNAs o RNAs largos (Mérai *et al.* 2006) como la proteína B2 de FHV, que forma un dímero que une dsRNA, evitando tanto la formación de siRNAs como su unión a RISC (Chao *et al.* 2005; Lingel *et al.* 2005). Incluso se pueden formar estructuras más complejas, como los dímeros de dímeros (tetrámeros) observados por cristalografía en la proteína 2b de TAV, que unen *in vitro* RNAs de doble cadena (Chen *et al.* 2008). En este caso primero se forman dímeros que unen siRNA y éstos se asocian en tetrámeros por uniones de hidrógeno y una cremallera de leucinas en el dominio terminal amino de la proteína (Rashid *et al.* 2008, Chen *et al.* 2008). Recientemente Dong y colaboradores (2015) han informado de la formación no sólo de tetrámeros sino de oligómeros de mayor tamaño en la cepa Fny de CMV. Otras estructuras complejas observadas son las de la proteína P21 de BYV, que forma un anillo de ocho proteínas cuyo interior alberga cargas positivas que interaccionan con el RNA (Ye y Patel 2005).

No se había visualizado *in vivo* la formación de ninguno de estos estos complejos previamente al desarrollo de esta tesis. Hamera y colaboradores (2012) observaron

que tanto los dímeros como los tetrámeros de 2b unen sRNAs con semejante afinidad, aunque encontraron que los tetrámeros unían preferentemente los sRNAs, comparados con los dímeros. Aunque también se podría interpretar sus resultados de otro modo, y es que en presencia de sRNAs las proteínas 2b tienen a tetramerizar, como observaron Chen y colaboradores (2008) en TAV, por lo que se encuentra más sRNAs unidos a tetrámeros que a dímeros. Xu y colaboradores (2013) mostraron, en la cepa Fny (subgrupo IA) de CMV, que la formación de dímeros de 2b era necesaria en la actividad supresora de silenciamiento de la proteína y la inducción de síntomas en *Nicotiana*, y que la mutación puntual del aa<sup>55</sup> en esta cepa inhibía la formación de dímeros de 2b. Dong y colaboradores (2015) informaron recientemente de que las mutaciones puntuales de los aa<sup>15</sup> y aa<sup>18</sup> de 2b en esta cepa, que forman parte de la correspondiente cremallera de leucinas en TAV (Chen *et al.* 2008), inhiben la formación de tetrámeros de 2b y la unión a siRNAs, y mostraron que la formación de dímeros de 2b es necesaria, pero no suficiente, para la actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b, en concordancia con nuestros resultados. Como se ha observado en varios estudios, la cepa Q (subgrupo II) de CMV tiene poco efecto en las funciones del miRNA en plantas transgénicas, probablemente por la inestabilidad o deficiencia de los dominios involucrados en esta actividad (Lewsey *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2006b); mientras que la cepa Fny (subgrupo IA) es muy estable e interrumpe las funciones del miRNA (Lewsey *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2006b), y los resultados de Dong y colaboradores (2015) indican que la cepa Q, cuyo aa<sup>18</sup> contiene un residuo diferente al de cepa Fny y tiene poca eficiencia en la unión a siRNAs, no forma tetrámeros, y han sugerido una relación entre ambos hechos, aunque sin poder establecer una relación causal.





## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



A pesar de su pequeño tamaño, la proteína 2b de *Cucumovirus* presenta propiedades tales como a) su interacción con proteínas celulares de la ruta de silenciamiento como AGO1, suprimiendo su actividad catalítica (Zhang *et al.* 2006b, Duan *et al.* 2012) y AGO4 (Hamera *et al.* 2012), y b) su unión a siRNAs, que puede incluso traslocar al núcleo y nucléolo (Kanazawa *et al.* 2011) y a través de cuyo secuestro podría inhibir el PTGS antiviral, como se ha visto en otros supresores de silenciamiento. A través de estas interacciones realiza sus funciones como supresor del silenciamiento de RNA inducido por siRNAs y de la metilación de DNA dependiente de RNA (Duan *et al.* 2012), siendo un determinante de virulencia viral (Shi *et al.* 2002); y suprime la dispersión de silenciamiento célula-célula (Guo y Ding 2002; Nemes *et al.* 2014) y a larga distancia (Ham *et al.* 1999).

Los estudios iniciales habían asociado la localización nuclear de la proteína con su actividad como determinante de patogenicidad. Sin embargo, estudios posteriores, entre ellos los nuestros, han demostrado que la acumulación de la proteína 2b en el núcleo no es suficiente para que ésta presente actividad supresora de silenciamiento de RNA, y se ha propuesto que las regiones de la proteína que contienen las NLSs tienen otro papel además de intervenir en el transporte de la proteína al núcleo, como es la unión a RNAs (Wang *et al.* 2004). Otras líneas de investigación han sugerido que el mecanismo de actuación de la proteína 2b de CMV es mediado por su interacción con proteínas AGO (Zhang *et al.* 2006b; Hamera *et al.* 2012; Duan *et al.* 2012; Feng *et al.* 2013), bloqueando su actividad o inhibiendo su expresión (Ye *et al.* 2009). Las interacciones de algunas proteínas virales con proteínas vegetales son importantes en el curso de una infección viral, aunque aún se sabe poco de las interacciones de proteínas supresoras con proteínas del huésped. Al inicio de este trabajo no se había visualizado *in vivo* la interacción de la proteína 2b con las proteínas AGO, ni estaba claro qué dominios de la proteína determinaban estas actividades o cómo contribuían a la supresión de silenciamiento. En cuanto a la estructura del supresor de silenciamiento 2b, Chen y colaboradores (2008) habían mostrado por cristalografía que la proteína ortóloga de TAV formaba dímeros y tetrámeros y que estos complejos unían *in vitro* RNAs de doble cadena, pero no se había visualizado *in vivo* la formación de dímeros o estructuras más complejas en CMV. Otras líneas de investigación se

habían centrado más en la unión de la proteína 2b a siRNAs y miRNAs, y los síntomas desarrollados en plantas infectadas con CMV hicieron pensar que algunos de los efectos observados se debían a la inhibición de las rutas de miRNAs (Zhang *et al.* 2006a; Du *et al.* 2014b), pero al inicio de este trabajo tampoco se habían estudiado comparativamente las cinéticas de dichas uniones a diferentes tipos de RNAs o utilizado diferentes proteínas mutantes de función en dichos estudios.

Por todo ello al comienzo de nuestro estudio nos encontramos con preguntas acerca del modo de acción *in vivo* de la proteína 2b de CMV en su función supresora, tales como si era necesaria o no su presencia nuclear para la actividad supresora de silenciamiento; si su actividad en la supresión de silenciamiento estaba relacionada con la unión y secuestro de RNAs de las rutas del silenciamiento; o si su actividad estaba más relacionada con la interacción con proteínas de la ruta de silenciamiento, sin olvidarnos de que nos encontrábamos con una proteína con un mecanismo de acción potencialmente múltiple. Junto con estas preguntas surgieron otras durante el desarrollo de la tesis, como intentar esclarecer el papel que cumple la proteína 2b en el nucléolo y si potencialmente podría interactuar con proteínas nucleares.

Teniendo en cuenta estas premisas y el estado de conocimiento del tema en el momento de iniciar esta tesis doctoral, nuestros objetivos principales fueron:

1. Estudiar el efecto que generan diversas mutaciones y la fusión a distintos genes, reporteros o de otro tipo, en la actividad supresora de silenciamiento de la proteína, visualizar la localización subcelular de la proteína 2b y la de una batería de mutantes *in vivo* en un sistema libre de virus, y establecer si existe relación entre una localización subcelular determinada y la actividad supresora de silenciamiento de la proteína.
2. Visualizar *in vivo* la formación y localización de homodímeros de la proteína 2b y de heterodímeros con los efectores de RISC AGO1 y AGO4, y determinar si las alteraciones que afectan a la actividad supresora de la proteína guardan alguna relación con estas interacciones.
3. Caracterizar la unión *in vitro* de la proteína 2b a diversos tipos de RNAs y las características de sus cinéticas de unión y determinar, mediante el uso de una batería

de mutantes, si la unión a determinados tipos de RNAs correlaciona con la actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b de CMV, y qué dominios o motivos de 2b determinan esta capacidad.

4. Visualizar potenciales interacciones *in vivo* entre la proteína 2b y proteínas nucleares que pudieran ser funcionalmente relevantes.

5. Relacionar los resultados de las diversas aproximaciones seguidas para el estudio de la proteína 2b: de biología celular *in vivo* con construcciones fluorescentes; de los estudios *in vitro* con diversos tipos de RNAs; de actividades funcionales en ensayos biológicos de supresión del silenciamiento *in planta*, y establecer las conclusiones pertinentes.

Nuestro trabajo ha intentado contribuir a clarificar la relación entre la actividad supresora de silenciamiento de RNA, la localización subcelular de la proteína, la interacción con proteínas Argonauta, la unión a siRNAs y una potencial interacción de la proteína con ciertas proteínas nucleares. La mayor parte de los resultados presentados en esta tesis se han publicado en los artículos en revistas de alto impacto González *et al.* 2010. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 23, 294; y González *et al.* 2012. *RNA*. 18, 771.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**





## **3.1. Material biológico**

### **3.1.1. Plantas**

Se utilizaron plantas de la especie *Nicotiana benthamiana*. Las plantas se cultivaron en cámara de ambiente controlado en condiciones óptimas de crecimiento, a 22-24°C, con humedad relativa de 60-75% y fotoperiodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. Como sustrato se empleó una mezcla de tierra vegetal y vermiculita en proporción 2:1.

### **3.1.2. Cepa Fny de CMV**

Se utilizó la cepa Fny de CMV perteneciente al subgrupo IA (Roossinck *et al.* 1999). El gen correspondiente a la proteína 2b de CMV Fny con número de acceso de GenBank D00355 se clonó a partir del vector pFny209 (Rizzo y Palukaitis 1990). Su secuencia nucleotídica y peptídica se puede consultar en la Fig. 7.

### **3.1.3. Cultivos bacterianos**

Según el fin del cultivo bacteriano, se utilizaron bacterias de la especie *Escherichia coli* de las estirpes DH5 $\alpha$ , XL1-Blue y JM109. Estas tres estirpes pueden acumular DNA plasmídico con alta calidad para su aislamiento y análisis posteriores (Taylor *et al.* 1993). Además, se utilizó la especie *Agrobacterium tumefaciens* desarmada, estirpe C58C1. Las células electrocompetentes de estas bacterias fueron preparadas en el propio laboratorio a partir de un inóculo conservado en glicerol. Se transformaron las mismas por electroporación.

*E. coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan 1985) permite amplificar DNA plasmídico. *E. coli* XL-1 Blue (Bullock *et al.* 1987) se utilizó para amplificar el DNA plasmídico derivado de plásmidos pQE30, ya que éste plásmido resulta tóxico para bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Finalmente *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron *et al.* 1985) se utilizó para la expresión de proteínas 2b y mutantes en bacteria. Los cultivos se crecieron en fase exponencial a 37°C, con agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm).

*A. tumefaciens* C58C1 se utilizó para agroinfiltrar plantas. La agroinfiltración es un método para conseguir la expresión transitoria de genes en tejidos de planta. El método se basa en inyectar en las hojas una suspensión de *Agrobacterium* conteniendo plásmidos binarios con los genes a expresar en la región del DNA de transferencia (*transfer DNA*, T-DNA). Los cultivos se crecieron en fase exponencial a 28°C, con agitación a 220 rpm durante dos días.

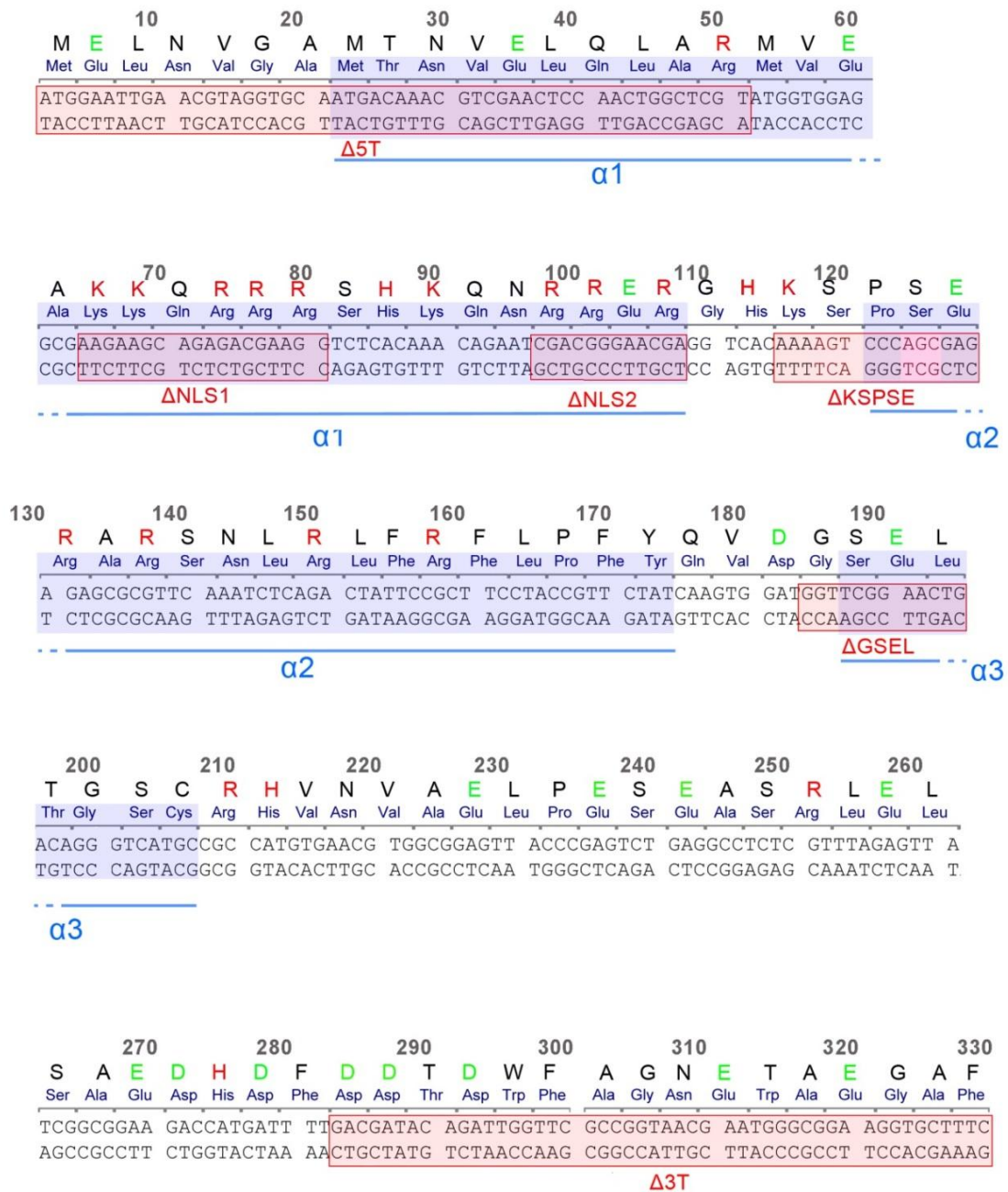


Fig. 7: Secuencia del gen *2b* y secuencia peptídica de la proteína *2b* de la cepa *Fny* de *CMV*. Sombreado en azul, alfa-hélices ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) de la proteína *2b*. Sombreado en rojo, deleciones de las proteínas mutantes. Las letras rojas representan aminoácidos con carga positiva, y las letras verdes representan aminoácidos con carga negativa en la proteína. Los números indican los nucleótidos en la secuencia del gen.

## 3.2. Clonaje de las construcciones plasmídicas

### 3.2.1. Mutantes de la proteína 2b de la cepa Fny de CMV

Se utilizó la proteína 2b de la cepa Fny de CMV y nueve mutantes que presentaron, como se muestra en la Tabla 1 y Fig. 8, deleciones en los dominios amino y carboxilo (CMV2bΔ5T y CMV2bΔ3T, respectivamente), en una o ambas NLSs (CMV2bΔNLS1, CMV2bΔNLS2 y CMV2bΔNLS1+2), en el supuesto motivo de fosforilación (CMV2bΔKSPSE) y en un dominio relacionado con la inhibición de la transcripción de AGO4 (CMV2bΔGSEL) por Ye y colaboradores (2009). Además, se utilizaron dos mutantes por sustitución puntual de Serina por Alanina en los aa S<sup>40</sup> y S<sup>42</sup> (CMV2bS40A y CMV2bS42A), dentro del supuesto motivo de fosforilación.

Tabla 1: Resumen de los aminoácidos (aas) afectados por las mutaciones en la proteína 2b de la cepa Fny de CMV con número de acceso de GenBank D00355. El gen *2b* se clonó a partir del vector infeccioso pFny209 correspondiente al RNA 2 del virus (Rizzo y Palukaitis 1990). Se generaron una serie de mutantes en diferentes puntos de la proteína de estudio, por deleción de los nucleótidos (nts) del RNA2 de CMV indicados en la tabla. ML: Mutantes procedentes del grupo del Prof. John Carr (Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EA, UK) en forma de plásmido F209 con las mutaciones correspondientes. IG: mutantes clonados en el laboratorio del Dr. Tomás Canto (Grupo "Interacciones moleculares planta/virus/vector" del CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid). ML/IG: mutantes utilizados por ML en estudios previos y clonados de nuevo en el laboratorio del Dr. Tomás Canto.

CMV	Proteína Nativa	RNA 2 de la cepa Fny de CMV
CMV2bΔ5T (ML/IG)	Deleción de aas 1 a 17	nts 2419 a 2469
CMV2bΔNLS1 (ML)	Deleción de aas 22 a 27	nts 2482 a 2499
CMV2bΔNLS2 (ML)	Deleción de aas 33 a 36	nts 2515 a 2526
CMV2bΔNLS1+2 (ML)	Deleción de aas 22 a 27 y 33 a 36	nts 2482 a 2499 y 2515 a 2526
CMV2bΔKSPSE (ML)	Deleción de aas 39 a 43	nts 2533 a 2547
CMV2bS40A (ML)	Sustitución de aa <sup>40</sup> : Serina por Alanina	nts 2535 a 2537 sustitución de AG por GC
CMV2bS42A (ML)	Sustitución de aa <sup>42</sup> : Serina por Alanina	nts 2542 a 2543 sustitución de AG por GC
CMV2bΔGSEL (IG)	Deleción de aas 62 a 65	nts 2602 a 2613
CMV2bΔ3T (ML/IG)	Deleción de aas 95 a 110	nts 2701 a 2748

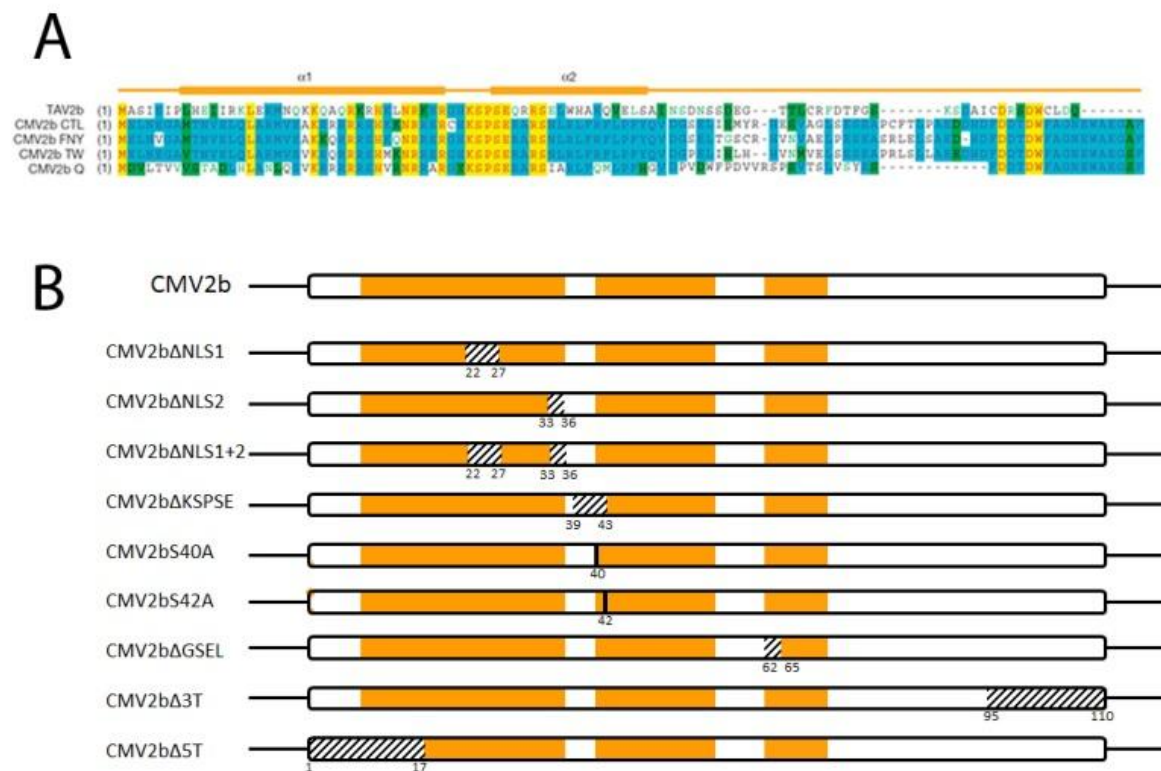


Fig. 8. Representación esquemática de la proteína 2b de CMV y de los mutantes utilizados. A, se muestra la secuencia proteica de la proteína 2b de la cepa Fny de CMV comparada con la secuencia de otras proteínas 2b (adaptado de Chen *et al.* 2008). B, esquema de la proteína 2b de CMV ilustrando la presencia de regiones con estructura de alfa hélices, sombreado en naranja; con la distribución de las deleciones, rayado; y mutaciones puntuales, marcadas en negro, de los mutantes utilizados en este estudio.

### 3.2.2. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) se realizó empleando como molde preparaciones de DNA plasmídico (0,1-0.5 µg). La mezcla de reacción se ajustó a 50 µl, en tampón HF (Finnzymes) con una concentración final de 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, en presencia de oligonucleótidos específicos para el fragmento que se deseaba amplificar (ver Anexo II) a concentración final 1,3 µM cada uno, mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega. Cat. U120A a U123A) a concentración final 0.2 mM cada uno y 2 unidades de enzima termoestable Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes. Cat. F-530L). El número y condiciones de los ciclos de amplificación

variaron en función de los oligonucleótidos utilizados y el tamaño del fragmento a amplificar. La reacción se realizó en termociclador (Thermal Cycler 2720. Applied Biosystems).

### **3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Agarose D2. Pronadisa. Cat. 8034) al 1% en tampón Tris-Acetato EDTA (*Tris acetate-EDTA*, TAE) pH 8, conteniendo bromuro de etidio (BrEt; Sigma Aldrich. Cat. E-8751). La electroforesis se llevó a cabo a 100-120 V hasta la correcta separación y diferenciación de la bandas de ácidos nucleicos. Los geles se visualizaron por transiluminación con luz ultravioleta (UV) en Transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR (BIO-RAD). Como marcador de peso molecular se utilizó 1 kb DNA Ladder (Promega. Cat. G5711) y marcador de carga Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega. Cat. G190A).

En experimentos de unión de RNA a proteína la electroforesis se realizó en geles de agarosa al 2% en tampón Tris-Acetato (*Tris acetate*, TA) pH 8, conteniendo BrEt. La electroforesis se llevó a cabo a 110 V durante 11 minutos, lo que permite que el RNA libre se introduzca en el gel aproximadamente un centímetro, suficiente para su visualización y cuantificación. Como marcador de peso molecular y control negativo se utilizó el sRNA conveniente en cada gel. Los geles se visualizaron con el transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR (BIO-RAD). Se tomaron imágenes digitales para su posterior cuantificación.

### **3.2.4. Clonaje en plásmidos binarios pROK2**

Para la expresión transitoria en plantas, clonamos la proteína 2b de la cepa Fny de CMV en el vector binario Ti, pROK2 (Baulcombe *et al.* 1986). El plásmido pROK2 es un derivado del vector binario pBin19 (Bevan 1984). pROK2 es un vector grande (12.8 Kb) que consta de un *cassete* de expresión con el promotor 35S de CaMV, un sitio múltiple de clonaje (*multiple cloning site*, MCS) y el fragmento terminador del gen de la nopalina sintasa del T-DNA de *Agrobacterium* (*Nopaline synthase terminator*, NOS TERM).

Se digirió el plásmido y el fragmento a clonar, proveniente de PCR o por digestión previa de otro clon, en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l, en presencia de albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA). Se adecuaron las condiciones de digestión a las enzimas utilizadas, realizándose digestiones secuenciales en aquellos casos en que las condiciones requeridas para el correcto funcionamiento de las enzimas eran incompatibles. Tras la digestión se trataron los plásmidos con Fosfatasa Alcalina FastAP (Fermentas. Cat. EF0651), según las instrucciones del fabricante, para evitar su recircularización y se precipitaron y lavaron los ácidos nucleicos, resuspendiéndolos en 15  $\mu$ l. Este volumen se cargó en un gel de agarosa 1% en tampón TAE y se separaron las bandas por electroforesis. Se tomaron del gel aquellas bandas que correspondían al plásmido y a los fragmentos digeridos y se extrajeron del mismo con Qiaex II Gel Extraction Kit (QIAGEN. Cat. 20021). En este procedimiento, al añadir la solución QX1 y disolver la banda del gel de agarosa, se puso en contacto el plásmido y fragmento requeridos para cada construcción, anterior a la adición de la resina (QIAEX II suspension) del kit. Se continuó según las instrucciones del fabricante, seguido de precipitación y lavado de los ácidos nucleicos. Finalmente se resuspendieron los ácidos nucleicos en 15  $\mu$ l de mezcla de reacción de ligación. La ligación se llevó a cabo a 16°C durante toda la noche con T4 DNA Ligasa (PROMEGA. Cat. M180A). El producto de la ligación se utilizó para transformar *E. coli*.

Anteriormente se había clonado la proteína 2b de CMV Fny en pROK2, construcción pROK-2b (Canto *et al.* 2002). Contábamos además, con las construcciones pROK-mRFP y pROK-GFP que expresaban la proteína fluorescente roja (*monomeric red fluorescent protein 1*, mRFP1) (Shaner *et al.* 2004) y verde (*green fluorescent protein*, GFP) (Canto *et al.* 2002), respectivamente. La proteína 2b se amplificó por PCR (oligonucleótidos 79 y 97, ver Anexo II) y se clonó usando las enzimas de restricción Bam HI y Sac I, en los extremos 5' y 3' respectivamente, generando las construcciones pROK-2b-mRFP y pROK-GFP-2b. Todas las construcciones marcadas con GFP contienen una variante de GFP con fluorescencia desplazada al rojo (Tu65; Clontech) que no es visible bajo la lámpara UV (Black Ray, UVP). Además, se clonó 2b en un plásmido pROK que contenía el péptido hemaglutinina (*Hemagglutinin*, HA) de la hemaglutinina del virus de la gripe, para generar la construcción pROK-2b-HA.



Para generar los vectores para complementación bimolecular fluorescente (*bimolecular fluorescence complementation*, BiFC) basados en pROK2, se utilizaron las mitades amino y carboxilo de la proteína fluorescente amarilla (*splits yellow fluorescent protein*, sYFP; sYFPN y sYFPC, respectivamente): sYFPN, aas 1 a 154 y sYFPC, aas 155 a 238 (Bracha-Drori *et al.* 2004). Se generaron así las construcciones pROK-sYFPN y pROK-sYFPC. La proteína 2b y los mutantes utilizados (todas las construcciones sin el péptido HA) se clonaron en estos vectores con las enzimas de restricción Bam HI y Sac I en extremos 5' y 3', respectivamente (ver Anexo III). Con esto generamos las construcciones pROK-sYFPN-2b y pROK-sYFPC-2b.

Del mismo modo que con la proteína nativa, los mutantes de la proteína 2b utilizados se amplificaron mediante PCR a partir de clones infectivos que contenían los cDNAs mutantes del RNA 2 de Fny de CMV (Fny-CMV $\Delta$ NLS1, Fny-CMV $\Delta$ NLS2, Fny-CMV $\Delta$ NLS1+2, Fny-CMVS40A, Fny-CMVS42A), amablemente donados por Mathew Lewsey (Lewsey *et al.* 2009) del grupo del Prof. John Carr. Generamos así las construcciones en pROK2: pROK-2b $\Delta$ NLS1, pROK-2b $\Delta$ NLS2, pROK-2b $\Delta$ NLS1+2, pROK-2b $\Delta$ KSPSE, pROK-2bS40A, pROK-2bS42A; en pROK-GFP: pROK-GFP-2b $\Delta$ NLS1, pROK-GFP-2b $\Delta$ NLS2, pROK-GFP-2b $\Delta$ NLS1+2, pROK-GFP-2b $\Delta$ KSPSE, pROK-GFP-2bS40A, pROK-GFP-2bS42A; en pROK con el péptido HA en el extremo 3' de la secuencia del gen de 2b: pROK-2b $\Delta$ NLS1-HA, pROK-2b $\Delta$ NLS2-HA, pROK-2b $\Delta$ NLS1+2-HA, pROK-2b $\Delta$ KSPSE-HA, pROK-2bS40A-HA, pROK-2bS42A-HA; y en pROK a continuación de las mitades amino y carboxilo de la proteína YFP: pROK-sYFPN-2b $\Delta$ NLS1, pROK-sYFPN-2b $\Delta$ NLS2, pROK-sYFPN-2b $\Delta$ NLS1+2, pROK-sYFPN-2b $\Delta$ KSPSE, pROK-sYFPN-2bS40A, pROK-sYFPN-2bS42A; y pROK-sYFPC-2b $\Delta$ NLS1, pROK-sYFPC-2b $\Delta$ NLS2, pROK-sYFPC-2b $\Delta$ NLS1+2, pROK-sYFPC-2b $\Delta$ KSPSE, pROK-sYFPC-2bS40A, pROK-sYFPC-2bS42A).

Para generar el mutante 2b $\Delta$ GSEL, se amplificaron por PCR las secuencias que flanquean el fragmento GSEL a deleccionar de la proteína 2b con los oligonucleótidos 245 y 325 (ver Anexo II), y se purificaron, seguido de acción con kinasa y ligación con T4 DNA ligasa (PROMEGA. Cat. M180A). El resultado de la ligación se utilizó como molde de PCR con los oligonucleótidos 79 y 97 (ver Anexo II), correspondientes a los extremos de la secuencia de 2b, con las dianas de restricción Bam HI y Sac I. El fragmento resultante de esta PCR se digirió con las enzimas apropiadas para clonarlo

en los plásmidos pROK2, pROK-GFP, pROK-sYFPN y pROK-sYFPC, pROK-HA y pQE30. Obtuvimos así las construcciones pROK-2bΔGSEL, pROK-GFP-2bΔGSEL, pROK-sYFPN-2bΔGSEL y pROK-sYFPC-2bΔGSEL, pROK-2bΔGSEL-HA y pQE-2bΔGSEL-HA. Para sustituir la proteína nativa en pF209 por 2bΔGSEL, se utilizó una aproximación semejante.

Las proteínas mutantes 2bΔ5T y 2bΔ3T, con deleciones en los extremos 5' y 3' del gen, se generaron por PCR con los pares de oligonucleótidos 285 y 357, y 79 y 358, respectivamente. Los fragmentos resultantes se digirieron con las enzimas apropiadas para clonarlos en pROK2, pROK-GFP, pROK-sYFPN y pROK-sYFPC, pROK-HA y pQE30. Así obtuvimos las construcciones pROK-2bΔ5T y pROK-2bΔ3T, pROK-GFP-2bΔ5T y pROK-GFP-2bΔ3T, pROK-sYFPN-2bΔ5T y pROK-sYFPC-2bΔ5T, pROK-sYFPN-2bΔ3T y pROK-sYFPC-2bΔ3T, y pQE-2bΔ5T y pQE-2bΔ3T.

También utilizamos una construcción de pROK2 que expresa la proteína fibrilarina fusionada a mRFP (pROK-Fib-mRFP) (Kim *et al.* 2007), donada amablemente por M. Taliansky y S.-H. Kim (The James Hutton Institute, Dundee, Reino Unido). Y se clonaron las proteínas coilina y nucleolina de *A. thaliana* y fibrilarina de *N. benthamiana* en los plásmidos pROK-GFP y pROK-sYFPN y pROK-sYFPC. Inicialmente se clonaron en un plásmido psk, de alto número de copias, y de éste se traspasaron a los plásmidos pROK. A partir de cDNA de *Arabidopsis* se amplificó la coilina con los oligonucleótidos 312 y 314, y la nucleolina con los oligonucleótidos 322 y 323. La fibrilarina de *N. benthamiana* se amplificó a partir del plásmido pROK-Fib-mRFP con los oligonucleótidos 309 y 311. El fragmento resultante de coilina se clonó en el plásmido psk con las enzimas de restricción Kpn I y Sac I en extremos 5' y 3', y el resultante de la nucleolina con las enzimas de restricción Bam HI y Kpn I en los extremos 5' y 3', respectivamente (ver Anexo III). El fragmento resultante de la fibrilarina se clonó en el plásmido psk con las enzimas de restricción Bam HI y Sac I en los extremos 5' y 3', respectivamente. Con esto generamos las construcciones psk-coilina, psk-nucleolina y psk-fibrilarina. Posteriormente se digirieron los fragmentos de coilina, fibrilarina y nucleolina a partir de estos plásmidos y se clonaron en los plásmidos pROK-GFP, pROK-sYFPN y pROK-sYFPC con las enzimas de restricción Kpn I y Sac I para la construcción pROK-GFP-coilina, pROK-sYFPN-coilina y pROK-sYFPC-coilina; las enzimas de restricción Bam HI y Kpn I para las construcciones pROK-GFP-nucleolina, pROK-sYFPN-nucleolina y

pROK-sYFPC-nucleolina; y las enzimas de restricción Bam HI y Sac I para las construcciones pROK-GFP-fibrilarina, pROK-sYFPN-fibrilarina y pROK-sYFPC-fibrilarina.

Para aportar una señal de exportación Nuclear (*nuclear export signal*, NES) a la proteína 2b, se tomó la NES de la proteína inhibidora de kinasa (*protein kinase inhibitor*, PKI), con secuencia peptídica Asn-Glu-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-Asn-Lys-Thr-Ala (Wen *et al.* 1995). Se amplificó con los oligonucleótidos 333 y 334 (Ver Anexo II) que añadieron, en extremo 5' un ATG (codón metionina) con diana de restricción Nhe I, y en el extremo 3' la diana de Xba I. Tras digerir el producto de PCR con ambas enzimas, se clonó el fragmento de PCR conteniendo NES en las construcciones pROK-GFP-2b y pROK-GFP-2bΔKSPSE linearizadas con Xba I, generando respectivamente los plásmidos pROK-NES-GFP-2b y pROK-NES-GFP-2bΔKSPSE. Posteriormente en este plásmido, se eliminó el segundo ATG correspondiente a la primera metionina de la GFP, para evitar la iniciación interna de la traducción por ribosomas en el RNA mensajero, ya que se observó que a partir de pROK-NES-GFP-2b se expresaban las proteínas NES-GFP-2b y GFP2b (datos no mostrados).

Para ello, se realizó una PCR de GFP-2b eliminando el ATG inicial a partir de NES-GFP-2b con los oligonucleótidos 289 y 410 (ver Anexo II). A continuación se clonó pROK-NES-GFP2b y el resultado de la PCR digeridos con las enzimas Xba I y Bam HI, con lo que se sustituye el GFP con ATG inicial por GFP sin ATG inicial.

### **3.2.5. Clonaje en plásmidos pQE30**

El plásmido pQE30 (Qiagen) es un vector de expresión de proteínas pequeño, de 3.4 kilobases (kbs) que consta de un promotor T5, el operón *lac* inducible por Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*, IPTG), un fragmento correspondiente a 6 Histidinas (6xHis), MCS, región terminadora y resistencia a ampicilina (Fig. 9). Las histidinas quedan fusionadas al extremo amino de la proteína una vez expresada en bacteria y permiten la purificación de la misma por cromatografía de afinidad.

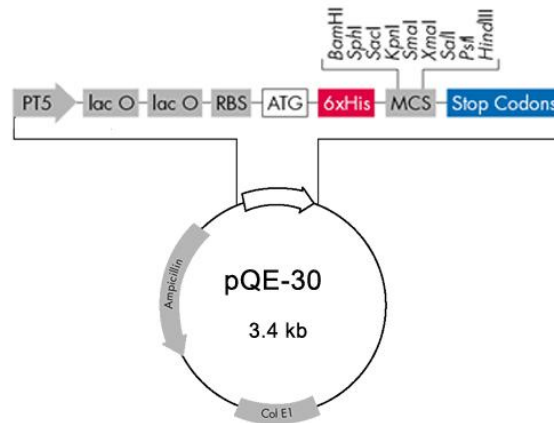


Fig. 9: Esquema del plásmido pQE30 utilizado para la expresión de la proteína 2b y mutantes en bacteria, una vez clonadas la proteína nativa y mutantes en el MCS.

Para la expresión de la proteína 2b de CMV y sus mutantes en *E. coli*, se realizó una PCR a partir de pF209 y pF209 conteniendo las mutaciones (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL, 2b $\Delta$ 5T y 2b $\Delta$ 3T) con los oligonucleótidos 79 y 285 (ver Anexo II). El primero añade la diana de restricción Bam HI y el segundo añade el péptido HA y la diana de restricción Sac I. Se digirieron el plásmido y fragmentos correspondientes a 2b-HA nativo y 2b-HA mutantes, con Bam HI y Sac I y se ligaron con pQE30. Generamos así las construcciones pQE-6xHis-2b-HA y los diferentes pQE-6xHis-2b-HA mutantes

### 3.2.6. Transformación de bacterias

Para introducir las construcciones plasmídicas en las bacterias, se partió de células competentes. La técnica empleada fue electroporación. En este caso se somete a las bacterias a un campo eléctrico que desestabiliza las estructuras de membrana. Durante este proceso se inducen poros temporales por los que el DNA puede entrar en las bacterias.

Se utilizaron cubetas Bio-Rad de paso óptico de 0.2 cm (Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes BIO-RAD. Cat. 165-2086). Para introducir las construcciones generadas en *E. coli* y *A. tumefaciens* se utilizó el electroporador MicroPulser™ (BIO-RAD).

Tras la electroporación se dejó las células una hora en medio de recuperación (medio de cultivo Luria Bertani, LB; 15mM MgCl<sub>2</sub>) y posteriormente se sembró en césped en placas de Petri con medio LB (bactotripton 10g/l, extracto de levadura 5g/l y NaCl 10g/l)/Agar en presencia de los antibióticos pertinentes en cada caso. Se dejó crecer *E. coli* 24h a 37°C; *A. tumefaciens* se dejó 48h a 28°C. Una vez crecidas las colonias, seleccionamos algunas de ellas y las crecimos en medio LB con antibióticos, *E. coli* a 37°C y *A. tumefaciens* a 28°C, con agitación 200 y 220 rpm, respectivamente.

### **3.2.7. Purificación de DNA plasmídico**

La purificación de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos de *E. coli*, estirpes DH5α y XL-1 Blue, crecidos en medio de cultivo en presencia del antibiótico adecuado a la cepa bacteriana y construcción que se quiere seleccionar. Para ello se cultivaron las bacterias conteniendo el plásmido de interés en 5 ml de medio LB con el antibiótico a 37°C y 200 rpm durante 24h. Se centrifugó los cultivos y, se purificó los plásmidos a partir del precipitado (*pellet*) haciendo *miniprep* con High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche. Cat. 11754777001).

### **3.2.8. Selección de clones y secuenciación**

Tras la digestión con las enzimas apropiadas, seleccionadas para cada construcción, se seleccionaron aquellos clones de la construcción cuyo patrón de digestión se correspondía con el esperado para la construcción de interés. Se secuenciaron estos resultados de *miniprep* en el servicio de secuenciación Secugen S.L.

Siguiendo las instrucciones de Secugen S.L., se mandó para la secuenciación un volumen de 15 µl de la muestra con concentración adecuada y 1,5 µl de oligonucleótidos a concentración 5 µM.

En el caso de plásmidos con bajo número de copia, como ocurre con el plásmido pROK2, es habitual una pobre secuenciación de la construcción. En estos casos se realizó una PCR previa a la secuenciación, con los mismos oligonucleótidos que se emplearían en la secuenciación, para amplificar el fragmento y poder secuenciarlo. Los clones en plásmidos psk se mandaron secuenciar con los oligos F17 y R19

proporcionados por el servicio de secuenciación Secugen S.L. (Anexo II); los clones en plásmidos pROK se mandaron secuenciar con los oligonucleótidos 327 y 328 (Anexo II); los clones en el plásmido pQE30 se mandaron secuenciar con los oligonucleótidos 329 y 330 (Anexo II); y el clon Fny2bΔGSEL se mandó secuenciar con los oligonucleótidos 79 y 97 (Anexo II).

### **3.3. Expresión transitoria de genes en tejidos vegetales mediante agroinfiltración**

La técnica de agroinfiltración permite expresar transitoriamente en planta proteínas nativas o modificadas, previamente clonadas en un vector de expresión. Este vector se introduce en una cepa desarmada de *Agrobacterium* que, en contacto con tejidos vegetales por infiltración sobre la propia hoja, introduce el segmento de interés en las células vegetales infectadas, donde se expresa transitoriamente la proteína de interés. Esto nos permite, por ejemplo, estudiar los efectos de una proteína aislada del entorno viral. La técnica de agroinfiltración y sus aplicaciones en expresión transitoria de genes y en ensayos de supresión del silenciamiento de un gen reportero por proteínas virales con actividades supresoras ha sido descrita y puesta a punto previamente (English *et al.* 1997; Voinnet *et al.* 1998; Johnsen y Carrington 2001; Canto *et al.* 2002).

#### **3.3.1. Crecimiento e inducción de cultivos de *Agrobacterium***

Para transferir las construcciones obtenidas en *E. coli* a *A. tumefaciens* se utilizó la técnica de electroporación con BIO-RAD MicroPulser™ de plásmidos purificados, como se ha descrito anteriormente en el punto 3.2.6. Tras el crecimiento de colonias en placa, se seleccionó una, redonda y aislada, y se dejó crecer en medio LB en presencia de los antibióticos pertinentes en un volumen de 2 ml durante 24 horas, tras lo cual se aumentó el cultivo a 5 ml y se dejó crecer 24 horas más. Las condiciones del cultivo fueron de 28°C, 220 rpm, como se ha descrito previamente.

### 3.3.2. Agroinfiltración de tejidos vegetales

Para expresar las construcciones de la proteína 2b y sus mutantes en *N. benthamiana*, transformamos una cepa desarmada de *A. tumefaciens*, C58C1 (van Larebeke *et al.* 1974), con los plásmidos binarios que contenían la construcción a expresar. Crecimos los cultivos de bacterias en medio LB con antibióticos a 28°C, hasta fase de crecimiento exponencial. Centrifugamos a baja velocidad para eliminar el medio de cultivo y resuspendimos los cultivos bacterianos en medio de inducción (10mM ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico [*morpholineethanesulfonic acid*, MES]; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 μM Acetosyringona) con una densidad óptica (*optical density*, OD) a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 0,2.

Tras una inducción de 2-3 horas a temperatura ambiente y sin agitación, infiltramos hojas de *N. benthamiana* completamente expandidas. Sobre la hoja, en el punto de infiltración, practicamos un pequeño orificio con una punta de pipeta pequeña y sobre ésta, presionamos con cuidado e infiltramos desde la superficie del envés de la hoja una porción de cultivo bacteriano inducido con acetosyringona, utilizando para ello jeringuillas de 1 ml, sin aguja (Fig. 10). El tejido infiltrado resultante tiene forma circular y un diámetro aproximado de 2 cm. En aquellos casos en que era necesario infiltrar más de una construcción en la misma en la misma infiltración, preparamos las mezclas de los cultivos que contenían las construcciones a infiltrar en medio de inducción (cada cultivo bacteriano a mezclar a una OD<sub>600</sub> final de 0,2) para su infiltración en las hojas.

De forma habitual infiltramos dos focos por hoja (izda. y dcha. de la hoja) y dos hojas por planta. Cada experimento se repitió al menos dos veces. Tras la infiltración, se esperó de 3 a 6 días para visualizar el resultado con lámpara UV o en microscopio confocal.

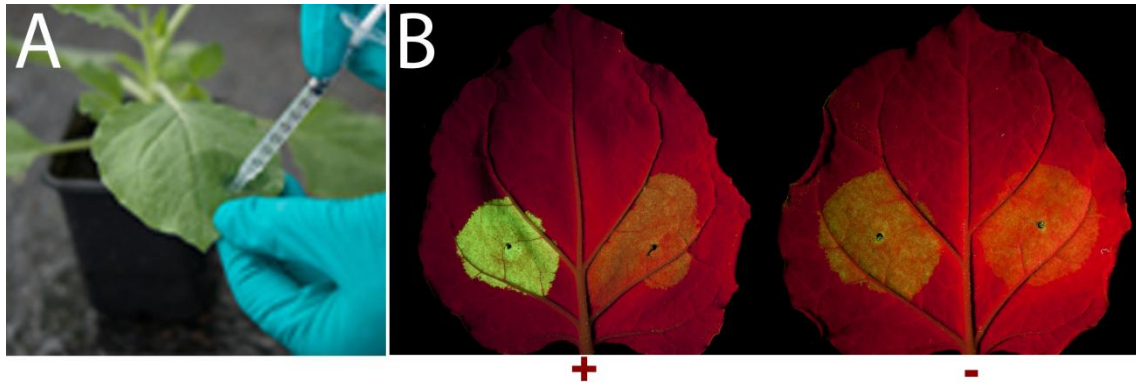


Fig. 10: Agroinfiltración de hojas completamente expandidas de *N. benthamiana*, A. Infiltración de hojas con suspensiones bacterianas inducidas de *Agrobacterium*, que contienen las construcciones de interés, con  $OD_{600} = 0,2$ . B. Observación de hojas agroinfiltradas con un vector que expresa la proteína fluorescente verde (GFP libre, eGFP), visible bajo luz UV, en presencia o ausencia del supresor de silenciamiento 2b de CMV. Lado derecho de las hojas, control, infiltrado con *Agrobacterium* que expresa eGFP junto con *Agrobacterium* que expresa el vector vacío pROK. Lado izquierdo de las hojas, infiltrado con *Agrobacterium* que expresa eGFP junto con la construcción que expresa la proteína 2b de CMV (hoja izquierda), y que expresa la proteína mutante 2b $\Delta$ NLS1, que carece de actividad supresora de silenciamiento, (hoja derecha). En presencia de un supresor de silenciamiento funcional, el disco infiltrado muestra mayor fluorescencia bajo iluminación UV.

### 3.4. Ensayos de actividad supresora de silenciamiento

La técnica de supresión de silenciamiento local o *agropatch assays*, nos permite chequear de una forma visual o mediante cuantificación de proteínas o transcritos en el disco infiltrado la actividad supresora de silenciamiento de una proteína o, carencia de actividad de la misma en dicho ensayo.

#### 3.4.1. Visualización de fluorescencia en tejidos vegetales

La técnica consiste en agroinfiltrar dos focos por hoja, a derecha e izquierda de la hoja, respectivamente, siguiendo el procedimiento expuesto anteriormente en el punto 3.2.2. En el foco izquierdo (cara abaxial de la hoja) pondremos un control negativo, que consiste en una mezcla de bacterias (*A. tumefaciens* C58C1) que contienen un plásmido vector que expresa una proteína fluorescente verde, eGFP libre, visible bajo luz UV; y bacterias que contienen el vector vacío que se ha utilizado en las construcciones a chequear (pROK2). El otro foco consiste en una mezcla de bacterias que expresan eGFP libre y bacterias que expresan la construcción que tenemos interés en comprobar su actividad (Fig. 10). El vector que expresa eGFP libre, visible bajo luz



UV ha sido donado amablemente por J. Cubero (INIA, Crta. de la Coruña, km 7,5 Madrid).

La expresión de GFP libre a partir de un vector binario es parcialmente silenciada por la planta, y bajo luz UV se ve de un tono verde apagado, que se hace más débil según pasan los días (Fig. 10 y Canto *et al.* 2002). Lo mismo ocurre al coinfiltrar dicha construcción junto con una construcción que no tiene actividad supresora de silenciamiento, como el vector vacío pROK2. Sin embargo, si se expresa junto con un vector que exprese una proteína con actividad supresora de silenciamiento, se suprime el silenciamiento del RNA mensajero expresado transitoriamente desde el T-DNA agroinfiltrado y se observa un incremento de la fluorescencia derivada de GFP bajo luz UV, de un verde brillante (Fig. 10B, hoja izda. lado izdo.). De 3 a 6 días postagroinfiltración (dpi), observamos las hojas y fotografiamos la fluorescencia derivada de la expresión transitoria de GFP libre en las hojas, iluminando con lámpara UV. Las imágenes tomadas se procesaron digitalmente con Adobe Photoshop CS5 Extended (Adobe Systems Software Ltd.).

### **3.4.2. Inmunodetección de proteínas o western blot**

Una vez tomadas las imágenes de las hojas, guardamos los círculos de tejido infiltrados, para hacer una inmunodetección de proteínas y detectar la presencia de las proteínas en los tejidos infiltrados.

#### **3.4.2.1. Preparación de la muestra para análisis por western blot**

Se extrajo de las hojas de *N. benthamiana* el contenido de proteínas totales de aproximadamente 0,1 g de tejido infiltrado (correspondiente a un círculo de agroinfiltración). Para ello, la muestra congelada en nitrógeno líquido se hizo polvo con un émbolo en 300 µl de tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*, PBS) 1X, 1% Mercaptoetanol. Tomando 50 µl de este extracto y 50 µl de Laemli 2X (4% SDS; 2% 2-Mercaptoetanol; 0,1 M Tris HCl pH 6,8; BPB; 20% Glicerol), se homogeneizó y se hirvió a 95°C la muestra con agitación durante 3 minutos, para extraer las proteínas totales; y se centrifugó para clarificar la muestra.

### **3.4.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)**

Cargamos 15 µl de la muestra por pocillo en los geles de poliacrilamida con SDS. Como marcador de peso molecular utilizamos Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (BIO-RAD. Cat. 161-0374). En los casos en que ha sido necesario cuantificar cantidad de proteína, se incluyó en el gel de interés una serie de concentraciones conocidas de BSA para construir una recta patrón que permitiera inferir la concentración de proteína.

Las muestras se fraccionaron por SDS-PAGE en geles con 15% de acrilamida (BIO-RAD. Cat. 161-0158) en sistemas Mini Protean II (BIO-RAD) y fuente de electroforesis BIORAD, hasta que el marcador de frente azul (presente en el Laemli 2X) escapa por la base del gel.

Una vez acabada la electroforesis, aquellos geles control de carga o que se utilizaron para estimar una cantidad de proteína, se tiñeron con azul de coomassie (Sigma-Aldrich Brilliant Blue R. Cat. B0149) y se eliminó el exceso de azul con solución de desteñido (metanol 15%, ácido acético glacial 10%).

### **3.4.2.3. Transferencia húmeda a membranas**

Los geles de proteínas se transfirieron, por electro transferencia húmeda en buffer tris-glicina (tris-glicina [25 mM Tris; 192 mM Glicina]; 20% Metanol), a membranas de transferencia de proteínas (Hybond-P PVDF membranes, Amersham, GE Healthcare. Cat. RPN303F) durante una hora a 100 V, en frío. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se tiñeron con rojo Ponceau (Ponceau S solution SIGMA. Cat. P7767) durante unos minutos y se tomó la imagen de las bandas como control de carga. A continuación se destiñó la membrana con agua y se bloqueó con solución de bloqueo (PBS 1X; 5% peso/volumen leche en polvo desnatada) durante al menos una hora, para evitar la adherencia de anticuerpos a zonas no específicas de la membrana.

### **3.4.2.4. Inmunodetección de proteínas por western blot**

Una vez bloqueada la membrana se puede detectar la presencia de proteínas específicas en la membrana. Nosotros teníamos interés en detectar las proteínas 2b y

proteínas 2b mutantes (en los diferentes vectores construidos), GFP (eGFP libre o en construcciones tipo GFP-2b) e YFP (en construcciones de BiFC).

Para la detección inmunológica de GFP, se utilizó un anticuerpo policlonal contra GFP de ratón, donado por G. Cowan (James Hutton Institute, Dundee, Reino Unido). Para la detección de proteína 2b de la cepa Fny de CMV se utilizó un anticuerpo policlonal de ratón contra los dominios amino y carboxilo de la proteína (aas 2-58 y 51-107, respectivamente), desarrollado por el Dr. Félix A. Atencio en el CIB-CSIC. Para la detección de proteínas marcadas con sYFPN, se utilizó el anticuerpo policlonal de ratón contra la terminación amino de GFP (Anti-GFP, N-terminal antibody produced in rabbit. SIGMA. Cat. G1544).

Se incubó la membrana en solución de bloqueo en presencia de los anticuerpos primarios durante toda la noche en agitación suave a temperatura ambiente. Se lavó bien la membrana en solución de lavado [PBS 1%; 0.05% Tween 20 (Sigma Aldrich. Cat. P1379)] antes de poner el anticuerpo secundario.

Como anticuerpos secundarios se utilizaron un anticuerpo antiratón conjugado con fosfatasa alcalina [Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Alkaline Phosphatase antibody produced in goat. SIGMA. Cat. A3688] o uno anticonejo [Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Alkaline Phosphatase antibody produced in goat. SIGMA. Cat. A3687], para detectar los anticuerpos primarios contra las proteínas 2b y GFP, respectivamente. Se incubó la membrana en solución de bloqueo en presencia de los anticuerpos secundarios con la dilución adecuada durante una hora en agitación a temperatura ambiente, y se lavó de nuevo la membrana en solución de lavado.

La presencia de las proteínas se reveló con sigmaFAST™ BCIP/NBT (SIGMA Aldrich. Cat. B5655), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El control de carga de los geles se llevó a cabo por geles PAGE-SDS del 15% teñidos con azul de coomassie-R (Sigma-Aldrich Brilliant Blue R. Cat. B0149) o por tinción de la membrana de transferencia con Rojo Ponceau (Ponceau S solution. SIGMA. Cat. P7767).

### **3.5. Visualización *in vivo* de proteínas con marcajes fluorescentes**

Para observar la localización subcelular de las proteína 2b y mutantes de CMV en células vegetales epidérmicas se clonaron las mismas en el vector pROK2-GFP a continuación del marcador fluorescente, formando las construcciones pROK-GFP-2b y las variantes con la proteína mutada de 2b. Además, la proteína nativa se clonó también en posición anterior al fluoróforo GFP y mRFP formando las construcciones pROK-2b-GFP y pROK-2b-mRFP. Todo ello se ha descrito anteriormente en el apartado 3.2.4.

Para la observación del efecto que produce la presencia de una señal NES en la localización subcelular de la proteína 2b se utilizó la construcción pROK-NES-GFP-2b descrita en el apartado 3.2.4. La visualización de las proteínas fusionadas a *tags* fluorescentes se llevó a cabo en microscopio confocal tras su expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*

#### **3.5.1. Agroinfiltración y expresión transitoria**

Infiltramos hojas de *N. benthamiana* con las construcciones a visualizar *in vivo*, marcadas con los fluoróforos GFP y mRFP. Este método nos ofrece una forma sencilla de expresar una proteína en planta, ya que se infiltra la suspensión bacteriana directamente en las hojas, difunde en el tejido y permite la observación de campos de células epidérmicas que expresan la construcción de interés. Las construcciones que contenían GFP se infiltraron junto con un plásmido que contenía la proteína fibrilarina con el fluoróforo mRFP (pROK-Fib-mRFP). La proteína fibrilarina se localiza en los nucléolos y cuerpos de cajal, por lo que se utilizó como marcador de estos corpúsculos subnucleares.

#### **3.5.2. Infiltración de tinción DAPI**

En algunos casos se utilizó la tinción DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Esta tinción fluorescente atraviesa las membranas celulares y se une al DNA por lo que se usa

como marcador de los núcleos, pero no tiñe los nucléolos. Se puede utilizar tanto en células fijadas como vivas.

Se infiltraron las zonas agroinfiltradas de las hojas con tinción DAPI (4µg/ml en agua) 2 horas antes de su visualización en el microscopio confocal.

### **3.5.3. Visualización de fluorescencia *in vivo* con microscopio confocal**

El Microscopio Confocal emplea una técnica óptica para reconstruir imágenes tridimensionales, seleccionando cada vez un solo plano (eje z) del campo, descartando la información de otros planos con el *pinhole*. Esto nos permite observar campos epidérmicos en la muestra *in toto*. Ya que la superficie de la hoja es irregular, se hizo un barrido tomando imágenes en el eje z para reconstruir el campo de células epidérmicas. Estas imágenes se procesan con el programa Leica para superponerlas en una sola proyección que suma la fluorescencia derivada de todas ellas, permitiendo ver una imagen plana a partir de una muestra tridimensional. Las imágenes se formaron con dos Microscopios Laser Confocales espectrales (CLSM) Leica TCS SP2 y SP5 (Leica Microsystems).

Las preparaciones se montaron unos minutos antes de ir al Microscopio Confocal, a partir de tejido fresco colocado sobre portaobjetos. Se evitó en la medida de lo posible tomar tejidos con nervaduras, para facilitar la visualización y evitar una superficie irregular. Se colocó el tejido sobre el portaobjetos con la cara adaxial hacia el mismo, para observar campos de células epidérmicas en la superficie abaxial, desde la que se había infiltrado con la jeringuilla. Se inmovilizó el tejido sobre el portaobjetos con ayuda de cinta adhesiva de doble cara.

Se observó el tejido con objetivos de inmersión en agua a tiempos variables tras la infiltración (entre 2 y 5 dpi, dependiendo del tipo de experimento) y se tomaron imágenes con objetivos 20x, 40x y 63x, en función de si interesaba tomar imágenes de campos de células epidérmicas o centrarnos en compartimentos subcelulares, como se ha descrito anteriormente (Canto *et al.* 2006).

Las imágenes se obtuvieron por barrido secuencial (SP2 y SP5) y escáner resonante (SP5), con los siguientes ajustes de excitación (longitud de onda en la que un fluoróforo absorbe luz) y emisión (rango de longitudes de onda en las que un fluoróforo emite luz): para GFP, excitación de 488 nm y emisión de 500 a 530 nm; para YFP, excitación a 514 nm y emisión de 530-550 nm, para mRFP, excitación de 561 nm y emisión de 590 a 630 nm; para DAPI, excitación de 405 nm y emisión de 440 a 475 nm.

### **3.6. Complementación bimolecular fluorescente**

Para visualizar interacciones en células vivas utilizamos la técnica de la complementación bimolecular fluorescente (BiFC). Es un método muy sensible (Morell *et al.* 2008) basado en la interacción entre dos mitades de una proteína fluorescente fusionadas a las proteínas que se pretenden estudiar, que permite visualizar *in vivo* interacciones potenciales proteína-proteína (Citovski *et al.* 2006) entre proteínas iguales o diferentes y establecer su ocurrencia subcelular *in vivo* y en el contexto celular por observación directa sobre tejido fresco, eliminando posibles artefactos causados por rotura celular o fijación del tejido previa a su visualización (Kerppola 2006). La asociación de proteínas produce un complejo fluorescente a partir de constituyentes no fluorescentes y se ha utilizado en distintos tipos celulares y organismos (revisado en Kerppola 2006).

Se examinó por co-expresión transitoria potenciales interacciones entre pares de proteínas coexpresadas en células epidérmicas por agroinfiltración, observando en microscopio confocal la fluorescencia, de 3 a 6 dpi. Comprobamos diferentes combinaciones de plásmidos, en los dos sentidos de la interacción en aquellos casos en que se observa la interacción entre proteínas diferentes, no así en homodímeros. La visualización se hizo a veces en presencia de fibrilarina marcada con mRFP (Fib-mRFP) como marcador nucleolar. Las agroinfiltraciones de vectores binarios expresando proteínas marcadas para BiFC se hicieron en las mismas condiciones que para proteínas fluorescentes monoméricas, y se visualizaron con los ajustes de excitación y emisión de la YFP intacta (excitación 514 nm; emisión 530-550 nm).

### 3.7. Unión *in vitro* de la proteína 2b a RNAs

Para los estudios de unión *in vitro* de la proteína 2b a RNAs se expresó la proteína 2b y mutantes en bacterias, previa comprobación de la funcionalidad de la construcción en estudios de agroinfiltración. En estudios anteriores, diversos grupos han expresado y purificado sólo proteína 2b truncada, ya que encontraron dificultades en la expresión de la proteína completa, pero nosotros no encontramos ningún problema por lo que nuestros resultados muestran las propiedades de la unión a RNAs de la proteína 2b completa.

Para expresar y purificar las proteínas 2b y mutantes utilizamos el sistema QIAexpressionist™ (QIAGEN) con el vector pQE30. Este sistema se basa en el marcado con seis histidinas (6xHis tag), que se unen selectivamente a matrices cromatográficas por afinidad al metal níquel- ácido nitrilotriacético (*nickel- nitrilotriacetic acid*, Ni-NTA), sin interferir en su estructura y función.

#### 3.7.1. RNAs

Para visualizar la unión *in vitro* de sRNAs a la proteína 2b y sus mutantes, y posteriormente calcular sus cinéticas de unión, sintetizamos tres RNAs sintéticos, basados en la secuencia del miRNA 171 de *A. thaliana* (Fig. 11): de hebra sencilla y polaridad positiva (ss siRNA); de doble hebra, con 2 nts desapareados en los extremos terminales 3' (ds siRNA); y el micro RNA correspondiente (miRNA).

Para preparar los sRNAs de doble hebra, se tomaron cantidades equimoleculares de los sRNAs de hebra sencilla de polaridad complementaria, se hirvieron durante 5 minutos en agua y se enfriaron lentamente hasta temperatura ambiente. Para los experimentos de unión *in vitro* a proteína, se utilizó 5 pmol de sRNAs de doble hebra (ds siRNA, miRNA) y 15 pmol de ss siRNA, ya que en este caso 5 pmol de RNA de cadena sencilla no se visualizaron bien en el gel.

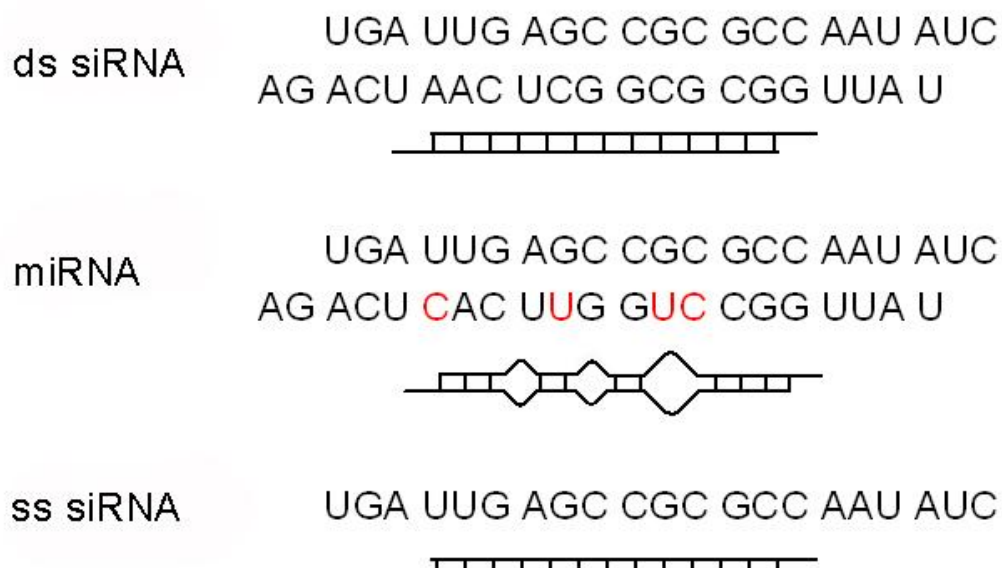


Fig. 11: Representación de los sRNAs sintéticos utilizados en el estudio, correspondientes al RNA 171 de *Arabidopsis thaliana*: sRNA de doble hebra (ds siRNA), micro RNA (miRNA) y sRNA de hebra sencilla (ss siRNA).

### 3.7.2. Expresión de proteínas en bacterias

Para expresar la proteína 2b nativa y las proteínas mutadas en bacteria, se clonaron en el plásmido de expresión pQE30 sus secuencias génicas generando pQE30-2b, como se ha explicado en el apartado 3.2.5. Estas proteínas presentan, una vez en el plásmido pQE30, 6 histidinas (6xHis) en el extremo amino de la proteína, procedentes del plásmido pQE30, y el péptido HA que clonamos nosotros anteriormente en el extremo carboxilo de la proteína 2b. No sabemos si las histidinas y el péptido HA a ambos extremos de la proteína 2b la estabilizan, ya que nosotros no observamos toxicidad alguna durante la expresión de proteínas. Las proteínas se expresaron en la cepa JM109 de *E. coli*. Se utilizó un cultivo recién transformado con el plásmido pQE30-2b, ya que en nuestra experiencia, los stocks bacterianos ultracongelados presentan alguna dificultad en el crecimiento y expresión de proteínas. Partimos de varias colonias de células transformadas, que crecimos a 37°C durante la noche con agitación en 50 ml de medio líquido 2xYT (bactotriptona 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l y NaCl 5 g/l) en presencia de ampicilina. A la mañana siguiente se llevó el cultivo a 300



ml y se dejó crecer durante una hora más. A continuación inducimos la expresión de la proteína durante 3 horas añadiendo al cultivo IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) (CALBIOCHEM. Cat. 420322) a una concentración final 1 mM. Tras la inducción, se eliminó el sobrenadante por centrifugación a 4°C y se guardaron los precipitados de cultivo a -20°C durante al menos 1 hora.

### **3.7.3. Purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes**

Resuspendimos los precipitados de bacterias en 3 ml de tampón B (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM Tris-HCl; 8M Urea, pH 8) en presencia de PMSF (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM para romper las células. Las muestras se mantuvieron en agitación a 50 rpm y temperatura ambiente durante una hora. Luego las clarificamos por centrifugación a 6000 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente. Tomamos el sobrenadante, que tiene un aspecto bastante transparente si la lisis celular es completa, y descartamos el precipitado con restos celulares. A continuación se purificó la proteína por incubación con la resina de Ni-NTA (QIAGEN. Cat. D-40724). Previamente a la incubación es necesario lavar tres veces y equilibrar la resina con el tampón B, en que también se encuentra la proteína que estamos purificando. Incubamos, en pequeñas columnas de plástico de cromatografía (de un diámetro de 1,5 cm) cerradas en ambos extremos e inclinadas, el sobrenadante con 300  $\mu$ l de resina Ni-NTA en agitación a 50 rpm, a temperatura ambiente durante una hora, para que se una la proteína por afinidad entre el Níquel de la resina y las histidinas en las proteínas expresadas. Posteriormente colocamos la columna en vertical, cuidando de que la resina quedase depositada en la base. A continuación se lavó la resina con tampones que eliminaron el resto de componentes del sobrenadante y que poco a poco bajaron el pH hasta el pH de elución. Conviene poner el volumen ml a ml, para el correcto lavado de la muestra, y el lavado se realizó con la siguiente secuencia: 10 ml con tampón B y 5 ml de tampón C (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM Tris-HCl; 8M Urea, pH 6.3). Por último eluímos con tampón E (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM Tris-HCl; 8M Urea, pH 4.5) de la siguiente manera: Pusimos 1 ml y se eluyó rápidamente en un eppendorff de 1.5 ml, muestra E1, en principio la proteína no la encontramos en esta fase de elución. Luego se incubó con 1 ml de tampón E durante 10 minutos y se eluyó

en otro ependorff, E2, que en principio contenía la proteína purificada. Por último se añadió 1 ml más y se eluyó en otro tubo, E3, que en principio tiene proteína muy diluida.

Una vez purificadas las proteínas se realizó una electroforesis de 10  $\mu$ l de muestra en PAGE-SDS al 15% para comprobar que se han purificado y que el tamaño de las mismas es el esperado, y para determinar su concentración de cara a los ensayos. En aquellos casos en que la cantidad de proteína obtenida resultaba insuficiente para los ensayos de unión a sRNAs, se concentró la misma 2x-4x, utilizando las columnas Amicon ultra 0.5 de 10 kilodalton (kDa) (SIGMA-ALDRICH. Cat. Z677108-96).

#### **3.7.4. Renaturalización de proteínas**

Las proteínas purificadas en estas condiciones presentaban una alta concentración de urea en el tampón de elución y se encontraban desnaturalizadas. Para renaturalizar las proteínas purificadas se utilizó la técnica de diálisis, que permite eliminar poco a poco la urea y demás productos presentes en el tampón de elución de forma que la proteína lentamente va recuperando su conformación nativa. La tripa de diálisis es necesario hervirla 5 min y dejarla enfriar lentamente en agua ultrapura (Milli-Q) previamente para que tome sus propiedades.

La diálisis se llevó a cabo frente a agua Milli-Q en una relación 1:10<sup>3</sup>. Así, para renaturalizar 100  $\mu$ l de proteína purificada se puso en tripa de diálisis frente a 100 ml de agua Milli-Q en agitación 70 rpm durante 60 minutos. Durante este tiempo se cambió el agua a los 20, 40 y 50 minutos. La proteína renaturalizada presenta actividad durante un corto espacio de tiempo, por lo que una vez renaturalizada, es necesario hacer los experimentos de unión *in vitro* a RNAs en un breve periodo de tiempo.

#### **3.7.5. Cuantificación de proteínas**

Para cuantificar la proteína 2b renaturalizada se realizó una electroforesis con 10  $\mu$ l de la proteína dializada en PAGE-SDS al 15%, y se tiñó el gel con azul de coomassie. Se eliminó el exceso de azul químicamente con solución de desteñido. Se escaneó el gel y obtuvimos la imagen en tonos grises. La cuantificación se llevó a cabo por

densitometría con el programa Gel-Pro Analyzer (version 3.1.00.00. Media Cybernetics) frente a una recta patrón a partir de concentraciones conocidas de BSA presentes en el mismo gel. Se infirió la concentración de proteína utilizando el programa de cálculo Excel (Microsoft Corp.). Con esto obtuvimos los  $\mu\text{g}$  de proteína renaturalizada presentes en 10  $\mu\text{l}$  de muestra dializada. Para pasar esta concentración a  $\text{pmol}/\mu\text{l}$  necesitamos saber los KDa de nuestra proteína, que se calcularon por traducción de secuencia en el portal [www.sciencegateway.or/tools/proteinmw.htm](http://www.sciencegateway.or/tools/proteinmw.htm). En el portal [www.genscript.com/conversion.html](http://www.genscript.com/conversion.html) relacionamos los KDa con los  $\mu\text{g}$  y  $\text{pmol}$ , con lo que finalmente pudimos convertir la concentración de proteína dializada presente en el gel que medimos como  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , en las medidas  $\text{pmol}/\mu\text{l}$  que utilizamos en los cálculos para unión a sRNAs.

Para nuestros ensayos, dado el volumen de muestra que manejábamos, se requirió una concentración de proteína renaturalizada de al menos 3  $\text{pmol}/\mu\text{l}$ .

### **3.7.6. Unión *in vitro* de proteína a sRNAs**

Para los experimentos de unión *in vitro* de proteínas a sRNAs, se utilizó sRNAs sintéticos (ds siRNA, miRNA y ss siRNA) a concentración fija (ver apartado 3.7.1), y concentraciones crecientes de proteína 2b renaturalizada. La unión *in vitro* se llevó a cabo en volúmenes de 15  $\mu\text{l}$  en tampón de unión a RNAs (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mM NaCl; 5% Glicerol) en presencia de 1mM  $\text{MgCl}_2$ , incubados durante 15 minutos en hielo. El resultado de la incubación se cargó en geles de Tris Acetato (TA) y agarosa al 2% teñidos con BrEt. El fundamento de esta técnica es que el sRNA libre (no unido a proteína) entra en el gel durante la electroforesis, mientras que el sRNA unido a proteína queda retenido en el pocillo del gel, donde habitualmente se puede visualizar. Este sRNA que entra en el gel se puede cuantificar, y es el inverso al RNA que ha quedado retenido por la proteína.

Los geles resultantes se fotografiaron en transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR (BIO-RAD) y las imágenes se analizaron con el programa Gel-Pro Analyzer.

### 3.7.7. Cuantificación de pequeños RNAs unidos a proteínas

Para cuantificar los RNAs unidos a proteína, se obtuvo una imagen en tonos grises del gel de agarosa con los tonos invertidos, apareciendo las bandas que corresponden al RNA en tonos oscuros. La cuantificación del RNA libre (no unido a proteína) presente en el gel se llevó a cabo por densitometría con el programa Gel-Pro Analyzer (MediaCybernetics). Estos datos se trataron posteriormente con el programa Excel (Microsoft Office). La cuantificación de las bandas (de más intensa, RNA libre, a menos intensa; el RNA retenido por la proteína no penetra en el gel ya que queda retenido por la proteína en el pocillo del gel en que se depositó la muestra) permite relativizar la densidad de cada banda respecto a la de la calle control en el gel con RNA libre. Los valores resultado de relativizar la densidad de cada calle (muestras con concentración creciente de proteína) frente a la calle control, con RNA libre, oscilan de 0 a 1. Valores próximos a 1 indican mayor intensidad de banda en el gel, que significa más RNA libre, no unido a proteína; valores más próximos a 0 indican menor intensidad de banda y por lo tanto más RNA retenido por la proteína en el pocillo del gel. Al expresar estos datos en porcentaje (0-1 expresado como 0%-100%), un 100% corresponde a la totalidad del RNA libre, no unido a proteína, calle control) y un 0% corresponde con la situación en que todo el RNA queda retenido por la proteína. Para calcular el dato inverso, el porcentaje de RNA unido a proteína, que es lo que nos interesa (y no el RNA libre que es el que ha penetrado en el gel y podemos cuantificar por intensidad de banda), restamos estos valores, que ya hemos representado como porcentaje, a 100 (porcentaje). De este modo pasamos de hablar de porcentaje de RNA libre en el gel, a porcentaje de RNA retenido por la proteína (en el pocillo).

Habiendo estimado anteriormente en un gel de PAGE-SDS la concentración de proteína renaturalizada, relacionamos el porcentaje de retención de RNA calculado con la concentración conocida de proteína en cada uno de los pocillos del gel, con lo que expresamos en una gráfica la relación molar de proteína:RNA frente al valor de retención de RNA. Obtuvimos así las cinéticas de retención de RNA de cada una de las proteínas, 2b y mutantes, con los tres sRNAs, que representamos en curvas con el programa Excel (Microsoft Office).

### 3.7.8. Cálculo de la constante de disociación y del coeficiente de Hill

El coeficiente de Hill es un indicador de cooperatividad en la unión a RNA, como se ha descrito anteriormente (Marcos *et al.* 1999). La unión cooperativa significa que la afinidad de una molécula por el ligando cambia con la cantidad de ligando unido. Describe la fracción de macromoléculas saturadas por ligando en función de la concentración de ligando. El coeficiente de Hill de las proteínas 2b y las proteínas mutantes se calculó usando la transformación de Hill de los datos de unión a RNA obtenidos en experimentos repetidos. Valores del Coeficiente de Hill <1 indican unión cooperativa negativa. Esto significa que, una vez que el ligando (sRNA) se ha unido a la proteína, la afinidad por el mismo disminuye. El Coeficiente de Hill con valor =1 significa unión no cooperativa. En este caso la afinidad de la proteína por el ligando no depende de si otras moléculas de ligando se han unido a proteína. Y coeficiente de Hill con valor >1 significa unión cooperativa positiva. Aquí la afinidad por el ligando aumenta según se van uniendo proteína y ligando.

También se determinó la constante de disociación aparente (Kd) en base a los datos obtenidos. Kd es la concentración de proteína a la que el 50% del sRNA aparece unido en la interacción proteína/RNA. Representa la concentración de ligando en la que un lugar de unión de una proteína está ocupado a medias. Cuanto menor es una constante de disociación, más afinidad hay entre proteína y ligando.

Para determinar los valores del Coeficiente de Hill y Kd se utilizó la ecuación de Hill en Sigmaplot 11 [Systat Software Inc. (SSI) San Jose, CA. USA], en que n representa el Coeficiente de Hill:

$$\text{Fracción unida} = 1 / (1 + (Kd^n / [\text{Protein concentration}]^n))$$

## **4. RESULTADOS**



## 4.1. Localización subcelular y actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b de CMV

### 4.1.1. Proteína 2b nativa fusionada a marcadores fluorescentes

Para analizar en detalle la distribución subcelular *in vivo* de la proteína 2b de la cepa Fny de CMV la hemos fusionado a proteínas fluorescentes. Sin embargo, un aspecto importante a tener en cuenta al trabajar con proteínas fusionadas a una secuencia peptídica es el posible efecto que el marcaje pueda tener en su funcionalidad biológica. Los ensayos de supresión de silenciamiento local de la expresión transitoria de genes en T-DNAs introducidos en *N. benthamiana* mediante agroinfiltración (ensayos de supresión local de silenciamiento, *agropatch assays*), nos permiten evaluar la actividad supresora de las proteínas virales en un sistema libre de virus. En este sistema, en ausencia de un supresor de silenciamiento, la expresión transitoria de un gen indicador como *GFP* sufre un silenciamiento parcial que deprime su acumulación en el tejido infiltrado, lo que hace que bajo una lámpara de luz UV la fluorescencia derivada de esta proteína sea débil en comparación con una situación de ausencia de silenciamiento (ver Fig. 10, en Material y Métodos).

La presencia de la proteína 2b de la cepa Fny de CMV, expresada por agroinfiltración a partir del plásmido binario pROK2, causó una supresión del silenciamiento parcial del gen indicador *GFP*, como muestran las intensidades relativas de fluorescencia bajo iluminación UV derivadas de GFP, en presencia o ausencia del supresor viral (Fig. 12A, primera hoja por la izquierda), o las acumulaciones correspondientes de GFP en los tejidos agroinfiltrados, detectadas serológicamente (Fig. 12B, western blot). Cuando la proteína 2b se expresó fusionada a la proteína GFP en su extremo amino (GFP-2b), o a la proteína mRFP en su extremo carboxilo (2b-mRFP), las proteínas de fusión retuvieron la actividad supresora de silenciamiento de GFP libre comparable a la de la proteína nativa sin marcar (Fig. 12A, fluorescencia en hojas; y Fig. 12B, acumulación de la proteína en el tejido, western blots correspondientes). Las proteínas de fusión sYFPN-2b y sYFPC-2b también presentaron actividad supresora de silenciamiento, tanto infiltradas por separado como juntas (Fig. 12A). En todos los casos, la mayor



acumulación de GFP se correspondió también con una mayor acumulación de su mRNA en tejido infiltrado en el análisis por northern blot (Fig. 12C).

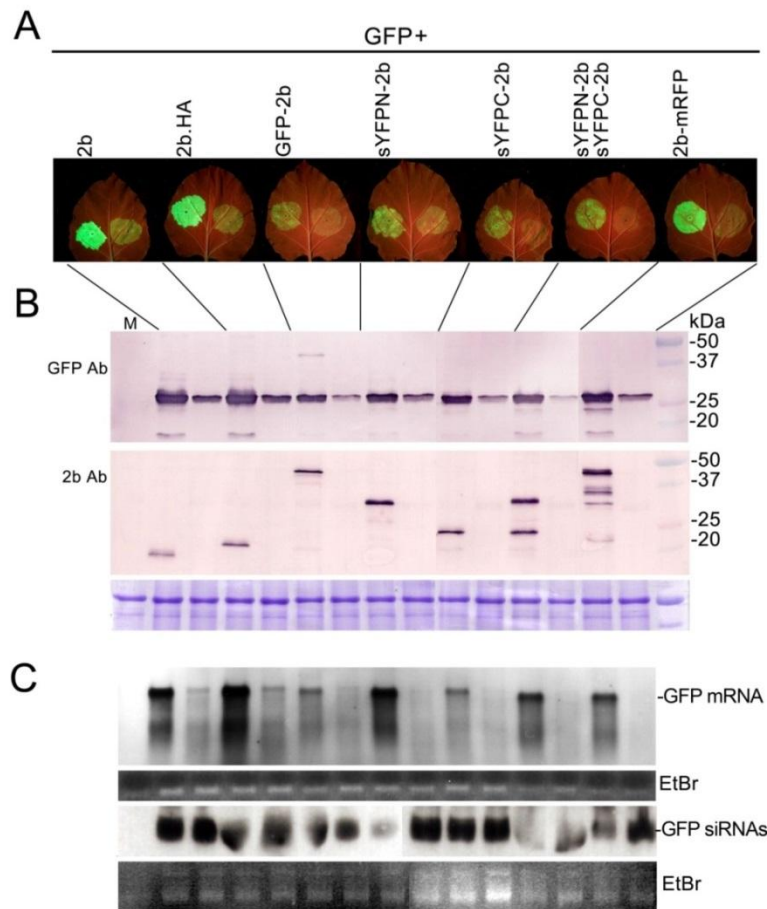


Fig. 12: Actividad supresora de la proteína 2b de CMV. La proteína 2b fusionada a marcadores fluorescentes retiene la actividad supresora de silenciamiento de RNA. Se co-agroinfiltró y expresó en hojas de *N. benthamiana* la proteína GFP libre a partir de un vector binario (un clon que emite luz visible bajo lámpara de luz UV), junto con el vector vacío pROK2, (círculo de infiltración en lado dcho. de las hojas, control interno de cada hoja), o junto con vectores binarios derivados de pROK2 que expresaban las proteínas 2b nativa y 2b marcadas con diferentes fluoróforos o el péptido HA (círculo de infiltración en lado izdo. de las hojas), insertadas en el MCS del vector. A, Fotografías de las hojas agroinfiltradas. La proteína 2b y todas las proteínas de fusión retienen la actividad supresora de silenciamiento en ensayos de supresión local de silenciamiento, e inducen un aumento de la fluorescencia derivada de GFP libre bajo iluminación UV. La contribución a la fluorescencia de GFP-2b se considera residual al acumularse en cantidades mucho menores que la GFP libre, como se observa en el sexto carril del panel de western blot con anticuerpo contra GFP. B, El aumento en la fluorescencia (en panel A) derivada de GFP en presencia de la proteína 2b nativa o fusionada, se correlaciona con una mayor acumulación de proteína GFP [western blot, con anticuerpo (*antibody* Ab) contra GFP, panel superior]. La presencia de la proteína 2b nativa y fusionada se confirmó con un Ab contra 2b (western blot, panel central). El panel inferior muestra el control de carga, gel de PAGE-SDS teñido con azul de coomassie. En el western blot y el control de carga, la línea M (*mock*) constituye tejido sano que ha seguido el mismo tratamiento de infiltración, sin GFP y con el vector vacío pROK2. C, Northern blot, análisis de la acumulación transitoria de mRNA de *GFP* (panel superior) y de los pequeños RNAs interferentes (siRNAs) de la proteína GFP expresada transitoriamente en las mismas muestras (panel central). El aumento de la fluorescencia y acumulación de GFP se correlaciona con la presencia de mayores niveles de mRNAs de *GFP*. Los paneles inferiores correspondientes, muestran los controles de carga, teñidos con bromuro de etidio (BrEt).

En conclusión, la presencia de marcadores fluorescentes fusionados a los extremos amino o carboxilo de la proteína 2b no parecen causar un detrimento en su actividad supresora de silenciamiento en ensayos de supresión local de silenciamiento, a pesar de su considerable tamaño en relación al de la proteína viral nativa.

Para analizar en detalle la distribución subcelular *in vivo* de la proteína 2b de CMV, utilizamos la proteína marcada con GFP (GFP-2b) o con mRFP (2b-mRFP). Como hemos visto, ambas proteínas de fusión tienen una actividad supresora de silenciamiento comparable a la de la proteína 2b en ensayos de supresión local de silenciamiento (Fig. 12). Expresamos transitoriamente estas proteínas, individualmente, a partir del plásmido binario pROK2, por agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*. La visualización de campos de células epidérmicas infiltradas con las proteínas GFP-2b y 2b-mRFP en microscopio fluorescente confocal mostró que la proteína 2b-mRFP se localiza en células epidérmicas, principalmente en unos puntos únicos que podrían corresponder a los núcleos celulares (Fig. 13A, izda.), aunque también se encontró una parte en el citoplasma celular, que en este tipo de células se localiza en el contorno celular (el resto está ocupado por la vacuola). La tinción DAPI (Fig. 13A, central), conocido marcador nuclear, permitió confirmar que estos puntos en los campos de células epidérmicas correspondían efectivamente a núcleos celulares (Fig. 13A, dcha.). Una observación ampliada de estos mismos mostró que la proteína 2b-mRFP se localiza en el nucléolo, ya que esta misma región aparece en negro, sin teñir, en la imagen con tinción DAPI (Fig. 13B), que no tiñe la cromatina altamente condensada contenida en el nucléolo.

Del mismo modo, la fluorescencia derivada de la proteína GFP-2b se localizó en los núcleos de las células epidérmicas (Fig. 13C) y dentro de éstos en los nucléolos (Fig. 13D). Descartamos que esta fluorescencia derivase de GFP libre, ya ésta no ocurría en el nucléolo (Fig. 13E). La expresión transitoria en el mismo tejido de las proteínas GFP-2b y de fibrilarina fusionada a mRFP (Fib-mRFP), conocido marcador del nucléolo y de los CBs (Kim *et al.* 2007), confirmó que la fluorescencia derivada de GFP-2b se localizaba en el citoplasma y núcleo y en su interior en el nucléolo y CBs (Fig. 13F, imagen izda. vs. imagen central), coincidiendo ambas como se muestra en la superposición de imágenes (Fig. 13F, dcha.).

En conclusión, la proteína 2b de la cepa Fny de CMV no sólo se localiza en el núcleo celular, como estaba publicado (Lucy *et al.* 2000; Mayers *et al.* 2000), sino que dentro de éste lo hace en el nucléolo y en los CBs, además de estar presente en el citoplasma, donde presenta una distribución uniforme.

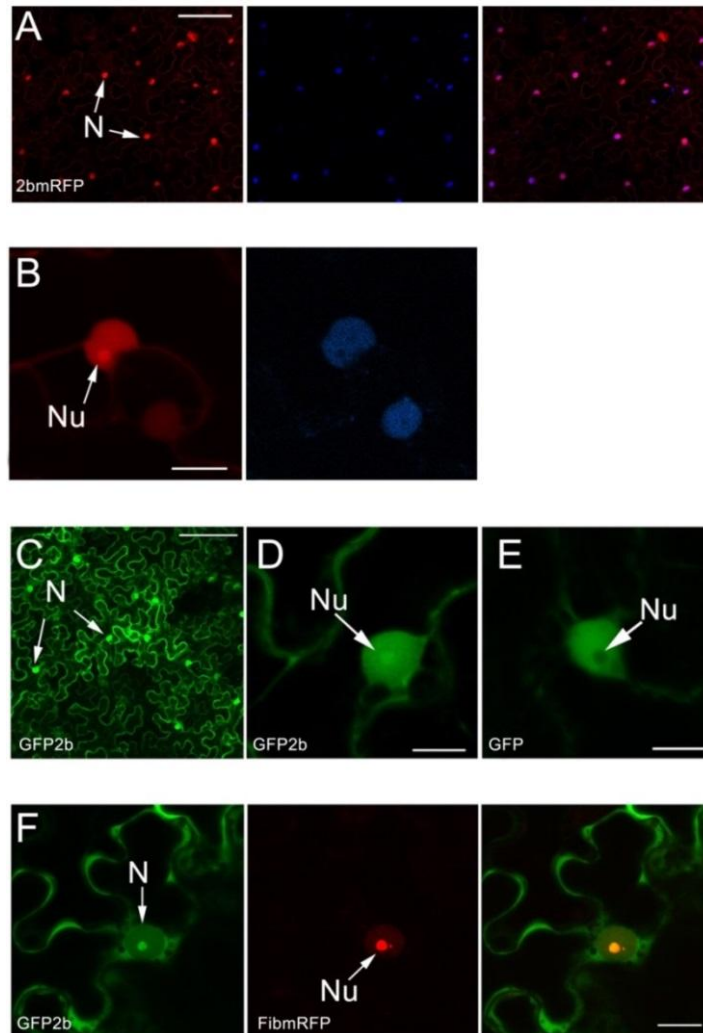


Fig. 13: Distribución subcelular de la proteína 2b de CMV fusionada a diferentes fluoróforos y expresada transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración. A, Fluorescencia derivada de 2b-mRFP en un campo de células epidérmicas. La proteína se localiza en los núcleos (N, flechas en la imagen izda.). La naturaleza nuclear de los puntos se confirmó con tinción DAPI, imagen central. La imagen dcha. muestra la superposición de las imágenes anteriores. B, Vista ampliada de un núcleo, con 2b-mRFP, panel izdo.; y tinción DAPI, panel dcho. La proteína 2b-mRFP se localiza, dentro del núcleo celular, en el nucléolo (Nu, flechas). C, Fluorescencia derivada de la proteína GFP-2b. Las flechas marcan algunos de los núcleos. D, Vista ampliada de la fluorescencia derivada de GFP-2b en el núcleo de una célula epidérmica. La proteína se presenta en estructuras que parecen nucléolos (flechas). E, Vista ampliada de la fluorescencia derivada de GFP libre en el núcleo, ausente en el nucléolo (punto negro dentro del núcleo). F, Distribución subcelular de GFP-2b co-agroinfiltrado con fibrilarina fusionada a mRFP (Fib-mRFP). La fluorescencia de GFP-2b en el núcleo (imagen izda.) co-localiza con la fluorescencia derivada de Fib-mRFP (imagen central), en los nucléolos, y CBs (pequeño punto a la derecha del Nu) como confirma la superposición de imágenes (imagen dcha.). La barra en la esquina superior dcha. representa 100  $\mu\text{m}$ . La barra en la esquina inferior dcha. representa 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.2. Mutantes de la proteína 2b fusionados a marcadores fluorescentes

Para estudiar comparativamente la actividad biológica y la localización subcelular del supresor 2b, hemos utilizado mutantes que afectan a dominios que se han considerado funcionalmente importantes en la bibliografía. En los ensayos de actividad biológica expresamos estas proteínas (2b y mutantes) con el péptido HA fusionado en el extremo carboxilo, y en los estudios de localización subcelular las expresamos con GFP fusionada en el extremo amino. En ambos casos la expresión fue transitoria, mediante agroinfiltración. Contamos con la proteína mutante 2b $\Delta$ 5T con el extremo terminal amino deleciónado; con tres proteínas mutantes con deleciones de una o ambas NLSs (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2 y 2b $\Delta$ NLS1+2, respectivamente); mutantes en un supuesto motivo de fosforilación, ya sea por deleción (2b $\Delta$ KSPSE) o por sustituciones puntuales por alaninas de los residuos S<sup>40</sup> o S<sup>42</sup> (2bS40A y 2bS42A); con un mutante con una deleción que afecta al dominio tres (2b $\Delta$ GSEL); y con un mutante que presenta el dominio terminal carboxilo deleciónado (2b $\Delta$ 3T). Las nueve proteínas mutantes (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, S42A, 2b $\Delta$ GSEL, 2b $\Delta$ 5T y 2b $\Delta$ 3T) y los dominios de la proteína 2b que afectan están representados en la Fig. 7 de Material y métodos y esquemáticamente en las Figs. 8B y 15A. La proteína 2b $\Delta$ 5T carece de los primeros 17 aas del extremo terminal amino. Algunos de éstos forman parte de la primera  $\alpha$ -hélice de 2b, y la mayor parte de ellos forman parte del dominio de cremallera de leucinas identificado en la formación de dímeros de dímeros en TAV y CMV (Chen *et al.* 2008; Dong *et al.* 2015). Las proteínas con mutaciones en las NLSs y el motivo de fosforilación (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A y S42A) afectan a la ARR y algunos de estos aas proporcionan lugares de unión a ácidos nucleicos (Mayers *et al.* 2000). La proteína mutante 2b $\Delta$ GSEL presenta una deleción parcial del dominio 3 que Ye y colaboradores (2009) identificaron en la cepa SD (subgrupo, IB) de CMV y que han relacionado con la inhibición de la transcripción de AGO4. El mutante de deleción 2b $\Delta$ 3T tiene deleciónados los 16 últimos aas, el dominio terminal carboxilo, que se ha relacionado con el desarrollo de síntomas en plantas infectadas con el virus (Lewsey *et al.* 2009) y con la toxicidad en la expresión de proteínas en bacterias (Mayers *et al.* 2000; Goto *et al.* 2007; Dong *et al.* 2015; Sueda *et al.* 2010).

La patología de los virus que contienen las mutaciones utilizadas en nuestro estudio habían sido caracterizadas previamente en planta por Lewsey y colaboradores (2009) excepto para la mutación *2bΔGSEL*. Nosotros hemos caracterizado la infección de CMV conteniendo esta mutación en el RNA2 inoculando mecánicamente hojas de *N. benthamiana* con los transcritos del RNA1, RNA2 conteniendo el gen *2bΔgsel* y RNA3 obtenidos *in vitro* de los correspondientes clones infectivos. El fenotipo que presentó la planta infectada fue más suave que el de la planta infectada con CMV, con menor atrofia y deformación de las hojas intermedias, y sin necrosis (Fig. 14).

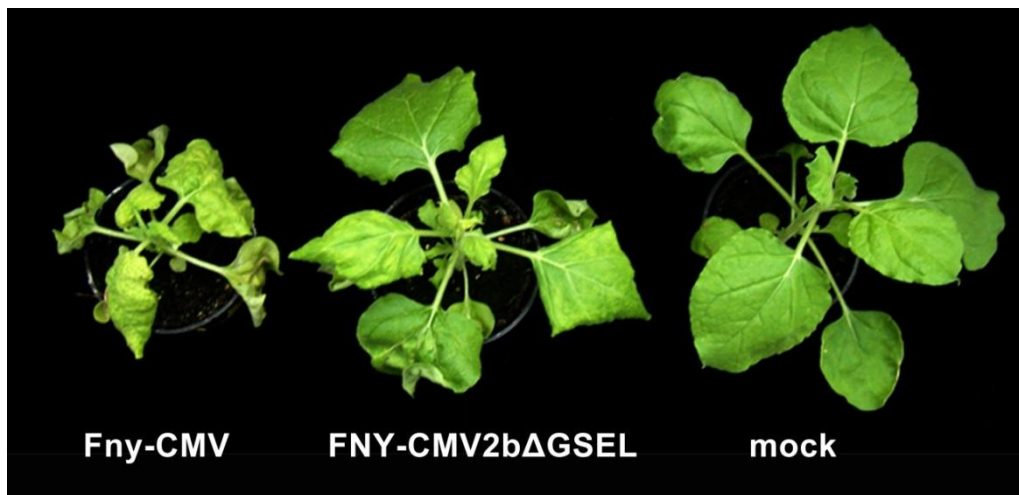


Fig. 14: Patogenicidad del virus Fny-CMV2bΔGSEL en plantas de *N. benthamiana*. El virus presenta síntomas menos severos que el virus nativo (Fny-CMV), con atrofia y distorsión foliar más leve en la planta, y sin necrosis.

Con respecto a la actividad supresora en ensayos de supresión local de silenciamiento, las proteínas mutantes con un péptido HA fusionado en el extremo carboxilo 2bΔNLS1-HA, 2bΔNLS2-HA, 2bΔNLS1+2-HA, 2bΔKSPSE-HA, y 2bΔ5T-HA no presentaron actividad supresora de silenciamiento, mientras que las proteínas mutantes 2bS40A-HA, 2bS42A-HA, 2bΔGSEL-HA y 2bΔ3T sí lo hicieron (Fig. 15B). El análisis de la acumulación por western blot de dichas proteínas en el tejido agroinfiltrado mostró que las proteínas mutantes sin actividad supresora apenas se acumulaban respecto a la proteína nativa, mientras que aquellos mutantes que retenían la actividad supresora de silenciamiento (2bS40A, 2bS42A, 2bΔGSEL y 2bΔ3T) sí se acumularon normalmente

(Fig. 15C). Un ensayo semejante con las proteínas de fusión GFP-2b, GFP-2b $\Delta$ NLS1, GFP-2b $\Delta$ NLS2, GFP-2b $\Delta$ NLS1+2, GFP-2b $\Delta$ KSPSE, GFP-2bS40A, GFP-2bS42A, GFP-2b $\Delta$ GSEL, GFP-2b $\Delta$ 3T y GFP-2b $\Delta$ 5T, mostró que las proteínas GFP-2b $\Delta$ NLS1, GFP-2b $\Delta$ NLS2, GFP-2b $\Delta$ NLS1+2, GFP-2b $\Delta$ KSPSE y GFP-2b $\Delta$ 5T carecían de actividad supresora de silenciamiento, mientras que la proteína GFP-2b, y los mutantes GFP-S40A, GFP-S42A, GFP-2b $\Delta$ GSEL y GFP-2b $\Delta$ 3T sí la presentaban, induciendo en las hojas un aumento en la fluorescencia en el área agroinfiltrada bajo lámpara ultravioleta. Por lo que la fusión de un gen reportero como *GFP* no alteró la actividad supresora de silenciamiento de cada proteína mutante (Fig. 16).

La localización subcelular de los mutantes expresados como fusiones a GFP se visualizó directamente en los casos de las construcciones GFP-2bS40A, GFP-2bS42A, GFP-2b $\Delta$ GSEL y GFP-2b $\Delta$ 3T mediante su expresión transitoria en células epidérmicas de tejido agroinfiltrado (Fig. 17). En todos los casos, tanto en campos de células epidérmicas como en núcleos individuales a mayor magnificación, se observó una localización citoplásmica y nuclear, y dentro del núcleo en el nucléolo (Fig. 17). En los casos de las construcciones GFP-2b $\Delta$ NLS1, GFP-2b $\Delta$ NLS2, GFP-2b $\Delta$ NLS1+2, GFP-2b $\Delta$ KSPSE y GFP-2b $\Delta$ 5T, inicialmente no se observó fluorescencia en el tejido infiltrado, o se observó débilmente. Esto podría ser debido a que las mutaciones hicieran a la proteína inestable e impidieran su acumulación, a que por la carencia de actividad supresora de silenciamiento (Fig. 15) no se acumularan en cantidades suficientes para emitir una fluorescencia detectable en el microscopio confocal, o a ambas razones. La coexpresión del supresor de silenciamiento P19 de TBSV, que previene el PTGS en el tejido infiltrado, permite altos niveles de expresión transitoria de diferentes proteínas ectópicas. En nuestro caso la co-agroinfiltración junto con este supresor de silenciamiento heterólogo fuerte permitió una acumulación de estos mutantes a niveles similares a los de la proteína nativa (Fig. 18A y B), lo que demostró que su falta de acumulación en ausencia de P19, o cuando fueron expresadas en CMV (Lewsey *et al.* 2009), no se debía a que las mutaciones hicieran a la proteína inestable, sino a su falta de actividad supresora de silenciamiento. Por lo tanto, al carecer de actividad supresora, el silenciamiento de la planta dirigido a los transcritos que expresaban las proteínas 2b mutadas deprimía su acumulación.

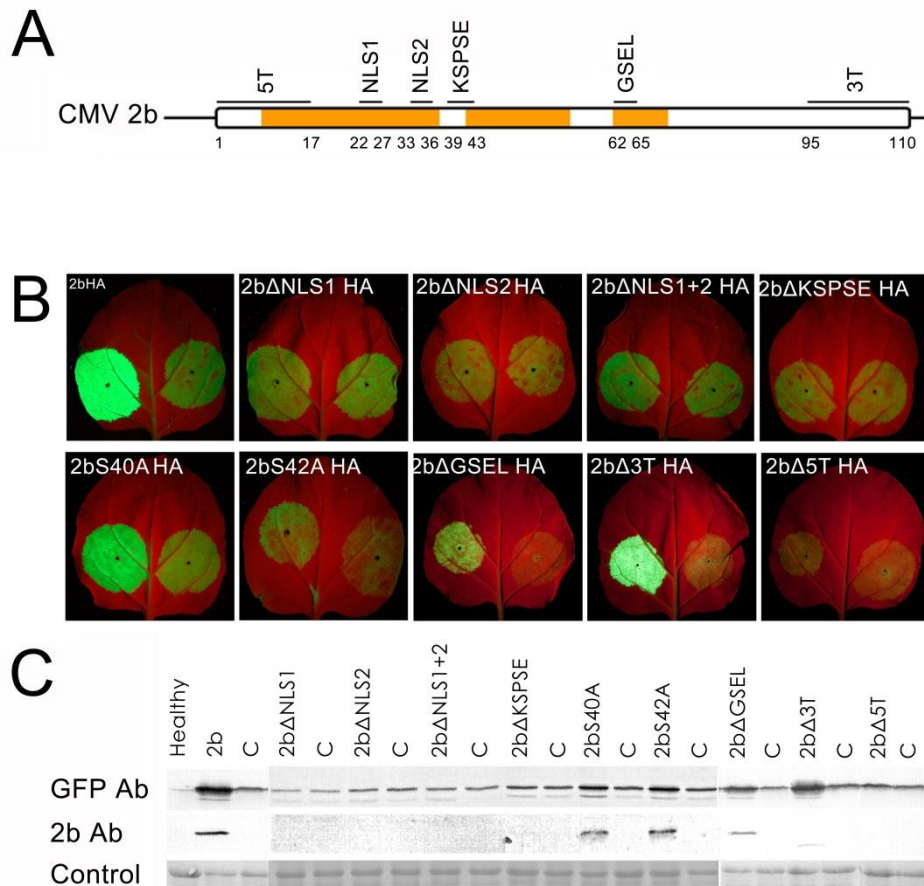


Fig. 15: Actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b nativa y las de los nueve mutantes 2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL, 2b $\Delta$ 5T y 2b $\Delta$ 3T, marcados con el péptido HA en el extremo carboxilo. A, Representación esquemática de la proteína 2b y de las mutaciones utilizadas en el estudio. Tres mutantes presentan deleciones en una o en ambas NLSs (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2 y 2b $\Delta$ NLS1+2). Un mutante tiene delecionado un supuesto motivo de fosforilación de la proteína (2b $\Delta$ KSPSE) mientras que dos mutantes presentan sustituciones puntuales en el mismo de serina por alanina (2bS40A y 2bS42A). Otro mutante tiene una deleción en el dominio 3 (2b $\Delta$ GSEL). Otros dos mutantes tienen sus dominios terminales amino o carboxilo delecionados (2b $\Delta$ 5T y 2b $\Delta$ 3T, respectivamente). Las cajas naranjas representan las conformaciones de  $\alpha$ -hélices previstas por los modelos. Las dos primeras, en CMV son equivalentes a las de la proteína ortóloga 2b de TAV (Chen *et al.* 2008). La tercera es el dominio 3 en CMV (Ye *et al.* 2009). La numeración corresponde a los aas en la proteína 2b: dominio terminal amino, aas 1-17; NLS1, aas 22-27; NLS2: aas 33-36; KSPSE aas 39-43; GSEL, aas 62-62; dominio terminal carboxilo, aas 95-110. B, Actividad supresora de las proteínas mencionadas en A, en ensayos de supresión local de silenciamiento. Se expresó transitoriamente GFP libre a partir de un vector binario co-agroinfiltrado con un vector vacío pROK2 (círculo dcho. en cada hoja), o junto con vectores binarios derivados de pROK2 que expresan las distintas proteínas 2b (círculo izdo. en cada hoja). Las proteínas 2b $\Delta$ NLS1-HA, 2b $\Delta$ NLS2-HA, 2b $\Delta$ NLS1+2-HA, 2b $\Delta$ KSPSE-HA y 2b $\Delta$ 5T-HA, carecen de actividad supresora de silenciamiento, mientras que la proteína 2b-HA, y los mutantes 2bS40A-HA, 2bS42A-HA, 2b $\Delta$ GSEL-HA y 2b $\Delta$ 3T-HA inducen un aumento en la fluorescencia en el área agroinfiltrada bajo lámpara UV. C, Análisis de la acumulación por western blot de GFP libre (panel superior) y de las proteínas 2b y mutantes (panel central). Aquellas proteínas que carecían de actividad supresora de silenciamiento (2b $\Delta$ NLS1-HA, 2b $\Delta$ NLS2-HA, 2b $\Delta$ NLS1+2-HA, 2b $\Delta$ KSPSE-HA, 2b $\Delta$ 5T-HA) no se acumularon en el tejido infiltrado, como tampoco lo hizo la proteína GFP. El panel inferior muestra el control de carga del experimento (membrana de western blot teñida con rojo ponceau S). La proteína 2b-HA, los mutantes puntuales 2bS40A-HA y 2bS42A-HA, y los mutantes de deleción 2b $\Delta$ GSEL-HA y 2b $\Delta$ 3T-HA se acumularon en el tejido infiltrado e indujeron un aumento en la acumulación de GFP. La calle M (*mock*) representa tejido sano infiltrado con el vector vacío, que ha seguido el mismo proceso que el resto del tejido tratado para la expresión transitoria.

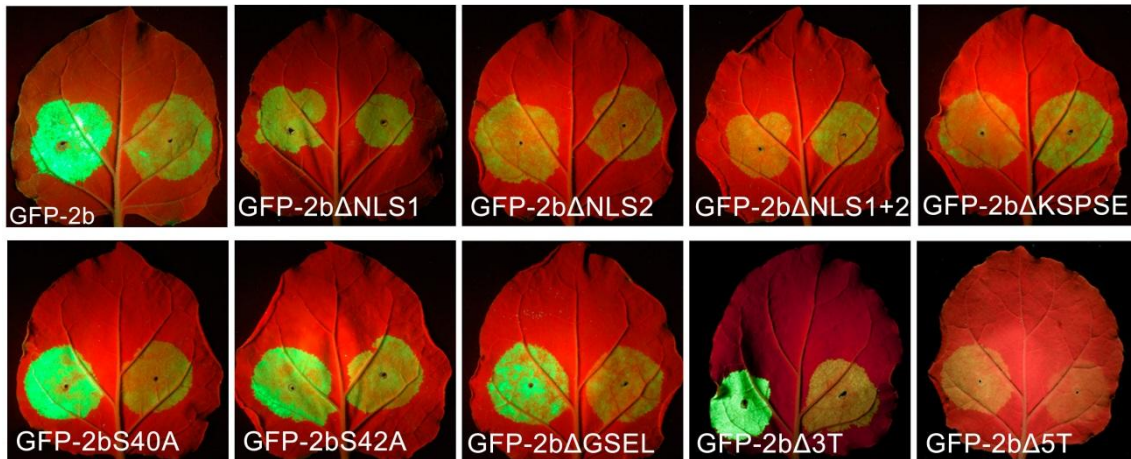


Fig. 16: Actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b y de los mutantes (2bΔNLS1, 2bΔNLS2, 2bΔNLS1+2, 2bΔKSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2bΔGSEL, 2bΔ5T y 2bΔ3T) fusionados con GFP en el extremo amino, en ensayos de supresión local de silenciamiento. Se expresó transitoriamente GFP libre a partir de un vector binario co-agroinfiltrado con un vector vacío pROK2 (círculo dcho. en cada hoja), o junto con vectores binarios derivados de pROK2 que expresaban las distintas proteínas 2b fusionadas a GFP (círculo izdo. en cada hoja). Las proteínas GFP-2bΔNLS1, GFP-2bΔNLS2, GFP-2bΔNLS1+2, GFP-2bΔKSPSE y GFP-2bΔ5T, carecieron de actividad supresora de silenciamiento, mientras que la proteína GFP-2b, y los mutantes GFP-2bS40A, GFP-2bS42A, GFP-2bΔGSEL y GFP-2bΔ3T indujeron un aumento en la fluorescencia en el área agroinfiltrada bajo lámpara UV.

Aquellas proteínas con deleciones en las NLSs o en el motivo de fosforilación (GFP-2bΔNLS1, GFP-2bΔNLS2, GFP-2bΔNLS1+2 y GFP-2bΔKSPSE) presentan una localización subcelular diferente a la de la proteína 2b. La visualización de campos de células epidérmicas (Fig. 18C, imagen izda. de cada construcción) muestra que la deleción de una o ambas NLSs restringe la fluorescencia principalmente al citoplasma bordeando la pared celular y el núcleo y a los filamentos citoplasmáticos (*cytoplasmic strands*) que los conectan atravesando la vacuola. No encontramos estas proteínas en el núcleo, como se observa en las imágenes ampliadas de núcleos para cada una de estas construcciones (Fig. 18C, resto de imágenes). La deleción de la NLS2 no afectó tan profundamente a la localización subcelular como la de NLS1, por lo que encontramos algo de fluorescencia en el núcleo. Un caso distinto fue el de la proteína GFP-2bΔKSPSE, en la que la deleción del motivo de fosforilación afectó a la localización subcelular de la proteína en sentido opuesto, mostrando una localización restringida al núcleo y nucléolo. La coexpresión de estos diferentes mutantes con la proteína de fusión Fib-mRFP permitió visualizar el núcleo y nucléolo (Fig. 18C, en rojo) y confirmar la co-localización nucleolar en este último caso.



En conclusión, el extremo terminal amino, junto con las dos NLSs y el motivo de fosforilación parecen ser esenciales para la actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b, ya que deleciones en estos tres dominios suprimen su actividad supresora, además de alterar su localización subcelular en la mayor parte de los casos. La localización nuclear de la proteína no es suficiente para conferirle actividad supresora (mutantes GFP-2b $\Delta$ 5T y GFP-2b $\Delta$ KSPSE). Las dos sustituciones puntuales por alanina en el motivo de fosforilación, GFP-2bS40A y GFP-2bS42A, o las otras dos deleciones en motivos de la región carboxilo, GFP-2b $\Delta$ GSEL y GFP-2b $\Delta$ 3T, no alteran ni la actividad supresora ni la localización subcelular de la proteína.

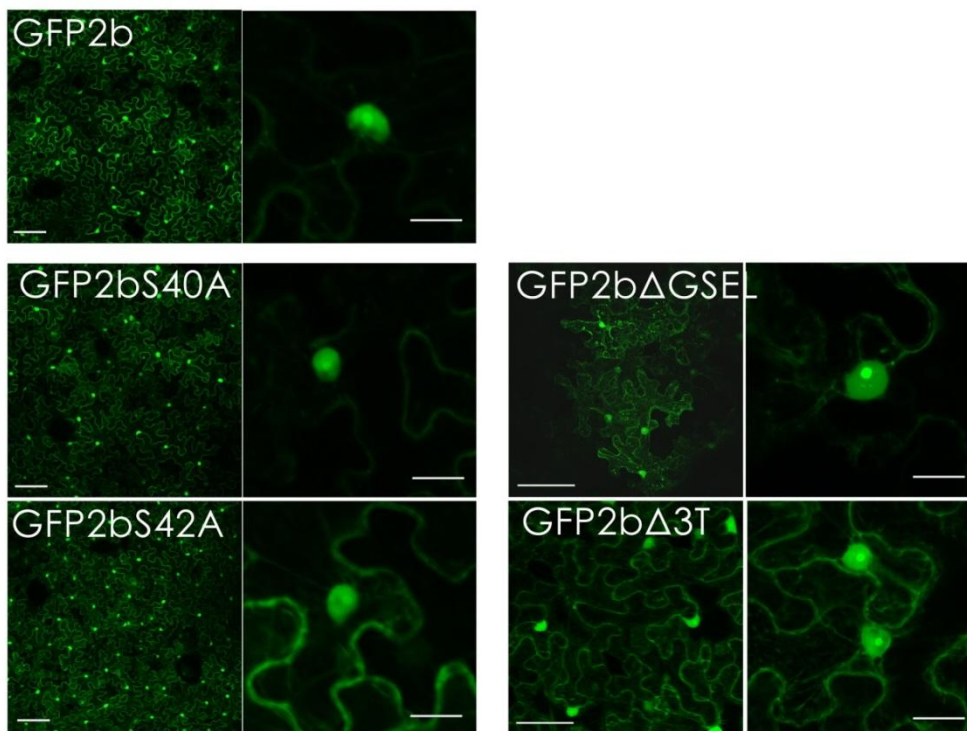


Fig. 17: Distribución subcelular de la proteína 2b de CMV y de las proteínas 2b mutantes con actividad supresora de silenciamiento, marcadas con GFP (GFP-2b, GFP-2bS40A, GFP-2bS42A, GFP-2b $\Delta$ GSEL y GFP-2b $\Delta$ 3T). De cada una de las proteínas de fusión se muestra un campo de células epidérmicas (imagen izda.) y una imagen ampliada de un núcleo representativo de la muestra (imagen dcha.). La fluorescencia derivada de estas proteínas se encuentra en el citoplasma y los núcleos de células epidérmicas (imagen izda.), y dentro de éstos, en nucléolos y CBs. La barra en la esquina inferior izda. representa 100  $\mu$ m. La barra en la esquina inferior derecha representa 10  $\mu$ m.

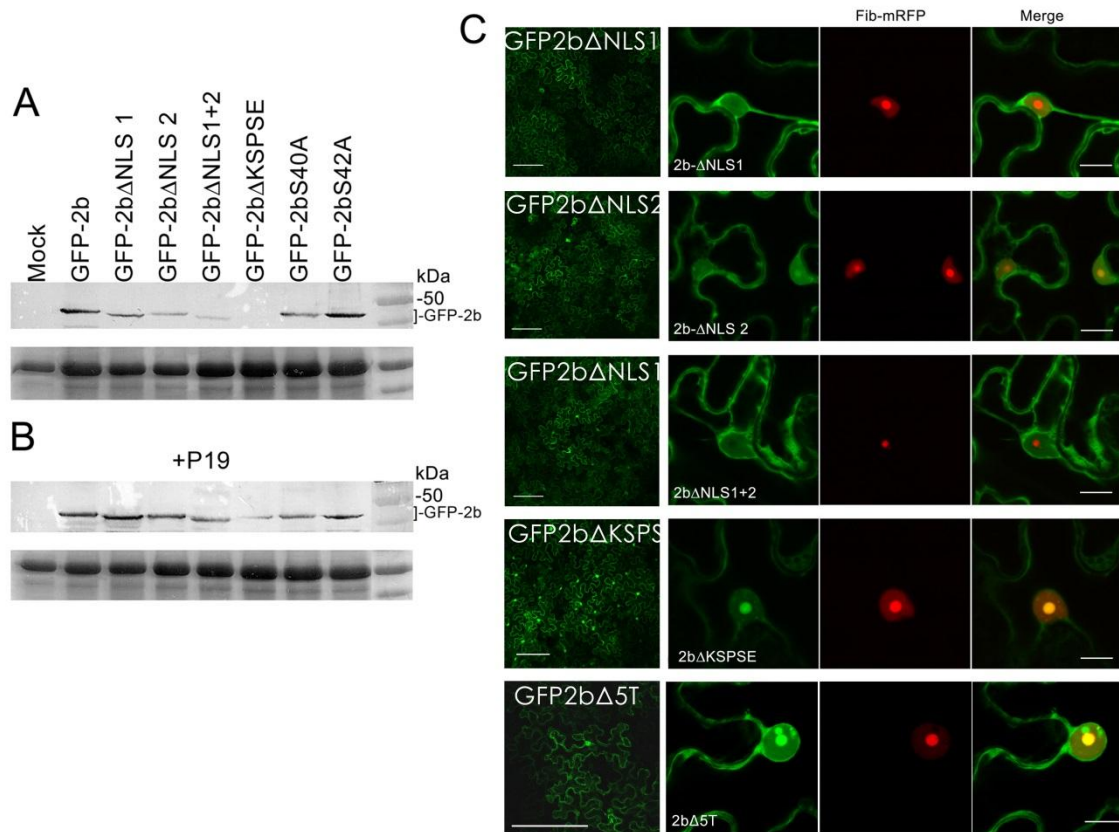


Fig. 18: Acumulación y distribución subcelular de la proteína 2b de CMV y de mutantes sin actividad supresora de silenciamiento, marcadas con GFP (GFP-2b, GFP-2bΔNLS1, GFP-2bΔNLS2, GFP-2bΔNLS1+2, GFP-2bΔKSPSE, GFP-2bΔ5T). Se co-agroinfiltraron con el marcador nucleolar Fib-mRFP, y en ausencia (A) o presencia (B) del supresor de silenciamiento P19 de TBSV. A, B, Análisis la acumulación de la proteína 2b y mutantes por western blot del tejido infiltrado. C, imagen izda., fluorescencia derivada de campos de células epidérmicas; resto de imágenes, vista ampliada de núcleos representativos: imagen izda., fluorescencia derivada de las proteínas GFP-2b, GFP-2bΔNLS1, GFP-2bΔNLS2, GFP-2bΔNLS1+2, GFP-2bΔKSPSE y GFP-2bΔ5T; imagen central, fluorescencia derivada de Fib-mRFP; imagen dcha., solapamiento de ambas imágenes. Las proteínas con una o ambas NLSs delecionadas tienen alterado su patrón de localización, presentando una distribución principalmente citoplásmica. Por el contrario, la proteína GFP-2bΔKSPSE presenta un patrón de distribución marcadamente nucleolar y de los CBs. La proteína GFP-2bΔ5T tiene un patrón de localización subcelular semejante a GFP-2b. La barra en la esquina inferior izda. representa 100  $\mu$ m. La barra en la esquina inferior dcha. representa 10  $\mu$ m.

#### 4.1.3. La proteína 2b marcada con una señal de exportación nuclear

Debido a que las NLSs y el motivo de fosforilación de la proteína 2b de CMV (Lucy *et al.* 2000; Wang *et al.* 2004) solapan con los dominios de unión a siRNAs en la proteína ortóloga de TAV (Chen *et al.* 2008), es difícil determinar la importancia relativa de la presencia nuclear y de la capacidad de unión a siRNAs en su actividad supresora de silenciamiento. Ambas propiedades han sido propuestas por separado como necesarias para dicha actividad (Lucy *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006b,

respectivamente). Nuestros resultados muestran que la sola presencia de la proteína 2b en el núcleo no confiere actividad supresora de silenciamiento a la proteína, ya que aunque aquellas proteínas mutantes de 2b que presentan delecionada una o ambas NLSs (GFP-2b $\Delta$ NLS1, GFP-2b $\Delta$ NLS2 y GFP-2b $\Delta$ NLS1+2) están esencialmente excluidas del núcleo y carecen de actividad supresora de silenciamiento, otros mutantes que mantienen las NLSs (2b $\Delta$ KSPSE y 2b $\Delta$ 5T), aun localizándose en núcleo y nucléolo, tampoco presentan actividad supresora (Figs. 15-18). Sin embargo, estas dos mutaciones podrían afectar a la actividad supresora por razones distintas a la de su localización subcelular. Nos planteamos por tanto diseccionar las propiedades de localización nuclear y actividad supresora de silenciamiento en la proteína nativa, aprovechando que, como hemos demostrado, la proteína 2b presenta una gran tolerancia a los marcajes en sus extremos amino y carboxilo conservando su actividad supresora de silenciamiento. Para ello marcamos GFP-2b con una señal de exportación nuclear en su extremo terminal amino, generando la proteína de fusión NES-GFP-2b. Cuantificamos su grado de presencia nuclear y determinamos su actividad biológica como supresor. Esta NES procede de un inhibidor de proteína kinasa (PKI; Wen *et al.* 1995; García *et al.* 2010) y su secuencia está descrita en el apartado de Material y Métodos. No teníamos de antemano una idea de cuál sería la distribución subcelular que tendría esta construcción, ya que resultaría del equilibrio entre su entrada en el núcleo, mediada por las NLSs, y su salida del mismo, mediada por su NES. En paralelo expresamos transitoriamente NES-GFP-2b y GFP-2b mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*, y observamos campos de células epidérmicas secuencialmente durante un período de tres a seis dpi. Al tercer día de la agroinfiltración, las diferencias en la localización subcelular entre ambas proteínas (NES-GFP-2b y GFP-2b) resultaron muy evidentes (Fig. 19A), la proteína de fusión NES-GFP-2b presentaba una distribución subcelular mucho más citoplásmica que la de GFP-2b, que se acumulaba en los núcleos y en particular nucléolos, además de en el citoplasma. Estas diferencias se acentuaron a lo largo de los días del experimento, incrementándose el número de núcleos vacíos en tejidos que expresaban NES-GFP-2b (Fig. 19A, paneles a 6 dpi). Por lo tanto nuestra señal NES promovía activamente la salida de la proteína de fusión del núcleo e impedía su acumulación en el mismo. Sin embargo, esto no afectó a su actividad supresora de silenciamiento a lo largo de los días del ensayo en ensayos de

agroinfiltración. Tampoco afectó a su acumulación global en el tejido infiltrado, como muestra el análisis comparado de la acumulación por western blot de ambas construcciones y del marcador GFP (Fig. 19B). Para cuantificar las diferencias en cuanto a presencia nuclear entre NES-GFP-2b y GFP-2b, se expresó transitoriamente cada proteína por separado y se tomaron imágenes aleatorias de campos epidérmicos bajo las mismas condiciones, de modo que estas imágenes son directamente comparables. Se realizó en ellos un conteo del número de núcleos que presentaban fluorescencia, de 3 a 6 dpi. Cada campo de células epidérmicas, de 750x750  $\mu\text{m}$ , contiene alrededor de 50-80 células epidérmicas. Se contaron en los mismos los núcleos con presencia de fluorescencia derivada del supresor (definido como fluorescencia igual o mayor que la del citoplasma perinuclear). A 3 dpi, en campos de células epidérmicas infiltradas con GFP-2b encontramos que la mayoría de los núcleos presentaba fluorescencia, mientras que el número de núcleos fluorescentes en campos epidérmicos que expresaban NES-GFP-2b era ya un orden de magnitud menor, y esta diferencia se incrementaba a medida que el experimento progresaba en el tiempo (Fig. 20A y B).

Se podría argumentar que la actividad supresora de silenciamiento de NES-GFP-2b (Fig. 19) fuera debida al efecto de la actividad de la proteína nuclear a tiempos muy tempranos (anteriores a 3 dpi), antes de que la NES hubiera sacado completamente a la proteína del núcleo. Se sabe que la proteína 2b se acumula en el tejido agroinfiltrado a tiempos muy tempranos, siendo detectable a 1 dpi (Del Toro *et al.* 2014). Para excluir esta posibilidad, realizamos un experimento de agroinfiltración secuencial en el que expresamos primero NES-GFP-2b o GFP-2b, y tres días más tarde agroinfiltramos el mismo tejido con *Agrobacterium* que portaba un vector binario que expresa GFP libre, una vez que NES-GFP-2b está ya ausente del núcleo, como muestra la Fig. 20B. La evaluación de la fluorescencia bajo lámpara UV indica que NES-GFP-2b y GFP-2b suprimían el silenciamiento de GFP libre de modo comparable en esta infiltración secuencial (Fig. 20C).

Estos experimentos no nos permiten excluir que el tránsito de proteína 2b por el núcleo celular sea innecesario para su actividad supresora del silenciamiento, ya que NES-GFP-2b entra y sale del núcleo continuamente y la ausencia de fluorescencia en el mismo se debe a que el equilibrio entre entradas y salidas bascula su acumulación

hacia el citoplasma. Pero sí podemos concluir que la acumulación de esta proteína en el núcleo no es necesaria para su supresión del silenciamiento de transcritos o de RNAs virales, y que el núcleo seguramente no es un orgánulo celular donde este tipo de supresión esté teniendo lugar.

En la tabla 2 se puede consultar un sumario de la actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b y los mutantes utilizados en nuestro trabajo, su localización subcelular, y el fenotipo que presentan en planta el virus CMV y los virus correspondientes que portan dichas mutaciones. No se encontró correlación entre las citadas propiedades.

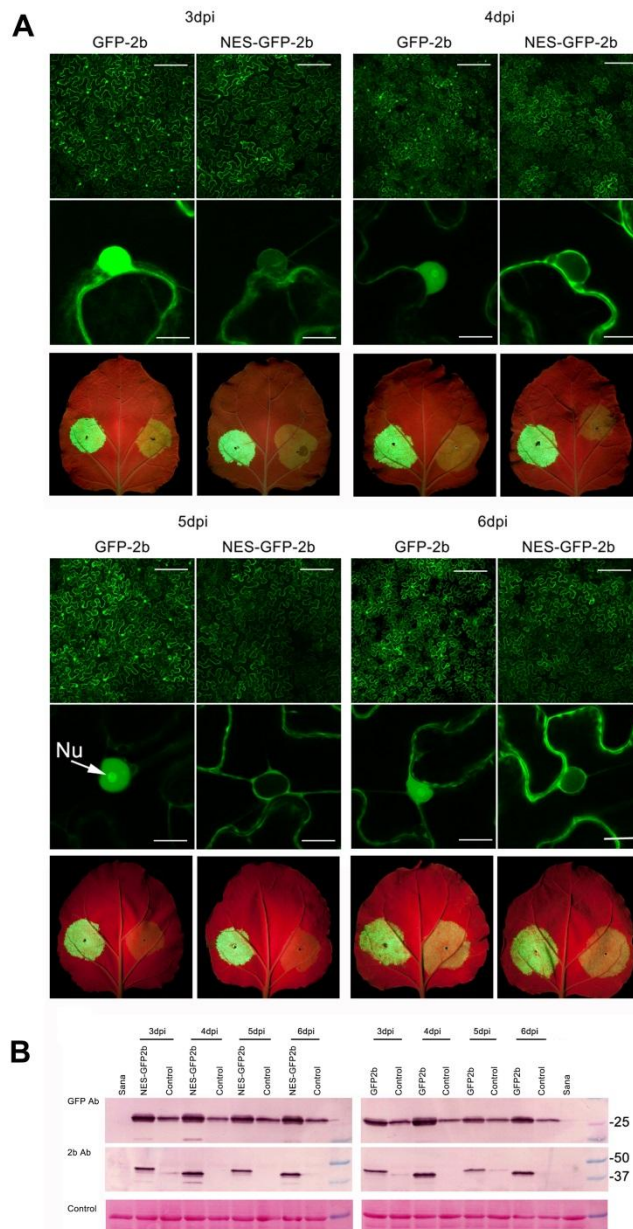


Fig. 19: Alteraciones en el patrón de localización subcelular de la proteína GFP-2b de CMV marcada con una señal NES adicional (NES-GFP-2b), y su efecto en la actividad supresora de silenciamiento. Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* para la expresión transitoria de las construcciones. A, Visualización de la fluorescencia derivada de campos de células epidérmicas que expresan GFP-2b o NES-GFP-2b a 3, 4, 5 y 6 dpi (paneles izdo. y dcho., respectivamente). Todas las imágenes se tomaron bajo las mismas condiciones, y son directamente comparables. Los paneles superiores muestran campos de células epidérmicas y los centrales núcleos individuales representativos. Las flechas indican nucléolos (Nu). A 3 dpi, GFP-2b presentó mayor número de núcleos fluorescente que NES-GFP-2b. Según pasaron los días (4-6 dpi), las diferencias entre ambas proteínas aumentaron quedando la mayoría de los núcleos sin fluorescencia en el caso de NES-GFP-2b. Los paneles inferiores muestran la actividad supresora de silenciamiento de ambas construcciones en ensayos de supresión local del silenciamiento a los mismos dpi. En el lado dcho. de la hoja aparece el control (GFP libre co-agroinfiltrado con pROK2) y en el lado izdo. GFP libre co-agroinfiltrada con GFP-2b o NES-GFP-2b. La barra en la esquina superior dcha. representa 100  $\mu$ m y la barra en la esquina inferior dcha. 10  $\mu$ m. B, Análisis de la acumulación de GFP libre y de GFP-2b y NES-GFP-2b por western blot a 3, 4, 5 y 6 dpi. Se extrajeron las proteínas totales y se analizaron con Ab contra GFP (panel superior) o contra 2b (panel central). El panel inferior muestra el control de carga del experimento, la membrana de western blot teñida con rojo ponceau S.

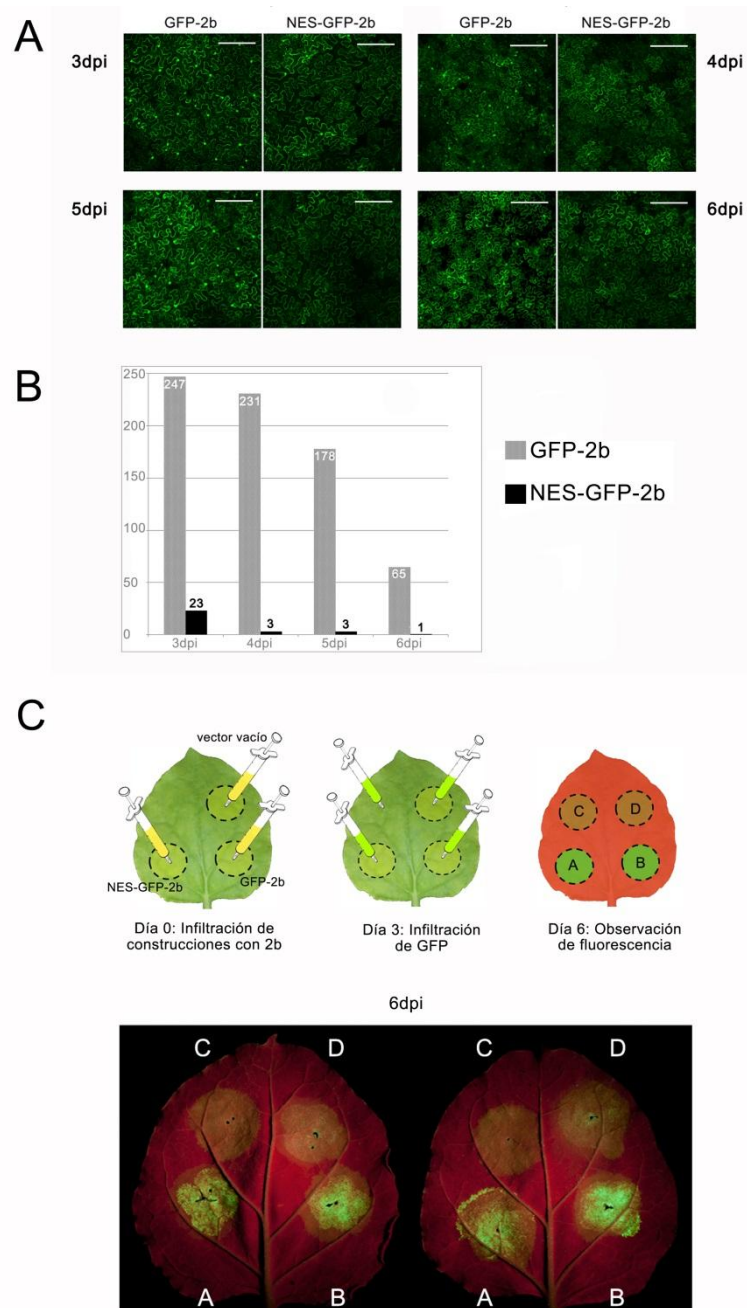

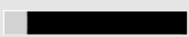

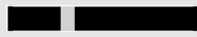








Fig. 20: Cuantificación de la alteración en la localización subcelular de las proteínas NES-GFP-2b y GFP-2b. A, Se expresó transitoriamente cada proteína mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* y se observaron campos de células epidérmicas de los tejidos infiltrados en microscopio confocal a 3, 4, 5 y 6 dpi. Las imágenes se tomaron bajo las mismas condiciones. Las diferencias en la distribución subcelular de NES-GFP-2b y GFP-2b se hicieron más patentes conforme pasaban los días, presentando NES-GFP-2b muchos menos núcleos fluorescentes que GFP-2b. B, Cuantificación del número de núcleos fluorescentes. Se analizaron cuatro campos de células epidérmicas aleatorios para cada construcción, de 750 x 750  $\mu\text{m}$ , y se contó el número de núcleos con fluorescencia en los campos infiltrados con NES-GFP-2b (barras negras) y GFP-2b (barras grises). C, Supresión de silenciamiento de GFP libre por NES-GFP-2b y por GFP-2b en un experimento de agroinfiltración secuencial. Se infiltraron las hojas con las construcciones NES-GFP-2b (parte inf. izda. de la hoja), GFP-2b (parte inf. dcha. de la hoja), o el vector binario vacío pROK2 (parte sup. dcha. de la hoja). Tres días después se infiltraron estos mismos tejidos y una cuarta zona no infiltrada previamente con un vector binario que expresa GFP libre. A los seis días de la primera agroinfiltración se observó la fluorescencia derivada de GFP bajo la lámpara UV. Se muestran dos réplicas del experimento. La barra en la esquina sup. dcha. representa 100  $\mu\text{m}$ .

Tabla 2: Sinopsis de la actividad supresora de silenciamiento, localización subcelular de la proteína 2b y mutantes, y fenotipo de la infección viral. En la tabla se muestra un sumario de los resultados obtenidos en los ensayos de actividad supresora de silenciamiento y localización subcelular de las proteínas 2b y mutantes fusionadas a GFP en el extremo amino y el fenotipo en planta de los correspondientes virus (Fny, Fny2bΔ5T, Fny2bΔNLS1, Fny2bΔNLS2, Fny2bΔNLS1+2, Fny2bΔKSPSE, Fny2bS40A, Fny2bS42A, Fny2bΔGSEL y Fny2bΔ3T). N: Nuclear. Nu: Nucleolar. Los símbolos + (y ++) indican una propiedad positiva (o marcadamente positiva) mientras que el símbolo - indica negativo a una propiedad. ND, no disponible por no haberse analizado.

Proteína 2b y mutantes de la cepa Fny de CMV	Activ. Supres. de Silenc.	Localización subcelular		Síntomas en planta (Lewsey <i>et al.</i> 2009 excepto *obtenido en el lab. del Dr. Canto)			
		N	Nu	<i>A. thaliana</i> Col0	<i>N. benthamiana</i>	tabaco	
2b		+	+	+	Atrofia, deformación de las hojas	Atrofia, deformación de las hojas, necrosis	Atrofia, deformación de las hojas, mosaico sistémico
2bΔ5T		-	+	+	No	No	No
2bΔNLS1		-	-	-	No	No	No
2bΔNLS2		-	+	+	No	No	No
2bΔNLS1+2		-	-	-	No	No	No
2bΔKSPSE		-	++	++	No	No	No
2bS40A		+	+	+	Ligera atrofia	Ligera deformación de las hojas, ligera atrofia	Ligera atrofia, ligera deformación de las hojas, ligero mosaico sistémico
2bS42A		+	+	+	Ligera atrofia	Atrofia intermedia, deformación de las hojas intermedia	Ligera atrofia, ligera deformación de las hojas, ligero mosaico sistémico
2bΔGSEL		+	+	+	ND	Atrofia intermedia, deformación de las hojas intermedia*	ND
2bΔ3T		+	+	+	Atrofia, deformación de las hojas	Atrofia, deformación de las hojas, necrosis	Deformación de las hojas, mosaico sistémico, clorosis



## 4.2. Visualización *in vivo* de interacciones de la proteína 2b

Muchas proteínas interactúan consigo mismas para formar homodímeros, o con proteínas diferentes para formar heterodímeros, y éstos en ocasiones forman parte de agregados más complejos que pueden constituir el estado molecular en que una proteína es funcional, o en el que se procesa y madura, almacena, o incluso degrada. Chen y colaboradores (2008) han observado que la proteína 2b de TAV, ortóloga a la proteína 2b de CMV, puede formar *in vitro* dímeros y tetrámeros. Por ello era interesante para nosotros visualizar *in vivo* interacciones de la proteína 2b de CMV, y de las proteínas mutantes de que disponemos, consigo mismas y con otros factores presentes durante la infección viral en la planta, relacionados con la maquinaria del silenciamiento.

### 4.2.1. Visualización de homodímeros de proteína 2b

Mediante BiFC estudiamos si la proteína 2b interactuaba *in vivo* consigo misma, formando dímeros (homodímeros). La técnica permite visualizar las interacciones directamente en células epidérmicas de tejido fresco sin fijarlo ni seccionarlo. Expresamos transitoriamente las proteínas de fusión sYFPN-2b y sYFPC-2b, con las mitades amino y carboxilo de la proteína fluorescente YFP fusionados en el extremo amino de la proteína 2b, a partir de plásmidos binarios, mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*. Si dos proteínas marcadas con las mitades complementarias de YFP interactúan entre sí, la proximidad de éstas permite la reconstitución de su fluoróforo (Fig. 21A, izda.), emitiendo fluorescencia visible en microscopio confocal bajo excitación de luz adecuada (Hu *et al.* 2002; Kerppola 2006). Sin embargo, la mitad de las interacciones potenciales, en que participan mitades iguales del marcador fluorescente, continuarían siendo invisibles.

Observamos fluorescencia derivada de pares de proteínas 2b marcadas con sYFP complementarias en tejidos agroinfiltrados en que se habían co-expresado, lo que indica que la proteína 2b de CMV puede formar *in vivo* homodímeros (Fig. 21), como sugerían las observaciones *in vitro* de la proteína ortóloga de TAV (Chen *et al.* 2008). La fluorescencia derivada de la interacción se localizó dentro de la célula vegetal

distribuida por el citoplasma y el núcleo (Fig. 21A, dcha.). La visualización ampliada de estos núcleos permitió observar que dentro del núcleo la interacción tenía lugar en el nucléolo, coincidiendo con la localización del marcador nuclear fibrilarina (Fib-mRFP; Fig. 21B). Este patrón de localización de la fluorescencia derivada de BiFC coincide con el patrón de localización subcelular de la proteína 2b fusionada a proteínas fluorescentes intactas (2b-mRFP y GFP-2b, Fig. 13). Las proteínas sYFPN-2b y sYFPC-2b retienen la actividad supresora de silenciamiento en experimentos de supresión local del silenciamiento (Figs. 12, y 21C, izda.). La fluorescencia derivada de YFP reconstituida en la interacción YFPN-2b/YFPC-2b no fue visible bajo la lámpara UV (Fig. 21C, dcha.), y cada una de las construcciones por separado (sYFPN-2b o sYFPC-2b) no mostró fluorescencia en microscopio confocal para BiFC cuando se co-agroinfiltraron con el binario complementario vacío, que expresa las mitades amino o carboxilo de YFP junto con una pequeña cola peptídica en su extremo carboxilo (sYFPN-2b/sYFPC, sYFPN/sYFPC-2b), utilizados como controles negativos en los experimentos. Chen y colaboradores (2008) propusieron un modelo de formación de los dímeros de la proteína 2b de TAV, de su interacción con siRNAs, y de formación de dímeros de dímeros mediante una cremallera de leucinas, y la proteína 2b de CMV podría estar interaccionando de manera semejante (Fig. 21D).

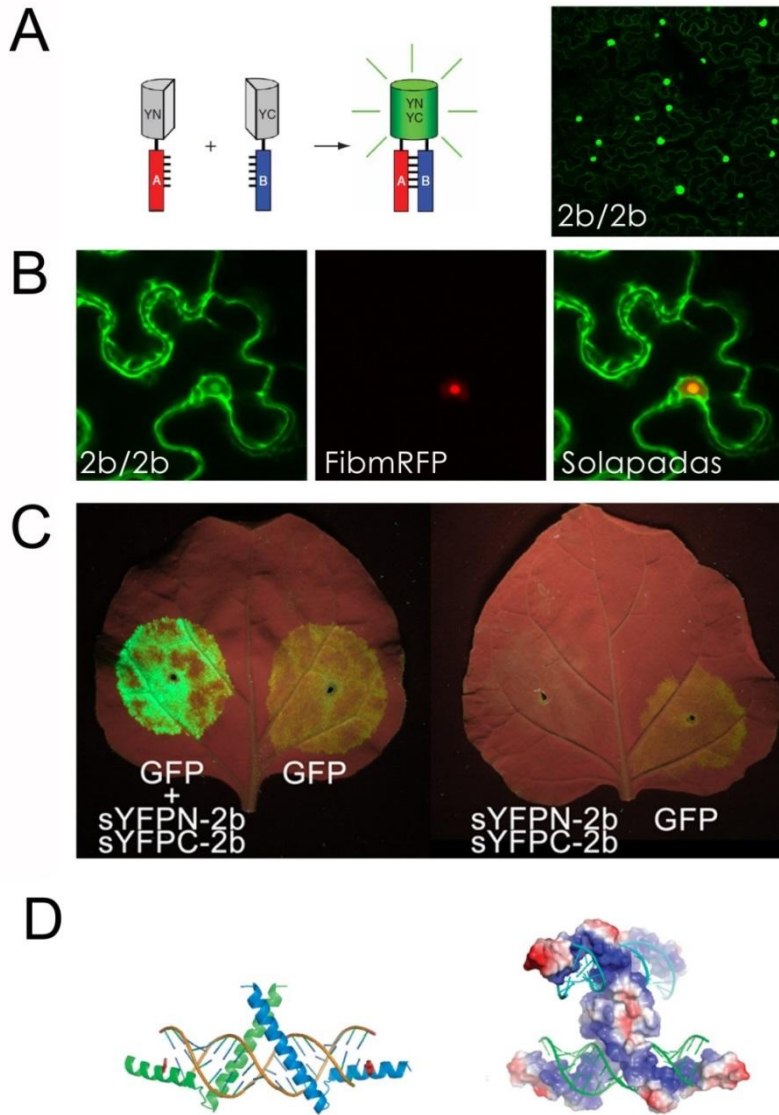


Fig. 21: La proteína 2b de CMV interacciona *in vivo* formando dímeros en experimentos de BiFC. A, La BiFC se basa en la expresión de pares de proteínas fusionadas a mitades de una proteína fluorescente. En caso de interacción se puede reconstituir el fluoróforo dividido entre las dos mitades de la proteína fluorescente produciéndose emisión de fluorescencia cuando es excitado a la longitud de onda adecuada (panel izdo.; diagrama esquemático reproducido de Kerppola 2006). La co-agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* de sYFPN-2b y sYFPC-2b y la observación de campos de células epidérmicas nos permitió estudiar la posible interacción *in vivo* entre proteínas 2b (imagen dcha.). El patrón de localización subcelular de la fluorescencia fue similar a los observados para 2b-mRFP y GFP-2b, principalmente nuclear, con presencia también en el citoplasma. B, En el núcleo, la interacción sYFPN-2b/sYFPC-2b (imagen izda.) co-localizó con el marcador nucleolar Fib-mRFP (imagen central). Las imágenes solapadas se muestran en la imagen dcha. Cada una de las construcciones por separado (sYFPN-2b y sYFPC-2b), co-expresadas con el vector vacío (sYFPN o sYFPC), no mostraron fluorescencia (imágenes no mostradas). C, Ensayo de supresión local de silenciamiento de sYFPN-2b y sYFPC-2b. Ambas construcciones retuvieron la actividad supresora. D, Reproducción de los modelos propuestos por Chen y colaboradores (2008) para el dímero y el dímero de dímeros (tetrámero) de la proteína 2b de TAV (imágenes izda. y dcha., respectivamente). El color azul representa zonas con cargas positivas y el rojo cargas negativas. La interacción con la hélice de RNA se da en zonas con cargas positivas, que corresponden con las regiones ricas en arginina.

Las nueve proteínas 2b mutantes utilizadas en este estudio (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL, 2b $\Delta$ 5T y 2b $\Delta$ 3T) fusionadas a las mitades amino y carboxilo de YFP retuvieron la propiedad de interactuar consigo mismas (Fig. 22), entre ellas y con proteína 2b no mutada en ensayos de BiFC (datos no mostrados). Aquellas proteínas mutantes de 2b que carecían de actividad supresora de silenciamiento (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2b $\Delta$ 5T) se agroinfiltraron en presencia del supresor de silenciamiento heterólogo P19 de TBSV para asegurar que se alcanzaban niveles de acumulación transitoria comparables a los mutantes con actividad supresora (Fig. 22A). En aquellos mutantes cuya localización subcelular era citoplásmica (GFP-2b $\Delta$ NLS1, GFP-2b $\Delta$ NLS2, GFP-2b $\Delta$ NLS1+2) encontramos que la interacción de la proteína consigo misma se localizaba también en el citoplasma (Fig. 22B). La proteína 2b $\Delta$ KSPSE, con distribución principalmente nucleolar (GFP-2b $\Delta$ KSPSE), mostró fluorescencia derivada de su autointeracción en ensayos de BiFC también en el nucléolo. Y las proteínas que presentaban localización subcelular semejante a la proteína 2b (GFP-2bS40A, GFP-2bS42A, GFP-2b $\Delta$ GSEL, GFP-2b $\Delta$ 5T y GFP-2b $\Delta$ 3T) en ensayos de BiFC también mostraron un fenotipo de fluorescencia similar a GFP-2b (Fig. 22B y C). Todo ello sugiere que ninguna de estas mutaciones impide la dimerización de la proteína 2b y que, pese a las diferentes localizaciones subcelulares observadas *in vivo* en los mutantes marcados con GFP, en todos los casos parecen estar formando homodímeros.

Dado que los diferentes mutantes de la proteína 2b parecen retener la propiedad de interactuar entre ellos, estudiamos la posibilidad de que las mutaciones que suprimen el silenciamiento se pudieran complementar *in trans*, complementándose entre sí y recobrando el dímero la actividad supresora de silenciamiento. Para ello co-agroinfiltramos y expresamos las construcciones mutantes para BiFC en pares, junto con GFP libre. El ensayo se llevó a cabo con las seis proteínas mutantes de 2b que teníamos en el momento de llevarlo a cabo (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A y 2bS42A). Nuestros resultados mostraron supresión del silenciamiento de la GFP libre sólo en aquellos casos en que una o ambas de las construcciones de proteína 2b para BiFC retenían la actividad supresora, pero los

mutantes que carecían de actividad supresora no pudieron complementarse en estos ensayos de co-expresión (Fig. 23).

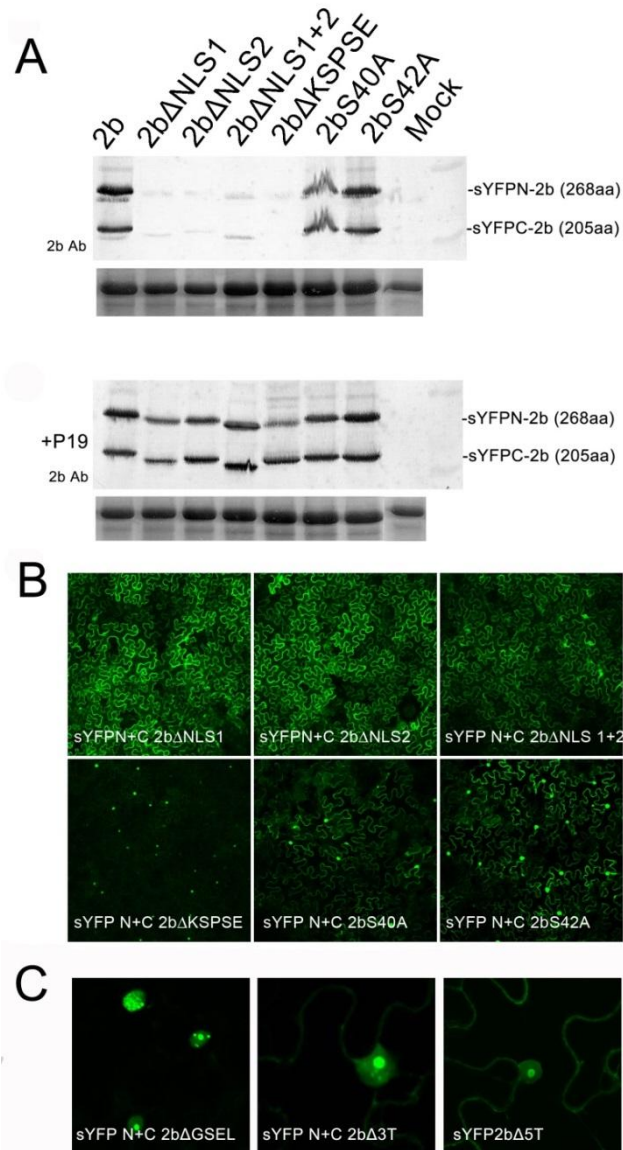


Fig. 22: Las proteínas mutantes de 2b retienen su propiedad de formar homodímeros *in planta*. Las proteínas 2b mutantes, marcadas con sYFPN y sYFPC en el extremo amino de la proteína 2b, se co-agroinfiltraron en *N. benthamiana*. A, Acumulación por western blot de los pares de proteínas (sYFPN+ + sYFPC-) de los seis mutantes analizados (2bΔNLS1, 2bΔNLS2, 2bΔNLS1+2, 2bΔKSPSE, 2bS40A y 2bS42A). Los cuatro primeros mutantes, sin actividad supresora de silenciamiento, se acumularon pobremente (western blot superior), pero la co-agroinfiltración con P19 de TBSV igualó su acumulación a la de las proteínas con actividad supresora (western blot inferior). Debajo de cada western blot se muestran las membranas teñidas con rojo ponceau S como controles de carga. B, la fluorescencia derivada de BiFC en campos de células epidérmicas fue predominantemente citoplásmica en el caso de los pares sYFPN+C 2bΔNLS1, sYFPN+C 2bΔNLS2 y sYFPN+C 2bΔNLS1+2, y principalmente nucleolar en el caso de sYFPN+C 2bΔKSPSE. La fluorescencia derivada de las interacciones sYFPN+C 2bS40A y sYFPN+C 2bS42A fue semejante a la derivada de la interacción 2b/2b (ver Fig. 21). C, Fluorescencia derivada de la interacción de otros tres mutantes: la interacción sYFPN+C 2bΔGSEL fue predominantemente nucleolar, mientras que las interacciones sYFPN+C 2bΔ5T y sYFPN+C 2bΔ3T fueron semejantes a la interacción 2b/2b (ver Fig. 21).

## sYFPC

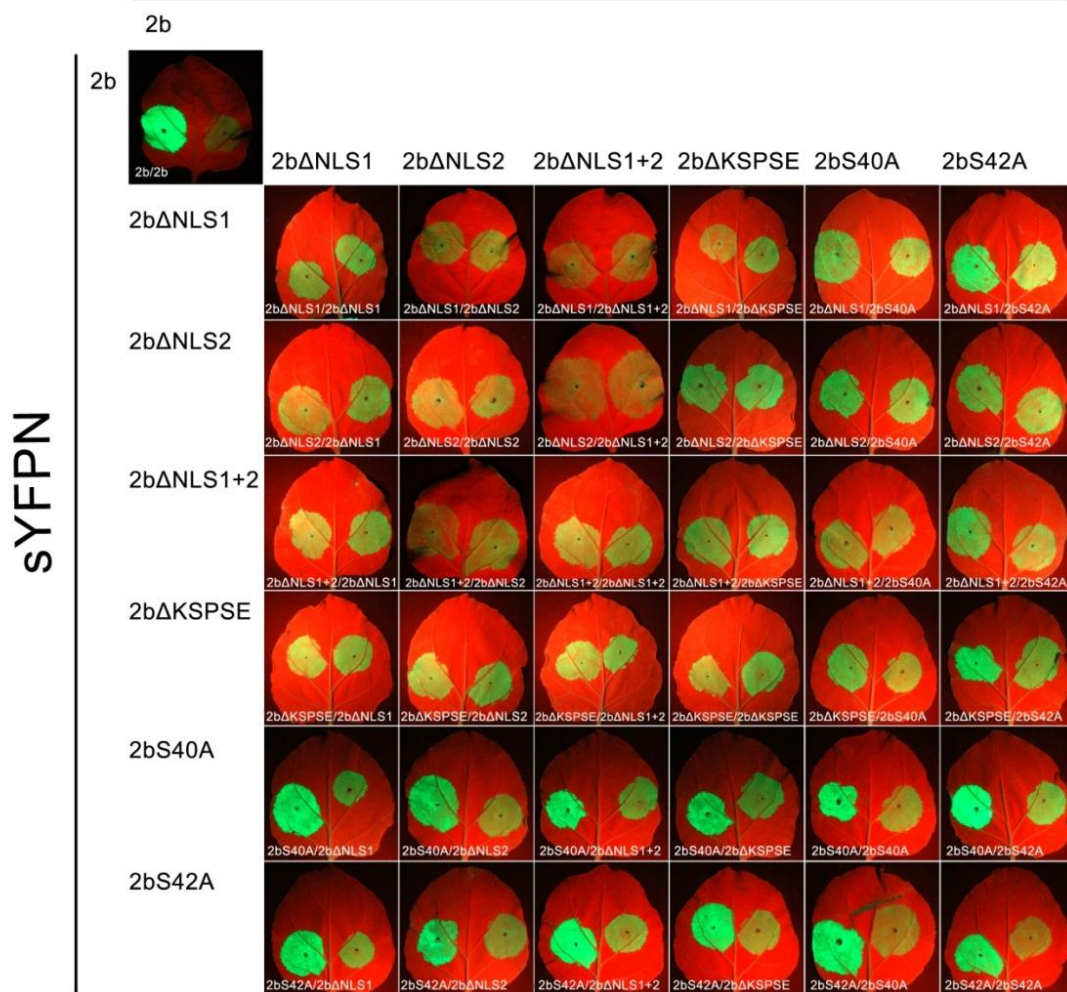


Fig. 23: Comparación de la actividad supresora del silenciamiento de las combinaciones posibles entre seis pares de proteínas 2b mutantes marcadas para BiFC en ensayos de supresión local de silenciamiento. En cada hoja de *N. benthamiana*, como control interno negativo, se expresó transitoriamente GFP libre junto con el vector binario vacío (pROK2; lado dcho. de cada hoja). En el lado izdo. de las hojas se co-agroinfiltraron pares de proteínas 2b mutantes junto con GFP libre. Hubo actividad supresora de silenciamiento en todos aquellos pares de proteínas en los que una o ambas tenían actividad supresora de silenciamiento (2b y mutantes 2bS40A y 2bS42A), mientras que los mutantes que carecían de actividad supresora por separado (2bΔNLS1, 2bΔNLS2, 2bΔNLS1+2, 2bΔKSPSE) no se complementaron entre sí en ninguna de las combinaciones posibles.

### 4.2.2. Visualización de interacciones de la proteína 2b con proteínas argonauta

La interacción de la proteína 2b de CMV con otras proteínas de la planta podría ser importante en la actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b.

Anteriormente a nuestro trabajo se había demostrado mediante co-immunoprecipitación que la proteína 2b de CMV interactuaba *in vivo* con AGO1 (Zhang *et al.* 2006b), y también que inhibía la transcripción de AGO4 (Ye *et al.* 2009). En ensayos de reconstitución *in vitro* de RISC, Zhang y colaboradores (2006b) observaron que la proteína 2b de CMV inhibía el silenciamiento interactuando con AGO1, inhibiendo su actividad degradadora de RNAs. Estas proteínas AGO forman parte de complejos RISC de la maquinaria del silenciamiento antiviral de la planta. Las proteínas AGO son sus efectores, que degradan los RNAs diana. Mientras que AGO1 une siRNAs de 21 nts, derivados de DCL4, AGO4 une siRNAs de 24 nts derivados de DCL3 (Mi *et al.* 2008).

Decidimos visualizar *in vivo* la ocurrencia subcelular de esas posibles interacciones entre la proteína 2b y sus mutantes y las proteínas AGO1 y AGO4 mediante BiFC. La proteína 2b se localiza en el citoplasma y nucléolo (Fig. 13) mientras que AGO1 lo hace en el citoplasma y en el núcleo celular (Vaucheret 2008) y AGO4 principalmente en los cuerpos nucleolares (Li *et al.* 2006). Mediante BiFC, visualizamos *in vivo* la interacción de 2b/AGO1 y 2b/AGO4 en el citoplasma y de 2b/AGO4 en el núcleo, co-agroinfiltrando los pares de proteínas sYFPN-AGO1/sYFPC-2b y sYFPN-2b/sYFPC-AGO1, y sYFPN-AGO4/sYFPC-2b y sYFPN-2b/sYFPC-AGO4 en hojas de *N. benthamiana* (Fig. 24, A-D). La interacción 2b/AGO4 no se había estudiado anteriormente al desarrollo de esta parte experimental de la tesis doctoral, aunque sí se había observado una inhibición de la transcripción de AGO4 por la proteína 2b, que Ye y colaboradores (2009) relacionaron con el dominio tres o tercera alfa-hélice de esta última. Nuestras observaciones nos permitieron visualizar *in vivo* fluorescencia derivada de BiFC, que sugiere una interacción de la proteína 2b con AGO4 dentro del núcleo celular, aunque excluyendo el nucléolo del núcleo. Posteriormente a nuestro trabajo se ha demostrado la interacción *in vitro* de la proteína 2b de CMV con AGO1 y AGO4 de *Arabidopsis* en experimentos de inmunoprecipitación y *pull down* (Hamera *et al.* 2012).

Para ver si las mutaciones en nuestra batería de mutantes de la proteína 2b afectaban a la interacción del supresor con AGO1 o AGO4, o a la localización subcelular del mismo, los co-agroinfiltramos con las proteínas AGO1 y AGO4 en pares compatibles para BiFC (por ejemplo, sYFPN-AGO1/sYFPC-2b $\Delta$ NLS1; sYFPN-AGO4/sYFPC-2b $\Delta$ NLS1)

en hojas de *N. benthamiana*. Las proteínas mutantes sin actividad supresora (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2b $\Delta$ 5T) se co-agroinfiltraron junto con P19 de TBSV para asegurar su acumulación transitoria y poder visualizar fluorescencia derivada de las interacciones, si las hubiere.

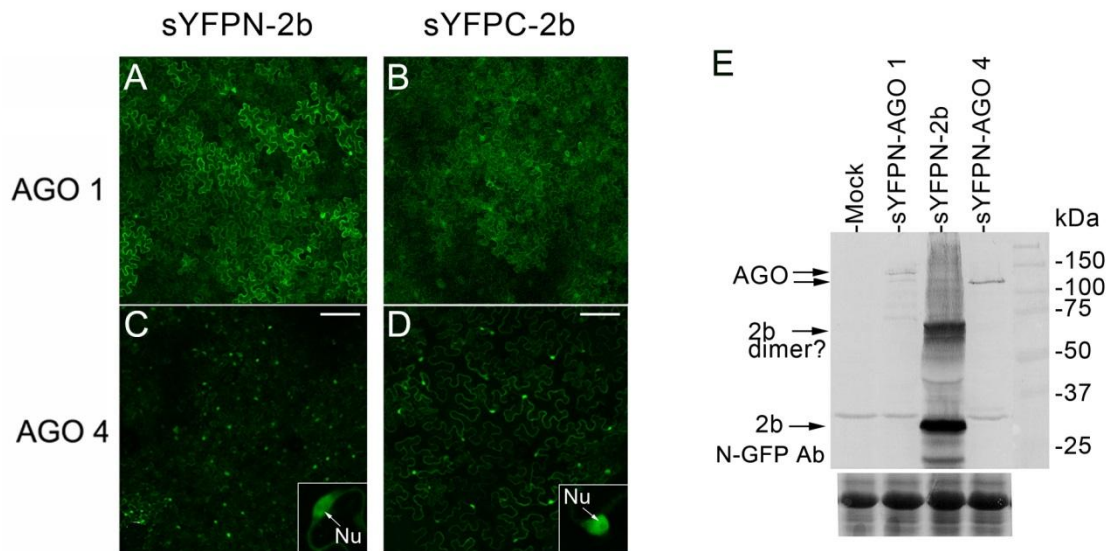


Fig. 24: Visualización de la interacción de la proteína 2b de CMV con las proteínas celulares AGO1 y AGO4 de *A. thaliana* y su ocurrencia subcelular. Se co-agroinfiltraron y expresaron transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* las construcciones sYFPN-2b, sYFPN-AGO1, sYFPN-AGO4, sYFPC-2b, sYFPC-AGO1 y sYFPC-AGO4 en pares complementarios. A y B, fluorescencia derivada de las interacciones sYFPN-2b/sYFPC-AGO1 y sYFPN-AGO1/sYFPC-2b. La fluorescencia se localizó mayoritariamente en el citoplasma y fue mucho más débil que la observada en la interacción 2b/2b (ver Fig. 21). C y D, fluorescencia derivada de las interacciones sYFPN-2b/sYFPC-AGO4 y sYFPN-AGO4/sYFPC-2b. La fluorescencia se localizó en el núcleo celular, aunque ausente del nucléolo (Nu, en la vista ampliada del núcleo en la esquina inferior dcha. de las imágenes), y fue también mucho más débil que la derivada de 2b/2b. La barra en la esquina superior dcha. representa 100  $\mu$ m. E, Análisis de la acumulación por *western blot* de sYFPN-2b, sYFPN-AGO1 y sYFPN-AGO4 en tejidos co-agroinfiltrados, en que se utilizó un anticuerpo para detectar sYFPN (N-GFP Ab). El panel inferior muestra el control de carga, gel teñido con azul de coomassie. La acumulación de sYFPN-AGO1 y sYFPC-AGO4 fue menor a la de sYFPN-2b. *Mock* representa tejido infiltrado con tampón de infiltración en ausencia de agrobacterium, como control negativo.

Nuestros resultados mostraron que los nueve mutantes de 2b analizados interactúan con ambas AGOs (Fig. 25): La distribución subcelular de la fluorescencia derivada de su BiFC fue semejante a la observada en la interacción con la proteína 2b, todas las proteínas 2b mutantes interactuaron con AGO1 en el citoplasma, y con AGO4 en citoplasma y núcleo, excluyendo el nucléolo. A pesar de que algunos mutantes carecían de una o ambas NLSs (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2), esto no afectó a la



localización de la interacción, por lo que la interacción con AGO4 sobreexpresada transitoriamente parece poder traslocar parte de dichos mutantes (o al complejo resultante) al núcleo celular, excluyendo el nucléolo en cualquier caso. Incluso la proteína 2b $\Delta$ KSPSE, de fuerte presencia nucleolar, se re-localizó al nucleoplasma al interactuar con AGO4, aunque no podemos saber en qué proporción.

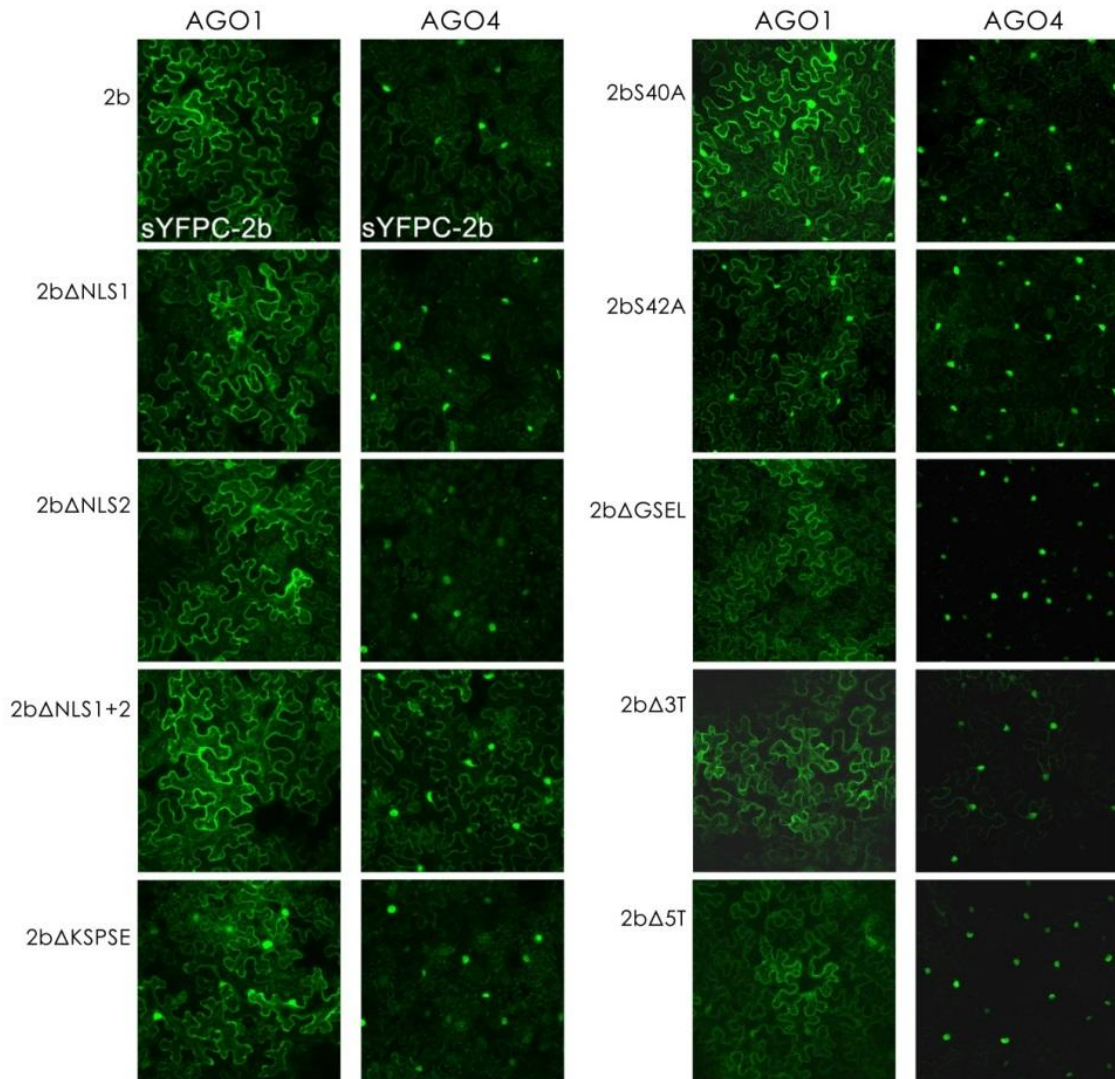


Fig. 25: Visualización y ocurrencia subcelular de interacciones de nueve mutantes de proteína 2b con las proteínas celulares AGO1 y AGO4 de *A. thaliana*. Se co-agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* los pares de proteínas 2b mutantes y AGO con las mitades complementarias amino y carboxilo de la proteína YFP en el extremo amino de las proteínas. Las proteínas 2b mutantes sin actividad supresora de silenciamiento (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2b $\Delta$ 5T) se co-agroinfiltraron junto con P19 de TBSV para garantizar su acumulación transitoria. Se muestra la fluorescencia derivada de BiFC en campos de células epidérmicas. Todas las proteínas 2b mutantes interaccionaron con ambas proteínas AGO. En todas las interacciones con AGO1, la fluorescencia fue principalmente citoplásmica, similar a la BiFC resultante de 2b/AGO1. En todas las interacciones con AGO4, el patrón de localización subcelular fue nuclear, excluyendo al nucléolo, como la BiFC resultante de 2b/AGO4, a pesar de que algunas proteínas 2b mutantes no se acumulaban en el núcleo celular por sí mismas (ver Fig. 18).

### 4.3. Unión *in vitro* de la proteína 2b a RNAs

La unión a RNAs se ha encontrado en proteínas supresoras del silenciamiento de virus de diferentes familias, y puede constituir una propiedad muy extendida en dichas proteínas, y estar relacionada con sus actividades supresoras del silenciamiento. La proteína 2b de TAV forma dímeros que unen *in vitro* sRNAs, con una relación entre proteína y RNA de 2:1 (Rashid *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008). En nuestro estudio quisimos investigar si la proteína 2b de CMV unía *in vitro* diferentes tipos de RNAs, y en caso afirmativo determinar las propiedades cinéticas de estas uniones. Los intentos de purificación de proteína 2b de planta, marcada con un péptido de seis histidinas (6xHis) no fueron exitosos (datos no mostrados) por lo que expresamos en *E. coli* el plásmido pQE30 conteniendo el gen 2b nativo o nuestra batería de nueve mutantes que expresaban las proteínas como fusiones a 6xHis en su extremo amino y el péptido HA en su extremo carboxilo (construcciones pQE30- 6xHis-2b, 6xHis-2b $\Delta$ NLS1, 6xHis-2b $\Delta$ NLS2, 6xHis-2b $\Delta$ NLS1+2, 6xHis-2b $\Delta$ KSPSE, 6xHis-2bS40A, 6xHis-2bS42A, 6xHis-2b $\Delta$ GSEL, 6xHis-2b $\Delta$ 3T y 6xHis-2b $\Delta$ 5T). Las proteínas expresadas se purificaron mediante columnas con resina Ni-NTA en condiciones desnaturizantes, y posteriormente fueron renaturalizadas *in vitro*. Se evaluó entonces su unión *in vitro* a sRNAs sintéticos en ensayos de retardo en gel (Rakitina *et al.* 2006). Estos sRNAs están basados en la secuencia del miRNA 171 de *A. thaliana*. Evaluamos tres tipos de RNAs pequeños: de doble hebra de 21 nts con complementariedad total y dos nts desapareados en los extremos (ds siRNA); el microRNA sintético (miRNA) de 21 nts con complementariedad parcial con dos nts desapareados en los extremos y 4 nts desapareados en su interior, dos de ellos consecutivos; y de hebra sencilla de 21 nts y polaridad positiva (ss siRNA), descritos en el apartado 3.7. de Material y Métodos (Fig. 11). Tras incubar las proteínas y el RNA en un tampón de unión, sometimos la muestra incubada a electroforesis en condiciones nativas. En este tipo de ensayos el RNA que permanece unido a la proteína 2b no penetra en el gel o lo hace con retardo, mientras que el RNA libre penetra directamente en el mismo. El ensayo permite cuantificar indirectamente la proporción de RNA que se ha unido a la proteína, como medida inversa a la cantidad de RNA que ha penetrado en el gel, y éste se puede cuantificar midiendo la intensidad de banda visualizada frente al control.

En un primer estudio incubamos la proteína 2b y seis mutantes (6xHis-2b $\Delta$ NLS1, 6xHis-2b $\Delta$ NLS2, 6xHis-2b $\Delta$ NLS1+2, 6xHis-2b $\Delta$ KSPSE, 6xHis-2bS40A, 6xHis-2bS42A) con ds siRNA con una relación molar proteína:RNA de 15:1. Esta relación molar esperábamos que fuera más que suficiente para unir la totalidad del RNA, ya que estudios con la proteína 2b de TAV habían mostrado que ésta podía unir sRNAs *in vitro* con una relación molar 2:1 en sus condiciones experimentales (Chen *et al.* 2008). El resultado de este primer ensayo demostró que la proteína 2b de la cepa Fny de CMV une *in vitro* ds siRNA (Fig. 26), como se había observado anteriormente en otros estudios con otros cucumovirus (Goto *et al.* 2007; Rashid *et al.* 2008). La proteína 2b de CMV y las proteínas mutantes 2bS40A y 2bS42A, que retuvieron su actividad supresora de silenciamiento intacta (Fig. 15), unieron el ds siRNA, mientras que aquellos mutantes en los en que se había deleccionado la NLS1 (2b $\Delta$ NLS1 y 2b $\Delta$ NLS1+2) no impidieron la entrada del ds siRNA en el gel. Sin embargo, las proteínas mutantes 2b $\Delta$ NLS2 y 2b $\Delta$ KSPSE presentaron cierta unión a ds siRNAs en estos ensayos y retardaron parcialmente su entrada en el gel (Fig. 26). En posteriores ensayos utilizamos además los otros tres mutantes de la proteína 2b con deleciones fuera de la región de la proteína supuestamente involucrada en la unión a sRNAs: 6xHis-2b $\Delta$ GSEL, con una deleción parcial de un dominio conservado en el subgrupo I de CMV; 2b $\Delta$ 5T, con deleción del dominio terminal amino (aas 1-17); y 2b $\Delta$ 3T, con deleción del dominio terminal carboxilo (aas 95-110). Estas deleciones afectan en diferente grado a la patogenicidad del virus (Fig. 14, y Lewsey *et al.* 2009).

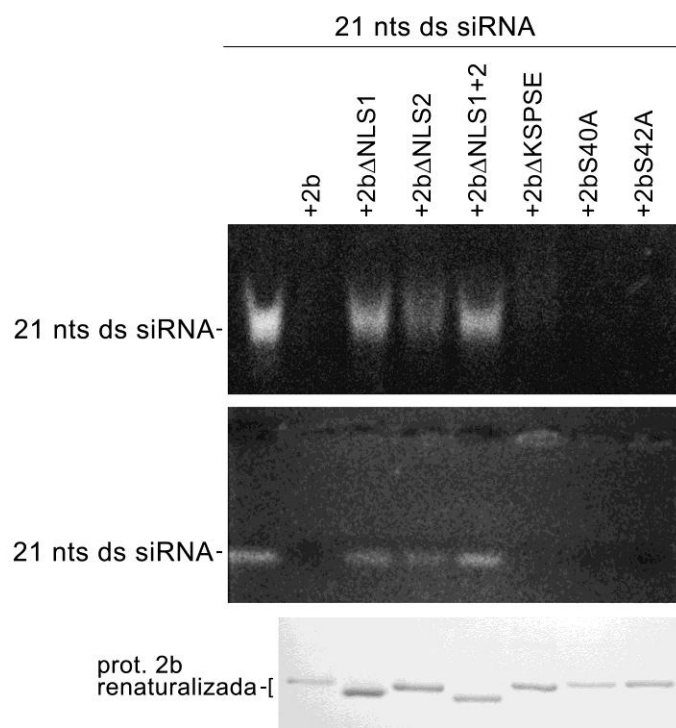


Fig. 26: Unión *in vitro* de la proteína 2b de CMV a un sRNA sintético de 21 nts de doble cadena (ds siRNA). Se expresaron y purificaron las proteínas en *E. coli* y se incubaron con el RNA sintético a una relación molar proteína:RNA de 15:1. Se resolvió el RNA no unido a proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida (panel superior) o en gel de agarosa al 2% (panel intermedio). La primera calle del gel muestra 5 pmol de RNA libre en ausencia de proteína, y las siguientes en presencia de las proteínas 2b y seis mutantes (2bΔNLS1, 2bΔNLS2, 2bΔNLS1+2, 2bΔKSPSE, 2bS40A y 2bS42A). Las proteínas 2b, 2bS40A y 2bS42A previnieron completamente la entrada del ds siRNAs en el gel, por lo que todo el RNA estaba unido a la proteína. Las proteínas 2bΔNLS1 y 2bΔNLS1+2 no unieron el ds siRNA, que penetró en el gel. Las proteínas 2bΔNLS2 y 2bΔKSPSE retuvieron parcialmente la entrada de ds siRNA de la muestra. El panel inferior muestra las proteínas 2b y mutantes utilizadas en el experimento, purificadas, renaturalizadas y separadas por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida del 12%.

#### 4.3.1. Caracterización de las propiedades de la unión *in vitro* de proteína 2b nativa o mutante a sRNAs

Nuestros primeros resultados de unión *in vitro* de la proteína 2b y seis mutantes al ds siRNA (Fig. 26) sugieren que podría haber una correlación entre la unión a sRNAs y la actividad supresora de silenciamiento antiviral de esta proteína, ya que mutantes que no presentaban actividad supresora (2bΔNLS1, 2bΔNLS2, 2bΔNLS1+2, 2bΔKSPSE) no lo unían, o tenían dicha unión debilitada (Fig. 26).

Investigamos más a fondo esta propiedad de unir sRNAs de la proteína 2b y sus posibles implicaciones funcionales. Para ello se ensayaron *in vitro* la proteína 2b nativa

y los nueve mutantes de que llegamos a disponer (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL, 2b $\Delta$ 5T y 2b $\Delta$ 3T) con tres tipos distintos de sRNAs (ds siRNA, miRNA y ss siRNA) y con un RNA viral de cadena sencilla, y se caracterizaron sus cinéticas de unión, contrastándolas con sus relativas actividades supresoras del silenciamiento, y con sus efectos en la infección viral como determinantes de patogenicidad cuando los mutantes se expresaban desde el propio CMV (Lewsey *et al.* 2009, y este trabajo).

Los resultados obtenidos de la unión *in vitro* a sRNAs mediante geles de retardo (Figs. 27 y 28), los cuantificamos y los representamos como gráficas de curvas de unión de la proteína 2b y mutantes a los tres tipos de sRNAs analizados (Figs. 27 y 29). Para ello en los pocillos de estos geles se aumentó gradualmente la relación molar de proteína frente a una concentración fija de RNA. Tras cuantificar el RNA que penetraba en el gel, y habiendo cuantificado la proteína, obtuvimos las gráficas que representan el porcentaje de RNA que es unido por la proteína para cada ratio molar proteína:RNA, en cada una de las calles del gel de retardo, y lo mismo con el RNA viral (Figs. 27 a 30). Con estos datos se calculó la constante de disociación (Kd) y el coeficiente de Hill, expresados en la Tabla 3. La constante Kd es la concentración de proteína a la que el 50% del RNA aparece unido a proteína. Cuanto menor es su valor, más afinidad hay entre proteína y ligando (RNA). Por otro lado, el Coeficiente de Hill es un indicador de cooperatividad en la unión a RNA. Si tiene un valor inferior a uno indica cooperatividad negativa, lo que significa que una vez que el ligando (RNA) se ha unido a la proteína, la afinidad de otras proteínas por más ligandos disminuye; un valor igual a uno significa unión no cooperativa, en que la afinidad de las proteínas por los ligandos no depende de si otras moléculas de ligando se han unido a la proteína; y valores superiores a uno significan unión cooperativa positiva, en que la afinidad por el ligando aumenta según se van uniendo ligandos a las proteínas. En proteínas con un único lugar de unión, uno podría esperar encontrar unión no cooperativa (coeficiente de Hill =1), y la observación de valores diferentes a uno pueden indicar que la proteína en cuestión no es monomérica. Chen y colaboradores (2008) habían mostrado por cristalografía que la proteína 2b de TAV forma dímeros y que cada dímero une un siRNA, y que los dímeros se asocian por las cremalleras de leucina para formar tetrámeros (un tetrámero une

dos siRNAs). En nuestro caso, los resultados habían mostrado que la proteína 2b formaba dímeros (Fig. 21), por lo que la unidad funcional en la unión *in vitro* a sRNAs podría ser el dímero, como se ha visto en otros casos, en que dos o más proteínas se asocian para unir uno o varios ligandos (Monod *et al.* 1965), y como ya apuntaron los resultados de la proteína 2b de TAV, en que un dímero 2b unía un siRNA (Fig. 21D y Chen *et al.* 2008).

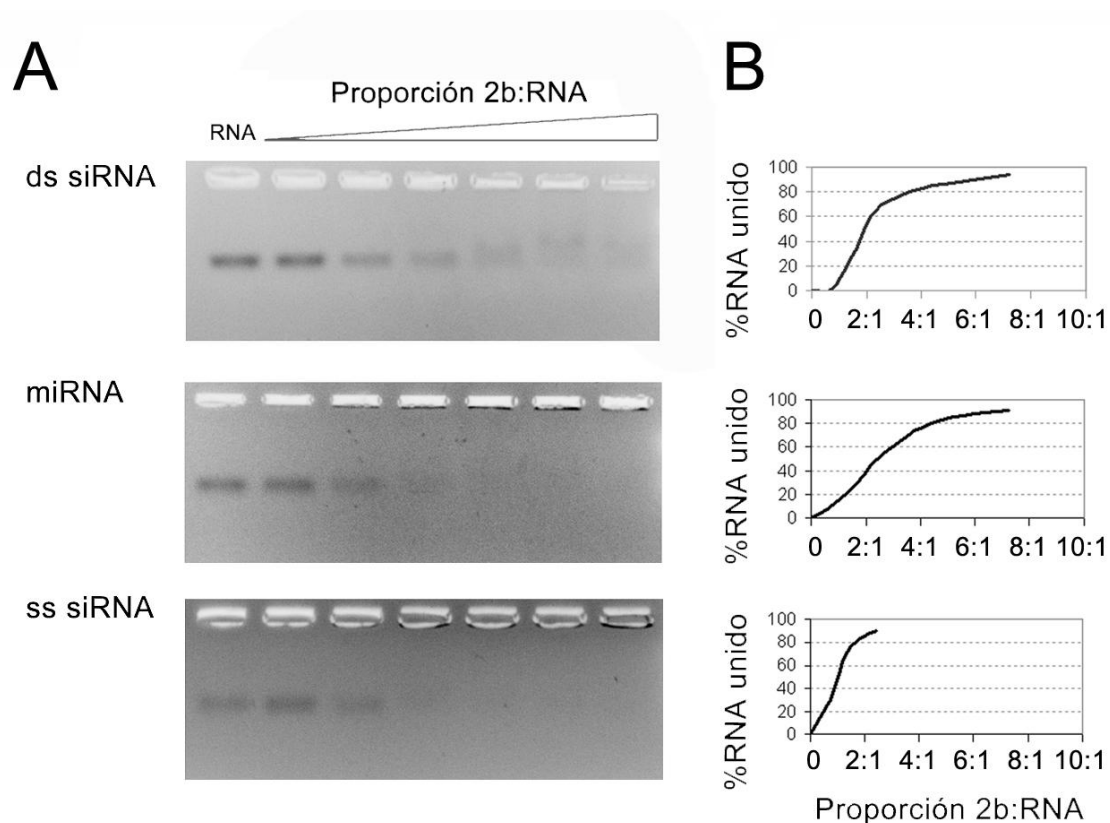


Fig. 27: Cinéticas de unión *in vitro* de la proteína 2b nativa a diferentes sRNAs basados en el miRNA 171 de *A. thaliana*. Se estudió la unión a un sRNA de 21 nts de doble hebra (ds siRNA), al miRNA sintético (miRNA) y a un sRNA de hebra sencilla y polaridad positiva (ss siRNA) (ver Fig. 11). A, Geles de retardo de agarosa al 2%. La primera calle del gel muestra RNA libre en ausencia de proteína. Se incubaron 5 pmol de ds siRNA o miRNA y 15 pmol de ss siRNA, en concentraciones crecientes de proteína 2b. El RNA unido a la proteína es retenido en el pocillo del gel y no penetra o penetra con retardo en el mismo. En presencia de concentraciones crecientes de proteína la relación de RNA retenido se incrementó en los tres casos. B, Curvas de retención de los RNAs. Se obtuvieron a partir de los geles mostrados en A, y representan el porcentaje de RNA retenido por la proteína, respecto a la carrera control (RNA incubado en solución sin proteína, primer pocillo), para cada proporción de proteína:RNA. La proteína 2b se unió al ss siRNA con una afinidad mayor que al miRNA o el ds siRNA.

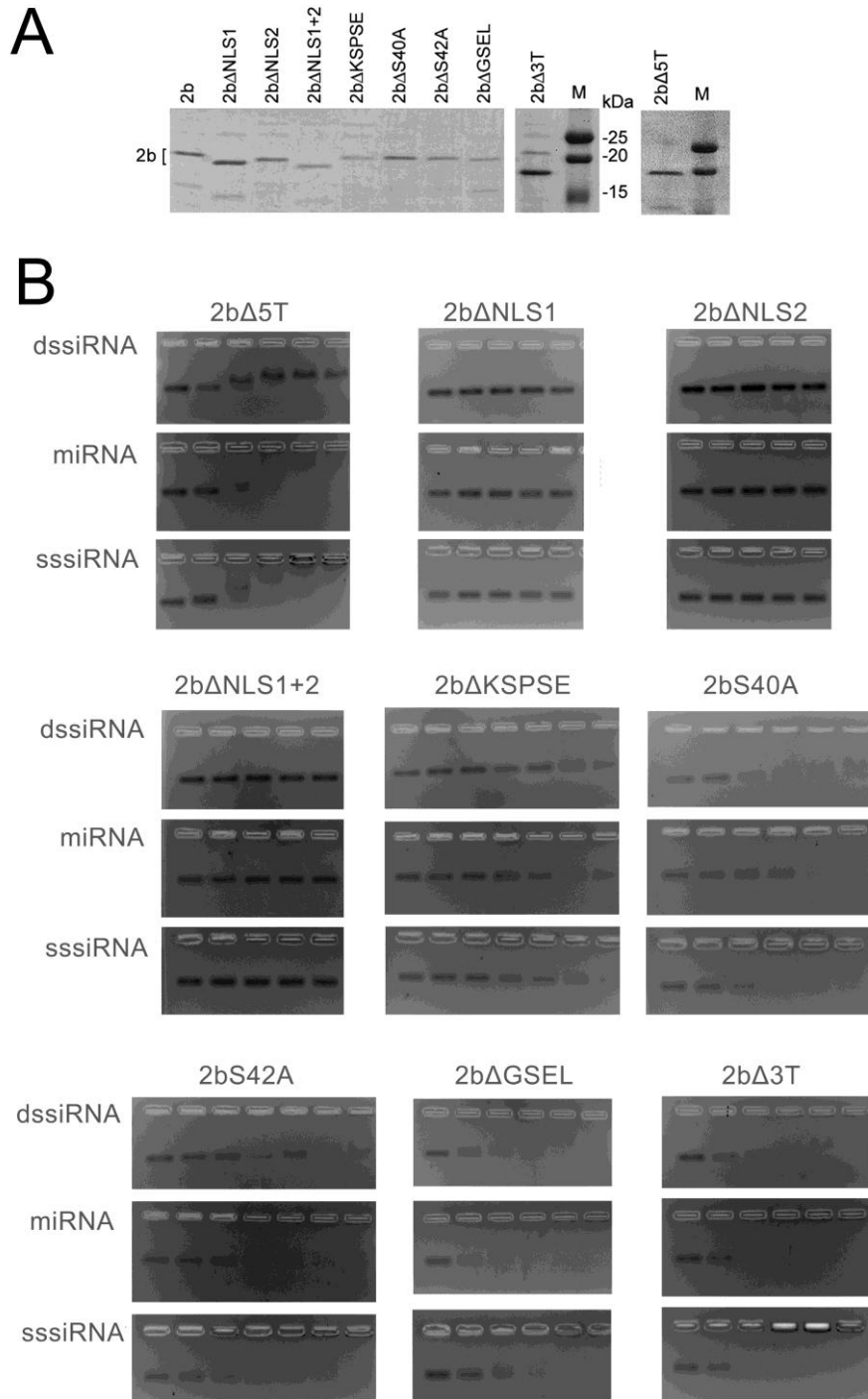


Fig. 28: Unión *in vitro* de las nueve proteínas mutantes a sRNAs (ds siRNA, a miRNA y a ss siRNA) basados en el miRNA 171 de *A. thaliana*. A, Proteínas purificadas, renaturalizadas y separadas en gel de SDS-poliacrilamida al 15%, utilizadas en el experimento. B, Geles de retardo de agarosa al 2%. La primera carrera muestra sRNA libre, en ausencia de proteína. Se incubaron 5 pmol de ds siRNA y de miRNA y 15 pmol de ss siRNA, con concentraciones crecientes de proteína. En presencia de concentraciones crecientes de las proteínas 2bS40A, 2bS42A, 2bΔGSEL y 2bΔ3T la proporción de RNA libre disminuyó, y el retenido se incrementó, en los tres casos. Otras proteínas mutantes, como 2bΔKSPSE y 2bS42A retuvieron sRNAs parcialmente, y aquellas proteínas con deleciones en las NLSs (2bΔNLS1, 2bΔNLS2 y 2bΔNLS1+2) no retuvieron sRNAs o lo hicieron de forma insignificante. La deleción en el extremo terminal amino (2bΔ5T) afectó asimétricamente la unión a los sRNAs, inhibiendo la unión al ds siRNA pero no al miRNA o al ss siRNA.

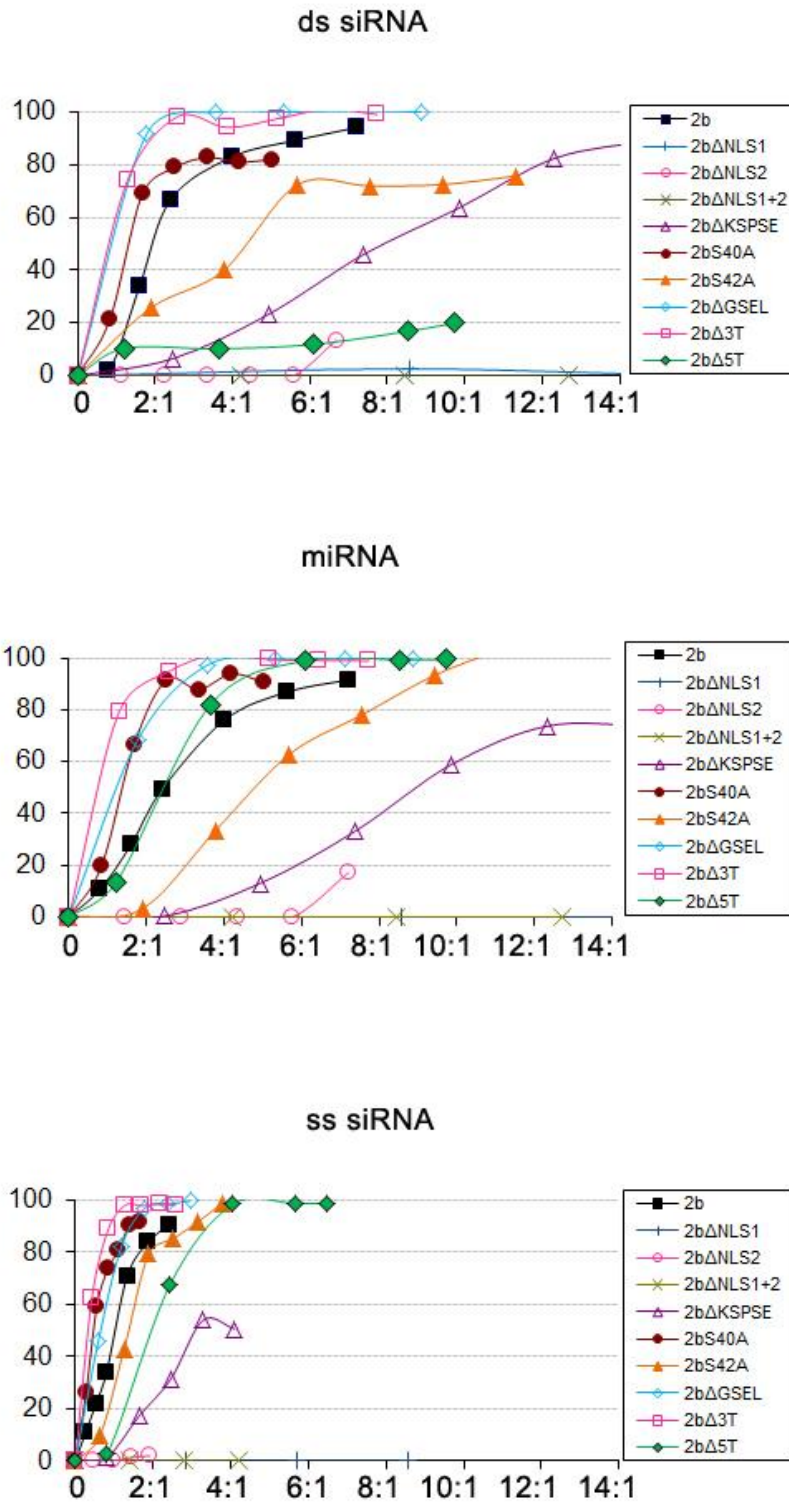


Fig. 29: Cinéticas de unión *in vitro* de la proteína 2b nativa y nueve mutantes (2bΔNLS1, 2bΔNLS2, 2bΔNLS1+2, 2bΔKSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2bΔGSEL, 2bΔ5T y 2bΔ3T) a los sRNAs (ds siRNA, miRNA y ss siRNA). Las curvas de retención de los RNAs se obtuvieron a partir de la cuantificación del sRNA que penetró en los geles mostrados en la Fig. 27, y representan para cada proporción molar proteína:RNA, mostradas en abscisas, el porcentaje de RNA unido a la proteína respecto a la calle control de RNA libre (incubado en ausencia de proteína), mostrado en ordenadas.



El cálculo de la constante de disociación ( $K_d$ ) y el coeficiente de Hill mostraron que la proteína 2b une ds siRNA de forma cooperativa (Coeficiente de Hill =3.65) con alta afinidad ( $K_d$  =0.92) (Tabla 3), y que a una relación molar proteína:RNA de 2:1 el 60% del ds siRNA quedaba unido a la proteína (Fig. 27). Esta relación molar se corresponde bien con los datos estructurales de 2b que Chen y colaboradores (2008) obtuvieron por cristalografía en TAV, en que la proteína 2b formaba dímeros que unían sRNAs. La proteína 2b unía también miRNA y ss siRNA (Fig. 27) de forma cooperativa (Coeficientes de Hill =2.11 y 2.03, respectivamente; Tabla 3) aunque su afinidad por estos sustratos era un poco menor que la que tenía por el ds siRNA ( $K_d$  =1.23 y 1.61, respectivamente frente a 0.92, Tabla 3). Con una relación molar proteína:RNA de 2:1, quedaba unido a la proteína 2b más del 80% del ss siRNA, mientras que sólo se unía el 40% del miRNA (Fig. 27).

De las nueve proteínas mutantes utilizadas en este estudio, aquellas con deleciones en las NLSs y que no tenían actividad supresora de silenciamiento (2b $\Delta$ NLS1 y 2b $\Delta$ NLS1+2) no unieron sRNAs, ya fuera ds siRNA, ss siRNA o miRNA, o la unión observada fue insignificante (2b $\Delta$ NLS2). La proteína 2b $\Delta$ KSPSE, sin actividad supresora de silenciamiento, mostró cierto grado de unión a sRNAs de forma cooperativa, aunque con una baja afinidad de unión en comparación con la proteína 2b (2b $\Delta$ KSPSE:  $K_d$  ds siRNA =4.63;  $K_d$  miRNA =3.96;  $K_d$  ss siRNA =5.61; Tabla 3). Esta proteína mutante no retuvo ss siRNAs o miRNA (Figs. 28 y 29) a la relación molar proteína:RNA 2:1 de la proteína 2b, y su unión al 50% de los ds siRNAs se alcanzó sólo a relaciones molares proteína:RNA de 8-10:1 (Figs. 28 y 29). Las proteínas 2bS40A y 2bS42A, con sustituciones puntuales en el motivo de fosforilación y que retenían la actividad supresora de silenciamiento (Tabla 1), presentaron diferencias en la unión a sRNAs con respecto a la proteína 2b nativa. El mutante 2bS40A presentó una afinidad por los tres sRNAs un poco mayor que la proteína 2b ( $K_d$  ds siRNA =0.55;  $K_d$  miRNA =0.62;  $K_d$  ss siRNA =0.71; Tabla 3), mientras que el mutante 2bS42A presentó una afinidad menor que la proteína nativa ( $K_d$  ds siRNA =1.59;  $K_d$  miRNA =2.8;  $K_d$  ss siRNA =2.00). A una relación molar proteína:RNA de 2:1, 2bS40A retenía el 80% del ds siRNA, frente al 30% de 2bS42A; este porcentaje de RNA unido se mantuvo en 2bS40A en la unión a miRNA,

mientras que fue algo menor para 2bS42A; y en la unión a ss siRNA se alcanzó más fácilmente la unión del 100% del RNA de 2bS40A que 2bS42A (Figs. 28 y 29).

Las proteínas con deleciones en la región carboxilo de la proteína 2b (2bΔGSEL y 2bΔ3T) presentaron mayor afinidad por los sRNAs que la proteína 2b nativa. Entre estas dos proteínas mutantes, 2bΔ3T presentó una mayor afinidad por los sRNAs (Kd ds siRNA =0.47; Kd miRNA =0.39; Kd ss siRNA =0.52; Tabla 3) que 2bΔGSEL (Kd ds siRNA =0.58; Kd miRNA =0.73; Kd ss siRNA =0.98; Tabla 3). Estas dos proteínas mutantes presentaban actividad supresora de silenciamiento (Fig. 15) y conservaban intacta la zona de unión a sRNAs y de formación de dímeros equivalente en TAV (Chen *et al.* 2008). Nuestros datos indican por tanto que la mitad carboxilo de la proteína puede de algún modo entorpecer la unión a sRNAs, ya que las deleciones en esta región de la proteína favorecieron la unión *in vitro* a los sRNAs.

Un caso distinto y muy interesante lo presentó la proteína 2bΔ5T, que carece del dominio terminal amino (aas 1-17). La deleción no afecta a las NLSs ni al motivo de fosforilación, aunque sí afecta parcialmente a la ARR en la primera  $\alpha$ -hélice de la proteína 2b, y a la zona equivalente en TAV implicada en la formación de tetrámeros (Chen *et al.* 2008). La proteína 2bΔ5T carecía de actividad supresora de silenciamiento (Fig. 15) aunque la localización subcelular y la interacción consigo misma o con las proteínas AGO era semejante a la proteína 2b (Figs. 18, 22 y 25). La deleción en 2bΔ5T afectó a la unión de la proteína a sRNAs diferencialmente según el tipo de sRNA: la proteína unió miRNA y ss siRNAs con una afinidad elevada, aunque algo menor que la de la proteína nativa (2bΔ5T: Kd miRNA =2,68 y Kd ss siRNA =2,21; vs 2b: Kd miRNA =1.23 y Kd ss siRNA =1.61; Tabla 3) y en ambos casos llegó a unir el 100% de estos sRNAs con relaciones molares proteína:RNA relativamente bajas (Fig. 29); sin embargo no ocurrió lo mismo con el ds siRNA (Figs. 28 y 29) por el que la proteína 2bΔ5T presentó una afinidad de unión muy baja (Kd ds siRNA =6,74, Tabla 3), y con una relación molar proteína:RNA de 10:1, apenas unió el 20% del ds siRNA (Figs. 28 y 29).

Por tanto se diferenciaron varios patrones de unión a sRNAs. El primer patrón lo conformaron la proteína 2b y los mutantes que retenían la actividad supresora de silenciamiento de RNA y la unión a sRNAs (2b, 2bS40A, 2bS42A, 2bΔGSEL, 2bΔ3T). El

segundo patrón aquellas proteínas mutantes de 2b sin actividad supresora de silenciamiento que no mostraban unión a ningún tipo de sRNAs (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2). El tercer patrón, la proteína mutante 2b $\Delta$ KSPSE, patrón intermedio entre los anteriores y con capacidad reducida de unión a sRNAs aunque sin actividad supresora de silenciamiento. Y un cuarto patrón lo conformó la proteína 2b $\Delta$ 5T, sin actividad supresora de silenciamiento y con un comportamiento diferencial de unión según el tipo de sRNA. No unía ds siRNA, pero sí miRNA y ss siRNA con afinidades cercanas a las de la proteína 2b (Figs. 28 y 29).

En conclusión, el análisis de la unión *in vitro* a sRNAs de la proteína 2b y de nuestra batería de nueve mutantes desveló una correlación entre la actividad supresora de silenciamiento de las proteínas y su capacidad de unión *in vitro* a sRNAs a proporciones molares de proteína:RNA cercanos a 2:1, en particular a ds siRNA. También mostró que deleciones en la mitad amino de la proteína inhibían la unión a sRNAs mientras que deleciones en la mitad carboxilo la favorecían.

Tabla 3: Parámetros cinéticos de unión a RNAs de la proteína 2b y sus nueve mutantes. La constante de disociación aparente (Kd) y el coeficiente de Hill (Coef. Hill) se obtuvieron a partir de la cuantificación de las bandas de RNA en los geles de retardo para el ds siRNA, el miRNA y el ss siRNA. No se calcularon los parámetros en aquellas proteínas que no unían RNAs. Los valores son la media de tres experimentos individuales y se muestra la desviación estándar de estos datos. En la última columna se indica si la proteína presenta actividad supresora de silenciamiento (Act. Sup.).

	ds siRNA		miRNA		ss siRNA		Act. Sup.
	Kd	Coef. Hill	Kd	Coef. Hill	Kd	Coef. Hill	
2b	0.92±0.03	3.65±0.41	1.23±0.05	2.11±0.13	1.61±0.28	2.03±0.40	+
2b $\Delta$ NLS1	No	No	No	No	No	No	-
2b $\Delta$ NLS2	No	No	No	No	No	No	-
2b $\Delta$ NLS1+2	No	No	No	No	No	No	-
2b $\Delta$ KSPSE	4.63±0.39	2.26±0.19	3.96±0.17	4.03±0.56	5.61±1.17	2.7±0.74	-
2bS40A	0.55±0.07	3.88±0.15	0.62±0.03	3.48±0.47	0.71±0.04	1.85±0.18	+
2bS42A	1.59±0.36	1.9±0.77	2.80±0.01	2.55±0.33	2.00±0.09	3.23±0.46	+
2b $\Delta$ GSEL	0.58±0.09	5.66±2.11	0.73±0.01	3.91±0.15	0.98±0.03	2.38±0.21	+
2b $\Delta$ 5T	6,74±0,47	2,52±0,25	2,68±0,3	2,66±0,70	2,21±0,07	3,66±0,31	-
2b $\Delta$ 3T	0.47±0.01	2.9±0.01	0.39±0.06	2.69±0.83	0.52±0.02	2.51±0.29	+

### 4.3.2. Caracterización de la unión *in vitro* de las proteínas 2b o mutantes a un RNA genómico viral

En nuestro sistema experimental estudiamos también si la proteína 2b podía unir RNAs largos, y confirmamos su unión cooperativa a RNA genómico de TMV, de unas 6.4 kb (Fig. 30). Estudiamos la unión de proteína 2b y de los ocho mutantes disponibles en el momento de realizar el experimento (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL y 2b $\Delta$ 3T) a este RNA viral de cadena sencilla. Los resultados se muestran en la Fig. 30, con uno de los geles y la representación gráfica de la relación molar proteína:RNA frente a 0,2  $\mu$ g de RNA de TMV, en abscisas; y el porcentaje de RNA retenido por la proteína a cada relación molar, en ordenadas. También calculamos la Kd y el coeficiente de Hill (Tabla 4).

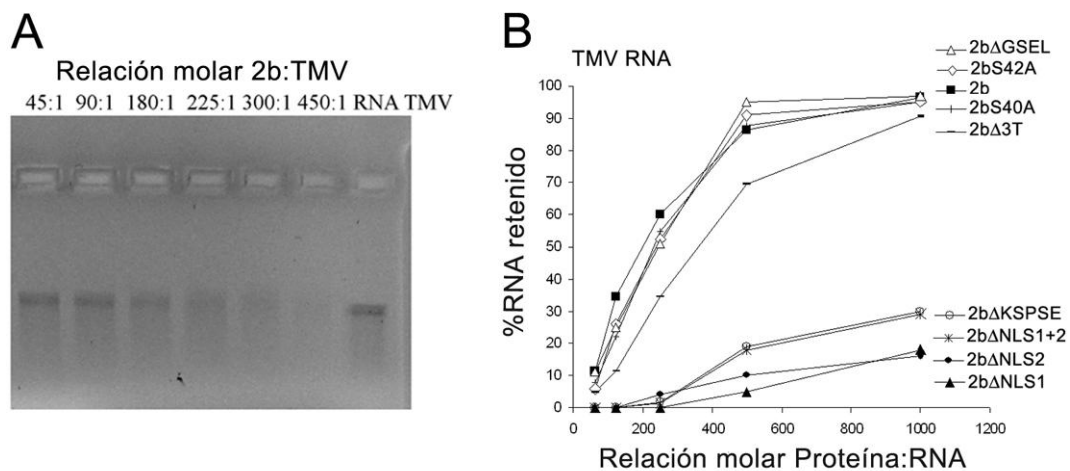


Fig. 30: Cinéticas de unión *in vitro* de la proteína 2b nativa y de ocho mutantes (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL y 2b $\Delta$ 3T) al RNA genómico de TMV. A, Gel resultante de la unión de la proteína 2b nativa al RNA de TMV, en las relaciones proteína:RNA indicadas en la parte superior del gel. La última carrera muestra 0,2  $\mu$ g de RNA de TMV. B, En otro experimento, se incubó el RNA de TMV en ausencia o presencia de las proteínas 2b o mutantes, en concentraciones crecientes de proteína. Las relaciones molares proteína:TMV en este caso fueron 65:1, 125:1, 250:1, 500:1 y 1000:1, en un volumen de 20  $\mu$ l. La muestra se resolvió por electroforesis en un gel no desnaturante de agarosa al 0.8% (no mostrado). El gráfico resultante de la cuantificación del porcentaje de RNA retenido (unido a las proteínas), en ordenadas, frente a la relación de proteína:RNA en abscisas muestra dos grupos de cinéticas diferenciadas: Un grupo incluye la proteína 2b y los mutantes 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL y 2b $\Delta$ 3T y unió el RNA de TMV con una relación molar proteína:RNA de 500:1; mientras que otro grupo, formado por las proteínas sin actividad supresora (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2 y 2b $\Delta$ KSPSE), no lo unió.

La afinidad aparente de unión de la proteína 2b por el RNA de TMV fue 1.78  $\mu$ M (Tabla 4), y el retardo total del RNA se alcanzó con una relación molar proteína:RNA de 500:1, con unión cooperativa (Coeficiente de Hill =1.72; Tabla 4). Observamos dos patrones claramente diferenciados en las cinéticas de unión del RNA de TMV a las proteínas 2b y mutantes (Fig. 30). El primer patrón lo conformaron las proteínas 2b y mutantes con actividad supresora de silenciamiento (2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL y 2b $\Delta$ 3T), que unieron el RNA de TMV con una relación molar proteína:RNA de 500:1. El segundo patrón lo conformaron los mutantes sin actividad supresora de silenciamiento (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE), que mostraron mucha menor unión al RNA de TMV, no llegando a alcanzar el 30% de retención del RNA con una relación molar proteína:RNA de 1000:1.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de unión al RNA de TMV de la proteína 2b y sus nueve mutantes. La constante de disociación aparente (Kd) y el coeficiente de Hill (Coef. Hill) se obtuvieron a partir de la cuantificación de las bandas de RNA en los geles de retardo para el RNA genómico de TMV. No se calcularon los parámetros en aquellas proteínas que no unían RNAs. Los valores son la media de tres experimentos individuales y se muestra la desviación estándar de estos datos. En la última columna se indica si la proteína presenta actividad supresora de silenciamiento (Act. Sup.).

	RNA TMV		Act. Sup.
	Kd	Coef. Hill	
2b	1.78 $\pm$ 0.17	1.72 $\pm$ 0.13	+
2b $\Delta$ NLS1	No	No	-
2b $\Delta$ NLS2	No	No	-
2b $\Delta$ NLS1+2	No	No	-
2b $\Delta$ KSPSE	No	No	-
2bS40A	2.00 $\pm$ 0.11	2.20 $\pm$ 0.21	+
2bS42A	2.01 $\pm$ 0.26	2.12 $\pm$ 0.43	+
2b $\Delta$ GSEL	2.11 $\pm$ 0.40	2.02 $\pm$ 0.57	+
2b $\Delta$ 5T	ND	ND	-
2b $\Delta$ 3T	3.10 $\pm$ 0.14	2.01 $\pm$ 0.11	+

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los resultados de la proteína 2b y la batería de mutantes obtenidos de los ensayos presentados hasta este punto de Resultados, que permite correlacionar de forma sencilla los estudios de biología celular y de unión *in vitro* de RNAs con la actividad funcional de las proteínas en ensayos de supresión del silenciamiento.

Tabla 5: Sinopsis de las propiedades de la proteína 2b y la batería de nueve mutantes en los ensayos de biología celular *in vivo*, de unión *in vitro* a RNAs y de actividad funcional de las proteínas en ensayos de supresión local del silenciamiento. La actividad supresora de silenciamiento se correlacionó con la capacidad de unión a ds siRNA a relaciones molares proteína:RNA de 2:1. Los símbolos + (y ++) indican una propiedad positiva (o marcadamente positiva), mientras que el símbolo - indica negativo a una propiedad. +/- indica situaciones intermedias. ND, no disponible por no haberse analizado.

	Presencia nuclear	Formación de dímeros	Interacción con AGOs	Unión a sRNAs	Actividad supresora de silenciamiento
2b	+	+	+	+	+
2bΔ5T	+	+	+	- ds siRNA + miRNA + ss siRNA	-
2bΔNLS1	-	+	+	-	-
2bΔNLS2	+/-	+	+	-	-
2bΔNLS1+2	-	+	+	-	-
2bΔKSPSE	++	+	+	+/-	-
2bS40A	+	+	+	+	+
2bS42A	+	+	+	+	+
2bΔGSEL	+	+	+	+	+
2bΔ3T	+	+	+	++	+
NES-GFP-2b	-	ND	ND	ND	+

#### **4.4. Visualización de potenciales interacciones de la proteína 2b con otras proteínas nucleolares de la planta**

La interacción de 2b con otras proteínas nucleares podría contribuir a explicar su distribución en el núcleo, nucléolo y CBs. En el núcleo/nuécleolo, la proteína viral podría beneficiarse de dichas interacciones para alterar la transcripción celular con el fin de facilitar la infección viral, poner a disposición del virus diferentes recursos celulares o incluso influir en la fase del ciclo celular en que se encuentra ésta.

Nosotros habíamos observado que al co-infiltrar las proteínas de fusión GFP-2b y Fib-mRFP en hojas de *N. benthamiana*, ambas co-localizaban en el nucléolo y CBs (Fig. 13F y 31A). Pero además, en esta co-agroinfiltración la sobreexpresión de la proteína fibrilarina parecía incrementar la presencia de la proteína 2b en el nucléolo, aunque no llegamos a cuantificar este efecto. Es más, co-agroinfiltrando GFP-2b con las proteínas sYFPN-fibrilarina (de *N. benthamiana*) y sYFPN-coilina y sYFPN-nucleolina (de *A. thaliana*), y observando la emisión de GFP en microscopio confocal, o co-agroinfiltrando 2b-mRFP con GFP-fibrilarina, GFP-coilina y GFP-nucleolina y observando la emisión de mRFP, vimos que la sobreexpresión de sendas proteínas nucleolares incrementaba la presencia de proteína 2b en el núcleo (Fig. 31B y resultados no mostrados). Decidimos pues visualizar mediante BiFC estas potenciales interacciones con la proteína 2b.

Expresamos el par de proteínas de fusión sYFP-2b/sYFP-Fibrilarina por co-agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*, y observamos campos de células epidérmicas en microscopio confocal. Nuestros resultados mostraron fluorescencia derivada de BiFC en los núcleos celulares, y probablemente en el nucléolo, CBs y corpúsculos asociados (Fig. 32A).

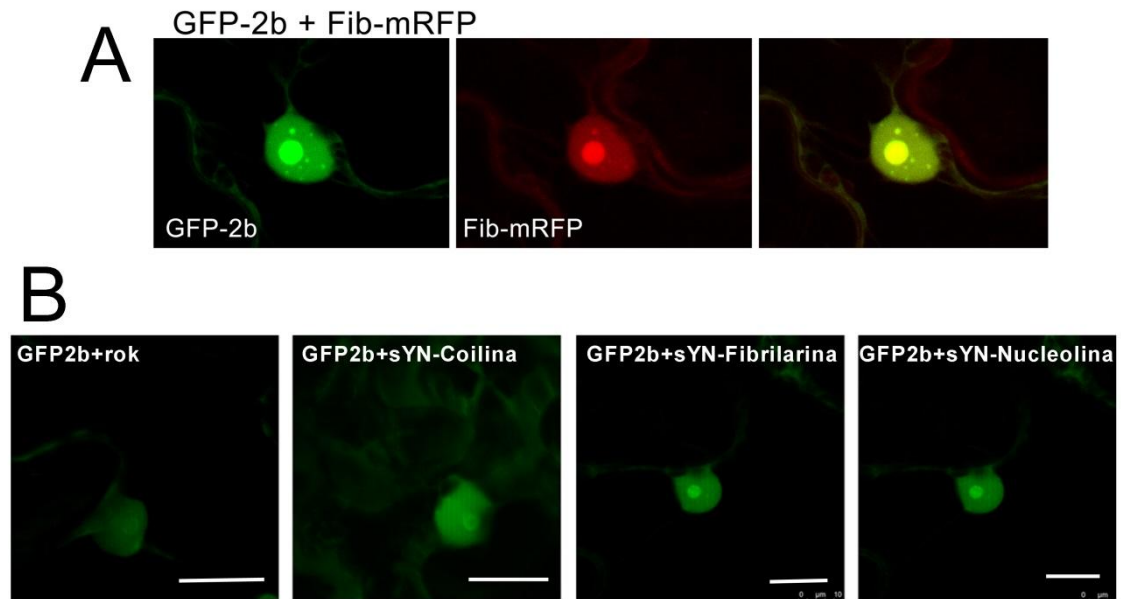


Fig. 31: Indicación de una posible interacción de la proteína 2b de CMV con proteínas celulares nucleares. A, Co-localización de las proteínas 2b de CMV y la proteína celular fibrilarina. Se muestra la ampliación de un núcleo en que se puede observar la localización de GFP-2b (imagen izda.), la de fibrilarina-mRFP (imagen central) y la imagen superpuesta de las anteriores (imagen dcha.). B, En presencia de sobreexpresión de las proteínas fibrilarina, coilina y nucleolina, parece haber una localización más marcadamente nucleolar de la proteína GFP-2b. La barra en la esquina inferior dcha. representa 10 μm.

También analizamos la interacción por BiFC de proteínas mutantes de 2b que presentaban alterada su localización subcelular ( $2b\Delta NLS1$ ,  $2b\Delta NLS2$ ,  $2b\Delta NLS1+2$ ,  $2b\Delta KSPSE$ ) con la fibrilarina, en presencia del supresor P19 de TBSV para asegurar la acumulación transitoria de las proteínas mutantes (Fig. 32A). En los campos de células epidérmicas observamos fluorescencia derivada de la interacción en todos los casos y que esta fluorescencia se localizaba en el núcleo. La fluorescencia fue más débil en aquellos mutantes que presentaban deleciones en las NLSs, mientras que la fluorescencia derivada de la interacción  $2b\Delta KSPSE$ /fibrilarina tuvo una localización fuertemente nuclear y una intensidad semejante a la derivada de la interacción 2b/fibrilarina. El análisis de la acumulación de proteínas (western blot) en el tejido agroinfiltrado mostró una acumulación de proteína 2b similar en todos los casos (Fig. 32B).



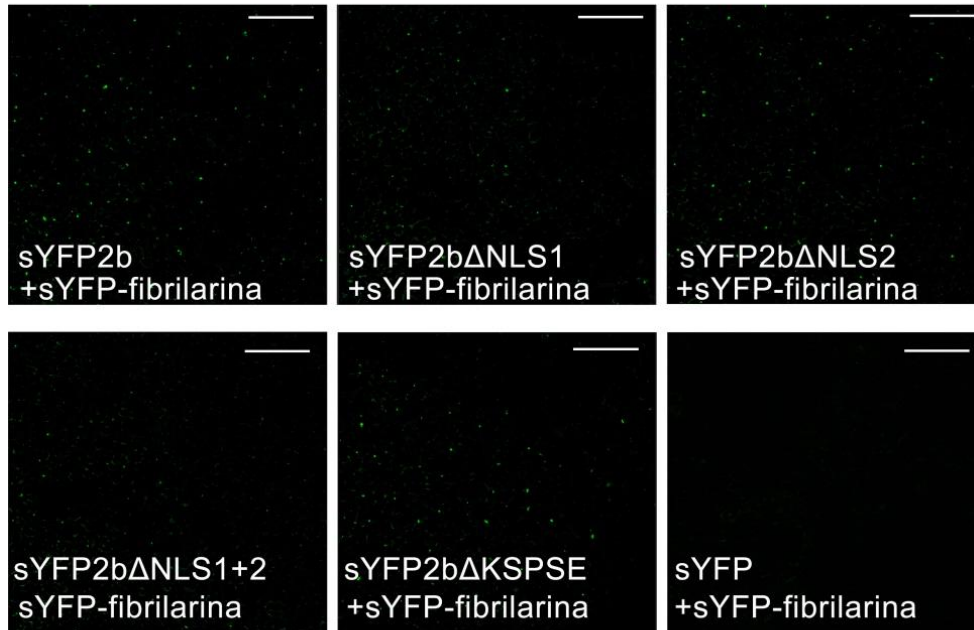
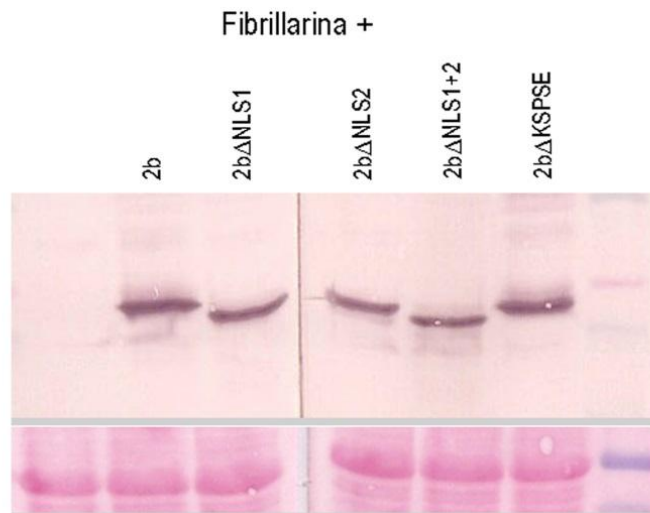
**A****B**

Fig. 32: Fluorescencia derivada de BiFC de 2b/fibrilarina y 2b mutantes/fibrilarina, y su localización subcelular. A, La fluorescencia derivada de BiFC para los pares de proteínas sYFPN-Fibrilarina/sYFPC-2b, sYFPN-Fibrilarina/sYFPC-2bΔNLS1, sYFPN-Fibrilarina/sYFPC-2bΔNLS2, sYFPN-Fibrilarina/sYFPC-2bΔNLS1+2 y sYFPN-Fibrilarina/sYFPC-2bΔKSPSE en presencia del supresor P19 de TBSV se localizó en los núcleos celulares. Imagen inf. dcha., control negativo co-agroinfiltrado con sYFPN-Fibrilarina/sYFPC (vector vacío). La fluorescencia es más débil con aquellos mutantes con deleciones en las NLSs, no así la fluorescencia derivada de la deleción del motivo de fosforilación. La localización de la interacción, respecto a la proteína 2b, no varía en aquellos mutantes con deleciones en las NLSs, y es fuertemente nucleolar en la interacción con 2bΔKSPSE. B, Análisis por western blot de la acumulación transitoria de las proteínas 2b nativa y algunas de las mutantes marcadas para BiFC en tejido agroinfiltrado. Todas las proteínas 2b se acumularon en cantidades comparables. La barra superior dcha. de las imágenes representa 150  $\mu\text{m}$ .

La coilina es un componente principal de los CBs y su función se ha relacionado con la regulación del ciclo celular y de las respuestas a estreses (Cioce y Lamond 2005; Boulon *et al.* 2010). Un estudio reciente ha relacionado la coilina de *A. thaliana* con la proteína viral 63K del hordeivirus PSLV, encontrándose que interactúan *in vitro* en ensayos de far-western e *in vivo* en BiFC (Semashko *et al.* 2012).

Expresamos el par de proteínas de fusión sYFP-2b/sYFP-coilina en hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración y visualizamos la fluorescencia derivada de BiFC en campos de células epidérmicas en microscopio confocal. Esta fluorescencia se localizó en los núcleos y, dentro de éstos, posiblemente en nucléolos y CBs (Fig. 33).

Estudiamos también la interacción entre aquellas proteínas mutantes de 2b que presentan alterada la localización subcelular (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE), y otros mutantes (2bS40A, 2bS42A y 2b $\Delta$ GSEL) con la coilina. Expresamos los pares de proteínas marcados para BiFC (2b $\Delta$ NLS1/coilina, 2b $\Delta$ NLS2/coilina, 2b $\Delta$ NLS1+2/coilina, 2b $\Delta$ KSPSE/coilina, 2bS40A/coilina, 2bS42A/coilina y 2b $\Delta$ GSEL/coilina) en hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración en presencia de P19 de TBSV. En todos los casos visualizamos la fluorescencia dentro del núcleo, en los nucléolos y probablemente CBs (Fig. 33A). El análisis de acumulación de proteínas por western blot de la proteína 2b y de sus mutantes mostró que todas ellas se acumulaban en cantidades comparables (Fig. 33B).

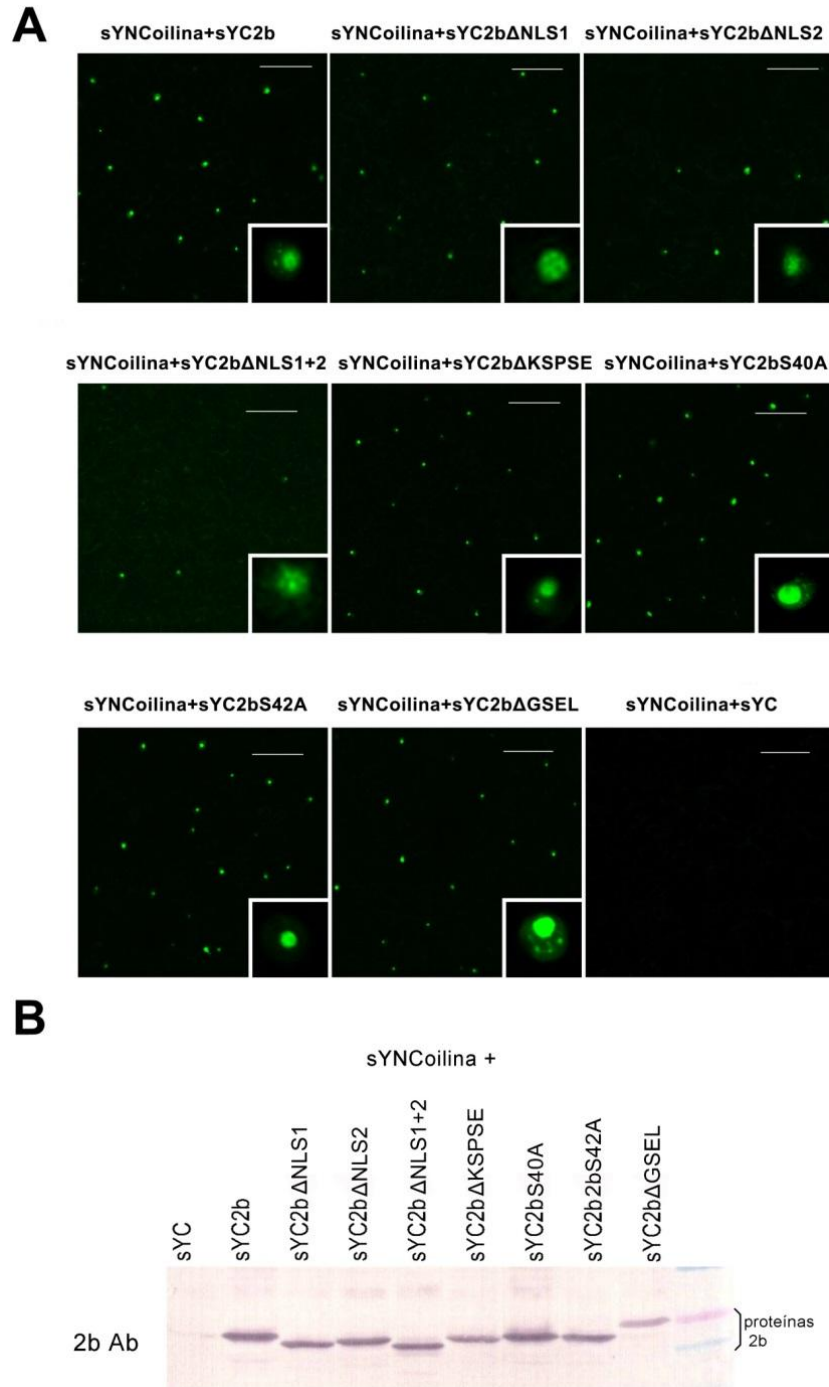


Fig. 33: Fluorescencia derivada de BiFC de 2b/coilina y 2b mutantes/coilina, y su localización subcelular. BiFC para los pares de proteínas sYFPN-Coilina/sYFPC-2b, sYFPN-Coilina/sYFPC-2bΔNLS1, sYFPN-Coilina/sYFPC-2bΔNLS2, sYFPN-Coilina/sYFPC-2bΔNLS1+2, sYFPN-Coilina/sYFPC-2bΔKSPSE, sYFPN-Coilina/sYFPC-2bS40A, sYFPN-Coilina/sYFPC-2bS42A y sYFPN-Coilina/sYFPC-2bΔGSEL, y el control negativo sYFPN-Coilina/sYFPC (vector vacío). Los mutantes sin actividad supresora de silenciamiento (2bΔNLS1, 2bΔNLS2, 2bΔNLS1+2, 2bΔKSPSE) se co-agroinfiltraron con el supresor P19 de TBSV. A, fluorescencia derivada de los campos de células epidérmicas que expresan los pares de proteínas. En cada imagen se muestra la ampliación de un núcleo representativo, en que se visualiza nucléolos y probablemente cuerpos de cajal. La fluorescencia derivada de BiFC se localiza en los núcleos celulares. B, Análisis por western blot de la acumulación de las proteínas 2b y mutantes. Todas las proteínas se acumularon en cantidades comparables. La barra superior dcha. de las imágenes representa 75  $\mu$ m.

La proteína celular nucleolina es, junto con la fibrilarina, uno de los componentes mayoritarios del nucléolo (Chen *et al.* 2002). Expresamos el par de proteínas sYFP-2b/sYFP-Nucleolina en hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración y observamos campos de células epidérmicas en microscopio confocal. La fluorescencia derivada de BiFC se localizó dentro de los núcleos celulares, en el nucléolo y muy probablemente en los CBs y corpúsculos asociados, coincidiendo con la distribución subcelular de la proteína nucleolina (Fig. 34).

También estudiamos por BiFC la interacción potencial de aquellos mutantes de proteína 2b que tenían alterada su localización subcelular (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2 y 2b $\Delta$ KSPSE) y los mutantes 2bS40A, 2bS42A y 2b $\Delta$ GSEL con la nucleolina. Aquellos mutantes con la actividad supresora comprometida se co-agroinfiltraron en presencia de P19 de TBSV. En todos los casos encontramos algo de fluorescencia, aunque en el caso de los mutantes con la NLS1 delecionada ésta era muy débil, lo que sugería ausencia o una menor interacción (Fig. 34).

En conclusión, todas las proteínas 2b interaccionaron con las proteínas celulares fibrilarina, coilina y nucleolina, aunque las proteínas con deleciones en las NLS interaccionaron débilmente con estas proteínas. La interacción se localizó dentro del núcleo formando parte de subestructuras que podían ser nucléolos y probablemente CBs, aunque algunos mutantes no tenían por sí mismos una acumulación nuclear (Fig. 17), lo que sugiere que las NLSs no son las únicas maneras de entrada de la proteína 2b al núcleo.

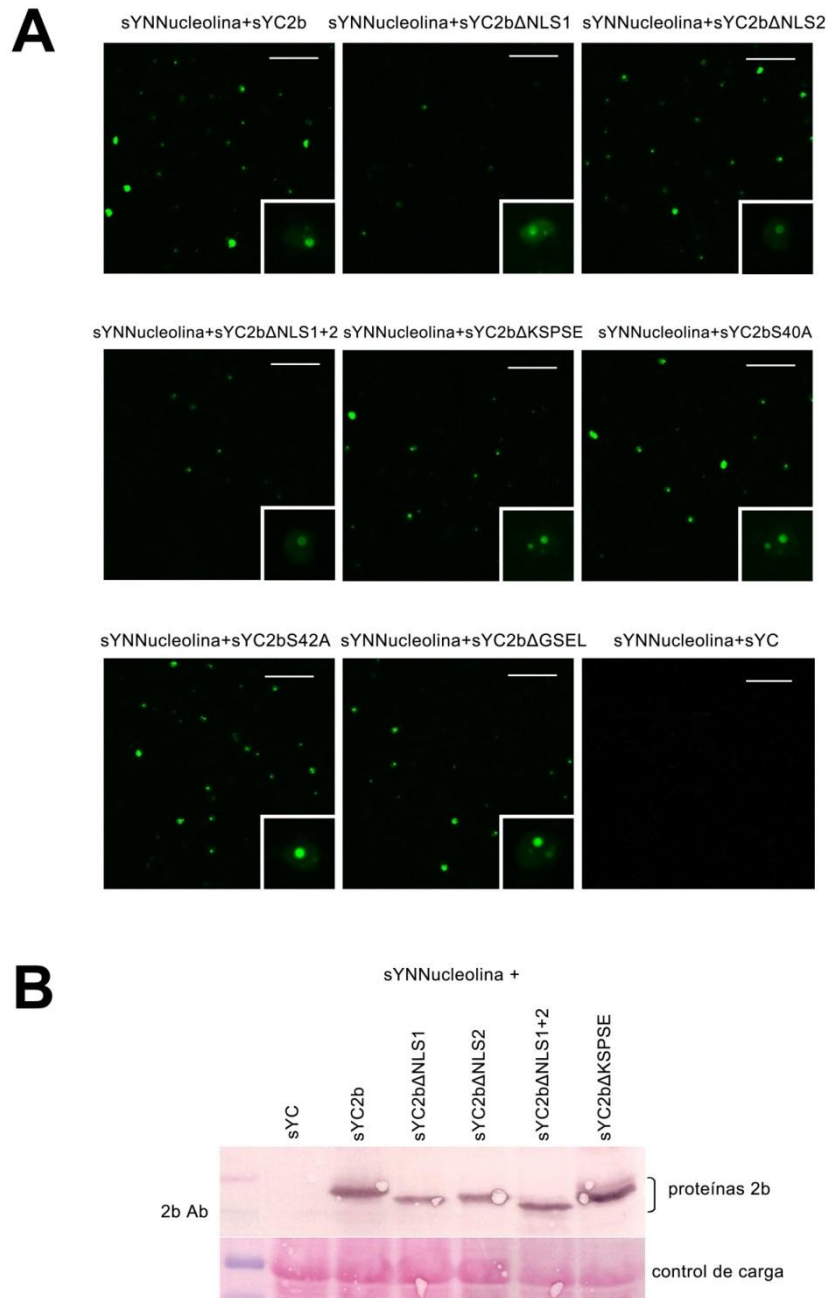


Fig. 34: Fluorescencia derivada de BiFC de 2b/nucleolina y 2b mutantes/nucleolina, y su localización subcelular. BiFC entre los pares de proteínas sYFPN-Nucleolina/sYFPC-2b, sYFPN-Nucleolina/sYFPC-2bΔNLS1, sYFPN-Nucleolina/sYFPC-2bΔNLS2, sYFPN-Nucleolina/sYFPC-2bΔNLS1+2, sYFPN-Nucleolina/sYFPC-2bΔKSPSE, sYFPN-Nucleolina/sYFPC-2bS40A, sYFPN-Nucleolina/sYFPC-2bS42A y sYFPN-Nucleolina/sYFPC-2bΔGSEL, junto con el supresor p19 de TBSV. A, En campos de células epidérmicas la interacción se localizó en los núcleos celulares. En cada imagen se muestra la ampliación de un núcleo representativo con estructuras subnucleares como nucléolo y probablemente CBs. Las proteínas 2b con deleciones en las NLSs presentaron fluorescencia más débil que la observada en la interacción 2b/nucleolina, aunque la localización de la interacción fue nuclear. El resto de mutantes presentaron igual intensidad de fluorescencia que la interacción Nucleolina/2b y localización fuertemente nuclear. B, Análisis por western blot de la acumulación transitoria de las proteínas 2b y mutantes. Las proteínas se acumularon en cantidades semejantes. El panel inferior muestra la membrana de western teñida con rojo Ponceau, como control de carga. La barra superior dcha. de las imágenes representa 75  $\mu$ m.

## **5. DISCUSIÓN**



Los supresores virales de silenciamiento interfieren con la defensa antiviral de la planta mediada por el silenciamiento de RNAs, lo que los hace determinantes de patogenicidad en las infecciones virales. Pueden actuar de diversas maneras, algunos de ellos incluso interfiriendo en más de un paso de este mecanismo de defensa (Díaz-Pendón y Ding 2008). Por un lado, la unión a RNAs es una propiedad común a muchos supresores virales, conocida desde hace años (Lakatos *et al.* 2006; Mérai *et al.* 2006), que podría estar relacionada con la función supresora. Esto se ha confirmado en algunos de ellos, como el supresor P19 de tombusvirus (Silhavy *et al.* 2002). Por otro lado, a lo largo de estos últimos años se han ido identificado interacciones de algunos supresores de silenciamiento con proteínas del huésped, algunas de ellas constituyentes de la maquinaria del silenciamiento, que podrían constituir otros mecanismos de bloqueo del silenciamiento de RNA (Baumberger *et al.* 2007; Bortolamiol *et al.* 2007; Díaz-Pendón y Ding 2008; Zhang *et al.* 2006b). El carácter multifuncional de muchas de las proteínas codificadas en los compactos genomas de los virus de plantas hace que no todas estas interacciones con diversos factores tengan que estar necesariamente relacionadas con la función supresora. Las dinámicas de estas interacciones de supresores con ácidos nucleicos o factores proteicos, y sus efectos a nivel funcional en la supresión del silenciamiento antiviral o de otras respuestas, en la manifestación fenotípica de la infección, y en general en la interacción planta-virus-ambiente, son actualmente motivo de intensa investigación.

A pesar de su pequeño tamaño, la proteína 2b de cucumovirus es un supresor de silenciamiento que tiene las propiedades tanto de unir RNAs como de interactuar con proteínas de las rutas de silenciamiento y estudios previos al nuestro habían relacionado la actividad supresora de silenciamiento con su localización celular nuclear, con su interacción de proteínas AGO y con la unión a siRNAs *in vitro*, sin que estas propuestas sean excluyentes entre ellas.

En este trabajo hemos llevado a cabo estudios sobre la distribución intracelular de la proteína 2b de CMV, sobre interacciones *in vivo* proteína-proteína y sobre interacciones *in vitro* con RNAs para contribuir a determinar la importancia relativa de estas propiedades de la proteína 2b en su función supresora del silenciamiento antiviral. Para ello, nuestra estrategia ha sido la de caracterizar, en proteína nativa o en



mutantes, por un lado sus actividades supresoras del silenciamiento en un sistema de expresión transitoria mediante ensayos de agroinfiltración, y por otro lado utilizar dichas construcciones para nuestros estudios moleculares y de biología celular, lo que nos ha permitido establecer relaciones entre nuestras observaciones y la actividad funcional de la proteína estudiada.

## 5.1. Localización, patogenicidad y actividad supresora del silenciamiento de la proteína 2b de CMV, nativa o modificada

La expresión de proteínas o RNAs foráneos en plantas encuentra la limitación de la pared celular, y requiere bien de su expresión constitutiva desde un transgén integrado en el genoma de la planta, lo que puede ser costoso en tiempo y técnicamente complejo (Giddings *et al.* 2000); o bien el uso de sistemas de expresión transitorios por bombardeo de plásmidos que expresen el RNA desde el control de un promotor eucariota, ya sea utilizando un vector viral o mediante T-DNAs transferidos a la célula vegetal por agroinfiltración (Fisher *et al.* 1999). En este último caso la bacteria, infiltrada en las hojas como un cultivo líquido, media la transferencia del fragmento T-DNA de plásmidos binarios a las células de la región infiltrada (Kapila *et al.* 1997). A diferencia de los vectores virales, la agroinfiltración no permite una expresión sistémica del gen, pero permite expresar localmente en tejidos infiltrados varios transgenes de T-DNAs diferentes en una misma célula, procedentes de diferentes cultivos que se mezclan previamente a la agroinfiltración (Kapila *et al.* 1997). Esta expresión ectópica puede ser elevada (Voinnet *et al.* 2003) aunque los transcritos expresados por el T-DNA son identificados como foráneos por la planta y sufren silenciamiento (Johansen y Carrington, 2001; Canto *et al.* 2002). Esto, lejos de ser un defecto, hace a la técnica adecuada para nuestros estudios porque por un lado nos permite expresar proteínas fusionadas a marcadores fluorescentes para estudios de co-localización o de interacciones moleculares, y por otro nos permite caracterizar la actividad de supresores virales marcados o mutados sobre el silenciamiento de un gen indicador también expresado de un T-DNA co-agroinfiltrado.

Nuestros resultados mostraron que las fusiones de la proteína 2b al péptido HA o a diferentes proteínas para la observación de fluorescencia *in vivo* (fusiones GFP-2b, sYFPN-2b, sYFPC-2b 2b-mRFP y 2b-HA, Fig. 12), tanto en su extremo amino como carboxilo, no afectaban a su actividad en ensayos de supresión local del silenciamiento a pesar de sus tamaños, a veces considerables. Nuestros resultados confirmaron lo que diversos autores observaron anteriormente tanto en estudios de microscopía en la cepa Q como de fraccionamiento celular en la cepa Fny (Lucy *et al.* 2000; Mayers *et al.*

2000): que la proteína 2b se localiza en el citoplasma y, mayoritariamente, en el núcleo. Dentro del núcleo, nuestras observaciones revelaron una distribución nucleolar y en los CBs asociados, de donde se encuentran ausentes las proteínas GFP y mRFP libres (Fig. 13). Esta asociación nucleolar de la proteína 2b no había sido descrita anteriormente.

Por otro lado, analizamos el efecto que tienen deleciones o sustituciones puntuales en los diferentes dominios y motivos de la proteína 2b en la actividad supresora y la localización subcelular de la proteína. Nuestros resultados de supresión local de silenciamiento mostraron, tanto en proteínas con un péptido HA en el extremo carboxilo, como en las fusionadas a GFP en el extremo amino del supresor, que los mutantes 2bS40A, 2bS40A, 2bΔGSEL y 2bΔ3T tenían actividad supresora como la proteína nativa, a pesar de las sustituciones de serina por alanina que presentaban en el motivo de fosforilación potencial (2bS40A, 2bS42A) o de las deleciones en una fracción del dominio 3 (2bΔGSEL) o del dominio terminal carboxilo (2bΔ3T) (Figs. 15 y 16). Estas proteínas mutantes se acumularon en el tejido infiltrado a niveles comparables con la proteína 2b (Fig. 15C). Sin embargo, aquellas proteínas con deleciones en el dominio terminal amino, en las NLSs o en el motivo de fosforilación (2bΔ5T, 2bΔNLS1, 2bΔNLS2, 2bΔNLS1+2 y 2bΔKSPSE, respectivamente), no retuvieron la actividad supresora de silenciamiento y se acumularon en el tejido más débilmente que la proteína 2b (Figs. 15 y 16).

En dos de los dominios mutados mencionados hemos observado algunas diferencias con resultados publicados por otros grupos: Li y colaboradores (2011) observaron que en la cepa Q (grupo II de CMV), sustituciones puntuales en su motivo de fosforilación de los residuos K<sup>39</sup> (supuesto lugar de ubiquitinización) y S<sup>40</sup> inhibían total o parcialmente su actividad supresora de silenciamiento por lo que, a diferencia de nuestros resultados, en la cepa Q de CMV las sustituciones puntuales en este motivo de la proteína 2b sí afectaban a la actividad supresora de la proteína. Por ello se podría concluir que el motivo de fosforilación en su conjunto es necesario para la actividad supresora de silenciamiento de la proteína aunque las sustituciones puntuales, según la cepa, pueden inhibir o no su actividad supresora. Por otro lado, Ye y colaboradores (2009) relacionaron el dominio 3 de la proteína 2b con la actividad supresora de

silenciamiento en la cepa SD de CMV. En este dominio, las cepas Fny y SD (subgrupo IA y IB, respectivamente) comparten sólo los aas <sup>63</sup>SEL<sup>65</sup> y H<sup>71</sup> (Ver anexo I), y por lo tanto nuestra proteína 2bΔGSEL carece de la fracción compartida entre ambas cepas. Nuestros resultados mostraron que esta proteína presenta actividad supresora y localización subcelular semejante a GFP-2b (Figs. 15 y 17) por lo que a diferencia de lo observado por Ye y colaboradores (2009) la delección de una fracción de este dominio en la cepa Fny no afecta directamente a su actividad supresora.

Lewsey y colaboradores (2009) han caracterizado en planta los efectos del virus nativo y de los virus que portan la mayoría de las mutaciones que hemos utilizado (todas menos ΔGSEL) en el desarrollo de esta tesis. A diferencia del virus nativo Fny de CMV (Fny-CMV), que causa atrofia y deformación de las hojas, los virus que portan el gen 2b con delecciones en el dominio terminal amino, las NLSs y el motivo de fosforilación (Fny-CMV2bΔ5T, Fny-CMV2bΔNLS1, Fny-CMV2bΔNLS2, Fny-CMV2bΔNLS1+2 y Fny-CMV2bΔKSPSE), eran asintomáticos en tabaco y *A. thaliana*; aunque en *N. benthamiana* la delección de la NLS1 originaba síntomas leves (Tabla 2 y Lewsey *et al.* 2009). Estos autores también observaron que el dominio terminal carboxilo y la sustitución puntual de las serinas en el motivo de fosforilación modulaban la severidad sintomática en la cepa Fny. Nosotros hemos caracterizado el fenotipo de la infección con el virus que porta la proteína 2bΔGSEL. El virus Fny-CMV2bΔGSEL presentó un fenotipo con síntomas atenuados frente a Fny (Fig. 14), y en este caso la acumulación viral en el tejido infectado fue ligeramente menor a la de aquél, por lo que la ausencia de este dominio atenúa los síntomas de infección a pesar de presentar actividad supresora de silenciamiento en ensayos de agroinfiltración (Fig. 14). Lewsey y colaboradores (2009) mostraron que los virus que portan delecciones en el gen 2b en su extremo 5', en los dominios que codifican las NLSs y el motivo de fosforilación (Fny-CMV2bΔ5T, Fny-CMV2bΔNLS1, Fny-CMV2bΔNLS2, Fny-CMV2bΔNLS1+2 y Fny-CMV2bΔKSPSE) se acumulaban en el tejido infectado mucho más débilmente que los virus que portaban delecciones en la mitad 3' de 2b o sustituciones puntuales en el motivo de fosforilación de la proteína resultante (Fny-CMV2bS40A, Fny-CMV2bS42A, Fny-CMV2bΔ3T). Estos autores sugirieron como posibles explicaciones a esta pobre acumulación: que fuera el resultado de la baja acumulación viral general (y la de sus

productos), o que las proteínas alteradas tuvieran una estabilidad reducida. Por tanto estas proteínas mutantes podrían no inhibir la actividad supresora de silenciamiento bien por no tener actividad supresora, o bien por no tener estabilidad para acumularse en el medio de la célula vegetal, lo que también impediría su función supresora. En nuestros ensayos, el análisis de la acumulación de las proteínas 2b y mutantes expresadas transitoriamente en los tejidos agroinfiltrados demostró que aquellas proteínas con deleciones en la mitad amino de la proteína (2b $\Delta$ 5T, 2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2 y 2b $\Delta$ KSPSE) no se acumulaban en la misma medida que la proteína nativa y el resto de mutantes (Figs. 15 y 18), pero la presencia del supresor heterólogo P19 de TBSV restauró su acumulación a niveles de la proteína 2b nativa. Por lo tanto nuestros resultados, en un sistema libre de virus, demostraron que en estas proteínas mutantes las deleciones inhibían su actividad supresora de silenciamiento pero no las hacían estructuralmente inestables (Figs. 15 y 18). Esto nos permitió estudiar su localización subcelular y otras propiedades, como sus interacciones con proteínas y RNAs en ensayos *in vivo* e *in vitro*, junto con las propiedades de la proteína nativa y las de los otros mutantes con función supresora, y relacionar nuestras observaciones con la función biológica. Por lo tanto, podemos concluir que las proteínas con deleciones en la mitad amino no se acumulan en el tejido infiltrado porque carecen de actividad supresora de silenciamiento y no porque sean inestables. Por otro lado, también podemos concluir que las mutaciones puntuales del motivo de fosforilación y las deleciones del motivo GSEL y del dominio terminal carboxilo, que no afectaban a la supresión local del silenciamiento, deben afectar otros aspectos de la interacción planta-virus que afectan a la inducción de síntomas y que expliquen las diferencias en el fenotipo de las plantas infectadas.

En cuanto a la localización subcelular de las proteínas mutantes de 2b, nuestras observaciones mostraron que las proteínas con el dominio terminal amino delecionado, con sustituciones puntuales en el motivo de fosforilación y con deleciones en la mitad carboxilo de la proteína (GFP-2b $\Delta$ 5T, GFP-2bS40A, GFP2b-S42A, GFP-2b $\Delta$ GSEL y GFP-2b $\Delta$ 3T) se localizaron en el citoplasma y nucléolo celulares como la proteína GFP-2b (Figs. 17 y 18). Sin embargo, las proteínas con deleciones en las NLSs (GFP-2b $\Delta$ NLS1, GFP-2b $\Delta$ NLS2 y GFP-2b $\Delta$ NLS1+2) perdieron la localización

nuclear y se localizaron principalmente en el citoplasma (Fig. 18); mientras que la proteína con el motivo de fosforilación delecionado (GFP-2b $\Delta$ KSPSE) se localizó principalmente en el nucléolo, sugiriendo que ésta había perdido su capacidad de permanecer o de retornar al citoplasma (Fig. 18). Lucy y colaboradores (2000) habían demostrado que la actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b en la cepa Q (grupo II de CMV) se correlacionaba con su localización nuclear. A diferencia de la cepa Fny, la cepa Q tiene una sola NLS y Lucy y colaboradores (2000) observaron que ésta, cuya ubicación en la proteína se corresponde con la NLS1 de la cepa Fny, era necesaria en su contexto para la supresión de PTGS y que la sola presencia nuclear de la proteína no era suficiente para dotarla de la actividad supresora. Por ello Lucy y colaboradores (2000) sugirieron que la proteína 2b podría funcionar como un competidor del tráfico nuclear, afectando así a la acumulación nuclear de uno o varios factores críticos para el inicio del PTGS, o como un activador de la transcripción en el núcleo que aumentase la transcripción de un regulador negativo de PTGS. Más adelante, Chen y colaboradores (2008) demostraron, en trabajos *in vitro* de cristalografía, que en la proteína ortóloga de TAV, la región en que se localiza la o las NLSs interviene en la interacción *in vitro* con sRNAs. Nuestras observaciones mostraron que en la cepa Fny la deleción de una sola de las NLSs de la proteína afectaba a la actividad supresora de silenciamiento y a su localización subcelular. La deleción de la NLS1 o de ambas NLSs (2b $\Delta$ NLS1+2) inhibió completamente la entrada de la proteína al núcleo (Fig. 18), como observaron Lucy y colaboradores (2000) con la NLS de la cepa Q. Sin embargo, la deleción de la NLS2, ausente en la cepa Q, inhibió sólo parcialmente la entrada de la proteína al núcleo (Fig. 18). Como en las observaciones de Lucy y colaboradores (2000), nuestros resultados de supresión local de silenciamiento (*agropatch assays*) mostraron que la deleción de una o de ambas NLSs de la proteína no sólo afectaba a la localización de la proteína en la célula, sino que conllevaba la pérdida de la actividad supresora de la proteína (Fig. 15). Por lo que estos datos correlacionaban la actividad supresora con la localización nuclear de la proteína, como se había propuesto anteriormente. Sin embargo, nuestros resultados también mostraron que la deleción del motivo de fosforilación (GFP-2b $\Delta$ KSPSE), que confinaba a la proteína en el nucléolo celular (Fig. 18), no implicaba actividad supresora de silenciamiento (Figs. 15, 16 y 18). Por otro lado, la deleción del dominio terminal

amino de la proteína inhibía la actividad supresora de silenciamiento de la proteína, aunque no afectaba a su localización subcelular nuclear. El resto de mutaciones (2bS40A, 2bS42A, 2bΔGSEL, 2bΔ3T) no afectaron a la actividad supresora de silenciamiento ni a la localización subcelular de la proteína (Figs. 15-18).

En diversas proteínas se ha observado que las NLSs, junto con un motivo de fosforilación, conforman un motivo CcN que permite el movimiento controlado de una proteína entre el citoplasma y el núcleo (Jans 1995; Jans y Hubner 1996). La presencia de un motivo CcN en la proteína 2b de CMV sugiere que este supresor de silenciamiento se podría mover entre citoplasma y núcleo de una forma controlada por el estado de fosforilación. Como hemos mostrado, la delección de las NLSs inhibía el transporte de la proteína al núcleo y, la delección del motivo de fosforilación <sup>39</sup>KSPSE<sup>43</sup> inhibía el transporte de 2b al citoplasma, confinando la proteína al nucléolo, lo que indica que en este caso la proteína ha perdido su capacidad de permanecer o de retornar al citoplasma (Fig. 18), por lo que podemos suponer que para la actividad de la proteína parece importante el poder traslocarse entre citoplasma y núcleo para llevar a cabo su función, y que este transporte está mediado por el motivo CcN.

Es difícil separar la actividad supresora de silenciamiento de la localización nuclear de la proteína utilizando sólo mutantes de delección, ya que el transporte nuclear mediado por las NLSs no es la única propiedad que presenta esta región de la proteína, sino que también puede intervenir en la unión a sRNAs. Sin embargo, siguiendo una aproximación diferente, clonamos una NES en el extremo amino de la proteína 2b fusionada a GFP (NES-GFP-2b) y comparamos su actividad supresora de silenciamiento y su localización con GFP-2b. NES-GFP-2b retuvo la actividad supresora de silenciamiento y su localización subcelular fue citoplásmica con la sucesión de los días, resultado del balance entre la entrada de la proteína en el núcleo inducida por las NLSs y su salida, por la señal NES. La acumulación del indicador GFP libre tanto en presencia de GFP-2b como de NES-GFP-2b fue semejante (Figs. 19 y 20), por lo que podemos concluir que la proteína NES-GFP-2b, sin acumulación nuclear, presenta tanta actividad supresora de silenciamiento como la proteína GFP-2b. Por otro lado, la propiedad de poder traslocarse entre el núcleo y el citoplasma en ambas direcciones, controlado por el CcN, es también importante en la actividad de la proteína viral. Estudios posteriores

a Lucy y colaboradores (2000), utilizando otros mutantes de NLSs, observaron también que la localización nuclear de 2b es insuficiente para inducir patogenicidad (Wang *et al.* 2004; Lewsey *et al.* 2009), y la presencia nuclear de la proteína podría participar en alguna otra función. Wang y colaboradores (2004) propusieron que esta función era la interacción con miRNAs.

En un estudio posterior a los nuestros, Nemes y colaboradores (2014) han realizado mutaciones a lo largo del gen *2b* de la cepa Fny y han confirmado que las NLSs y el motivo de fosforilación de la proteína son indispensables en la actividad supresora de silenciamiento, corroborando nuestros resultados. Por lo que nosotros desvinculamos localización nuclear y actividad supresora utilizando mutantes en las NLSs y en el motivo de fosforilación y estos autores en su estudio han demostrado que la inhibición de la actividad supresora causada por dichas deleciones está más relacionada con los daños que causan las deleciones en la estructura de la proteína (en la primera  $\alpha$ -hélice que une los RNAs, o a la segunda  $\alpha$ -hélice que altera la integridad de la proteína, respectivamente), que con la deslocalización nuclear de la proteína (Nemes *et al.* 2014).

La mitad amino de la proteína 2b ha sido objeto de diversos estudios en los que se han deleccionado o sustituido distintas regiones de la proteína, y observado su fenotipo en plantas infectadas con virus que expresan dichas proteínas mutadas. Un ejemplo de ello es el trabajo con un virus quimera de TAV y la cepa Q de CMV, en que Shi y Palukaitis (2011) observaron que se podía infectar sistémicamente, aunque con un fenotipo asintomático, plantas de *N. clevelandii* y *N. glutinosa* con tan sólo los primeros doce aas de la proteína 2b de TAV. En otro estudio, Ye y colaboradores (2009) comprobaron mediante recombinantes entre las cepas Q y SD (subgrupos II y IB) de CMV, que los primeros ocho aas de la proteína 2b afectaban a la actividad supresora de la proteína. Estos estudios evidenciaron que esta región de la proteína era muy importante para la función supresora y para el fenotipo de la infección viral. Nuestros datos mostraron que la deleción del dominio terminal amino (2b $\Delta$ 5T), que en planta genera un fenotipo asintomático (Fny-CMV2b $\Delta$ 5T, Lewsey *et al.* 2009), no afectaba a la localización subcelular de la proteína aunque inhibía su actividad supresora (Figs. 15, 16 y 18), por lo que esta proteína mutante (GFP-2b $\Delta$ 5T) es una



evidencia más de que el dominio terminal amino de la proteína y el ARR están involucrados en la actividad supresora a través de alguna propiedad diferente a la de dirigir la proteína al núcleo, como podría ser la de unir RNAs.

La mitad carboxilo de la proteína 2b también ha sido objeto de diversos estudios y contiene el dominio terminal carboxilo, que es una región altamente especializada que no está presente en todos los cucumovirus, como es el caso de TAV. En CMV este dominio es necesario para la inducción de síntomas en tabaco (Ding *et al.* 1994), y Lewsey y colaboradores (2009) mostraron que la cepa Fny de CMV que portaba una delección del mismo (Fny-CMV2b $\Delta$ 37) infectaba diversas especies con síntomas semejantes al virus nativo. Shi y Palukaitis (2011) mostraron que los 43 primeros aas de la proteína 2b de TAV eran suficientes para promover la infección sistémica de un pseudo-recombinante de TAV/CMV, aunque con síntomas muy leves, por lo que estos autores relacionaron la mitad carboxilo con la virulencia, y propusieron que ésta estaba posiblemente relacionada con la supresión de silenciamiento de RNA o con la interacción con la catalasa estudiada por Inaba y colaboradores (2011). En CMV, la fracción de los aas 70-110 de la mitad carboxilo de la proteína 2b está parcialmente desestructurada, aunque la región está bien conservada entre los aas 95-105 (ver Anexo I). Gellért y colaboradores (2012) simularon en ordenador una dinámica molecular con la proteína 2b completa de la cepa Rs (subgrupo IA de CMV) y propusieron que los residuos con carga negativa <sup>95</sup>DDTD<sup>98</sup> del dominio terminal carboxilo unían Mg<sup>2+</sup>, el ion más abundante en el contexto celular, y que esta unión estabilizaba la estructura 3D del dominio terminal carboxilo y la unión a ácidos nucleicos. Estos autores confirmaron experimentalmente sus resultados de modelización en un cuádruple mutante de sustitución que suavizó los síntomas de la infección en planta y ralentizó el movimiento del virus en *N. glutinosa* y *N. clevalandii* (Gellért *et al.* 2012), confirmando que el dominio terminal carboxilo se relacionaba con la inducción de síntomas que observada por Lewsey y colaboradores (2009), y propusieron que *in vivo* la sustitución del motivo <sup>95</sup>DDTD<sup>98</sup> por alaninas debilitaba la estabilidad del tetrámero formado por las proteínas 2b unidas a los siRNAs. Por otro lado, Inaba y colaboradores (2011) y Masuta y colaboradores (2012) observaron que tanto en cepas del grupo I como del grupo II de CMV, los cuarenta aas de la mitad

carboxilo de la proteína estaban involucrados en la interacción con la enzima CAT3. Esta interacción traslocaba CAT3 al núcleo, donde inhibía su actividad, y esta inhibición generaba H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que inducía necrosis en *Arabidopsis*, por lo que concluyeron que esta región en la mitad carboxilo de la proteína 2b era la responsable de la necrosis. Como hemos visto, nuestros resultados mostraron que la delección de este dominio no afectaba a la actividad supresora de silenciamiento de la proteína en ensayos de agroinfiltración, y que la localización nucleolar en el mutante GFP-2bΔ3T parecía incluso más patente que en la proteína GFP-2b (Figs. 15 y 16). Por lo que se puede concluir, por nuestros resultados y los de otros estudios, que el dominio terminal carboxilo no participa en la actividad supresora de silenciamiento, aunque sí en la modulación de los síntomas en planta, y que la modulación de estos síntomas podría estar mediada por su interacción con CAT3.

En el tráfico celular del citoplasma al núcleo, las partículas menores a 9 nm difunden pasivamente a través de los complejos de poro nuclear (*nuclear pore complex*, NPC) (Palmeri y Malim 1999), mientras que las NLSs permiten un transporte selectivo de proteínas de más de 40-60 kDa y facilitan el de proteínas menores. Las NLSs de las proteínas que las portan se unen a la importina  $\alpha$  en la parte citoplásmica del NPC, y ésta a la importina  $\beta$  para atravesarlo, desensamblándose el complejo en la cara nuclear (Görlich y Mattaj, 1996). Esta maquinaria la utilizan proteínas de patógenos de plantas para entrar en el núcleo, como *Agrobacterium* (Ballas y Citovsky 1997; Tzfira *et al.* 2002), algunos virus vegetales de DNA (Kunik *et al.* 1998; Leclerc *et al.* 1999) y virus de RNA de polaridad negativa (Goodin *et al.* 2001). Wang y colaboradores (2004) mostraron en ensayos de doble híbrido en levaduras (*yeast two hybrid*, Y2H) que la proteína 2b de la cepa Fny de CMV interactuaba con la karioferina  $\alpha$ , la importina de *A. thaliana*. En estos experimentos de Y2H, cada una de las NLSs de 2b se unió independientemente a la karioferina  $\alpha$  para entrar en el núcleo celular (Wang *et al.* 2004). Por otro lado, en células de cebolla y utilizando proteína 2b marcada con  $\beta$ -glucuronidasa, la delección de una sola de las dos NLSs no previno su presencia en el núcleo (Wang *et al.* 2004). En cambio, nuestros resultados *in vivo* en *N. benthamiana* mostraron que la delección de la NLS1 de la proteína 2b inhibía completamente el paso de la proteína 2b al núcleo mientras que la delección de la NLS2 lo reducía mucho

(Fig. 18), por lo que en este huésped la NLS1 parece tener más importancia para entrar al núcleo que la NLS2.

En un estudio reciente, Du y colaboradores (2014a) han relacionado las cepas del subgrupo I de CMV con una mayor presencia nuclear de la proteína 2b respecto a las cepas del subgrupo II. Estos autores han establecido una relación entre la localización nuclear y nucleolar de la proteína 2b y su patogenicidad en las infecciones virales: las cepas con presencia más nuclear presentan mayor virulencia, como la cepa Fny (subgrupo I de CMV); y las cepas con menor presencia nuclear presentan menor virulencia, como la cepa LS (subgrupo II). Este mismo grupo también ha establecido una relación entre la presencia citoplásmica y la actividad supresora de silenciamiento en un estudio comparativo entre las cepas Fny y LS. En este estudio observaron que la proteína 2b de la cepa Fny, con actividad supresora fuerte, es citoplásmica y nuclear/nucleolar mientras que la proteína de la cepa LS, con actividad supresora débil, es estrictamente nuclear (no nucleolar y no citoplásmica). Estos autores también han mostrado que las diferencias en la distribución y en la localización nucleolar de las proteínas 2b observadas entre los grupos IA y II de CMV, anteriormente atribuidas a diferencias en las secuencias de las NLSs, se deben también a diferencias en las secuencias que las bordean, y que éstas son críticas para el reconocimiento de la NLS1 por factores como la importina. En la cepa Fny estas secuencias que bordean las NLSs determinan una NoLS (aas 13-37), mientras que este mismo fragmento varía en 10 residuos en otras cepas como LS, lo que explica sus diferencias en la localización intranuclear, y confirman que la acumulación nuclear no es suficiente para que la proteína se acumule en el nucléolo. Du y colaboradores (2014a) han propuesto que el reparto de la proteína 2b entre el citoplasma y el nucléolo permite a CMV regular el balance entre la acumulación viral y el daño al huésped, en beneficio del virus. En su estudio también han mostrado que la acumulación forzada de la proteína 2b de la cepa Fny en el núcleo, por la adición de una NLS extra (*Fny2bNLS*), disminuye la actividad supresora de silenciamiento al tiempo que aumenta la virulencia y acelera el desarrollo de síntomas en plantas infectadas de *A. thaliana*. Por lo tanto, nuestro trabajo ha desvinculado la presencia nuclear de la proteína 2b (NES-GFP-2b) de la actividad supresora de silenciamiento (Figs. 19 y 20), y Du y colaboradores (2014a) han

confirmado nuestros resultados y han ampliado el conocimiento de la proteína 2b con nuevas correlaciones entre localización subcelular, actividad supresora de silenciamiento y patogenicidad. Lo que sugiere que la presencia nuclear de la proteína 2b estaría por tanto relacionada con motivos o con procesos no directamente requeridos para la actividad supresora.

## **5.2. Interacciones de la proteína 2b con proteínas: formación de homodímeros e interacción con proteínas AGO y con otras proteínas**

Se han desarrollado distintos métodos para analizar interacciones entre proteínas. La mayoría de ellos requieren la destrucción de las células para detectar las interacciones, o la síntesis y purificación de proteínas expresadas en bacterias o levaduras, con lo que no reproducen el contexto ni monitorizan la dinámica y la localización *in vivo* y en tiempo real de la interacción (Revisado en Shoemaker y Panchenco, 2007). Estas informaciones son necesarias a veces para entender la función de las proteínas a nivel celular y de organismo (Bracha-Drori *et al.* 2004). Hay diversas técnicas que permiten estudiar complejos de interacción de proteínas, como por ejemplo la purificación de afinidad y la espectroscopía de masas, los microarrays de proteínas, la cristalografía y espectroscopía o la microscopía electrónica (Shoemaker y Panchenco, 2007). Nosotros hemos aproximado al estudio de las interacciones entre proteínas con la técnica de BiFC desarrollada en estudios en células de mamíferos (Hu *et al.* 2002; Hu y Kerppola 2003) y adaptada inicialmente a tejidos vegetales para la detección de interacciones transitorias entre proteínas por Bracha-Drori y colaboradores (2004). Esta técnica es un método muy sensible (Zamyatnin *et al.* 2006; Morell *et al.* 2008 Kerppola 2009) basado en la interacción entre dos mitades de una proteína fluorescente fusionadas a las proteínas cuya potencial interacción se pretende estudiar. La aproximación de las mitades del fluoróforo reproduce un complejo y permite visualizar *in vivo* dichas interacciones mediante su excitación con luz de

longitud de onda adecuada. En combinación con la microscopía epifluorescente o confocal permite estudiar la ocurrencia subcelular de dichas interacciones en células y tejidos vivos no fijados (Hu *et al.* 2002; Citovsky *et al.* 2006; Kerppola 2006). Como limitaciones a esta metodología encontramos que los dos fragmentos de la proteína fluorescente deben poder asociarse a pesar de estar ligados al complejo proteico que está interaccionando (Hu *et al.* 2002) y puede no requerir que las proteínas a las que están fusionadas las dos mitades del fluoróforo interaccionen directamente entre sí, aunque puede utilizarse en la identificación de nuevas interacciones proteicas sin conocimiento previo de la base estructural de la interacción (Hu *et al.* 2002). La sobreexpresión de las mitades amino y carboxilo (solas) de la proteína fluorescente en algunos vectores de expresión pueden inducir fluorescencia (Zamyatnin *et al.* 2006), aunque no es el caso de nuestros vectores de expresión; y la sobreexpresión mediante promotores fuertes de pares de proteínas para estudios de BiFC puede dar lugar a la emisión de fluorescencia en ausencia de interacción real entre proteínas nativas (Walter *et al.* 2004). Es por ello que la BiFC constituye una técnica extraordinariamente útil para visualizar la ocurrencia subcelular de una interacción, junto con los experimentos de co-localización, pero por sí misma no demuestra la ocurrencia de dicha interacción entre proteínas nativas y a niveles fisiológicos. Para ello se necesita el apoyo adicional de otros datos, como experimentos de doble híbrido, o su confirmación mediante co-inmunoprecipitación. Otras limitaciones de la BiFC son que los fluoróforos necesitan un tiempo de maduración, que no se puede detectar cambios en tiempo real en las interacciones, o que las disociaciones entre proteínas pueden estar muy dificultadas o impedidas (Guo *et al.* 2005; Demidov *et al.* 2006).

Con respecto a la proteína 2b, Chen y colaboradores (2008) habían observado en estudios cristalográficos que la proteína 2b de TAV formaba homodímeros y estructuras de mayor orden, como dímeros de dímeros, que podían constituir la conformación activa de la proteína. Rashid y colaboradores (2008) confirmaron la formación de estas estructuras en TAV por espectroscopía de reflexión de fluorescencia interna total, aunque no las visualizaron *in vivo* en un contexto celular. En este mismo sentido, Hamera y colaboradores (2012) demostraron que la proteína de fusión GST-2b de CMV expresada en bacteria, formaba dímeros y tetrámeros que

unían RNAs. Nosotros hemos visualizado *in vivo* los dímeros de la proteína 2b de CMV mediante BiFC en tejido fresco, y su ocurrencia subcelular. Nuestras observaciones han mostrado fluorescencia resultado de interacciones tras la co-expresión transitoria de los pares sYFPN-2b/sYFPC-2b a partir de T-DNAs agroinfiltrados en hojas de *N. benthamiana*, y su localización en el citoplasma y en el nucléolo, donde co-localizan con fibrilarina-mRFP siguiendo un patrón semejante al de GFP-2b (Fig 21). Por tanto, la proteína 2b de CMV está presente en la célula formando dímeros solubles.

La estructura básica dimérica de la proteína 2b de CMV puede que forme agrupaciones más complejas, como los dímeros de dímeros observados en TAV, pero nosotros no podemos visualizarlos mediante BiFC. Chen y colaboradores (2008) mostraron en TAV que la interacción entre dímeros de 2b tiene lugar mediante un motivo de cremallera de leucinas, una estructura secundaria que consiste en el intervalo de múltiples leucinas formando una región hidrofóbica en un lado de la primera  $\alpha$ -hélice ( $L^8/I^{11}/L^{15}/M^{18}$ ). Esta región actúa como dominio de dimerización generando fuerzas de adhesión en  $\alpha$ -hélices paralelas, y la mutación puntual de estos aas en TAV inhibe la oligomerización en tetrámeros (Chen *et al.* 2008). Comparado con TAV, sólo  $L^{15}$  y  $M^{18}$  están bien conservados en CMV, y  $L^8$  y  $I^{11}$  están sustituidos por  $M^8$  y  $V^{11}$  en la cepa Fny (ver Anexo I), que también son aas apolares hidrófobos o neutros no polares que podrían participar en la formación de dímeros de dímeros del mismo modo que en TAV, ya que estos aas tienen ciertas características similares. Por lo que los dímeros de 2b de CMV, que nosotros visualizamos en BiFC, podrían interactuar entre sí como en TAV, formando tetrámeros. Sin embargo, nosotros proponemos que los dímeros constituyen la forma biológicamente activa del supresor 2b, ya que el hecho de que nuestra proteína 2b marcada con las mitades de YFP para experimentos de BiFC muestre una actividad supresora comparable a la de la proteína nativa (Fig. 12) sugiere que la tetramerización no es requerida para esta función, ya que es difícil imaginar que fusiones en el extremo amino tan grandes como la propia proteína permitan a ésta tetramerizar sin impedimentos estéricos, o al menos no lo dificulten sin afectar a su función, en particular cuando se reconstituye un fluoróforo de YFP, que es además un proceso difícilmente reversible (Zamyatnin *et al.* 2006; Kerppola 2009). Aunque la tetramerización puede que no sea necesaria para la actividad funcional, ello no es

incompatible con que la proteína nativa pueda formar tetrámeros a partir dímeros en las infecciones virales, incluso mayoritariamente, por razones de estabilidad o para prevenir su degradación por procesos celulares.

Nuestros datos de BiFC mostraron también que todas las proteínas mutantes analizadas, incluso las que carecían de actividad supresora de silenciamiento (2b $\Delta$ 5T, 2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2 y 2b $\Delta$ KSPSE), mantenían la capacidad de formar dímeros (Figs. 15 y 22) con la misma distribución subcelular e intensidad de fluorescencia que la de la misma proteína mutante marcada con GFP (Figs. 16-18 y 22). Aunque todas nuestras proteínas mutantes formaban dímeros consigo mismas y con la proteína 2b (datos no mostrados), los mutantes sin actividad supresora analizados no mostraron capacidad de complementarse funcionalmente en *trans* entre sí restituyendo la actividad supresora (Fig. 23). Nuestra proteína mutante 2b $\Delta$ 5T carece de parte de la cremallera de leucinas, por lo que aunque formaba dímeros en BiFC, podría no formar tetrámeros, y éste sería un punto interesante a clarificar en futuros experimentos.

Xu y colaboradores (2013) han informado de que en la cepa Rad35 (subgrupo IB) el aa<sup>55</sup> de la proteína 2b es crucial en la actividad supresora y la formación de dímeros de 2b. Esta cepa es la única en CMV que contiene P<sup>55</sup> en lugar de L<sup>55</sup> (ver anexo I), y su sustitución puntual por L restableció su actividad supresora de silenciamiento y la formación de dímeros de 2b (Xu *et al.* 2013), por lo que los autores correlacionaron estos sucesos. Nosotros tomamos con precaución esta propuesta, ya que la restauración de la actividad biológica del mutante no tiene por qué derivarse de su capacidad de dimerizar. En cualquier caso la L<sup>55</sup> debe ser importante ya que en el resto de cepas de CMV está conservada, y puede tener importancia funcional, esté relacionada o no con la formación de dímeros. Por otro lado, Dong y colaboradores (2015) han publicado recientemente el efecto de los aas L<sup>15</sup> y M<sup>18</sup> en la presencia de tetrámeros de la proteína 2b de la cepa Fny en extractos de planta, en la unión *in vitro* a RNAs, y en la actividad supresora de silenciamiento. Estos aas corresponden a la sección de la cremallera de leucinas conservada en CMV, y la sustitución de estos residuos inhibió la formación de tetrámeros (Dong *et al.* 2015), de acuerdo con los resultados de Chen y colaboradores (2008) en TAV. Dong y colaboradores (2015)

informaron de que L<sup>15</sup> y M<sup>18</sup> eran necesarios en la unión a siRNAs y que su sustitución la comprometía, y con ello inhibía la actividad supresora de la proteína. Relacionado también con la cremallera de leucinas descrita en TAV, Maneechoat y colaboradores (2015) observaron que en la cepa asintomática M1 (subgrupo IA), la sustitución puntual de T<sup>18</sup> por M<sup>18</sup> en la proteína 2b generaba síntomas severos que los autores relacionaron con la afinidad de unión a siRNAs. Sus resultados, junto con los de Chen y colaboradores (2008) y Dong y colaboradores (2015) indican que los residuos que forman la cremallera de leucinas tienen importancia funcional tanto en la proteína 2b de TAV como de CMV.

En el curso de una infección viral, la interacción de algunas proteínas virales con proteínas del huésped es necesaria. En el caso de la proteína 2b, diversos autores han determinado que interacciona con componentes proteicos de la planta, incluyendo algunos de las rutas de silenciamiento que intervienen en la defensa antiviral (Zhang *et al.* 2006b; Goto *et al.* 2007; Hamera *et al.* 2012). Guo y Ding (2002) sugirieron que la proteína 2b de CMV era un inhibidor de RdDM, como han confirmado otros estudios posteriores (Zhang *et al.* 2006; Hamera *et al.* 2012) y Zhang y colaboradores (2006a) propusieron que su re-direccionamiento de la expresión génica del huésped podría crear unas condiciones favorables para la proliferación de CMV. Nuestros resultados mostraron que este supresor interacciona *in vivo* con las proteínas AGO1 y AGO4 en BiFC, aunque la fluorescencia derivada de esta interacción es mucho más débil que la derivada de la formación de dímeros de proteína 2b (Fig. 24). Esto podría deberse a que la acumulación de las proteínas AGO expresadas transitoriamente en el tejido infiltrado es mucho menor que la de la proteína 2b. La distribución subcelular de la fluorescencia derivada del complejo de BiFC 2b/AGO1 fue citoplásmica y nuclear, coincidiendo con la distribución subcelular de AGO1 (Vaucheret 2007; Brodersen *et al.* 2012), mientras la del complejo 2b/AGO4 se localizó principalmente en el núcleo, aunque ausente del nucléolo. AGO4 es una proteína nuclear que, fusionada a GFP, se encuentra en todo el nucleoplasma (Xie *et al.* 2004), y fusionada al polipéptido Myc, se distribuye en el núcleo allí donde hay eucromatina, aunque también se acumula en cuerpos nucleolares adyacentes o inmersos en el nucléolo como los CBs (Li *et al.* 2006). Nosotros no hemos observado fluorescencia en corpúsculos nucleares derivada de la



interacción 2b/AGO4, quizá porque la débil intensidad de la señal fluorescente y su labilidad nos impidió trabajar a la resolución necesaria, pero en un estudio posterior Duan y colaboradores (2012) sí visualizaron co-localización de las proteínas en microscopía confocal usando proteínas marcadas con distintos fluoróforos en el nucléolo. A diferencia de estos autores, nuestros datos son de BiFC y visualizan las estructuras en que ambas proteínas interactúan. Otra explicación de la ausencia de AGO4 de los corpúsculos nucleares puede ser la interferencia de RNA aguas arriba del efector AGO4, ya que Li y colaboradores (2006) observaron que en plantas deficitarias en algún componente del mecanismo de interferencia de RNA aguas arriba del efector AGO4, se producía una deslocalización de esta proteína de los corpúsculos nucleares debido a que en ausencia de siRNAs de 24 nts AGO4 se volvía inestable y se deslocalizaba de los CBs. Por lo que nuestros datos sugieren que la interacción con 2b también provoca la deslocalización de AGO4 de estos corpúsculos nucleares en los que normalmente se encuentra, que puede deberse a que la proteína 2b une RNAs aguas arriba de la acción de AGO4. Alternativamente, la estabilidad de la interacción por BiFC podría impedir dinámicas de desplazamiento del dímero al nucléolo u otras subestructuras nucleares, donde no se visualizaría.

Las proteínas AGO son efectores de los complejos RISCs, especializadas en diversas funciones según los tipos de sRNAs que cargan preferentemente cada una de ellas (Mi *et al.* 2008). AGO1 actúa en PTGS (Bohmert *et al.* 1998; Fagard *et al.* 2000) y une siRNAs de 21 nts derivados de DCL4 como los siRNAs virales (Mi *et al.* 2008), mientras que AGO4 participa en TGS (Zilberman *et al.* 2003; Qi *et al.* 2006; Mahfouz 2010) y une siRNAs de 24 nts derivados de DCL3, preferentemente con adenosina en el extremo 5' (Mi *et al.* 2008). Estos últimos siRNAs participan en procesos de metilación del DNA que regulan la heterocromatinización y la transcripción y Guo y Ding (2002) demostraron que la proteína 2b de la cepa Q de CMV inhibía la metilación de DNA. AGO4 también promueve la metilación y la modificación de la cromatina (Chan *et al.* 2004; Jones *et al.* 2006) y es uno de los componentes de dispersión del silenciamiento sistémico (Jones *et al.* 2006; Brosnan *et al.* 2007), por lo que Ye y colaboradores (2009) especularon que AGO4 podía ser un punto convergente y de comunicación entre las rutas de silenciamiento de TGS y el silenciamiento sistémico. En este sentido,

Kanazawa y colaboradores (2011) demostraron que la proteína 2b de CMV podía transportar RNAs pequeños de 24 nts (y de otros tamaños) al núcleo celular, donde dirigían la metilación de DNAs de los genes endógenos correspondientes causando su silenciamiento heredable. Zhang y colaboradores (2006b) mostraron la interacción de AGO1 con la proteína 2b y Diaz-Pendón y colaboradores (2007) relacionaron AGO1 con la defensa antiviral contra CMV, ya que plantas deficientes en *ago1* eran hipersusceptibles a este virus. Algunos supresores de silenciamiento viral bloquean la actividad de AGO1 mimetizando el motivo glicina triptófano (GW) de proteínas que participan en el ensamblaje de RISC, como la proteína P38 de TCV (Jin y Zhu 2010; Schott *et al.* 2012); o la proteína P0 de poliovirus, que al interactuar con AGO provoca su degradación (Baumberger *et al.* 2007; Bortolamiol *et al.* 2007; Csorba *et al.* 2009), pero la interacción con la proteína 2b es diferente, ya que ésta no presenta ningún motivo GW. Por lo tanto, aunque los mecanismos de acción pueden variar entre las distintas proteínas supresoras, la inactivación de AGOs en la ruta de silenciamiento puede ser una actividad común en los supresores de silenciamiento virales en la interferencia de la actividad de RISC.

Zhang y colaboradores (2006b) demostraron la interacción de la proteína 2b de la cepa Fny de CMV con AGO1 en ensayos *in vitro* usando proteínas expresadas transitoriamente, y en ensayos de co-inmunoprecipitación, pero antes de nuestro estudio no se había visualizado *in vivo* esta interacción. La proteína 2b podría interferir la actividad de RISC bien bloqueando el paso en que el siRNA se carga en AGO, o bien inhibir la actividad de AGO1 en los complejos RISC activados. Estos autores observaron, en ensayos de reconstitución *in vitro* de RISC, que 2b bloqueaba la actividad de AGO1 por interacción directa y específica con la misma inhibiendo su actividad degradadora de RNAs diana y por tanto bloqueando RISC (Zhang *et al.* 2006b). Sería interesante llevar a cabo un estudio cristalográfico de la estructura que mostrara si la interacción 2b/AGO provoca un cambio conformacional en AGO o simplemente bloquea el sitio de interacción. Por lo pronto nosotros hemos visualizado por BiFC la interacción *in vivo* 2b/AGO1, y la interacción con 2b/AGO4, que no se había estudiado anteriormente (Fig. 24). Posteriormente, como ya mencionamos, Duan y colaboradores (2012) han

observado mediante experimentos de co-localización que la interacción de la proteína 2b con AGO1 o con AGO4 altera la distribución nuclear de las tres proteínas.

Anteriormente se había observado que las plantas infectadas con la proteína 2b de la cepa Fny de CMV mostraban síntomas que se correspondían con los síntomas de plantas deficientes en AGO1 y con una acumulación aberrante de miRNAs, que Zhang y colaboradores (2006b) atribuyeron a la inhibición de AGO1. Sin embargo, la planta tiene otras proteínas AGO y Harvey y colaboradores (2011) observaron que cuando AGO1 es superada, AGO2 muestra un papel antiviral. Usando plantas de *Arabidopsis* con mutaciones en las *dcls*, Díaz-Pendón y colaboradores (2007) encontraron que los siRNAs de 24 nts generados por DCL3 no reprimían la dispersión sistémica de CMV $\Delta$ 2b, carente del supresor 2b, mientras que los siRNAs de 21 y 22 nts sí lo hacían. Esta publicación en principio hacía pensar que AGO4 no jugaba un papel en las respuestas antivirales mediadas por silenciamiento. Pero en un estudio posterior, Ye y colaboradores (2009) publicaron que la proteína 2b de la cepa SD (subgrupo IB) inhibía la transcripción de AGO4 en *N. benthamiana*, mientras que el supresor de la cepa Q (subgrupo II) no lo hacía. Este efecto es consistente con el papel de la proteína 2b en la inhibición de la señal de silenciamiento sistémico y de RdDM, y los autores lo relacionaron con la tercera  $\alpha$ -hélice de 2b, ausente en la cepa Q (Ye *et al.* 2009). Otros estudios posteriores han confirmado que la proteína 2b, además de afectar a la acumulación de AGO4, también une preferentemente RNAs de 24 nts producto de DCL3, sustrato de AGO4 e inductores de RdDM (Chinnusamy y Zhu 2009; Hamera *et al.* 2012). Por otro lado, se ha relacionado a AGO4, y no a AGO1, con la inhibición de la traducción en casos de resistencia de plantas mediada por genes de resistencia (*R*), que afecta a virus que no portan genes de avirulencia. Este es el caso del gen *N* de *N. glutinosa*, que confiere resistencia a TMV, y cuya activación causa también la inhibición de la traducción de los RNAs de PVX, que no tiene lugar si *AGO4* es silenciado por silenciamiento génico inducido por virus (*viral-induced gene silencing*, VIGS; Bhattacharjee *et al.* 2009). De este modo, varias evidencias han asociado a AGO4 con las respuestas antivirales, en el silenciamiento génico y en las rutas de resistencia mediadas por genes *R*.

Respecto a las proteínas 2b mutantes utilizadas, nuestros resultados mostraron que todas interactuaban con AGO1 y AGO4, y que sus ocurrencias subcelulares eran las mismas que en las interacciones de la proteína 2b nativa con AGO1 (citoplásmica y nuclear) o con AGO4 (nuclear) (Fig. 25). Esto ocurrió incluso con aquellos mutantes que por sí mismos no se acumulaban en el núcleo celular (Figs. 17, 18). Por lo que podemos pensar que la interacción podría traslocar a la proteína 2b al núcleo en un proceso independiente de las NLSs del supresor viral, o que la retiene en el núcleo una vez que ésta ha entrado en el mismo por medios independientes de las NLSs. Si la interacción de 2b con AGO4 suprime la actividad de ésta por interacción directa, como ocurre con AGO1 (Zhang *et al.* 2006b) y como apuntan nuestras observaciones (Fig. 24 y 25), la proteína 2b podría inhibir de este modo el silenciamiento sistémico, ya que AGO4 es un componente necesario para la dispersión del silenciamiento (Jones *et al.* 2006; Brosnan *et al.* 2007).

Nuestros resultados mostraron que las proteínas 2b mutantes que carecen de actividad supresora también interactuaban con AGO (Figs. 15 y 25), como han confirmado Duan y colaboradores (2012). Estos autores confirmaron que las sustituciones de las NLSs de 2b (en la cepa SD, subgrupo IB de CMV) no afectaban a la interacción con AGO, y en un ensayo *in vitro* de reconstitución de RISC, las proteínas 2b mutantes sin actividad supresora se unieron a AGO e inhibieron la actividad degradadora de AGO1, y demostraron que para bloquear la actividad de RISC era necesario que la NoLS de 2b fuera funcional. Hamera y colaboradores (2012) acotaron el lugar de interacción de las proteínas AGO con la proteína 2b de la cepa SD (subgrupo IB) de CMV a los dominios PAZ y PIWI de AGO, que reconocen el extremo 3' del siRNA y cortan las cadenas diana de RNA de hebra sencilla, respectivamente. Y Duan y colaboradores (2012) han determinado que el dominio de la proteína 2b que interactúa *in vivo* e *in vitro* con AGO1 y AGO4, está comprendido entre los aas 38-94. Este dominio contiene una región poco conservada y otra altamente variable entre distintas cepas de CMV, junto con el dominio tres de la proteína (Ye *et al.* 2009). Si extrapolamos los resultados de Duan y colaboradores (2012) a la cepa Fny, nuestros resultados pueden indicar que, dentro de la región de proteína 2b delimitada (aas 38-94), la delección del motivo de fosforilación (<sup>39</sup>KSPSE<sup>42</sup>) no afecta a la interacción con

AGO (Fig. 25), con lo que la región de interacción excluiría dicho motivo quedando restringida a los aas 44-94. Nosotros también hemos visualizado la interacción 2bΔGSEL/AGO, con lo que la delección de este fragmento (<sup>62</sup>GSEL<sup>65</sup>) tampoco afecta a la interacción, lo que puede sugerir que o bien la región de interacción tiene una extensión reducida, o bien la zona de interacción es una región amplia de la proteína 2b en la que participan aas clave conservados en la secuencia. Por lo tanto, nuestros resultados de BiFC han sido confirmados por Hamera y colaboradores (2012) y por Duan y colaboradores (2012) en experimentos de *pull-down in vitro* y de co-inmunoprecipitación *in vivo*, y son consistentes con el modelo de Zhang y colaboradores (2006b) de supresión *in vitro* de la actividad degradadora de AGO1. Sin embargo, nuestros resultados con mutantes sin actividad supresora de silenciamiento indican que, como posteriormente han mostrado Duan y colaboradores (2012), la interacción con proteínas AGO no es suficiente para dotar a la proteína 2b de su actividad supresora de silenciamiento.

Como ya hemos tratado, la proteína 2b de la cepa Fny de CMV se localizó en el nucléolo de células vegetales, donde interaccionaba con proteínas AGOs afectando a su distribución subcelular (Duan *et al.* 2012), por lo que estudiamos si en esta localización la proteína interacciona potencialmente con las proteínas coilina, fibrilarina y nucleolina de estos orgánulos. Nuestras observaciones en BiFC mostraron una interacción potencial con las tres, no fundamentada aún con otros experimentos como co-inmunoprecipitación o Y2H, y son una primera aproximación a la interacción de un supresor de silenciamiento viral con estas proteínas nucleares.

La relación entre la coilina y las proteínas virales ha comenzado a estudiarse hace poco, y se ha observado que la infección con los virus animales del herpes simple tipo 1 (*Herpes simplex virus type 1*, HSV-1) y adenovirus, redistribuía la coilina de los CBs a otras subestructuras nucleares (Morency *et al.* 2007; James *et al.* 2010). Por otro lado, Semashko y colaboradores (2012b) han observado que la proteína de movimiento viral 63K del virus semilatente de la Poa (*Poa semilattent virus*, PSLV) interacciona *in vivo* e *in vitro* con la coilina y que esta interacción tiene lugar en un dominio con carga positiva de la proteína viral que une RNA *in vitro*, por lo que los autores especularon que la interacción podría afectar procesos biológicos importantes del núcleo celular. Nuestras

observaciones en BiFC mostraron una interacción potencial 2b/coilina en los nucléolos y probablemente en los CBs, donde se encuentra la coilina. El dominio de la coilina de unión a ácidos nucleicos y de interacción con otras proteínas podría ser también el de interacción con la proteína 2b.

La fibrilarina se ha encontrado interaccionando con elementos virales: Kim y colaboradores (2007) encontraron que interaccionaba con la proteína ORF3 de un umbravirus formando RNPs, esenciales para la diseminación del virus (Kim *et al.* 2007); y Semashko y colaboradores (2012a) observaron la interacción *in vivo* e *in vitro* de la fibrilarina 2 de *A. thaliana* (AtFib2) con la proteína 63K de PSLV, entre el dominio GAR de la fibrilarina y el dominio terminal amino de 63K, con cargas negativas (Kalinina *et al.* 2001; Semashko *et al.* 2012a y 2012b). La interacción de proteínas virales con la fibrilarina observada en *Hordeivirus*, *Coronavirus*, *Potyvirus*, *Umbravirus*, y ahora potencialmente en *Cucumovirus* podría constituir un mecanismo general operante en virus de diferente origen taxonómico aunque su papel en las infecciones virales es aún desconocido. Yoo y colaboradores (2003) observaron que algunas proteínas virales, como la proteína N del coronavirus IBV, y la nucleocápsida de un arterivirus animal interaccionaban directamente con la fibrilarina y la nucleolina, y Chen y colaboradores (2002) consideraron que esta interacción podía darse con el dominio de unión a RNAs de la fibrilarina. Ateniéndonos a los estudios de Semashko y colaboradores (2012a) con la proteína 63K de PSLV, cabe pensar que la interacción 2b/fibrilarina también se dé entre el dominio GAR de la fibrilarina y las cargas negativas de la mitad carboxilo de la proteína 2b (aas 76-110). De nuestras proteínas 2b mutantes, la única que presenta afectada esta región es 2b $\Delta$ 3T, y no disponíamos de dicho mutante en el momento de llevar a cabo estos ensayos.

Por último hemos visualizado también una interacción potencial 2b/nucleolina en el nucléolo, y muy probablemente formando parte de los CBs y corpúsculos asociados. Se ha observado que algunos virus animales como poliovirus y adenovirus redistribuyen la nucleolina hacia el citoplasma (Waggoner y Sarnow 1998; Matthews 2001), aunque nosotros no hemos observado este suceso en planta. Nuestras mutaciones en la proteína 2b no inhibieron la interacción, ni afectaron a su localización subcelular (Fig. 34), por lo que puede que la interacción se dé entre el dominio GAR de la nucleolina y

las cargas negativas de la proteína 2b, y en un futuro podría tener interés comprobar si un mutante con una delección de las cargas negativas de la mitad carboxilo de la proteína, como ejemplo 2b $\Delta$ 76-110, interacciona con la nucleolina y fibrilarina, especialmente si esta delección no afectara a la unión a RNAs y la actividad supresora de silenciamiento, como cabría pensar. Puede que CMV, como los adenovirus, al bloquear la actividad de la nucleolina evite que ésta reprima la transcripción del virus o que libere productos necesarios para la transcripción del mismo. O puede que, como Chen y colaboradores (2002) observaron en coronavirus, mantengan las células infectadas en interfase favoreciendo la transcripción y traducción de proteínas virales y el ensamblaje viral, y con ello la propagación viral. De este modo podría CMV causar el atrofiamiento que Lewsey y colaboradores (2009) observaron en las plantas infectadas. Por otro lado, se ha propuesto que la coilina, en asociación con la fibrilarina, tiene una función de transporte entre citoplasma y nucléolo (Bellini y Gall 1999; Boudonk *et al.* 1999), y nuestros resultados no son incompatibles con que este fuera el caso con la proteína 2b. En este caso la proteína 2b las utilizaría como lanzadera para entrar al nucléolo independientemente de las NLSs de la proteína 2b, lo que explicaría la localización de estos complejos en BiFC (Figs. 31-33).

Podemos concluir que nuestros resultados sugieren interacciones potenciales de la proteína 2b de CMV con las proteínas nucleares coilina, fibrilarina y nucleolina. No podemos aún confirmar estas interacciones, y en caso positivo interpretar si participan en un sistema de transporte nuclear o si están más relacionadas con la creación de un entorno favorable para el virus.

### **5.3. Interacciones *in vitro* de la proteína 2b con RNAs**

Aunque la presencia nuclear de la proteína no es necesaria para su actividad supresora del silenciamiento, como ya hemos discutido, es difícil separar ambas propiedades ya que el dominio terminal amino, las NLSs y la región que las bordea, y el motivo de fosforilación, participan en otra función distinta de la señalización subcelular: la unión

a RNAs. Estudios recientes entre los que se incluye este trabajo, han demostrado el papel de la proteína 2b de cucumovirus en la unión a siRNAs y propuesto que participan en la interferencia con el silenciamiento de RNA antiviral (Goto *et al.* 2007; Hamera *et al.* 2012). Cabe destacar que nosotros hemos expresado y purificado la proteína 2b completa en bacteria para los ensayos de unión *in vitro* a RNAs, ya que diferentes laboratorios han encontrado dificultades en su expresión y purificación, relacionadas con su extremo terminal carboxilo (Mayers *et al.* 2000, Goto *et al.* 2007 y Dong *et al.* 2015), y han llevado a cabo sus estudios con proteína 2b incompleta. Sin embargo tanto nosotros con la proteína 6xHis-2b-HA, como Ding y colaboradores (1994) y Hamera y colaboradores (2012) no encontramos estos problemas, quizás porque la fusión de ciertos elementos, especialmente en el extremo terminal carboxilo de la proteína, podría eliminar la toxicidad en *E. coli* encontrada por algunos grupos. En nuestro estudio, la unión *in vitro* a RNAs de proteína 2b nativa o mutada resultó un método que permitió establecer, sobre la base de los ensayos paralelos de actividad funcional en planta, una relación entre la actividad supresora del silenciamiento de la proteína 2b y su capacidad de unión a ds siRNAs.

Los primeros estudios que relacionaron la presencia nuclear de la proteína con la actividad supresora de silenciamiento sugirieron un papel de la proteína como competidor del transporte nuclear o en la regulación transcripcional (Lucy *et al.* 2000), o en la interferencia de la metilación de DNA nuclear (Guo y Ding 2002). Posteriormente, Wang y colaboradores (2004) propusieron que las NLSs de la proteína 2b podían tener otra función más allá de ser una señal de localización para transportar la proteína al núcleo, como la unión a miRNAs. Los dominios ARR con cargas positivas, como el que encontramos en la mitad amino de nuestra proteína de estudio, se han identificado en otras proteínas supresoras, en las que participan en la unión a RNAs (Bucher *et al.* 2004; Chapman *et al.* 2004; Chellappman *et al.* 2005; Lu *et al.* 2005; Méray *et al.* 2005) en lo que podría ser un mecanismo general de supresión de silenciamiento (Méray *et al.* 2005; Lakatos *et al.* 2006). Guo y Ding (2002) demostraron que la proteína 2b de la cepa Q de CMV (subgrupo II) inhibía la actividad de la señal de silenciamiento e interfería con la metilación del DNA en el núcleo, y sugirieron que esta señal de silenciamiento podrían ser los siRNAs. Posteriormente, Zhang y



colaboradores (2006b) en CMV, y Mérai y colaboradores (2006) en TAV, no obtuvieron resultados positivos de la unión de 2b a siRNAs partiendo de proteínas 2b expresadas en *E. coli* y de tejido de planta, respectivamente. Goto y colaboradores (2007) consideraron que estos intentos fallidos se debieron a que la proteína 2b aislada en estos estudios no era funcional, y demostraron que las proteínas de las cepas CM95 y CM95R (subgrupo I de CMV) unían *in vitro* siRNAs y dsRNAs (algo mayores a los siRNAs) generados por una Dicer humana, aunque con distinta afinidad en ambas cepas. Este último hecho lo relacionaron con el aa<sup>46</sup>, que varía entre ambas cepas. En su estudio, las proteínas 2b unieron preferentemente siRNAs frente a miRNAs, y la delección de las NLSs inhibió esta unión. Tanto las NLSs como el aa<sup>46</sup> están contenidos en la ARR, y la delección o variación de estos aas afectó a la actividad supresora de silenciamiento, por lo que relacionaron ambos sucesos (Goto *et al.* 2007). Anteriormente, Wang y Metzloff (2005) habían sugerido que los siRNAs, unidos con baja afinidad a los supresores de cepas con fenotipo asintomático, podrían liberarse de los supresores y jugar un papel importante en la protección cruzada, por lo que Goto y colaboradores (2007) relacionaron la unión a RNAs con la protección cruzada que confiere la cepa CM95, que une siRNAs con baja afinidad, frente a CM95R, que los une con alta afinidad, y sugirieron que los siRNAs unidos a la proteína 2b serían transportados al núcleo fuera del citoplasma, donde el complejo (2b/siRNA) forma inclusiones. A día de hoy no está aclarada del todo la función de la proteína 2b en el núcleo, donde se ha relacionado con la alteración de la expresión génica (Kanazawa *et al.* 2011; Du *et al.* 2014b).

Posteriormente, en un estudio estructural de la proteína 2b de TAV, Chen y colaboradores (2008) confirmaron que la unión a siRNA se daba mediante dos  $\alpha$ -hélices separadas por un codón. En esta estructura, los dominios de las NLSs estaban implicados en la unión a siRNAs en la primera hélice y el motivo de fosforilación en la segunda hélice (Chen *et al.* 2008; Rashid *et al.* 2008). Por ello en nuestros estudios cabía esperar que las delecciones en estos motivos afectasen a la unión a siRNAs de la proteína 2b de CMV. Nuestros resultados iniciales con la proteína 2b y una selección de seis proteínas mutantes (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, 2bS42A) y ds siRNA sintético basado en el miRNA171 de *A. thaliana*, mostraron que las

delecciones de una o ambas NLSs no sólo impidieron la supresión de silenciamiento y la localización nuclear de la proteína 2b (Figs. 15 y 18), sino que también inhibieron la unión a un ds siRNA (Fig. 26). Esto es similar a lo habían observado en CMV Goto y colaboradores (2007) y en TAV Rashid y colaboradores (2008). Asimismo, la delección del motivo de fosforilación en la segunda  $\alpha$ -hélice, que eliminó la actividad supresora de silenciamiento y confinó la proteína en el nucléolo (Figs. 15 y 18) también inhibió la unión al ds siRNA (Fig. 26). Por lo tanto, nuestros resultados, los datos estructurales de la proteína 2b de TAV, y la unión a ds siRNA de las proteínas 2b de TAV y de CMV (Goto *et al.* 2007; Chen *et al.* 2008; Rashid *et al.* 2008) sugirieron que la unión a ds siRNA podría estar involucrada en la actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b, mientras que en nuestros mutantes, la alteración de la distribución subcelular de la proteína sería un efecto diferente, pero no la causa de la pérdida de su actividad supresora.

A la vista de los resultados de esta primera aproximación a la unión *in vitro* a un ds siRNA con proteína nativa y una primera selección de mutantes, diseñamos un estudio más detallado de la unión *in vitro* a sRNAs, utilizando tanto la proteína nativa como las nueve proteínas mutantes de las que llegamos a disponer (2b $\Delta$ 5T, 2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL y 2b $\Delta$ 3T) y tres sRNAs sintéticos basados en la secuencia del miRNA171 de *A. thaliana*: ds siRNA, miRNA y ss siRNA (ver Fig. 11 en Material y Métodos) y un RNA viral largo, el RNA genómico de 6,4 kb de TMV. En este estudio comprobamos si la proteína 2b de CMV purificada de bacteria unía *in vitro* estos cuatro tipos de RNAs, y comparamos las capacidades de la proteína 2b y de los nueve mutantes de unir *in vitro* los mismos, determinando sus cinéticas y sus afinidades de unión.

Los análisis con proteína 2b nativa mostraron que unía tanto ds siRNAs como miRNAs y ss siRNAs con alta afinidad, los dos primeros a relaciones molares proteína:RNA semejantes, por lo que la proteína podría potencialmente alterar los diferentes procesos biológicos en que participan estos sRNAs. Por ello, nuestros resultados están de acuerdo con los resultados de Hamera y colaboradores (2012), que también observaron la unión de la proteína 2b a miRNAs, y creemos que la baja afinidad por éstos que Goto y colaboradores (2007) mostraron en la cepa CM95R podría deberse

bien a que las propiedades de la proteína de esta cepa fueran algo diferentes a las de la cepa Fny, o bien a diferencias en las condiciones experimentales. Nuestros resultados mostraron que en nuestras condiciones se puede encontrar hasta el 60% del ds siRNA unido a la proteína 2b nativa a una relación molar proteína:RNA de 2:1 (Fig. 29, gráfica superior), por lo que estos resultados concuerdan bien con el modelo estructural de cristalografía de la proteína 2b de TAV unida a siRNA (Chen *et al.* 2008), y con los datos de unión de RNAs a proteína 2b de TAV inmovilizada en Chip y de espectroscopía de reflexión interna total (Rashid *et al.* 2008). Por tanto, diversos estudios entre los que incluimos los nuestros, han establecido un modelo de unión *in vitro* e *in vivo* de la proteína 2b de cucumovirus a diferentes sRNAs (Goto *et al.* 2007; Rashid *et al.* 2008; Kanazawa *et al.* 2011; Duan *et al.* 2012; Hamera *et al.* 2012).

Nuestros resultados mostraron que la proteína 2b tiene mayor afinidad por el ds siRNA que por el miRNA o el ss siRNA (Fig. 27 y Tabla 3). Al unir con mayor afinidad ds siRNA frente a otros sRNAs, se podría hipotetizar que la proteína 2b afecta en mayor medida a los procesos en los que estos siRNAs intervienen, como el silenciamiento antiviral, frente a otros procesos mediados por los otros dos sRNAs, como la ruta de metilación en RdDM, en que participa AGO4. Hamera y colaboradores (2012) demostraron la unión de 2b a ss siRNAs de complejos RISC-AGO4 activados, y nuestros resultados *in vitro* muestran que la proteína 2b puede unir *in vitro* ss siRNAs sintéticos con alta afinidad (Fig. 29 y tabla 3), por lo que este estudio y nuestros resultados se complementan.

Nuestros resultados también mostraron que la unión de la proteína 2b a los sRNAs era cooperativa (Tabla 3), lo que indicaba que la proteína no actuaba en forma de monómero sino en estructuras más complejas como los dímeros, que habíamos visualizado en BiFC (Fig. 21), e incluso en estructuras más complejas. Esto sugiere que, como Chen y colaboradores (2008) propusieron para la proteína 2b de TAV, para la unión a sRNAs es necesaria una concentración mínima de supresor que permita la formación de dímeros, y probablemente de estructuras más complejas. Rashid y colaboradores (2008) propusieron que la unión de la proteína 2b de TAV al sRNA promovía la formación de tetrámeros; nosotros no podemos descartar que esto no ocurra también en CMV, pero como hemos discutido anteriormente, posiblemente el

estado dimérico sea suficiente para conferir la actividad supresora. Por otro lado, nuestros resultados sugirieron que la interacción con las proteínas AGO y la unión a sRNAs eran sucesos independientes, ya que todas nuestras proteínas mutantes podían interactuar con AGO1 y AGO4 (Fig. 25) aunque estas interacciones no se correlacionaron con la unión a sRNAs ni con sus actividades supresoras del silenciamiento (Tabla 5). De hecho, Duan y colaboradores (2012) han determinado que los lugares de interacción de la proteína 2b con AGO y con los ácidos nucleicos son independientes. Estos autores demostraron que en plantas transgénicas que expresan la proteína 2b de la cepa SD (subgrupo IB de CMV) hay una menor metilación de DNA, por lo que la proteína inhibe el RdDM, y para ello requiere del dominio de unión a RNA de la proteína 2b pero no su interacción física con AGO4. Sus resultados están de acuerdo con los estudios y el modelo presentado por Hamera y colaboradores (2012), en los que la proteína 2b interactúa con los siRNAs de 24 nts que une AGO4.

Por lo tanto, la proteína 2b de cucumovirus podría bloquear tanto los siRNAs que inician la ruta de silenciamiento como las proteínas AGO, y esta actividad dual podría conferir una ventaja al virus en lo que comúnmente se ha denominado la “carrera armamentística” con el huésped. Históricamente se han propuesto varios modelos de posible actuación de la proteína 2b en las rutas de silenciamiento. Uno de ellos es el propuesto por Chen y colaboradores (2008) para la proteína 2b de TAV que refleja estas dos características de actuación: por un lado previene la incorporación del ds siRNA en AGO secuestrando estos sRNAs, y por otro interactúa directamente con AGO inhibiendo su actividad (Fig. 35A). Otro modelo es el propuesto por Hamera y colaboradores (2012), en que la proteína 2b secuestra preferentemente los siRNAs de 24 nts que incorpora AGO4, y por otro lado perturba la maquinaria de RdDM de la planta formando un complejo AGO4/siRNA/2b que limita el acceso de AGO4 a la diana de DNA. En este modelo AGO4 tiene acceso a los siRNAs, y la proteína 2b interactúa con estos siRNAs y con AGO4 formando un complejo (Fig. 35B), siguiendo un modelo parecido al de la interacción 2b/AGO1 que propuesto por Zhang y colaboradores (2006b), en el que la proteína 2b no interfiere el acceso de AGO1 a los miRNAs y siRNAs antivirales de 21 nts (Fig. 35C).

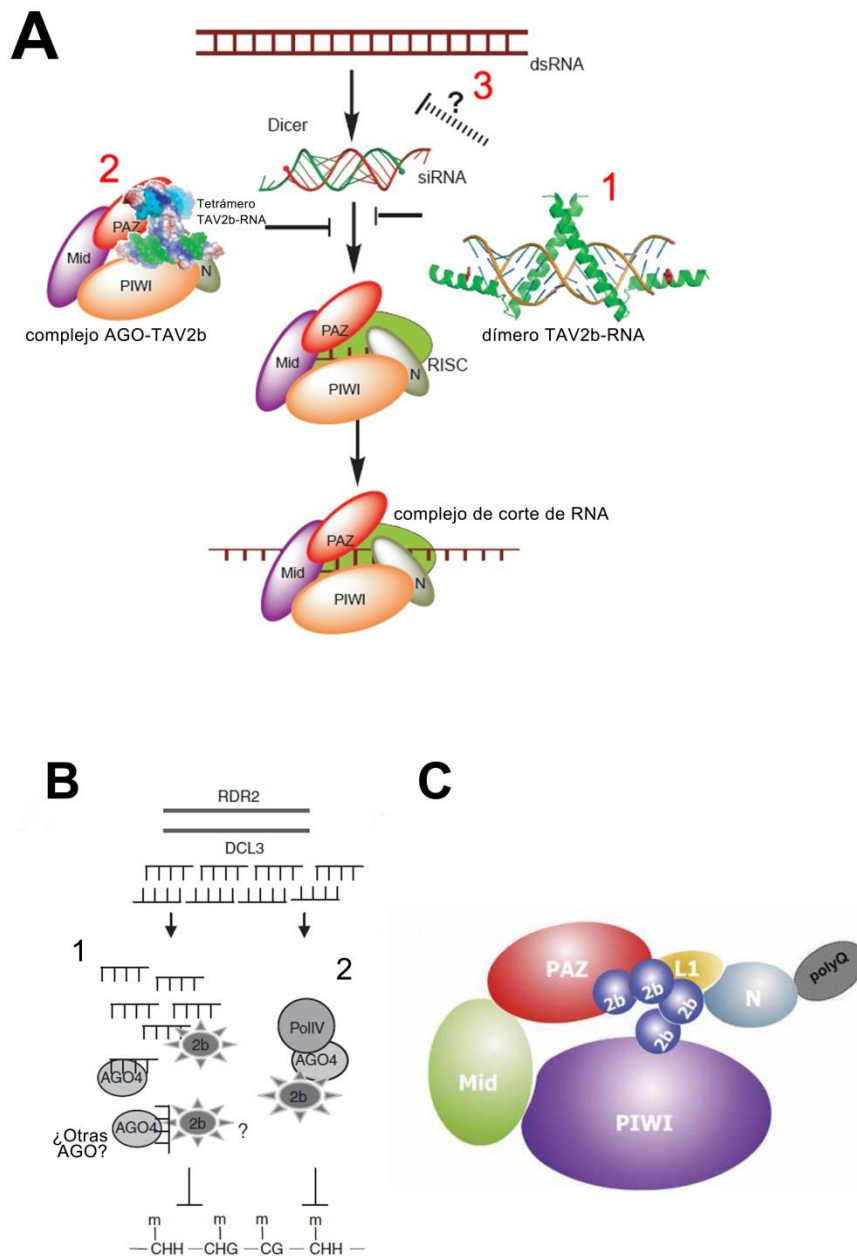


Fig. 35: Modelos de actuación propuestos para la proteína 2b de *Cucumovirus*. A, Modelo de Chen y colaboradores (2008). Se muestra un diagrama de silenciamiento y la acción de la proteína 2b de TAV. 1, El dímero formado por dos proteínas 2b une el siRNA, previniendo la incorporación y activación de RISC. 2, La proteína 2b interacciona directamente con AGO. 3, Además, la proteína 2b de TAV podría unir dsRNAs largos, inhibiendo la formación de más siRNAs. Reproducido de Chen y colaboradores (2008). B, Modelo de Hamera y colaboradores (2012): interferencia en dos pasos de la proteína 2b de CMV con la ruta de metilación de DNA dependiente de RNA (RdDM). 1, la proteína 2b de CMV tiene alta afinidad de unión a los siRNAs de 24 nts que une AGO4. Esta afinidad permite la formación de complejos tripartitos AGO4/siRNA/2b, reduciendo el acceso de AGO4 a los loci diana de DNA, causando hipometilación. 2, la proteína 2b de CMV, mediante la interacción específica 2b/AGO4, acompaña al complejo AGO4/PollIV, reduciendo su acceso al loci diana. Reproducido de Hamera *et al.* 2012. C, Modelo propuesto por Zhang y colaboradores (2006): interacción directa de la proteína 2b de CMV con AGO1 en los dominios PAZ (de interacción con siRNA) y PIWI. Se muestra los dominios PIWI, PAZ, Mid, Linker 1 (L1), terminal amino (N) y poly-Q. Reproducido de Zhang *et al.* 2006.

Como hemos visto, diversos grupos además del nuestro han estudiado la unión del supresor 2b de cucumovirus a sRNAs. En estos trabajos se ha descrito la unión *in vitro* e *in vivo* a distintos sRNAs como los siRNAs, miRNAs y siRNAs de cadena sencilla (Goto *et al.* 2007; Rashid *et al.* 2008; Kanazawa *et al.* 2011; Hamera *et al.* 2012) e *in vitro* a RNAs largos como han mostrado nuestros datos (Fig. 30) e *in vivo*, en TAV a RNAs virales (Shi *et al.* 2008). La afinidad por sendos RNAs varía. En algunos estudios, se ha encontrado que la proteína 2b de TAV presentaba mayor afinidad por los siRNAs que por los siRNAs de hebra sencilla; y en algunos ensayos se ha observado que la proteína 2b de CMV, además de unir dsRNAs algo mayores a los siRNAs (Wang *et al.* 2004; Goto *et al.* 2007), promovía la acumulación de siRNAs en el núcleo, probablemente transportándolos ahí, que se ha relacionado con la reducción en la metilación de DNA observada en varios estudios de infección viral (Wassenegger 2000; Guo y Ding 2002).

Por otro lado, las cepas del grupo I de CMV son más virulentas que las del grupo II (Wahyuni *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1994; Cillo *et al.* 2009), hecho que se ha relacionado con la proteína 2b; y diferentes autores han comprobado que la expresión de 2b de la cepa Fny (subgrupo IA), a diferencia de las cepas Q o LS (grupo II), inhibía la expresión génica regulada por miRNAs, lo que provocaba defectos en el desarrollo (Chapman *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006; Lewsey *et al.* 2007). Tanto Zhang y colaboradores (2006) como Lewsey y colaboradores (2007) propusieron que este efecto causaba las diferencias en el desarrollo de síntomas entre los subgrupos IA y II. Recientemente Du y colaboradores (2014b) han observado que el fenotipo de las plantas infectadas con la cepa Fny coincidía con el de las plantas que presentaban alterado el miR159. Esto no es exclusivo de la proteína 2b, ya que diversos estudios han mostrado que las plantas transgénicas que expresan constitutivamente supresores virales de silenciamiento muestran alteraciones fenotípicas asociadas a efectos en la regulación de mRNAs del huésped mediada por miRNAs (Kasschau *et al.* 2003; Chapman *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006b; Lewsey *et al.* 2007; Jay *et al.* 2011). Wang y colaboradores (2004) apuntaron que esta podía ser una función de la proteína 2b en el núcleo, y en este sentido Du y colaboradores (2014a) publicaron recientemente que la presencia más marcadamente nuclear una proteína 2b de la cepa Fny con una NLS extra (2bNLS), perjudicaba su actividad supresora de silenciamiento y al tiempo afectaba a la función reguladora de

los miRNAs en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaban la proteína. Este mismo grupo también relacionó la patogenicidad de las cepas del grupo I con la mayor presencia nuclear de la proteína 2b; y la de las cepas del subgrupo II, con menor presencia nuclear de la proteína 2b, con una mayor actividad supresora de silenciamiento (Du *et al.* 2014a). Zhang y colaboradores (2006b) informaron de que las proteínas 2b de las cepas Q y LS (grupo II de CMV), con fenotipo más suave en planta, no alteraban las funciones de los miRNAs. Y recientemente Du y colaboradores (2014b) han interpretado que la presencia en el núcleo de las proteínas 2bNLS y 2b de las cepas Q y LS no está relacionada con los efectos de la proteína en las rutas dependientes de miRNAs y siRNAs; sino que la presencia nuclear de 2bNLS (cepa Fny) está relacionada con la virulencia y un desarrollo más acelerado de los síntomas en planta. Por ello concluyeron que la presencia citoplásmica de la proteína 2b de la cepa Fny era responsable de la alteración de las rutas de miRNAs que generan los síntomas más severos en la cepa Fny respecto a otras cepas, y que los síntomas en planta están relacionados con la distribución citoplásmica de la proteína y no con la presencia nuclear de la misma. Estos autores mostraron que la acumulación nucleolar estimulaba de alguna manera los síntomas severos como la necrosis, y esto podría estar relacionado con la traslocación de la catalasa (CAT3) que observaron Inaba y colaboradores (2011) resultado de la interacción con la proteína 2b en plantas de *Arabidopsis*.

En cuanto a la unión de nuestras proteínas mutantes a los sRNAs, hemos caracterizado las cinéticas de unión *in vitro* de 2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE, 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL, 2b $\Delta$ 3T y 2b $\Delta$ 5T a los cuatro tipos de RNAs. Nuestros resultados mostraron que la delección de las NLSs inhibía la unión a los cuatro RNAs, mientras que la delección del dominio de fosforilación, que confinaba la proteína en el nucléolo, comprometía sustancialmente la unión a los tres tipos de sRNAs y completamente la unión al RNA viral (Figs. 15, 28, 29 y 30). Esta proteína mutante (2b $\Delta$ KSPSE) presentaba más afinidad por el miRNA que por otros sRNAs, aunque la afinidad por aquél era más de tres órdenes inferior a la de la proteína nativa por el miRNA (Figs. 28, 29 y Tabla 3). Sin embargo, las mutaciones puntuales en S<sup>40</sup> y S<sup>42</sup> (2bS40A, 2bS42A) en este motivo, que no afectaron a la localización subcelular de la proteína ni a la actividad supresora

de silenciamiento, modificaron levemente la afinidad por los sRNAs, resultando ésta mayor en el mutante 2bS40A que en 2bS42A (Figs. 15, 28, 29 y Tabla 3). En ambos casos estos dos mutantes presentaron, como la proteína nativa, mayor afinidad por el ds siRNA que por el miRNA o el ss siRNA. Por lo tanto, en el motivo de fosforilación, que estructuralmente se encuentra en la región de unión entre las dos primeras  $\alpha$ -hélices y en la segunda de éstas, la delección completa del mismo tuvo un efecto inhibitorio de la unión a sRNAs, que podría ser la causa de la pérdida de la actividad supresora de silenciamiento. En ello tendría importancia el aa P<sup>41</sup> del motivo KSPSE, conservado en CMV, ya que Chen y colaboradores (2008) en TAV demostraron que la sustitución de este aa reducía considerablemente la actividad supresora de la proteína y la afinidad de la proteína 2b por los siRNAs. En TAV se ha comprobado estructuralmente que P<sup>41</sup> crea un codo que permite unir una parte del siRNAs en la segunda  $\alpha$ -hélice de 2b (Chen *et al.* 2008). Esta razón explicaría que, en contraste con 2b $\Delta$ KSPSE, en los mutantes con sustituciones puntuales de S<sup>40</sup> y S<sup>42</sup> no se observase este efecto inhibitorio en la unión a siRNAs. Tomando en conjunto las delecciones en la mitad amino de la proteína (2b $\Delta$ 5T, 2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2, 2b $\Delta$ KSPSE), éstas afectaron seriamente a la unión a sRNAs, inhibiéndola, mientras que las sustituciones (2bS40A y 2bS42A) apenas la afectaron, mientras que las delecciones en la mitad carboxilo (2b $\Delta$ GSEL, 2b $\Delta$ 3T) incluso aumentaron la afinidad de la proteína por los sRNAs, respecto a la de la proteína nativa. La proteína mutante 2b $\Delta$ 5T resultó un caso especial, ya que la delección del dominio terminal amino afectó parcialmente a la primera alfa hélice de la proteína, implicada en la unión a sRNAs (Chen *et al.* 2008; Duan *et al.* 2012) y en la formación de tetrámeros por la proteína 2b de TAV (Chen *et al.* 2008). Como comprobamos anteriormente, nuestra proteína mutante 2b $\Delta$ 5T carecía de actividad supresora de silenciamiento (Fig. 15), aunque retenía otras propiedades de la proteína. Entre ellas es destacable que unía ss siRNA y miRNA casi con tanta afinidad como la proteína nativa y sin embargo apenas unía ds siRNA, lo que relacionó la actividad supresora de silenciamiento de la proteína 2b con la unión a ds siRNA, respecto a los otros dos sRNAs analizados (miRNAs y ss siRNAs). Duan y colaboradores (2012) también observaron que las delecciones en este extremo terminal amino afectaban a la unión a RNAs, confirmando nuestros resultados. Al unir ss siRNAs y miRNAs con alta finidad, sería esperable que nuestra proteína 2b $\Delta$ 5T



retuviera la propiedad de inhibir los procesos en que intervienen estos sRNAs, como la inhibición de RdDM, o el bloqueo de RISC activados que se nombran en la bibliografía y que nosotros no hemos tenido oportunidad de investigar. Tampoco hemos podido caracterizar en este trabajo si nuestra proteína 2b nativa o nuestros mutantes mostraban afinidades diferenciales por sRNAs de diferente tamaño dirigidos a incorporarse a distintas proteínas AGO (Mi *et al.* 2008; Montgomeri *et al.* 2008; Takeda *et al.* 2008), o el efecto de la presencia de diferentes nucleótidos en el extremo 5'-terminal del sRNA en las afinidades de unión, y si nuestras observaciones *in vitro* correlacionarían con los datos obtenidos en planta por otros grupos (Hamera *et al.* 2012). Caracterizar estas afinidades podría ayudar a explicar los fenotipos de infección que estas mutaciones causan cuando están presentes en el virus (Lewsey *et al.* 2009; nuestro trabajo).

La región ARR de la proteína 2b tiene un gran interés por sus propiedades. Diferentes estudios en TAV han mostrado que la región comprendida entre los aas 20-30, rica en cargas positivas, son cruciales para la unión a RNA (Chen *et al.* 2008; Rashid *et al.* 2008). En esta región se encuentran las NLSs, implicadas en la unión a siRNAs y en el transporte de la proteína al núcleo. Dos estudios mostraron que mutaciones puntuales en las NLSs de proteínas 2b de las cepas CM95 y CM95R de CMV, y también de TAV disminuían la unión a RNAs (Goto *et al.* 2007; Rashid *et al.* 2008). Aunque los aas de la ARR de la proteína 2b de TAV no están completamente conservados en CMV, la relación de cargas positivas sí es semejante y las variaciones puntuales o deleciones de los aas con carga positiva (como son los de las NLSs) comprometieron la unión a RNAs (Goto *et al.* 2007; Rashid *et al.* 2008; y nuestros resultados). Del mismo modo Chen y colaboradores (2008) observaron que la sustitución de un solo aa en el motivo de fosforilación de la proteína 2b de TAV (P<sup>41</sup>) disminuía la unión a siRNAs. Los aas prolina y serina de este motivo (KSPSE) forman interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno con los sRNAs, y se ha comprobado que la P<sup>41</sup> en la proteína 2b de TAV forma un codo que permite la unión del siRNA a la segunda  $\alpha$ -hélice (Chen *et al.* 2008). Por lo que el motivo de fosforilación cumple una función estructural en la proteína y las sustituciones en el mismo afectan a la afinidad por los sRNAs, como han mostrado también nuestros resultados (Fig. 29 y Tabla 3). Por ello, la deleción del

motivo de fosforilación conllevó un cambio conformacional que inhibió parcialmente la unión a RNAs y posiblemente con ello la actividad supresora de silenciamiento. La proteína 2b $\Delta$ KSPSE presentó una constante de disociación cuatro veces superior a la de la proteína nativa en su unión *in vitro* a RNAs, que fue posiblemente insuficiente para conferir actividad supresora del silenciamiento. El aa<sup>46</sup> de la proteína 2b también está contenido en la ARR, y Goto y colaboradores (2007) comprobaron que su sustitución puntual en las cepas CM95 y CM95R disminuía la unión a ds siRNAs, por lo que tanto los aas con carga positiva de las NLSs como de otras regiones de la ARR son importantes en la unión a siRNAs.

Fuera de la ARR, Ye y colaboradores (2009) definieron un dominio tres (aas 63-69 de la proteína 2b) presente sólo en las cepas del grupo I de CMV, y sugirieron que podría estar relacionado con la estabilización de la unión de la proteína a RNAs, o con su interacción con otros elementos de RISC (Ye *et al.* 2009). Nuestros resultados mostraron que la delección de una fracción de dicho dominio tres (2b $\Delta$ GSEL) no afectaba a la estabilidad de la proteína, ya que ésta se acumulaba normalmente en el tejido infiltrado (Fig. 15), y que de algún modo favorecía la interacción con los sRNAs (Fig. 29). Podría ser que la función principal de este dominio sea inhibir la transcripción de AGO4, como propusieron Ye y colaboradores (2009). Nuestros resultados mostraron que el virus que portaba esta delección causaba síntomas atenuados en planta respecto al virus nativo (Fig. 14). Esta delección favoreció la unión *in vitro* de la proteína 2b a los sRNAs (Fig. 29 y Tabla 3), y podría también afectar a la estabilidad de la tercera  $\alpha$ -hélice, cuya función se desconoce. Aunque Ye y colaboradores (2009) relacionaron la delección (aas 64-71) en la cepa SD con una reducción de la supresión de silenciamiento, en nuestro caso la delección  $\Delta$ GSEL, (aas 62-65) en la proteína 2b de la cepa Fny no afectó a su actividad supresora en ensayos de agroinfiltración (Fig. 15). De momento no podemos explicar por qué la delección de estos aas aumentó la afinidad de la proteína por los sRNAs *in vitro*.

La delección del dominio terminal carboxilo no afectó a la localización de la proteína (Fig. 17), como posteriormente confirmaron Kanazawa y colaboradores (2011). Nuestros resultados mostraron que la proteína 2b $\Delta$ 3T unía también sRNAs con mayor afinidad que la proteína nativa (Fig. 29). Kanazawa y colaboradores (2011) mostraron

que la delección de una sección del dominio terminal carboxilo permitía la acumulación de siRNAs en el núcleo, donde tiene lugar la RdDM. Ham y colaboradores (1999) observaron que este extremo presentaba actividad activadora de la transcripción en levaduras, y Sueda y colaboradores (2010) observaron, en un estudio comparativo de las cepas HL e Y (subgrupos IB y IA, respectivamente), que la delección o sustitución del aa<sup>104</sup> contenido en este dominio atenuaba la toxicidad de la proteína cuando se expresaba en *E. coli*. También observaron que la proteína 2b unía *in vitro* DNA y que la sustitución del aa<sup>104</sup> inhibía esta unión (Sueda *et al.* 2010). Por otro lado, dentro de la región terminal carboxilo, encontramos el motivo <sup>95</sup>DDTD<sup>98</sup>, conservado en CMV (ver Anexo I). Gellért y colaboradores (2012) demostraron que este dominio (aas <sup>95</sup>DDTD<sup>98</sup>) unía Mg<sup>2+</sup> y que su alteración en la cepa Rs (subgrupo IA) debilitaba la estabilidad del tetrámero de 2b unido a siRNAs, y consideraron que los residuos W<sup>99</sup> y W<sup>105</sup> conservados en las cepas de CMV (ver Anexo I) estabilizaban la unión al siRNA en presencia de Mg<sup>2+</sup>, apoyándose en que este tipo de residuo (W) en la proteína P19 de CIRV estabiliza la unión a RNA (Vargason *et al.* 2003). En la cepa Fny se ha observado que la delección del dominio terminal carboxilo de la proteína 2b aumenta la patogenicidad en algunas plantas huésped (Lewsey *et al.* 2009), lo que podría relacionarse con el aumento que nosotros observamos en la afinidad *in vitro* de 2bΔ3T por el siRNAs respecto a la proteína nativa. Una hipótesis que puede explicar esta mayor afinidad se basa en que el dominio terminal carboxilo podría haberse originado como un añadido que obstruye en cierto grado la unión a los sRNAs, resultante de la adición de un aa en el gen 2a, que cambió la fase de lectura del ORF 2a al ORF 2b (Ding *et al.* 1995). Su delección favorecería así la unión a sRNAs *in vitro*, aunque su conservación en el virus indica que su presencia es ventajosa en el contexto de la infección viral.

La comparación de las cinéticas de unión de la proteína 2b y sus mutantes a los tres tipos de sRNAs analizados se muestra en la Fig. 29. Basándonos en las cinéticas de unión al ds siRNA y tomando la de la proteína 2b nativa como referencia, observamos un primer grupo que unía el ds siRNA con una afinidad similar a la de la proteína nativa o incluso mayor (2b, 2bΔGSEL, 2bΔ3T, 2bS40A); un segundo grupo que prácticamente no unía el ds siRNA (2bΔNLS1, 2bΔNLS2, 2bΔNLS1+2, 2bΔ5T); y un grupo que

presentaba una unión al ds siRNA comprometida en cierto grado (2b $\Delta$ KSPSE, 2bS42A). En cuanto a las cinéticas de unión al miRNA, las proteínas mutantes mostraron patrones semejantes a los observados en la unión a ds siRNA, salvo en el caso de la proteína mutante 2b $\Delta$ 5T, que por su peculiaridad trataremos separadamente más adelante. En cuanto a las cinéticas de unión al ss siRNA, diferenciamos claramente un grupo que unía el ss siRNA con mayor afinidad que la proteína nativa (2b $\Delta$ GSEL, 2b $\Delta$ 3T y 2bS40A) y otras con menor afinidad (2bS42A y 2b $\Delta$ 5T); un grupo de proteínas que no unía ss siRNA, con deleciones en las NLSs, y un caso intermedio (2b $\Delta$ KSPSE) que unía parcialmente el ss siRNA.

Una vez analizadas por separado las cinéticas consideramos en conjunto la unión a los tres sRNAs, y definimos cinco grupos de proteínas: Un primer grupo unía los tres sRNAs (ds siRNA, miRNA y ss siRNA) como la proteína 2b o con más afinidad que ésta (2b $\Delta$ 3T, 2b $\Delta$ GSEL, 2bS40A) y presentaban actividad supresora de silenciamiento; un segundo grupo de proteínas que no unían sRNAs en ningún caso (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2 y 2b $\Delta$ NLS1+2) y no tenían actividad supresora; el tercer grupo lo formó la proteína mutante 2b $\Delta$ KSPSE con un patrón intermedio en la unión a todos los sRNAs aunque carecía de actividad supresora; el cuarto grupo lo constituyó la proteína 2bS42A, cuya sustitución puntual afectó relativamente la unión a sRNAs, presentó una afinidad por los sRNAs algo menor que la proteína nativa, aunque retuvo la actividad supresora; y finalmente el quinto grupo constituido por la proteína 2b $\Delta$ 5T, muy particular, ya que la deleción del dominio terminal amino inhibió la unión al ds siRNA, pero no a los otros dos sRNAs (miRNA y ss siRNA), a los que se unió de modo comparable al de la proteína nativa, y la proteína no retuvo la actividad supresora de silenciamiento.

Por lo tanto en nuestra batería de mutantes encontramos una correlación entre la capacidad de unir ds siRNAs a ratios molares próximos a 2:1 y la actividad supresora de silenciamiento de la proteína.

Por otro lado analizamos también las cinéticas de unión *in vitro* de nuestras proteínas 2b al RNA de TMV, y en este caso diferenciamos sólo dos patrones claros, de unión y de no unión al RNA (Fig. 30). El primer grupo lo conformaron las proteínas con actividad supresora de silenciamiento (2b, 2bS40A, 2bS42A, 2b $\Delta$ GSEL y 2b $\Delta$ 3T); y el

segundo grupo las proteínas sin actividad supresora (2b $\Delta$ NLS1, 2b $\Delta$ NLS2, 2b $\Delta$ NLS1+2 y 2b $\Delta$ KSPSE). Cuando se realizó este experimento no contábamos con el mutante 2b $\Delta$ 5T. La relación proteína:RNA a la que se produjo el retardo en el gel fue muy elevada (500:1), pero los datos indicaron que esta unión era cooperativa (Tabla 5). Por el momento no sabemos si la interacción de la proteína 2b con RNAs virales genómicos desempeña alguna función biológica. La proteína 2b puede por tanto unir y secuestrar ds siRNAs virales.

La razón de la presencia de la proteína 2b en el núcleo aún no se ha esclarecido, aunque en esta localización interacciona con proteínas AGO (Hamera *et al.* 2012), y la interacción puede ser un punto de unión entre la localización nuclear de la proteína 2b y la interferencia de la metilación de DNA. En esta localización la proteína 2b también podría interactuar potencialmente con otras proteínas nucleares, por lo que su presencia nuclear puede tener también que ver con otras funciones que faciliten el ciclo de la infección viral.

Como sinopsis de nuestro trabajo, mediante estudios de biología celular hemos realizado observaciones *in vivo* de la proteína 2b a nivel subcelular mediante la fusión de la proteína a diferentes marcadores fluorescentes o de otro tipo que no afectaron a su actividad supresora del silenciamiento en ensayos de agroinfiltración. Hemos estudiado su co-localización con otras proteínas y alterado sus dinámicas de acumulación entre compartimentos subcelulares. Hemos visualizado *in vivo* la formación de homodímeros de 2b y la interacción con diversas proteínas vegetales. Y en estudios *in vitro* hemos analizado la unión de la proteína 2b y mutantes expresadas en bacterias a siRNAs basados en el miRNA171 de *A. thaliana*. Todos nuestros resultados en su conjunto, obtenidos mediante estas aproximaciones de biología celular y molecular, y acompañados de ensayos funcionales de actividad supresora del silenciamiento, nos han permitido proponer que la supresión de silenciamiento de la proteína 2b de CMV reside en su capacidad de unión a ds siRNAs a ratios molares de proteína:RNA de 2:1 o cercanos a ellos, mientras que para la función supresora no es suficiente la interacción de la proteína 2b con proteínas AGO, o su acumulación nuclear-nucleolar. Todo ello sin perjuicio de que sus interacciones con proteínas AGO o

de otro tipo del huésped puedan constituir otros puntos de interferencia con el silenciamiento o con otros tipos de resistencia antiviral.

Hemos finalmente llegado a las conclusiones que se redactan a continuación, en el siguiente apartado.



## **6. CONCLUSIONES**





1. La fusión de marcadores fluorescentes a la proteína 2b no afecta a su actividad supresora de silenciamiento y permite localizar la proteína en el citoplasma y núcleo, donde hemos descrito por primera vez su presencia en el nucléolo y en los cuerpos de cajal.
2. La actividad supresora del silenciamiento de la proteína 2b es independiente de su acumulación nuclear, aunque requiere de las NLSs y el motivo de fosforilación que intervienen en el movimiento y el balance de proteína 2b entre el núcleo y el citoplasma.
3. La proteína 2b forma dímeros en el citoplasma y núcleo e interacciona con las proteínas AGO1 en el citoplasma y AGO4 en el núcleo, excluyendo al nucléolo. Estas interacciones son independientes de la actividad supresora de silenciamiento de la proteína.
4. La proteína 2b de CMV une *in vitro* sRNAs de modo cooperativo con alta afinidad. Hemos clasificado las uniones *in vitro* de la proteína 2b nativa y de nueve mutantes a tres sRNAs en cinco categorías y hemos encontrado que la unión del supresor de silenciamiento a ds siRNA a proporciones molares 2:1 correlaciona con la actividad supresora del silenciamiento. En esta unión participan el dominio terminal amino, las NLSs y el motivo de fosforilación.
5. Una primera aproximación sugiere que además de con AGO1 y AGO4, la proteína 2b podría interactuar con otras proteínas nucleares no implicadas en el silenciamiento.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- Ahlfquist P. (2002) RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, and RNA Silencing. *Science* **296**, 1270-3.
- Aliyari R., Wu Q., Li H.-W., Wang X.-H., Li F., Green L.D., Han C.S., Li W.-X. y Ding S.W. (2008) Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by small RNAs in *Drosophila*. *Cell Host Microbe* **4**, 387–97.
- Allen R.S., Li J., Stahle M.I., Dubroué A., Gubler F. y Millar A.A. (2007) Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 16371-6.
- Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T.H. y Vance V.B. (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 13079-84.
- Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr J.M., Mau C., Mallory A., Pruss G., Bowman L. y Vance V.B. (2000) A Calmodulin-Related Protein That Suppresses Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* **290**, 142-4.
- Angell S.M. y Baulcombe D.C. (1997) Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *European Molecular Biology Organization Journal* **16**, 3675–84.
- Azevedo J., Garcia D., Pontier D., Ohnesorge S., Yu A., Garcia S., Braun L., Bergdoll M., Hakimi M.A., Lagrange T. y Voinnet O. (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & Development* **24**, 904-15.
- Ballas N. y Citovsky V. (1997) Nuclear localization signal binding protein from Arabidopsis mediates nuclear import of Agrobacterium VirD2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 10723-8.
- Baulcombe D.C., Saunders G.R., Bevan M.W., Mayo M.A. y Harrison B.D. (1986) Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* **321**, 446-9.
- Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-63.
- Baumberger N. y Baulcombe D.C. (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11928-33.
- Baumberger N., Tsai C.-H., Lie M., Havecker E. y Baulcombe D.C. (2007) The Ploverovirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Current Biology* **17**, 1609–14.
- Béclin C., Berthomé R., Palauqui J.-C., Tepfer M. y Vaucheret H. (1998) Infection of Tobacco or Arabidopsis Plants by CMV Counteracts Systemic Post-transcriptional Silencing of Nonviral (Trans)Genes. *Virology* **252**, 313-7.
- Bellini M. y Gall J.G. (1998) Coilin Can Form a Complex with the U7 Small Nuclear Ribonucleoprotein. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 2987-3001.
- Bellini M. y Gall J.G. (1999) Coilin Shuttles between the Nucleus and Cytoplasm in *Xenopus* Oocytes. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 3425-34.
- Bender J.J. (2001) A Vicious Cycle - RNA Silencing and DNA Methylation in Plants. *Cell* **106**, 4-.
- Bender J.J. (2001) A Vicious Cycle - RNA Silencing and DNA Methylation in Plants. *Cell* **106**, 4.
- Bevan M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, **12**, 8711-21.
- Bhattacharjee S., Zamora A., Tehseen M., Sacco M.A., Lambert L.H. y Moffet P. (2009) Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute 4-dependent translational control. *Plant Journal* **58**, 940-51.

- Bisaro D.M. (2006) Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* **344**, 158-68.
- Blackman L.M., Boevink P., Cruz S.S., Palukaitis P. y Oparka K.J. (1998) The Movement Protein of Cucumber Mosaic Virus Traffics into Sieve Elements in Minor Veins of *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell Online* **10**, 525-38.
- Blevins T., Rajeswaran R., Shivaprasad P.V., Beknazariants D., Si-Ammour A., Park H.S., Vazquez F., Robertson D., Meins F.J., Hohn T. y Pooggin M.M. (2006) Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research* **34**, 6233-46.
- Boccard F. y Baulcombe D. (1993) Mutational Analysis of Cis-acting Sequences and Gene Function in RNA3 of Cucumber Mosaic Virus. *VIROLOGY* **193**, 563-78.
- Bohmert K., Camus I., Bellini C., Bouchez D., Caboche M. y Benning C. (1998) AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *European Molecular Biology Organization Journal* **17**, 170-80.
- Bologna N.G. y Voinnet O. (2014) The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 473-503.
- Borsani O., Zhu J., Verslues P.E., Sunkar R. y Zhu J.K. (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* **123**, 1279-91.
- Bortolamiol D., Pazhouhandeh M., Marrocco K., Genschik P. y Ziegler-Graff V. (2007) The Polerovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing. *Current Biology* **17**, 1615-21.
- Bouché N., Laressergues D., Gascioli V. y Vaucheret H. (2006) An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *European Molecular Biology Organization Journal* **25**, 3347-56.
- Boudonck K., Dolan L. y Shaw P.J. (1999) The Movement of Coiled Bodies Visualized in Living Plant Cells by the Green Fluorescent Protein. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 2297-307.
- Boulon S., Westman B.J., Hutten S., Boisvert F.-M. y Lamond A.I. (2010) The Nucleolus under Stress. *Molecular Cell* **40**, 216-27.
- Boutet S., Vazquez F., Liu J., Béclin C., Fagard M., Gratias A., Morel J.-B., Créte P., Chen X. y Vaucheret H. (2003) Arabidopsis HEN1. *Current Biology* **13**, 843-8.
- Boyne J.R. y Whitehouse A. (2006) Nucleolar trafficking is essential for nuclear export of intronless herpesvirus mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15190-5.
- Bracha-Drori K., Shichrur K., Katz A., Oliva M., Angelovici R., Yalovsky S. y Ohad N. (2004) Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* **40**, 419-27.
- Brodersen P. y Voinnet O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *TRENDS in Genetics* **22**, 268-80.
- Brosnan C.A., Mitter N., Christie M., Smith N.A., Waterhouse P.M. y Carroll B.J. (2007) Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14741-6.
- Bruenn J.A. (1991) Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **19**, 217-26.

- Bucher E., Hemmes H., de Haan P., Goldbach R. y Prins M. (2004) The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *Journal of General Virology* **85**, 983-91.
- Bullock W.O., Fernandez J.M. y Short J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-9.
- Burgyán J. y Havelda Z. (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* **16**, 265-72.
- Canto T., Prior D.A.M., Hellwald K.-H., Oparka K.J. y Palukaitis P. (1997) Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* **237**, 237-48.
- Canto T., Cillo F. y Palukaitis P. (2002) Generation of siRNAs by T-DNA Sequences Does Not Require Active Transcription or Homology to Sequences in the Plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1137-46.
- Canto T., Uhrig J.F., Swanson M., Wright K.M. y 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**, 9064-72.
- Cao X. y Jacobsen S.E. (2002) Role of the Arabidopsis DRM Methyltransferases in De Novo DNA Methylation and Gene Silencing. *Current Biology* **12**, 1138-44.
- Carmo-Fonseca M., Mendes-Soares L. & Campos I. (2000) To be or not to be in the nucleolus. *Nature Cell Biology* **2**, E107 - E12.
- Carrington J.C. y Ambros V. (2003) Role of MicroRNAs in Plant and Animal Development. *Science* **301**, 336-8.
- Carthew R.W. y Sontheimer E.J. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-55.
- Cerutti H. y Casas-Mollano J.A. (2006) On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current Genetics* **50**, 81-99.
- Chan S.W.-L., Zilberman D., Xie Z., Johansen L.K., Carrington J.C. y Jacobsen S.E. (2004) RNA Silencing Genes Control de Novo DNA Methylation. *Science* **303**, 1336.
- Chao J.A., Lee J.H., Chapados B.R., Debler E.W., Schneemann A. y Williamson J.R. (2005) Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2. *Nature structural y Molecular Biology* **12**, 952-7.
- Chapman E.J., Prokhnevsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V. y Carrington J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Development* **18**, 1179-86.
- Chapman E.J. y Carrington J.C. (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics* **8**, 884-96.
- Chellappan P., Vanitharani R. y Fauquet C.M. (2005) MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10381-6.
- Chen M.H., Sheng J.S., Hind G., Handa A.K. y Citovsky V. (2000) Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *European Molecular Biology Organization Journal* **19**, 913-20.
- Chen H., Wurm T., Britton P., Brooks G. y Hiscox J.A. (2002) Interaction of the Coronavirus Nucleoprotein with Nucleolar Antigens and the Host Cell. *Journal of Virology* **76**, 5233-50.



- Chen H.-Y., Yang J., Lin C. y Yuan Y.A. (2008) Structural basis for RNA-silencing suppression by Tomato aspermy virus protein 2b. *European Molecular Biology Organization Reports* **9**, 754-60.
- Chinnusamy V. y Zhu J.-K. (2009) RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Science in China Series C Life Sciences Journal* **52**, 331-43.
- Chiu M.H., Chen I.H., Baulcombe D.C. y Tsai C.H. (2010) The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology* **11**, 641-9.
- Cillo F., Roberts I.M. y Palukaitis P. (2002) In Situ Localization and Tissue Distribution of the Replication-Associated Proteins of Cucumber Mosaic Virus in Tobacco and Cucumber. *Journal of Virology* **76**, 10654-64.
- Cillo F., Mascia T., Pasciuto M.M. y Gallitelli D. (2009) Differential Effects of Mild and Severe Cucumber mosaic virus Strains in the Perturbation of MicroRNA-Regulated Gene Expression in Tomato Map to the 3' Sequence of RNA 2. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2**, 1239-49.
- Cioce M. y Lamond A.I. (2005) CAJAL BODIES: A Long History of Discovery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 105-31.
- Citovsky V., Lee L.-Y., Vyas S., Glick E., Chen M.-H., Vainstein A., Gafni Y., Gelvin S.B. y Tzfira T. (2006) Subcellular Localization of Interacting Proteins by Bimolecular Fluorescence Complementation in Planta. *Journal of Molecular Biology* **362**, 1120-31.
- Collier S., Pendle A., Boudonck K., van Rij T., Dolan L. y Shaw P. (2006) A Distant Coilin Homologue Is Required for the Formation of Cajal Bodies in Arabidopsis. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 2942-51.
- Csorba T., Bovi A., Dalmay T. y Burgyán J. (2007) The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *Journal of Virology* **81**, 11768-80.
- Csorba T., Pantaleo V. y Burgyán J. (2009) Chapter 2 - RNA Silencing: An Antiviral Mechanism. In: *Advances in Virus Research* (eds. by Gad L y John PC), pp. 35-230. Academic Press.
- Dalmay T., Horsefield R., Braunstein T.H. y Baulcombe D.C. (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *European Molecular Biology Organization Journal* **20**, 2069-78.
- del Toro F., Fernández F.T., Tilsner J., Wright K.M., Tenllado F., Chung B.N., Praveen S. & Canto T. (2014) Potato virus Y HCPro Localization at Distinct, Dynamically Related and Environment-Influenced Structures in the Cell Cytoplasm. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**, 1331-43.
- Deleris A., Gallego-Bartolome J., Bao J., Kasschau K.D., Carrington J.C. y Voinnet O. (2006) Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-like Proteins in Antiviral Defense. *Science* **313**, 68-71.
- Demidov V.V., Dokholyan N.V., Witte-Hoffmann C., Chalasani P., Yiu H.W., Ding F., Yu Y., Cantor C.R. y Broude N.E. (2006) Fast complementation of split fluorescent protein triggered by DNA hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 2052-6.
- Diaz-Pendon J.A., Li F., Li W.-X. y Ding S.-W. (2007) Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in Arabidopsis Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *The Plant Cell* **19**, 2053-63.
- Díaz-Pendón J.A. y Ding S.-W. (2008) Direct and Indirect Roles of Viral Suppressors of RNA Silencing in Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 303-26.

- Ding S.-W., Anderson B.J., Haase H.R. y Symons R.H. (1994) New Overlapping Gene Encoded by the Cucumber Mosaic Virus Genome. *Virology* **198**, 593-601.
- Ding S.W., Li W.X. y Symons R.H. (1995a) A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *European Molecular Biology Organization Journal* **14**, 5762-72.
- Ding S.W., Rathjen J.P., Li R.S., Swanson R., Healy H. y Symons R.H. (1995b) Efficient infection from cDNA clones of cucumber mosaic cucumovirus RNAs in a new plasmid vector. *Journal of General Virology* **76**, 459-64.
- Ding S.W., Shi B.J., Li W.-X. y Symons R.H. (1996) An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 7470-4.
- Ding S.-W. y Voinnet O. (2007) Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* **130**, 413-26.
- Ding S.W. (2010) RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology* **10**, 632-44.
- Donaire L., Barajas D., Martínez-García B., Martínez-Priego L., Pagán I. y Llave C. (2008) Structural and Genetic Requirements for the Biogenesis of Tobacco Rattle Virus-Derived Small Interfering RNAs. *Journal of Virology* **82**, 5167-77.
- Donaire L., Wang Y., Gonzalez-Ibeas D., Mayer K.F., Aranda M.A. y Llave C. (2009) Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology* **392**, 203-14.
- Dong K., Wang Y., Zhang Z., Chai L.-X., Tong X., Xu J., Li D. y Wang X.-B. (2015) Two amino acids near the N terminus of cucumber mosaic virus 2b play critical roles in the suppression of RNA silencing and viral infectivity. *Molecular Plant Pathology*. doi:10.1111/mpp.12270
- Du Z.-Y., Chen F.-F., Liao Q.-R., Zhang H.-R., Chen Y.-F. y Chen J.-S. (2007) 2b ORFs encoded by subgroup IB strains of cucumber mosaic virus induce differential virulence on Nicotiana species. *Journal of General Virology* **88**, 2596-604.
- Du Z., Chen A., Chen W., Liao Q., Zhang H., Bao Y., Roossinck M.J. y Carr J.P. (2014a) Nuclear-Cytoplasmic Partitioning of Cucumber Mosaic Virus Protein 2b Determines the Balance between Its Roles as a Virulence Determinant and an RNA-Silencing Suppressor. *Journal of Virology* **88**, 5228-41.
- Du Z., Chen A., Chen W., Westwood J.H., Baulcombe D.C. y Carr J.P. (2014b) Using a Viral Vector to Reveal the Role of MicroRNA159 in Disease Symptom Induction by a Severe Strain of Cucumber mosaic virus. *Plant Physiology* **164**, 1378-88.
- Duan C.-G., Fang Y.-Y., Zhou B.-J., Zhao J.-H., Hou W.-N., Zhu H., Ding S.-W. y 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**, 259-74.
- Dunoyer P. y Voinnet O. (2005) The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 415-23.
- Dunoyer P., Himber C. y Voinnet O. (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics* **37**, 1356-60.
- Dunoyer P., Himber C., Ruiz-Ferrer V., Alioua A. y Voinnet O. (2007) Intra- and intercellular RNA interference in Arabidopsis thaliana requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nature Genetics* **39**, 848-56.
- Dunoyer P., Schott G., Himber C., Meyer D., Takeda A., Carrington J.C. y Voinnet O. (2010) Small RNA Duplexes Function as Mobile Silencing Signals Between Plant Cells. *Science* **328**, 912-6.

- Elbashir S.M., Lendeckel W. y Tuschl T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* **15**, 188-200.
- English J.J., Davenport G.F., Elmayan T., Vaucheret H. y Baulcombe D.C. (1997) Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *The Plant Journal* **12**, 597-603.
- Fagard M., Boutet S., Morel J.B., Bellini C. y Vaucheret H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 11650-4.
- Feng L., Duan C.-G. y Guo H.-S. (2013) Inhibition of in vivo Slicer activity of Argonaute protein 1 by the viral 2b protein independent of its dsRNA-binding function. *Molecular Plant Pathology* **14**, 617-22.
- Ferreira S.A. y Boley R.A. (1992) Crop Knowledge Master. URL <http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/cucvir.htm>.
- Finch J.T., Klug A. y van Regenmortel M.H.V. (1967) The structure of cucumber mosaic virus. *Journal of Molecular Biology* **24**, 303-5.
- Finnegan E.J., Margis R. y Waterhouse P.M. (2003) Posttranscriptional Gene Silencing Is Not Compromised in the Arabidopsis CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) Mutant, a Homolog of Dicer-1 from Drosophila. *Current Biology* **13**, 236-40.
- Fisher R., Vaquero-Martín C., Sack M., Drossard J., Emans N. y Commandeur U. (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **30**, 113-6.
- Foreman K.E. y Tang J. (2003) Molecular mechanisms of replicative senescence in endothelial cells. *Experimental Gerontology* **38**, 1251-7.
- Francki R.I.B. y Hatta T. (1980) Cucumber mosaic virus: Variation and problems of identification. *Acta Horticulturae* **110**, 167-74.
- Fusaro A.F., Matthew L., Smith N.A., Curtin S.J., Dedic-Hagan J., Ellacott G.A., Watson J.M., Wang M.-B., Brosnan C., Carroll B.J. y Waterhouse P.M. (2006) RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *European Molecular Biology Organization Reports* **7**, 1168-75.
- Gal-On A., Kaplan I., Roossinck M.J. y Palukaitis P. (1994) The Kinetics of Infection of Zucchini Squash by Cucumber Mosaic Virus Indicate a Function for RNA 1 in Virus Movement. *Virology* **205**, 280-9.
- García A.V., Blanvillain-Baufumé S., Huibers R.P., Wiermer M., Li G., Gobbato E., Rietz S. & Parker J.E. (2010) Balanced Nuclear and Cytoplasmic Activities of EDS1 Are Required for a Complete Plant Innate Immune Response. *Public Library of Science Pathogens* **6**.
- García-Ruiz H., Takeda A., Chapman E.J., Sullivan C.M., Fahlgren N., Bremmelis K.J. y Carrington J.C. (2010) Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* **22**, 481-96.
- García-Ruiz H., Carbonell A., Hoyer J.S., Fahlgren N., Gilbert K.B., Takeda A., Giampetruzzi A., García Ruiz M.T., McGinn M.G., Lowery N., Martínez Baladejo M.T. y Carrington J.C. (2015) Roles and Programming of Arabidopsis ARGONAUTE Proteins during Turnip Mosaic Virus Infection. *PLoS Pathog* **11**, e1004755.
- Gellért Á., Nemesb K., Kádára K., Salánkic K. y Balázs E. (2012) The C-terminal domain of the 2b protein of Cucumber mosaic virus is stabilized by divalent metal ion coordination. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **38**, 446-54.

- Giddings G., Allison G., Brooks D. y Carter A. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* **18**, 1151-5.
- Giner A., Lakatos L., García-Chapa M., López-Moya J.J. y Burgyán J. (2010) Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *Public Library of Science Pathogens* **6**, e1000996.
- Glick E., Zrachya A., Levy Y., Mett A., Gidoni D., Belausov E., Citovsky V. y Gafni Y. (2008) Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 157-61.
- Goodin M.M., Austin J., Tobias R., Fujita M., Morales C. y Jackson A.O. (2001) Interactions and Nuclear Import of the N and P Proteins of Sonchus Yellow Net Virus, a Plant Nucleorhabdovirus. *JOURNAL OF VIROLOGY* **75**, 9393-406.
- Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P. y Blinov V.M. (1988) A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **235**, 16-24.
- Görlich D. y Mattaj I.W. (1996) Nucleocytoplasmic Transport. *Science* **271**, 1513-9.
- Goto K., Kobori T., Kosaka Y., Natsuaki T. y Masuta C. (2007) Characterization of Silencing Suppressor 2b of Cucumber Mosaic Virus Based on Examination of its Small RNA-Binding Abilities. *Plant Cell Physiology* **48**, 1050-60.
- Greco A. (2009) Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Reviews in Medical Virology* **19**, 201-14.
- Guo H.S. y Ding S.W. (2002) A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *European Molecular Biology Organization Journal* **21**, 398-407.
- Guo Y., Rebecchi M. y Scarlata S. (2005) Phospholipase Cbeta2 binds to and inhibits phospholipase Cdelta1. *The Journal of biological chemistry* **280**, 1438-47.
- Haas G., Azevedo J., Moissiard G., Geldreich A., Himber C., Bureau M., Fukuhara T., Keller M. y Voinnet O. (2008) Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *European Molecular Biology Organization Journal* **27**, 2102-12.
- Habili N. y Symons R.H. (1989) Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acids Research* **17**, 9543-55.
- Habili N. y Francki R.I.B. (1974) Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses: I. Physical and chemical properties. *Virology* **57**, 392-401.
- Ham B.K., Lee T., You J.S., Nam Y.W., Kim J.K. y Paek K.H. (1999) Isolation of a putative tobacco host factor interacting with cucumber mosaic virus-encoded 2b protein by yeast two-hybrid screening. *Molecules and Cells* **9**, 548-55.
- Hamera S., Song X., Su L., Chen X. y Fang R. (2012) Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *The Plant Journal* **69**, 104-15.
- Hammond S.M., Bernstein E., Beach D. y Hannon G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* **404**, 293-6.
- Hanahan D. (1985) Techniques for Transformation of E. coli. in *DNA cloning: a practical approach. Vol. I. Glover D.M. (Ed.), IRL Press, Oxford, England.*, 109-35.
- Harvey J.J.W., Lewsey M.G., Patel K., Westwood J., Heimstadt S., Carr J.P. y Baulcombe D.C. (2011) An antiviral defense role of AGO2 in plants. *Public Library of Science ONE* **6**, 1-6.

- Havelda Z., Várallyay E., Válóczy A. y Burgyán J. (2008) Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **55**, 278-88.
- Hayes R.J. y Buck K.W. (1990) Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* **63**, 363-8.
- Hebert M.D. y Matera A.G. (2000) Self-association of Coilin Reveals a Common Theme in Nuclear Body Localization. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 4159-71.
- Hiscox J.A. (2002) The nucleolus – a gateway to viral infection? *Archives of Virology* **147**, 1077-89.
- Hiscox J.A. (2007) RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 119-27.
- Hodgman T.C. (1988) A new superfamily of replicative proteins. *Nature* **333**, 22-3.
- Hu C.-D., Chinenov Y. y Kerppola T.K. (2002) Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular Cell* **9**, 789-98.
- Hu C.-D. y Kerppola T.K. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology* **21**, 539-45.
- Hutvagner G. y Zamore P.D. (2002) A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science* **297**, 2056-60.
- Hutvagner G. y Simard M. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 22 - 32.
- Inaba J.-i., Kim B.M., Shimura H. y Masuta C. (2011) Virus-Induced Necrosis Is a Consequence of Direct Protein-Protein Interaction between a Viral RNA-Silencing Suppressor and a Host Catalase. *Plant Physiology* **156**, 2026-36.
- Isaac C., Yang Y. y Meier U.T. (1998) Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *The Journal of Cell Biology* **142**, 319-29.
- James N.J., Howell G.J., Walker J.H. y Blair G.E. (2010) The role of Cajal bodies in the expression of late phase adenovirus proteins. *Virology* **399**, 299-311.
- Jamous R.M., Boonrod K., Fuellgrabe M.W., Ali-Shtayeh M.S., Krczal G. y Wassenegger M. (2011) The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *Journal of General Virology* **92**, 2222-6.
- Jans D.A. (1995) The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem Journal* **311**, 705-16.
- Jans D.A. y Hubner S. (1996) Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiological Reviews* **76**, 651-85.
- Jaubert M., Bhattacharjee S., Mello A.F.S., Perry K.L. y Moffett P. (2011) ARGONAUTE2 Mediates RNA-Silencing Antiviral Defenses against Potato virus X in Arabidopsis. *Plant Physiology* **156** 1556-64.
- Jay F., Wang Y., Yu A., Tacconnat L., Pelletier S., Colot V., Renou J.P. y Voinnet O. (2011) Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 Underlies the Developmental Abnormalities Caused by Three Distinct Viral Silencing Suppressors in Arabidopsis. *Public Library of Science Pathogens* **7**, e1002035.
- Ji L.-H. y Ding S.-W. (2001) The Suppressor of Transgene RNA Silencing Encoded by Cucumber mosaic virus Interferes with Salicylic Acid-Mediated Virus Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 715–24.

- Jiang L., Wei C. y Li Y. (2012) Viral suppression of RNA silencing. *Science China Life Sciences* **55**, 109-18.
- Jin H. y Zhu J.K. (2010) A viral suppressor protein inhibits host RNA silencing by hooking up with Argonautes. *Genes & Development* **24**, 853-6.
- Johansen L.K. y Carrington J.C. (2001) Silencing on the Spot. Induction and Suppression of RNA Silencing in the Agrobacterium-Mediated Transient Expression System. *Plant Physiology* **126**, 930-8.
- Jones A.L., Thomas C.L. y Maule A.J. (1998) De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *European Molecular Biology Organization Journal* **17**, 6385-93.
- Jones L., Hamilton A.J., Voinnet O., Thomas C.L., Maule A.J. y Baulcombe D.C. (1999) RNA-DNA Interactions and DNA Methylation in Post-Transcriptional Gene Silencing. *The Plant Cell* **11**, 2291-301.
- Jones K.W., Gorzynski K., Hales C.M., Fischer U., Badbanchi F., Terns R.M. y Terns M.P. (2001) Direct Interaction of the Spinal Muscular Atrophy Disease Protein SMN with the Small Nucleolar RNA-associated Protein Fibrillarin. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 38645-51.
- Jones L., Keining T., Eamens A. y Vaistij F.E. (2006) Virus-Induced Gene Silencing of Argonaute Genes in *Nicotiana benthamiana* Demonstrates That Extensive Systemic Silencing Requires Argonaute1-Like and Argonaute4-Like Genes. *Plant Physiology* **141**, 598-606.
- Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura P.y.D.R. (2014) Red de Alerta e Información Fitosanitaria.
- Kadaré G. y Haenni A.L. (1997) Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology* **71**, 2583-90.
- Kalinina N.O., Rakitina D.A., Yelina N.E., Zamyatnin A.A., T.A. S., Klinov D.V., Prokhorov V.V., S.V. U., Chernov B.K., Schiemann J., Solovyev A.G. y Morozov S.Y. (2001) RNA-binding properties of the 63 kDa protein encoded triple gene block of poa semilattent hordevirus. *Journal of General Virology* **82**, 2569-78.
- Kanazawa A., Inaba J.-i., Shimura H., Otagaki S., Tsukahara S., Matsuzawa A., Kim B.M., Goto K. y Masuta C. (2011) Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. *The Plant Journal* **65**, 156-68.
- Kaper J.M. y Re G.G. (1974) Redetermination of the RNA content and the limiting RNA size of three strains of cucumber mosaic virus. *Virology* **60**, 308-11.
- Kapila J., de Rycke R., van Montagu M. y Angenon G. (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**, 101-8.
- Kaplan I.B., Shintaku M.H., Li Q., Zhang L., Marsh L.E. y Palukaitis P. (1995) Complementation of Virus Movement in Transgenic Tobacco Expressing the Cucumber Mosaic Virus 3a Gene. *Virology* **209**, 188-99.
- Kasschau K.D. y Carrington J.C. (1998) A Counterdefensive Strategy of Plant Viruses. *Cell* **95**, 461-70.
- Kasschau K.D., Xie Z., Allen E., Llave C., Chapman E.J., Krizan K.A. y Carrington J.C. (2003) P1/HC-Pro, a Viral Suppressor of RNA Silencing, Interferes with Arabidopsis Development and miRNA Function. *Developmental Cell* **4**, 205-17.
- Kerppola T.K. (2009) Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: Characteristics of protein fragment complementation. *Chemical Society Reviews* **38**, 2876-86.
- Kerppola T.K. (2006) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature Protocols* **1**, 1278-86.

- Khvorova A., Reynolds A. y Jayasena S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* **115**, 209-16.
- Kim S.H., MacFarlane S., Kalinina N.O., Rakitina D.V., Ryabov E.V., Gillespie T., Haupt S., Brown J.W.S. y Taliansky M. (2007) Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11115–20.
- Kobori T., Ryang B.-S., Natsuaki T. y Kosaka Y. (2005) A New Technique to Select Mild Strains of Cucumber mosaic virus. *Plant Disease* **89**, 879-82.
- Kumakura N., Takeda A., Fujioka Y., Motose H., Takano R. y Watanabe Y. (2009) SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **583**, 1261-6.
- Kumpatla S.P., Chandrasekharan M.B., Iyer L.M., Guofu L. y Hall T.C. (1998) Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *Trends in Plant Science* **3**, 97-104.
- Kunik T., Palanichelvam K., Czosnek H., Citovsky V. y Gafni Y. (1998) Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *The Plant Journal* **13**, 393-9.
- Lakatos L., Szittyá G., Silhavy D. y Burgyan J. (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *European Molecular Biology Organization Journal* **23**, 876–84.
- Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E.J., Carrington J.C., Liu Y.-P., Dolja V.V., Fernandez Calvino L., Lopez-Moya J.J. y Burgyan J. (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *European Molecular Biology Organization Journal* **25**, 2768–80.
- Lakshman D.K. y Gonsalves D. (1985) Genetic Analyses of Two Large-Lesion Isolates of Cucumber Mosaic Virus. *Phytopathology* **75**, 758-62.
- Lapeyre B., Bourbon H. y Amalric F. (1987) Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 1472-6.
- Law J.A. y Jacobsen S.E. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* **11**, 204-20.
- Lazinski D., Grzadzińska E. y Das A. (1989) Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell* **59**, 207-18.
- Leclerc D., Chapdelaine Y. y Hohn T. (1999) Nuclear Targeting of the Cauliflower Mosaic Virus Coat Protein. *Journal of Virology* **73**, 553-60.
- Leuschner P.J.F., Ameres S.L., Kueng S. y Martinez J. (2006) Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *European Molecular Biology Organization Reports* **7**, 314-20.
- Lewsey M.G., Robertson F.C., Canto T., Palukaitis P. y Carr J.P. (2007) Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *The Plant Journal* **50**, 240–52.
- Lewsey M.G., Surette M., Robertson F.C., Ziebell H., Choi S.H., Ryu K.H., Canto T., Palukaitis P., Payne T., Walsh J.A. y Carr J.P. (2009) The Role of the Cucumber mosaic virus 2b Protein in Viral Movement and Symptom Induction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 642–54.

- Li H.-W., Lucy A.P., Guo H.-S., Li W.-X., Ji L.-H., Wong S.-M. y Ding S.-W. (1999) Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *European Molecular Biology Organization Journal* **18**, 2683-91.
- Li J., Yang Z., Yu B., Liu J. y Chen X. (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 39-end uridylation activity in Arabidopsis. *Current Biology* **15**, 1501-07.
- Li F. y Ding S.W. (2006) Virus Counterdefense: Diverse Strategies for Evading the RNA-Silencing Immunity. *Annual Review of Microbiology* **60**, 503-31.
- Li C.F., Pontes O., El-Shami M., Henderson I.R., Bernatavichute Y.V., Chan S.W.L., Lagrange T., Pikaard C.S. y Jacobsen S.E. (2006) An ARGONAUTE4-Containing Nuclear Processing Center Colocalized with Cajal Bodies in Arabidopsis thaliana. *Cell* **126**, 93-106.
- Li C.F., Henderson I.R., Song L., Fedoroff N., Lagrange T. y Jacobsen S.E. (2008) Dynamic Regulation of ARGONAUTE4 within Multiple Nuclear Bodies in Arabidopsis thaliana. *Public Library of Science Genetics* **4**, 1-14.
- Li M., Jia Y. y Fang R. (2011) Implication of post-translational modifications in suppressor activity and stability of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *Chinese Journal of Biotechnology* **27**, 212-8.
- Lingel A., Simon B., Izaurralde E. y Sattler M. (2003) Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* **426**, 465-9.
- Lingel A., Simon B., Izaurralde E. & Sattler M.I. (2005) The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *European Molecular Biology Organization Reports* **6**, 1149-55.
- Lippman Z. y Martienssen R. (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**, 364-70.
- Lot H. y Kaper J.M. (1976) Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. *Virology* **74**, 223-6.
- Lowery N. (2012) The Role of Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerase Genes 3, 4 and 5 in Antiviral Defense. Oregon State University.
- Lu R., Maduro M., Li F., Li H.W., Broitman-Maduro G., Li W.X. y Ding S.W. (2005) Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in Caenorhabditis elegans. *Nature* **436**, 1040-3.
- Lucy A.P., Guo H.-S., Li W.-X. y Ding S.W. (2000) Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *European Molecular Biology Organization Journal* **19**, 1672-80.
- Llave C. (2010) Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in Plant Science* **15**, 701-7.
- MacRae I.J., Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A.N., Cande W.Z., Adams P.D. y Doudna J.A. (2006) Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* **311**, 195-8.
- Mahfouz M.M. (2010) RNA-directed DNA methylation. Mechanisms and functions. *Plant Signaling y Behavior* **5**, 806-16.
- Maneechoat P., Takeshita M., Uenoyama M., Nakatsukasa M., Kuroda A., Furuya N. y Tsuchiya K. (2015) A single amino acid at N-terminal region of the 2b protein of cucumber mosaic virus strain m1 has a pivotal role in virus attenuation. *Virus Research* **197**, 67-74.
- Marcos J.F., Vilar M., Pérez-Payá E. y Pallás V. (1999) In Vivo Detection, RNA-Binding Properties and Characterization of the RNA-Binding Domain of the p7 Putative Movement Protein from Carnation Mottle Carmovirus (CarMV). *Virology* **255**, 354-65.



- Masuta C., Inaba J. y Shimura H. (2012) The 2b proteins of Cucumber mosaic virus generally have the potential to differentially induce necrosis on Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **7**, 43-5.
- Matranga C., Tomari Y., Shin C., Bartel D.P. y Zamore P.D. (2005) Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. *Cell* **123**, 607-20.
- Matthews D.A. (2001) Adenovirus Protein V Induces Redistribution of Nucleolin and B23 from Nucleolus to Cytoplasm. *Journal of Virology* **75**, 1031-8.
- Matzke M.A. y Matzke A.J.M. (1998) Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 94-103.
- Matzke M.A. y Matzke A.J.M. (2004) Planting the Seeds of a New Paradigm. *Public Library of Science Biology* **2**, 582-6.
- Matzke M.A. y Birchler J.A. (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews Genetics* **6**, 24-35.
- Mayers C.N., Lee K.-C., Moore C.A., Wong S.-M. y Carr J.P. (2005) Salicylic Acid-Induced Resistance to Cucumber mosaic virus in Squash and Arabidopsis thaliana: Contrasting Mechanisms of Induction and Antiviral Action. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 428-34.
- Matzke M., Kanno T., Huettel B., Daxinger L. y Matzke A.J.M. (2007) Targets of RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 512-9.
- Mayers C.N., Palukaitis P. y Carr J.P. (2000) Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. *Journal of General Virology* **81**, 219-26.
- Meister G. y Tuschl T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-9.
- Mello C.C. y Conte D. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**, 338-42.
- Mérai Z., Kerényi Z., Molnár A., Barta E., Válóczy A., Bisztray G., Havelda Z., Burgyán J. y Silhavy D. (2005) Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of Virology* **79**, 7217-26.
- Mérai Z., Kerényi Z., Kertész S., Magna M., Lakatos L. y Silhavy D. (2006) Double-Stranded RNA Binding May Be a General Plant RNA Viral Strategy To Suppress RNA Silencing. *Journal of Virology* **80**, 5747-56.
- Mi S., Cai T., Hu Y., Chen Y., Hodges E., Ni F., Wu L., Li S., Zhou H., Long C., Chen S., Hannon G.J. y Qi Y. (2008) Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 50 Terminal Nucleotide. *Cell* **133**, 116-27.
- Miyoshi K., Tsukumo H., Nagami T., Siomi H. y Siomi M.C. (2005) Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes & Development* **19**, 2837-48.
- Mlotshwa S., Voinnet O., Mette M.F., Matzke M., Vaucheret H., Ding S.W., Pruss G. y Vance V.B. (2002) RNA Silencing and the Mobile Silencing Signal. *Plant Cell* **14**, S289-S301.
- Mlotshwa S., Schauer S.E., Smith T.H., Mallory A.C., Herr J.M., Roth B., Merchant D.S., Ray A., Bowman L.H. y Vance V.B. (2005) Ectopic DICER-LIKE1 Expression in P1/HC-Pro Arabidopsis Rescues Phenotypic Anomalies but Not Defects in MicroRNA and Silencing Pathways. *The Plant Cell Online* **17**, 2873-85.
- Mochizuki T. y Ohki S.T. (2012) Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology* **13**, 217-25.
- Molnár A., Melnyk C.W., Bassett A., Hardcastle T.J., Dunn R. y Baulcombe D.C. (2010) Small Silencing RNAs in Plants Are Mobile and Direct Epigenetic Modification in Recipient Cells. *Science* **328**, 872-5.

- Molnar A., Melnyk C. y Baulcombe D. (2011) Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biology* **12**, 215.
- Monod J., Wyman J. y Changeux J.-P. (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology* **12**, 88-118.
- Montgomery T.A., Howell M.D., Cuperus J.T., Li D., Hansen J.E., Alexander A.L., Chapman E.J., Fahlgren N., Allen E. y Carrington J.C. (2008a) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell* **133**, 128-41.
- Montgomery T.A., Yoo S.J., Fahlgren N., Gilbert S.D., Howell M.D., Sullivan C.M., Alexander A., Nguyen G., Allen E., Ahn J.H. y Carrington J.C. (2008b) AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20055-62.
- Morel J.-B., Godon C., Mourrain P., Béclin C., Boutet S., Feuerbach F., Proux F. y Vaucheret H. (2002) Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (ago1) Mutants Impaired in Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance. *The Plant Cell Online* **14**, 629-39.
- Morell M., Espargaro A., Aviles F.X. y Ventura S. (2008) Study and selection of in vivo protein interactions by coupling bimolecular fluorescence complementation and flow cytometry. *Nature Protocols* **3**, 22-33.
- Morency E., Sabra M., Catez F., Texier P. y Lomonte P. (2007) A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability. *The Journal of Cell Biology* **177**, 757-68.
- Mossop D.W. y Francki R.I.B. (1977) Association of RNA 3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus. *Virology* **81**, 177-81.
- Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S., Sharma A., Charroux B., Abel L., Rappsilber J., Mann M. y Dreyfuss G. (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes y Development* **16**, 720-8.
- Mourrain P., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.-B., Jouette D., Lacombe A.-M., Nikic S., Picault N., Ré moué K., Sanial M., Vo T.-A. y Vaucheret H. (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 Genes Are Required for Posttranscriptional Gene Silencing and Natural Virus Resistance. *Cell* **101**, 533-42.
- Moussian B., Schoof H., Haecker A., Jürgens G. y Laux T. (1998) Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *European Molecular Biology Organization Journal* **17**, 1799-809.
- Nakahara K.S., Masuta C., Yamada S., Shimura H., Kashihara Y., Wada T.S., Meguro A., Goto K., Tadamura K., Sueda K., Sekiguchi T., Shao J., Itchoda N., Matsumura T., Igarashi M., Ito K., Carthew R.W. y Uyeda I. (2012) Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 10113-8.
- Nemes K., Gellért Á., Balázs E. y Salánki K. (2014) Alanine Scanning of Cucumber Mosaic Virus (CMV) 2B Protein Identifies Different Positions for Cell-To-Cell Movement and Gene Silencing Suppressor Activity. *Public Library of Science ONE* **9**, e112095.
- Nicol R.L., Frey N. y Olson E.N. (2000) FROM THE SARCOMERE TO THE NUCLEUS: Role of Genetics and Signaling in Structural Heart Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **1**, 179-223.
- Nitta N., Takanami Y., Kuwata S. y Kubo S. (1988) Comparative studies on the nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 3 between Y strain and Q strain. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **54**, 516-22.

- Noctor G. y Foyer C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-79.
- Olson M.O., Dundr M. y Szebeni A. (2000) The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends in cell biology* **10**, 189-96.
- Palmeri D. y Malim M.H. (1999) Importin  $\beta$  Can Mediate the Nuclear Import of an Arginine-Rich Nuclear Localization Signal in the Absence of Importin  $\alpha$ . *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1218-25.
- Palukaitis P., Roossinck M.J., Dietzgen R.G. y Francki R.I.B. (1992) Cucumber Mosaic Virus. In: *Advances in Virus Research* (eds. by Karl Maramorosch FAM y Aaron JS), pp. 281-348. Academic Press.
- Palukaitis P. y García-Arenal F. (2003) Cucumoviruses. *Advances in Virus Research* **62**, 241-323.
- Pallás V. y García J.A. (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology* **92**, 2691-705.
- Papp I., Mette M.F., Aufsatz W., Daxinger L., Schauer S.E., Ray A., van der Winden J., Matzke M. y Matzke A.J. (2003) Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiology* **132**, 1382-90.
- Parker J.S., Roe S.M. y Barford D. (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* **434**, 663-6.
- Pazhouhandeh M., Dieterle M., Marrocco K., Lechner E., Berry B., Brault V., Hemmer O., Kretsch T., Richards K.E., Genschik P. y Ziegler-Graff V. (2006) F-box-like domain in the poliovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1994-9.
- Pederson T. (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Research* **26**, 3871-6.
- Peng Y., Kwok K.H.H., Yang P.-H., Ng S.S.M., Liu J., Wong O.G., He M.-L., Kung H.-F. y Lin M.C.M. (2005) Ascorbic acid inhibits ROS production, NF- $\kappa$ B activation and prevents ethanol-induced growth retardation and microencephaly. *Neuropharmacology* **48**, 426-34.
- Peragine A., Yoshikawa M., Wu G., Albrecht H.L. y Poethig R.S. (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development* **18**, 2368-79.
- Petersen B. y Albrechtsen M. (2005) Evidence implying only unprimed RdRP activity during transitive gene silencing in plants. *Plant Molecular Biology* **58**, 575-83.
- Platani M., Goldberg I., Swedlow J.R. y Lamond A.I. (2000) In Vivo Analysis of Cajal Body Movement, Separation, and Joining in Live Human Cells. *The Journal of Cell Biology* **151**, 1561-74.
- Poch O., Sauvaget I., Delarue M. y Tordo N. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *European Molecular Biology Organization Journal* **8**, 3867-74.
- Poethig R.S., Peragine A., Yoshikawa M., Hunter C., Willmann M. y Wu G. (2006) The function of RNAi in plant development. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **71**, 165-70.
- Pontes O., Li C.F., Nunes P.C., Haag J., Ream T., Vitins A., Jacobsen S.E. y Pikaard C.S. (2006) The Arabidopsis Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell* **126**, 79-92.
- Price W.C. (1934) Isolation and study of some yellow strains of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* **24**, 743-61.
- Pumplin N. y Voinnet O. (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 745-60.

- Puvion-Dutilleul F. y Christensen M.E. (1993) Alterations of fibrillar distribution and nucleolar ultrastructure induced by adenovirus infection. *European journal of cell biology* **61**, 168-76.
- Qi Y., Denli A.M. y Hannon G.J. (2005) Biochemical Specialization within Arabidopsis RNA Silencing Pathways. *Molecular Cell* **19**, 421–8.
- Qi Y., He X., Wang X.-J., Kohany O., Jurka J. y Hannon G.J. (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **443**, 1008-12.
- Qu F., Ye X., Hou G., Sato S., Clemente T.E. y Morris T.J. (2005) RDR6 Has a Broad-Spectrum but Temperature-Dependent Antiviral Defense Role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology* **79**, 15209-17.
- Qu F., Ye X. y Morris T.J. (2008) Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14732–7.
- Raja P., Jackel J.N., Li S., Heard I.M. y Bisaro D.M. (2014) Arabidopsis Double-Stranded RNA Binding Protein DRB3 Participates in Methylation-Mediated Defense against Geminiviruses. *Journal of Virology* **88**, 2611-22
- Rajamaki M.-L. y Valkonen J.P.T. (2009) Control of Nuclear and Nucleolar Localization of Nuclear Inclusion Protein a of Picorna-Like Potato virus A in *Nicotiana* Species. *The Plant Cell* **21**, 2485-502.
- Rakitina D.V., Yelina N.E. y Kalinina N.O. (2006) Zinc ions stimulate the cooperative RNA binding of hordeiviral cb protein. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **580**, 5077–83.
- Ramachandran V. y Chen X. (2008a) Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* **321**, 1490-2.
- Rakitina D.V., Taliensky M., Brown J.W.S. y Kalinina N.O. (2011) Two RNA-binding sites in plant fibrillar protein provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research*.
- Ramón y Cajal S. (1903) Un sencillo metodo de coloracion selectiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid* **2**, 129–221.
- Rashid U.J., Hoffmann J., Brutschy B., Piehler J. y Chen J.C.-H. (2008) Multiple Targets for Suppression of RNA Interference by Tomato Aspermy Virus Protein 2B. *Biochemistry* **47**, 12655–7.
- Reichow S.L., Hamma T., Ferré-D'Amaré A.R. y Varani G. (2007) The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research* **35**, 1452-64.
- Rietveld K., Pleij C.W.A. y Bosch L. (1983) Three-dimensional models of the tRNA-like 3' termini of some plant viral RNAs. *European Molecular Biology Organization Journal* **2**, 1079-85.
- Rizzo T.M. y Palukaitis P. (1990) Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: Generation of infectious RNA transcripts. *Molecular and General Genetics* **222**, 249-56.
- Roossinck M.J., Zhang L. y Hellwald K.-H. (1999) Rearrangements in the 5' Nontranslated Region and Phylogenetic Analyses of Cucumber Mosaic Virus RNA 3 Indicate Radial Evolution of Three Subgroups. *Journal of Virology* **73**, 6752-8.
- Roossinck M.J. (2001) Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology* **2**, 59-63.
- Roossinck M.J. (2002) Evolutionary History of Cucumber Mosaic Virus Deduced by Phylogenetic Analyses. *Journal of Virology* **76**, 3382–7.

- Rozanov M.N., Koonin E.V. y Gorbalenya A.E. (1992) Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* **73**, 2129-34.
- Ruiz-Ferrer V. y Voinnet O. (2009) Roles of Plant Small RNAs in Biotic Stress Responses. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 485-510.
- Schiebel W., Pélissier T., Riedel L., Thalmeir S., Schiebel R., Kempe D., Lottspeich F., Sanger H.L. y Wassenegger M. (1998) Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *The Plant Cell* **10**, 2087-101.
- Schott G., Mari-Ordonez A., Himber C., Alioua A., Voinnet O. y Dunoyer P. (2012) Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *European Molecular Biology Organization Journal* **31**, 2553-65.
- Schuck J., Gursinsky T., Pantaleo V., Burgyan J. y Behrens S.-E. (2013) AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Research* **41**, 5090-103.
- Schwach F., Vaistij F.E., Jones L. y Baulcombe D.C. (2005) An RNA-Dependent RNA Polymerase Prevents Meristem Invasion by Potato Virus X and Is Required for the Activity But Not the Production of a Systemic Silencing Signal. *Plant Physiology* **138**, 1842-52.
- Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N. y Zamore P.D. (2003) Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* **115**, 199-208.
- Schwinghamer M.W. y Symons R.H. (1975) Fractionation of cucumber mosaic virus RNA and its translation in a wheat embryo cell-free system. *Virology* **65**, 252-62.
- Semashko M., Gonzalez I., Shaw J., Leonova O.G., Popenko V.I., Taliansky M.E., Canto T. y Kalinina N.O. (2012a) The extreme N-terminal domain of a hordeivirus TGB1 movement protein mediates its localization to the nucleolus and interaction with fibrillarin. *Biochimie* **94**, 1180-8.
- Semashko M.A., Rakitina D.V., Gonzalez I., Canto T., Kalinina N.O. y Taliansky M.E. (2012b) Movement Protein of Hordeivirus Interacts In Vitro and In Vivo with Coilin, a Major Structural Protein of Cajal Bodies. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **442**, 57-60.
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N.G., Palmer A.E. y Tsien R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22**, 1567-72.
- Shang J., Xi D.-H., Xu F., Wang S.-D., Cao S., Xu M.-Y., Zhao P.-P., Wang J.-H., Jia S.-D., Zhang Z.W., Yuan S. y Lin H.-H. (2011) A broad-spectrum, efficient and nontransgenic approach to control plant viruses by application of salicylic acid and jasmonic acid. *Planta* **233**, 299-308.
- Shi B.-J., Ding S.W. y R.H. S. (1997) In vivo expression of an overlapping gene encoded by the cucumoviruses. *Journal of General Virology* **78**, 237-41.
- Shi B.-J., Palukaitis P. y Symons R.H. (2002) Differential Virulence by Strains of Cucumber mosaic virus is Mediated by the 2b Gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 947-55.
- Shi B.-J., Miller J., Symons R.H. y Palukaitis P. (2003) The 2b Protein of Cucumoviruses Has a Role in Promoting the Cell-to-cell Movement of Pseudorecombinant Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 261-7.
- Shi B.-J., Symons R.H. y Palukaitis P. (2008) The cucumovirus 2b gene drives selection of inter-viral recombinants affecting the crossover site, the acceptor RNA and the rate of selection. *Nucleic Acids Research* **36**, 1057-71.

- Shi B.J. y Palukaitis P. (2011) The N-terminal 12 amino acids of tomato aspermy virus 2b protein function in infection and recombination. *Journal of General Virology* **92**, 2706-10.
- Shimakami T., Honda M., Kusakawa T., Murata T., Shimotohno K., Kaneko S. & Murakami S. (2006) Effect of Hepatitis C Virus (HCV) NS5B-Nucleolin Interaction on HCV Replication with HCV Subgenomic Replicon. *Journal of Virology* **80**, 3332-40.
- Shimura H. y Pantaleo V. (2011) Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1809**, 601-12.
- Shoemaker B.A. y Panchenko A.R. (2007) Deciphering Protein–Protein Interactions. Part I. Experimental Techniques and Databases. *Public Library of Science Computational Biology* **3**, e42.
- Shpargel K.B., Ospina J.K., Tucker K.E., Matera A.G. y Hebert M.D. (2003) Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus. *Journal of Cell Science* **116**, 303-12.
- Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K.L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R.H.A. y Fire A. (2001) On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing. *Cell* **107**, 465–76.
- Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittya G., Hornyik C., Tavazza M. y Burgyan J. (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *European Molecular Biology Organization Journal* **21**, 3070-80.
- Smith L.M., Pontes O., Searle I., Yelina N., Yousafzai F.K., Herr A.J., Pikaard C.S. y Baulcombe D.C. (2007) An SNF2 Protein Associated with Nuclear RNA Silencing and the Spread of a Silencing Signal between Cells in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **19**, 1507-21.
- Soards A.J., Murphy A.M., Palukaitis P. y Carr J.P. (2002) Virulence and Differential Local and Systemic Spread of Cucumber mosaic virus in Tobacco are Affected by the CMV 2b Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 647–53.
- Song J.J., Liu J., Tolia N.H., Schneiderman J., Smith S.K., Martienssen R.A., Hannon G.J. y Joshua-Tor L. (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structural Biology* **10**, 1026-32.
- Song J.-J., Smith S.K., Hannon G.J. y Joshua-Tor L. (2004) Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science* **305**, 1434-7.
- Sueda K., Shimura H., Meguroa A., Uchida T., Inabaa J.-i. y Masuta C. (2010) The C-terminal residues of the 2b protein of Cucumber mosaic virus are important for efficient expression in *Escherichia coli* and DNA-binding. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **584**, 945-50.
- Suzuki M., Kuwata S., Kataoka J., Masuta C., Nitta N. y Takanami Y. (1991) Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology* **183**, 106-13.
- Symons R. (1975) Cucumber mosaic virus RNA contains 7-methyl guanosine at the 50-terminus of all four RNA species. *Molecular Biology Reports* **2**, 277-85.
- Takabatake R., Karita E., Seo S., Mitsuhashi I., Kuchitsu K. y Ohashi Y. (2007) Pathogen-Induced Calmodulin Isoforms in Basal Resistance Against Bacterial and Fungal Pathogens in Tobacco. *Plant and Cell Physiology* **48**, 414-23.
- Takeda A., Iwasaki S., Watanabe T., Utsumi M. y Watanabe Y. (2008) The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiology* **49**, 493-500.
- Taliansky M.E., Brown J.W.S., Rajamäki M.L., Valkonen J.P.T. y Kalinina N.O. (2010) Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal

- pathosystems. In: *Advances in Virus Research* (eds. by Maramorosch K, Shatkin AJ y Murphy FA), pp. 119–58.
- Taylor R.G., Walker D.C. y McInnes R.R. (1993) E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research* **21**, 1677- 8.
- Tijsterman M., Ketting R.F. y Plasterk R.H.A. (2002) The genetics of RNA silencing. *Annual Review of Genetics* **36**, 489-519.
- Tzfira T., Vaidya M. y Citovsky V. (2002) Increasing plant susceptibility to Agrobacterium infection by overexpression of the Arabidopsis nuclear protein VIP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10435-40.
- Vaistij F.E., Jones L. y Baulcombe D.C. (2002) Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. *The Plant Cell Online* **14**, 857-67.
- Valli A., López-Moya J.J. y García J.A. (2009) RNA Silencing and its Suppressors in the Plant-virus Interplay. In: (Chichester, UK: John Wiley y Sons Ltd.
- van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N. y Stuitje A.R. (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell* **2**, 291-9.
- van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Den Elzacker S.V., Zaenen I., Schilperoort R.A. y Schell J. (1974) Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**, 169-70.
- Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E., Estes M., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D., Pringle C.R. y Wickner R.B. (2000) In "Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." *Academic Press, San Diego*.
- Vance V. y Vaucheret H. (2001) RNA Silencing in Plants—Defense and Counterdefense. *Plant Pathology Review* **292**, 2277-80.
- Vaquero C., Sanz A.I., Serra M.T. y García-Luque I. (1996) Accumulation kinetics of CMV RNA 3-encoded proteins and subcellular localization of the 3a protein in infected and transgenic tobacco plants. *Archives of Virology* **141**, 987-99.
- Várallyay E., Válóczy A., Agyi A., Burgyán J. y Havelda Z. (2010) Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *European Molecular Biology Organization Journal* **29**, 3507-19.
- Vargason J.M., Szittyá G., Burgyán J. y Hall T.M.T. (2003) Size Selective Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor. *Cell* **115**, 799-811.
- Vaucheret H. (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* **13**, 350-8.
- Voinnet O., Vain P., Angell S. y 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**, 177-87.
- Voinnet O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* **17**, 449-59.
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P. y Baulcombe D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of Tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* **33**, 949–56.
- Voinnet O. (2008) Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science* **13**, 317-28.

- Waggoner S. y Sarnow P. (1998) Viral Ribonucleoprotein Complex Formation and Nucleolar-Cytoplasmic Relocalization of Nucleolin in Poliovirus-Infected Cells. *Journal of Virology* **72**, 6699-709.
- Wahyuni W.S., Dietzgen R.G., Hanada K. y Francki R.I.B. (1992) Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathology* **41**, 282-97.
- Walter M., Chaban C., Schütze K., Batistic O., Weckermann K., Näke C., Blazevic D., Grefen C., Schumacher K., Oecking C., Harter K. y Kudla J. (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* **40**, 428-38.
- Wang H., Hao L., Shung C.-Y., Sunter G. y Bisaro D.M. (2003) Adenosine Kinase Is Inactivated by Geminivirus AL2 and L2 Proteins. *The Plant Cell Online* **15**, 3020-32.
- Wang Y., Tzfira T., Gaba V., Citovsky V., Palukaitis P. y Gal-On A. (2004) Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein: pathogenicity and nuclear localization. *Journal of General Virology* **85**, 3135-47.
- Wang M.-B. y Metzlaff M. (2005) RNA silencing and antiviral defense in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 216-22.
- Wang H., Buckley K.J., Yang X., Buchmann R.C. y Bisaro D.M. (2005) Adenosine Kinase Inhibition and Suppression of RNA Silencing by Geminivirus AL2 and L2 Proteins. *Journal of Virology* **79**, 7410-8.
- Wang X.-B., Wu Q., Ito T., Cillo F., Li W.-X., Chen X., Yu J.-L. y Ding S.-W. (2010) RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 484-9.
- Wang H., Zhang X., Liu J., Kiba T., Woo J., Ojo T., Hafner M., Tuschl T., Chua N.-H. y Wang X.-J. (2011a) Deep sequencing of small RNAs specifically associated with *Arabidopsis* AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions. *The Plant Journal* **67**, 292-304.
- Wang X.-B., Jovel J., Udomporn P., Wang Y., Wu Q., Li W.-X., Gascioli V., Vaucheret H. y Ding S.-W. (2011b) The 21-Nucleotide, but Not 22-Nucleotide, Viral Secondary Small Interfering RNAs Direct Potent Antiviral Defense by Two Cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online* **23**, 1625-38.
- Wassenegger M., Heimes S., Riedel L. y Sängler H.L. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**, 567-76.
- Wassenegger M. (2000) RNA-directed DNA methylation. *Plant Molecular Biology* **43**, 203-20.
- Waterhouse P.M., Wang M.B. y Lough T. (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-42.
- Wen W., Meinkoth J.L., Tsien R.Y. y Taylo S.S. (1995) Identification of a Signal for Rapid Export of Proteins from the Nucleus. *Cell* **82**, 463-73.
- Westwood J.H., McCann L., Naish M., Dixon H., Murphy A.M., Stancombe M.A., Bennett M.H., Powell G., Webb A.A.R. y Carr J.P. (2013) A viral RNA silencing suppressor interferes with abscisic acid-mediated signalling and induces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **14**, 158-70.
- Westwood J.H., Lewsey M.G., Murphy A.M., Tungadi T., Bates A., Gilligan C.A. y Carr J.P. (2014) Interference with jasmonic acid-regulated gene expression is a general property of viral suppressors of RNA silencing but only partly explains virus-induced changes in plant-aphid interactions. *Journal of General Virology* **95**, 733-9.
- Whitham S.A. y Wang Y. (2004) Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 365-71.



- Wu Q., Wang X. y Ding S.-W. (2010) Viral Suppressors of RNA-Based Viral Immunity: Host Targets. *Cell host y microbe* **8**, 12-5.
- Xiao C.-Y., Hübner S., Elliot R.M., Caon A. y Jans D.A. (1996) A Consensus cAMP-dependent Protein Kinase (PK-A) Site in Place of the CcN Motif Casein Kinase II Site of Simian Virus 40 Large T-antigen Confers PK-A-mediated Regulation of Nuclear Import. *JOURNAL OF Biological Chemistry* **271**, 6451-7.
- Xie Z., Fan B., Chen C. y Chen Z. (2001) An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6516–21.
- Xie Z., Johansen L.K., Gustafson A.M., Kasschau K.D., Lellis A.D., Zilberman D., Jacobsen S.E. y Carrington J.C. (2004) Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. *Public Library of Science Biology* **2**, e104.
- Xu A., Zhao Z., Chen W., Zhang H., Liao Q., Chen J., Carr J.P. y Du Z. (2013) Self-interaction of the cucumber mosaic virus 2b protein plays a vital role in the suppression of RNA silencing and the induction of viral symptoms. *Molecular Plant Pathology* **14**, 803-12.
- Yan K.S., Sherry Yan S., Farooq A., Han A., Zeng L. y Zhou M.-M. (2003) Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* **426**, 468-74.
- Yang T.H., Tsai W.H., Lee Y.M., Lei H.Y., Lai M.Y., Chen D.S., Yeh N.H. y Lee S.C. (1994) Purification and characterization of nucleolin and its identification as a transcription repressor. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 6068-74.
- Yang S.-J., Carter S.A., Cole A.B., Cheng N.-H. y Nelson R.S. (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6297-302.
- Yang X., Tan S.H., Teh Y.J. y Yuan Y.A. (2011) Structural implications into dsRNA binding and RNA silencing suppression by NS3 protein of Rice Hoja Blanca Tenuivirus. *RNA* **17**, 903-11.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. y Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.
- Ye K., Malinina L. y Patel D., J. (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* **426**, 874-8.
- Ye K. y Patel D.J. (2005) RNA Silencing Suppressor p21 of Beet Yellows Virus Forms an RNA Binding Octameric Ring Structure. *Structure* **13**, 1375-84.
- Ye J., Qua J., Zhang J.-F., Geng Y.-F. y Fang R.-X. (2009) A critical domain of the Cucumber mosaic virus 2b protein for RNA silencing suppressor activity. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **583**, 101–6.
- Yoo D., Wootton S.K., Li G., Song C. y Rowland R.R. (2003) Colocalization and Interaction of the Porcine Arterivirus Nucleocapsid Protein with the Small Nucleolar RNA-Associated Protein Fibrillarin. *Journal of Virology* **77**, 12173-83.
- Yoo B.-C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., Haywood V., Archer-Evans S., Lee Y.M., Lough T.J. y Lucas W.J. (2004) A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. *The Plant Cell Online* **16**, 1979-2000.
- You J.-S., Baik H.-S. y Paek K.-H. (1999) Mutational analysis of cucumber mosaic virus movement protein gene. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 82-5.
- Yu D., Fan B., MacFarlane S.A. y Chen Z. (2003) Analysis of the Involvement of an Inducible Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerase in Antiviral Defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 206-16.

- Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A. y Bartel D.P. (2000) RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zamyatnin A.A., Solovyev A.G., Bozhkov P.V., Valkonen J.P.T., Morozov S.Y. y Savenkov E.I. (2006) Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *The Plant Journal* **46**, 145-54.
- Zhang L., Hanada K. y Palukaitis P. (1994) Mapping Local and Systemic Symptom Determinants of Cucumber Mosaic Cucumovirus in Tobacco. *Journal of General Virology* **75**, 3185-91.
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P. y Anderson T.A. (2006a) Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology* **289**, 3-16.
- Zhang X., Yuan Y.-R., Pei Y., Lin S.-S., Tuschl T., Patel D.J. y Chua N.-H. (2006b) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* **20**, 3255-68.
- Zhang X., Du P., Lu L., Xiao Q., Wang W., Cao X., Ren B., Wei C. y Li Y. (2008) Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs. *Virology* **374**, 351-60.
- Zhang H. y Zhu J.-K. (2011) RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 142-7.
- Zhang Z., Chen H., Huang X., Xia R., Zhao Q., Lai J., Teng K., Li Y., Liang L., Du Q., Zhou X., Guo H. y Xie Q. (2011) BSCTV C2 Attenuates the Degradation of SAMDC1 to Suppress DNA Methylation-Mediated Gene Silencing in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **23**, 273-88.
- Zhou T., Murphy A.M., Lewsey M.G., Westwood J.H., Zhang H.-M., González I., Canto T. y Carr J.P. (2014) Domains of the cucumber mosaic virus 2b silencing suppressor protein affecting inhibition of salicylic acid-induced resistance and priming of salicylic acid accumulation during infection. *Journal of General Virology* **95**, 1408-13.
- Zilberman D., Cao X. y Jacobsen S.E. (2003) ARGONAUTE4 Control of Locus-Specific siRNA Accumulation and DNA and Histone Methylation. *Science* **299**, 716-9.
- Zrachya A., Glick E., Levy Y., Arazi T., Citovsky V. y Gafni Y. (2007) Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology* **358**, 159-65.



ANEXOS





314	CAT <u>GAGCTC</u> CTCAAATCTCTTTCTGAGATCT	Coilin At 3' Sac (+stop)
322	AT <u>GGGATCC</u> ATGGGAAAGTCTAAATCC	Nucleolin At 5' BamHI
323	CAT <u>GGTACCT</u> ACTCGTCACCGAAGGTAGTC	Nucleolin At 3' KpnI
324	ACAGGGTCATGCCGCCATGTG	2b domain 3 forward
325	ATCCAATTGATAGAACGGTAG	2b domain 3 reverse
333	ACAGCTAGCATGAACGAGCTGGCTCTGAAACTGGCT GGTCTG	Nuclear export signal 5' NheI
334	CAT <u>TCTAGAG</u> CTGTTTTGTTAATATCCAGACCAGCCAG TTT	nuclear export signal 3' XbaI
357	AT <u>GGGATCC</u> ATGGTGGAGGCGAAGAAGCAG	Delta 5T 2b
358	CAT <u>GAGCTC</u> TAAGCATAATCTGGAACATCGTATGGAT AAAAATCATGGTCTTCCGCCG	Delta3T 2b
410	ATGTCTAGATAGTAAAGGAGAAGAAC	GFP minus N ATG

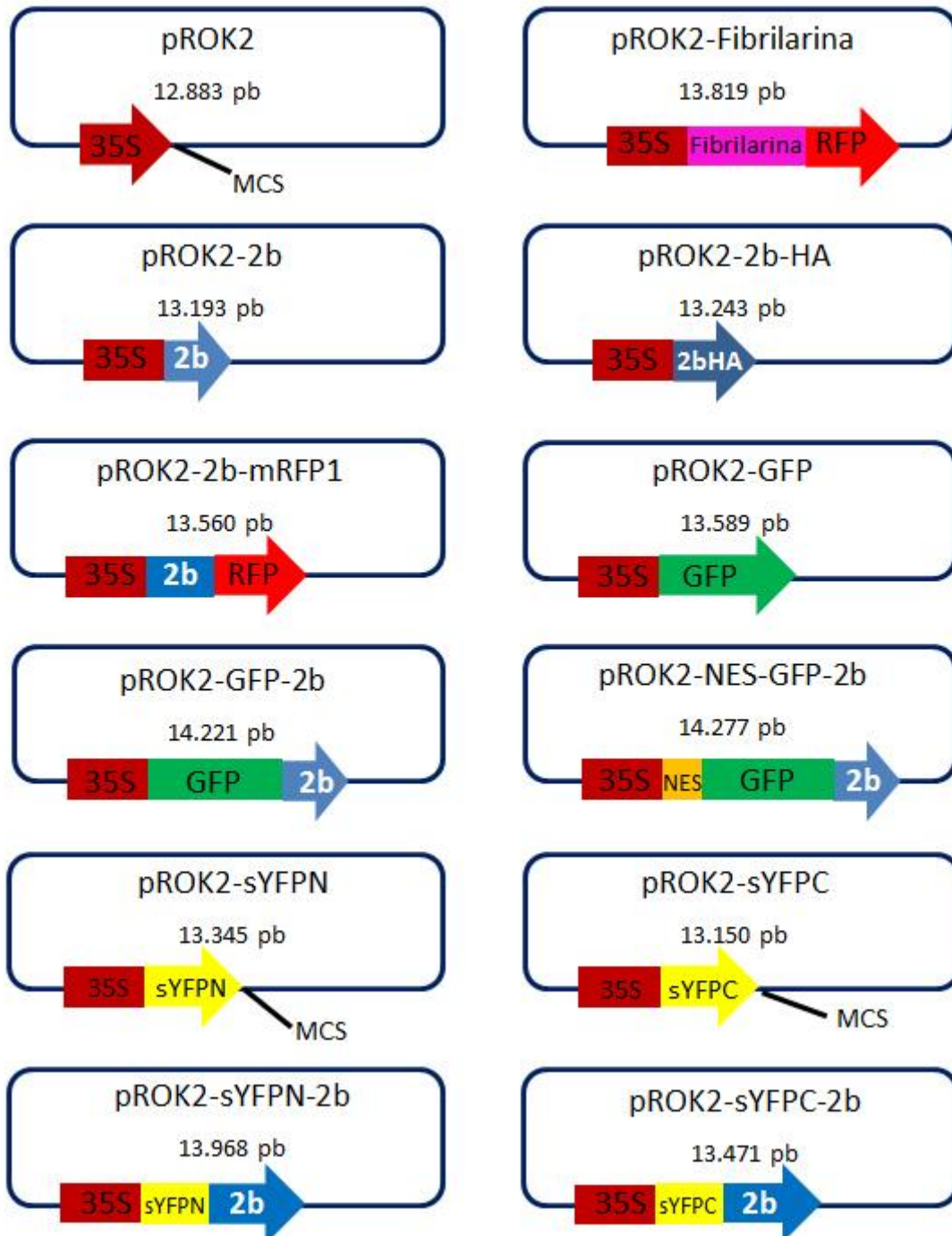
## Secuenciación:

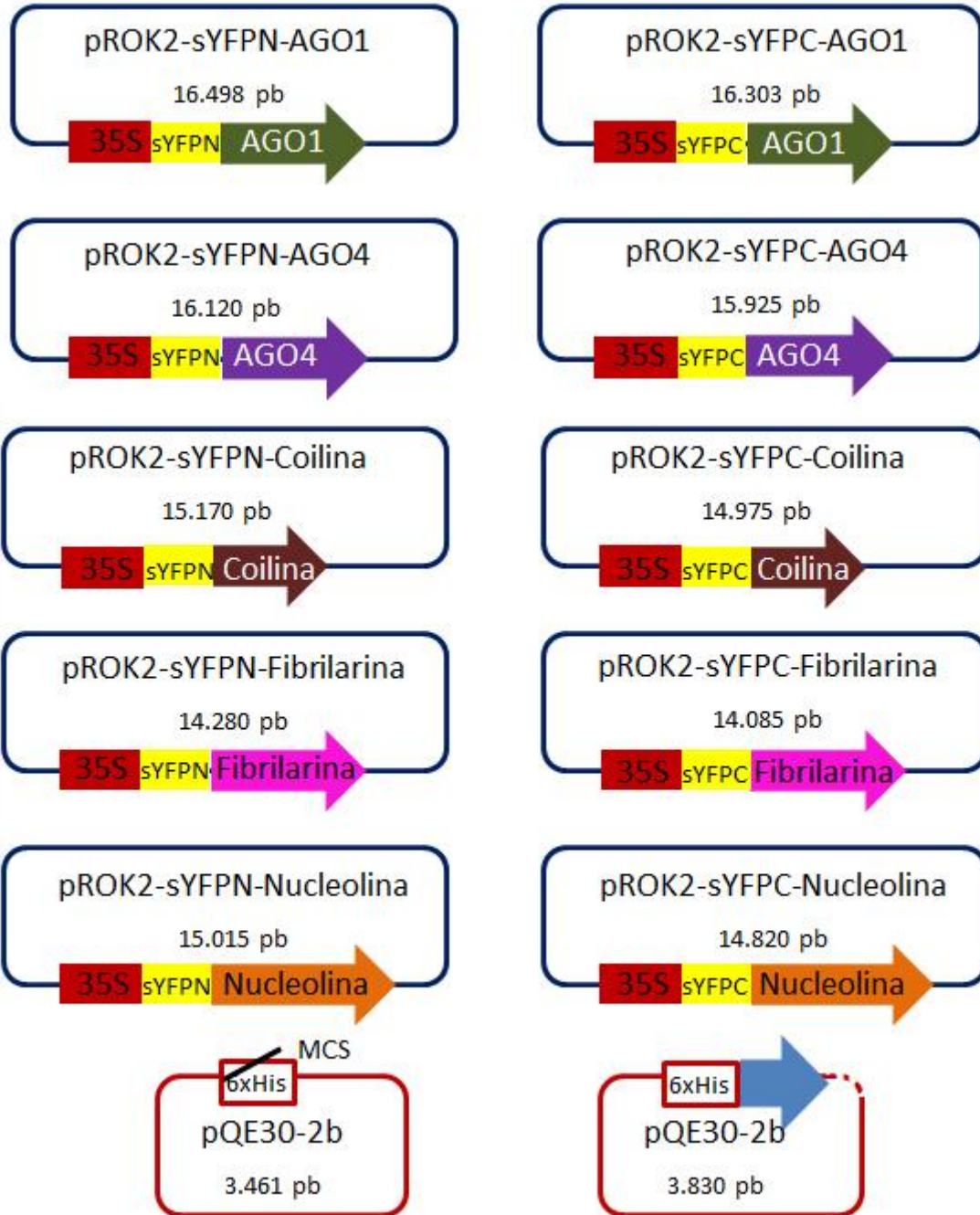
Oligo.	Secuencia	Nombre
F17	GTAAAACGACGGCCAGT	M13 forward (-20) SECUGEN
R19	GGAAACAGCTATGACCATG	M13 reverse (-24) SECUGEN
79	ACT <u>GGATCC</u> ATGGAATTGAACGTA	Fny CMV 2b 5 Bam
97	GT <u>GAGCTC</u> TGGTCTCCTTTTGG	
327	GATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGG	New ROK 3' sequencing
328	GACGCACAATCCCACTATCCTTCGC	New 35SP sequencing
329	CGGATAACAATTTACACAG	PQE 5' seq
330	GTTCTGAGGTCATTACTGG	PQE 3' seq

---



### ANEXO III: ESQUEMA DE LAS CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS





## ANEXO IV: EFECTOS DE DIVERSAS MUTACIONES EN LA PROTEÍNA 2B DE CMV (\*En otros Cucumovirus: \*TAV)

### Efectos en la formación de dímeros, tetrámeros y oligómeros en la proteína 2b

Cepa	Formación de dímeros, tetrámeros y oligómeros original	Sustitución o delección	Formación de dímeros, tetrámeros y oligómeros resultante	Técnica	Referencia
Fny (IA)	Dímeros	Delección aas 1-17 Delección aas 22-27 Delección aas 33-36 Delección aas 22-27 + 33-36 Delección aas 39-57 $S^{40} \rightarrow A^{40}$ $S^{42} \rightarrow A^{42}$ Delección aas 62-65 Delección aas 95-110	Dímeros	BiFC	Datos propios
Rs (IA)	Tetrámeros	$^{10}NVE^{12} \rightarrow AAA$	Dímeros	Modelado molecular	Nemes <i>et al.</i> 2014
Rs (IA)	Tetrámeros	$^{95}DDTD^{98} \rightarrow AAAA$	Desestabiliza el tetrámero	Simulación modelado molecular dinámico	Géllert <i>et al.</i> 2012
Rad35 (IB)	No forma dímeros	$P^{55} \rightarrow L^{55}$	Forma dímeros	BiFC	Xu <i>et al.</i> 2013
Fny (IA)	Dímeros, Tetrámeros y oligómeros	$L^{15} \rightarrow A^{15}$ , $M^{18} \rightarrow A^{18}$	Sólo Dímeros	<i>Chemical cross-linking in vitro</i>	Dong <i>et al.</i> 2015
*TAV-2b	Tetrámeros y más	$L^8 \rightarrow A^8$ , $I^{11} \rightarrow A^{11}$ , $L^{15} \rightarrow A^{15}$ , $M^{18} \rightarrow A^{18}$ (cremallera de leucinas)	Pobre oligomerización. No tetrámeros	<i>EGS cross linking</i>	Chen <i>et al.</i> 2008

## Efectos en la localización subcelular de la proteína 2b

Cepa	localización original	Sustitución, delección o adición	Localización resultante	Especie de planta	Referen.
Fny (IA)	Citoplásmica Nucleolar	Delección aas 1-17	Citoplásmica. Nucleolar	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Datos propios
		Delección aas 22-27	Citoplásmica		
		Delección aas 33-36	Citoplásmica. Algo nucleolar		
		Delección aas 22-27 + 33-36	Citoplásmica		
		Delección aas 39-57	++Nucleolar		
		S <sup>40</sup> → A <sup>40</sup>	Citoplásmica. Nucleolar		
		S <sup>42</sup> → A <sup>42</sup>	Citoplásmica. Nucleolar		
		Delección aas 62-65	Citoplásmica. Nucleolar		
		Delección aas 95-110	Citoplásmica. Nucleolar		
Adición NES (NES-GFP-2b)	++citoplásmica				
Fny (IA)	Citoplásmica Nucleolar	Adición NLS de cepa LS	Sólo Nucleolar	<i>N. benthamiana</i>	Du <i>et al.</i> 2014
		K <sup>23</sup> → R <sup>23</sup>	Citoplásmica		
		Q <sup>24</sup> → R <sup>24</sup>	Nucleolar		
		E <sup>35</sup> → A <sup>35</sup>			
		K <sup>23</sup> , Q <sup>24</sup> , E <sup>35</sup> → R <sup>23</sup> R <sup>24</sup> A <sup>35</sup> (igual a NLS de cepa Fny a NLS de cepa LS)			
LS (II)	Predominante nuclear (no nucleolar)			<i>N. benthamiana</i>	Du <i>et al.</i> 2014
Fny (IA)	Citoplásmica Nucleolar	L <sup>15</sup> → A <sup>15</sup> + M <sup>18</sup> → A <sup>18</sup>	Citoplásmica, Nuclear y nucleolar		Dong <i>et al.</i> 2015
CM95 (IA)	Nuclear	C <sup>46</sup> → R <sup>46</sup>	Nuclear	Cebolla	Goto <i>et al.</i> 2007
Q (II)	Citoplásmica y nuclear	<sup>22</sup> KRRRRR <sup>27</sup> → AAAAAA	Punteado citoplásmica. Perinuclear	Células Bright Yellow-2 (BY2)	Lucy <i>et al.</i> 2000
		<sup>23</sup> RRR <sup>25</sup> → QAQ	perinuclear		
		R <sup>24</sup> → Q <sup>24</sup>	Nuclear		
		<sup>22</sup> KRRRRR <sup>27</sup> → AAAAAA + <sup>101</sup> KRRRRR <sup>106</sup> (prot. Original 100 aas)	Nuclear		
		Delección aas <sup>39</sup> KSPSE <sup>43</sup>	Nuclear		
		Delección aas 85-100	Nuclear		

## Efectos en la virulencia de la proteína 2b en el virus CMV

Cepa	Síntoma original	Sustitución, delección o adición	Síntoma resultante	Especie de planta	Referencia
Fny (IA) Cb7 (IB)	Mosaico	Delección aas 777-858 de 2a	Atenuado	<i>Nicotiana glutinosa</i>	Du <i>et al.</i> 2008
Rad35 (IB) Cb7 (IB)	Mosaico atenuado Necrosis sistémica	P <sup>55</sup> → L <sup>55</sup> L <sup>55</sup> → P <sup>55</sup>	Necrosis sistémica Mosaico atenuado	<i>N. glutinosa</i>	Du <i>et al.</i> 2008
Fny (IA)	Mosaico	S <sup>40</sup> → A <sup>40</sup> S <sup>42</sup> → A <sup>42</sup>	Síntoma suavizado	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>N. benthamiana</i>	Lewsey <i>et al.</i> 2009
Fny (IA)	Mosaico	Delección aas 1-17 Delección aas 22-27 Delección aas 22-36 Delección aas 39-57	Atenuado	<i>N. tabacum</i> <i>N. benthamiana</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Lewsey <i>et al.</i> 2009
Fny (IA)	Mosaico	Delección aas 95-110	Clorosis	<i>N. tabacum</i> <i>N. benthamiana</i> <i>A. thaliana</i>	Lewsey <i>et al.</i> 2009
CM95 (IA)	Atenuado	C <sup>46</sup> → R <sup>46</sup>	Mosaico	<i>N. tabacum</i>	Goto <i>et al.</i> 2007
HL (IB)	Necrosis	Delección aas 71-111	Atenuado	<i>A. thaliana</i>	Inaba <i>et al.</i> 2011
Rs (IA)		<sup>1</sup> MEL <sup>3</sup> → AAA <sup>10</sup> NVE <sup>12</sup> → AAA <sup>22</sup> KKQ <sup>24</sup> → AAA <sup>25</sup> RRR <sup>27</sup> → AAA <sup>31</sup> QNR <sup>33</sup> → AAA <sup>34</sup> RER <sup>36</sup> → AAA <sup>40</sup> SPS <sup>42</sup> → AAA <sup>55</sup> LPF <sup>57</sup> → AAA <sup>70</sup> HRV <sup>72</sup> → AAA	Asintomático Asintomático Atenuado Síntomas como Rs Atenuado Atenuado Asintomático Atenuado Asintomático	<i>Nicotiana clelandii</i> <i>Chenopodium murale</i>	Nemes <i>et al.</i> 2014
Rs (IA)	Síntomas sistémicos mosaico, atrofia severa	<sup>95</sup> DDTD <sup>98</sup> → AAAA	Atenuado y retrasado respecto a cepa Rs. Mosaico. No atrofia	<i>N. clelandii</i> <i>N. glutinosa</i>	Géllert <i>et al.</i> 2012
Fny (IA)		Adición NLS de cepa LS	Síntomas más severos que Fny. Necrosis	<i>N. benthamiana</i>	Du <i>et al.</i> 2014
Pepo (IA) → 36R37 (IA)	Severo	P <sup>41</sup> → L <sup>41</sup>	Síntomas atenuados	<i>Nicotiana rustica</i>	Kobori <i>et al.</i> 2005.

Q (II)	Atrofia severa, deformación de las hojas severa	<sup>22</sup> KRRRRR <sup>27</sup> →AAAAAA	Atrofia reducida, síntomas de la hoja reducidos, comparado con cepa Q	<i>N. benthamiana</i>	Lucy <i>et al.</i> 2000
		<sup>23</sup> RRR <sup>25</sup> → QAQ	Atrofia reducida, más mosaico que <sup>22</sup> AAAAAA <sup>27</sup>		
		R <sup>24</sup> →Q <sup>24</sup>	Como cepa Q		
		<sup>22</sup> KRRRRR <sup>27</sup> →AAAAAA + <sup>101</sup> KRRRRR <sup>106</sup> (prot. Original 100 aas)	Atrofia reducida, síntomas de la hoja reducidos, comparado con cepa Q		
		Delección aas <sup>39</sup> KSPSE <sup>43</sup>	No atrofia		
		Delección aas 85-100	No atrofia		
Q (II)	Lesiones cloróticas que aumentan en tamaño, mosaico	Delección 2b (Q-CMVΔ2b)	Pequeñas lesiones cloróticas. Mosaico muy leve	<i>Cucumis sativus</i> <i>Tabaco</i>	Ding <i>et al.</i> 1995
		Delección aas <sup>39</sup> KSPSE <sup>43</sup>	Más síntomas que Q-CMVΔ2b. Mosaico leve. Retraso síntomas sistémicos		
		Delección aas 84-100 (C-terminal conservado)	Como Q-CMVΔ2b. Mosaico leve.		
Fny (IA)	Síntomas severos	L <sup>15</sup> →A <sup>15</sup>	Síntomas atenuados		Dong <i>et al.</i> 2015
		M <sup>18</sup> →A <sup>18</sup>	Síntomas atenuados		
*TAV	HR. Resistencia al virus (expresado desde vector TMV), activación de genes de Avr	K <sup>21</sup> →V <sup>21</sup> + R <sup>28</sup> →S <sup>28</sup>	No HR, No resistencia al virus	<i>N. tabacum</i> <i>cultivar Samsun</i>	Li <i>et al.</i> 1999
		Quimera TAV aas 1-69, CMV (Q) últimos 34 aas	Sin lesiones necróticas. Multiplicación viral en hojas inoculadas		
		Quimera TAV aas 1-50, CMV(Q) últimos 50 aas	Infección sistémica, huésped susceptible		
		Quimeras con 50 o más aas de extremo terminal de CMV y resto de TAV	Infección sistémica, huésped susceptible		
Rad35 (IB)	Asintomático	P <sup>55</sup> →L <sup>55</sup>	Síntomas severos	<i>Nicotiana sp</i>	Xu <i>et al.</i> 2013
M1 (IA)	Asintomático	T <sup>18</sup> → M <sup>18</sup>	Síntomas severos	<i>N. benthamiana</i>	Maneechoat <i>et al.</i> 2015

## Efectos en la actividad supresora de la proteína 2b

Cepa	Actividad original	Sustitución, delección o adición	Actividad resultante	Especie de planta	Referencia
Fny (IA)	+	S <sup>40</sup> → A <sup>40</sup>	+	<i>N. tabacum</i> <i>N. benthamiana</i> <i>A. thaliana</i>	Lewsey <i>et al.</i> 2009
		S <sup>42</sup> → A <sup>42</sup>	+		
		Delección aas 1-17	-		
		Delección aas 22-27	-		
		Delección aas 33-36	-		
		Delección aas 39-57	-		
		Delección aas 95-110	+		
Rs (IA)	+	<sup>1</sup> MEL <sup>3</sup> → AAA	Atenuado	<i>N. clevelandii</i> <i>Ch. murale</i>	Nemes <i>et al.</i> 2014
		<sup>10</sup> NVE1 <sup>2</sup> → AAA	-		
		<sup>22</sup> KKQ <sup>24</sup> → AAA	-		
		<sup>25</sup> RRR <sup>27</sup> → AAA	+		
		<sup>31</sup> QNR <sup>33</sup> → AAA	-		
		<sup>34</sup> RER <sup>36</sup> → AAA	-		
		<sup>40</sup> SPS <sup>42</sup> → AAA	-		
		<sup>55</sup> LPF <sup>57</sup> → AAA	-		
		<sup>70</sup> HRV <sup>72</sup> → AAA	Apenas afectado		
Fny (IA)	+	Adición NLS de cepa LS (II)	Atenuado respecto a Fny	<i>N. benthamiana</i>	Du <i>et al.</i> 2014
Fny (IA)	+	Adición NES (NES-GFP-2b)	+	<i>N. benthamiana</i>	Datos propios
Rad35 (IB)	-	P <sup>55</sup> → L <sup>55</sup>	+	<i>N. benthamiana</i>	Xu <i>et al.</i> 2013
Fny (IA)	++	L <sup>15</sup> → A <sup>15</sup>	+, menor que Fny		Dong <i>et al.</i> 2015
		M <sup>18</sup> → A <sup>18</sup>			
		L <sup>15</sup> → A <sup>15</sup> + M <sup>18</sup> → A <sup>18</sup>			
SD (IB)	+	Delección aas 62-71	Disminuye mucho actividad respecto a SD	<i>N. benthamiana</i>	Ye <i>et al.</i> 2009
Q (II)	-	<sup>1</sup> MDVLTVVV <sup>8</sup> → <sup>1</sup> MELNEGAM <sup>8</sup> (aas de cepa SD, subgrupo IB)	Aumenta actividad supresora	<i>N. benthamiana</i>	Ye <i>et al.</i> 2009
M1 (IA)	+	T <sup>18</sup> → M <sup>18</sup>	+		Maneechoat <i>et al.</i> 2015

CM95 (IA)	Atenuado	C <sup>46</sup> → R <sup>46</sup> (cepa CM95 pasa a → CM95R)	+, más eficiente que CM95	<i>N. benthamiana</i>	Goto <i>et al.</i> 2007
Q (II)	+	<sup>22</sup> KRRRRR <sup>27</sup> → AAAAAA	-	<i>N. benthamiana</i>	Lucy <i>et al.</i> 2000
		<sup>23</sup> RRR <sup>25</sup> → QAQ	- (Algo de actividad)		
		R <sup>24</sup> → Q <sup>24</sup>	+		
		<sup>22</sup> KRRRRR <sup>27</sup> → AAAAAA + <sup>101</sup> KRRRRR <sup>106</sup> (prot. Original 100 aas)	-		
		Delección aas <sup>39</sup> KSPSE <sup>43</sup>	+, como cepa Q		
		Delección aas 85-100	+, como cepa Q		
Q (II)	+	Sustitución K <sup>22</sup> → R <sup>22</sup>	+	<i>N. benthamiana</i>	Li <i>et al.</i> 2011
		Sustitución K <sup>22</sup> → R <sup>22</sup> + K <sup>39</sup> → R <sup>39</sup>	Menor que Q		
		Sustitución S <sup>40</sup> → A <sup>40</sup>	-		

### Interacción de la proteína 2b con AGO

Cepa	Interacción con AGO	Sustitución o delección	Interacción resultante	Especie de planta	Referencia
Fny (IA)	+	Delección aas 1-17 Delección aas 22-27 Delección aas 33-36 Delección aas 22-27 + 33-36 Delección aas 39-57 S <sup>40</sup> → A <sup>40</sup> S <sup>42</sup> → A <sup>42</sup> Delección aas 62-65 Delección aas 95-110	+	<i>N. benthamiana</i>	Datos propios
Rad35 (IB)	No	P <sup>55</sup> → L <sup>55</sup>	Sí (AGO1)	<i>Arabidopsis</i>	Xu <i>et al.</i> 2013



## Unión a ácidos nucleicos

Cepa	Unión siRNA Original	Sustitución, delección o adición	Unión siRNA resultante	Método	Referencia
Fny (IA)	+	Delección aas 1-17	+	<i>In vitro</i>	Datos propios
		Delección aas 22-27	-		
		Delección aas 33-36	-		
		Delección aas 22-27 + 33-36	-		
		Delección aas 39-57	-		
		S <sup>40</sup> → A <sup>40</sup>	+		
		S <sup>42</sup> → A <sup>42</sup>	+		
		Delección aas 62-65	++		
Fny (IA)	+	Adición NLS de cepa LS	+	<i>In vitro</i>	Du <i>et al.</i> 2014
Fny (IA)	+	L <sup>15</sup> → A <sup>15</sup> , M <sup>18</sup> → A <sup>18</sup>	Muy disminuida	<i>In vitro</i>	Dong <i>et al.</i> 2015
		Sólo 61 aas prot.			
		L <sup>15</sup> → A <sup>15</sup>			
		M <sup>18</sup> → A <sup>18</sup>			
*TAV-2b	Unión a siRNA	L <sup>8</sup> → A <sup>8</sup> , I <sup>11</sup> → A <sup>11</sup> , L <sup>15</sup> → A <sup>15</sup> , M <sup>18</sup> → A <sup>18</sup> (cremallera de leucinas)	Unión a ds siRNA	EMSA	Chen <i>et al.</i> 2008
		P <sup>41</sup> → A <sup>41</sup>	Disminución unión a RNA 10 veces		
		W <sup>50</sup> → R <sup>50</sup>	Disminución unión a RNA 2 veces		
		W <sup>50</sup> → A <sup>50</sup>	Disminución unión a RNA 5 veces		
		<sup>28</sup> RH <sup>29</sup> → <sup>28</sup> AA <sup>29</sup>	Disminución unión a RNA 10 veces		
CM95 (IA)	Poca unión a siRNAs	C <sup>46</sup> → R <sup>46</sup>	Unión a siRNAs	<i>the wheat germ in vitro translation system</i>	Goto <i>et al.</i> 2007
CM95R (IA)	+	Delección aas 22-27 + 33-36	-	<i>the wheat germ in vitro translation system</i>	Goto <i>et al.</i> 2007

## Efectos en el movimiento del virus

Cepa	Movimiento original	Sustitución o delección	Movimiento resultante	Especie de planta	Referencia
Rs (IA)	Célula-célula	<sup>1</sup> MEL <sup>3</sup> → AAA <sup>70</sup> RHV <sup>72</sup> → AAA		<i>N. clevelandii</i> <i>Ch. murale</i>	Nemes <i>et al.</i> 2014
Rs (IA)	Sistémico	<sup>95</sup> DDTD <sup>98</sup> → AAAA	Retraso en movimiento sistémico	<i>N. clevelandii</i> <i>N. glutinosa</i>	Géllert <i>et al.</i> 2012
Q (II)	Sistémico	Delección 2b (Q-CMVΔ2b)	No movimiento sistémico	<i>C. sativus</i> Tabaco	Ding <i>et al.</i> 1995
		Delección aas <sup>39</sup> KSPSE <sup>43</sup>	Menor movimiento que cepa wt		
		Delección aas 84-100 (C-terminal conservado)	Menor movimiento que cepa wt		
Q (II)	Sistémico	Sustitución K <sup>22</sup> → R <sup>22</sup>	sistémico	<i>N. benthamiana</i>	Li <i>et al.</i> 2011
		Sustitución K <sup>22</sup> → R <sup>22</sup> + K <sup>39</sup> → R <sup>39</sup>	reducido		
		Sustitución S <sup>40</sup> → A <sup>40</sup>	no		

## Interacción de la proteína 2b con AGO

Cepa	Interacción con AGO	Sustitución o delección	Interacción resultante	Especie de planta	Referencia
Fny (IA)	+	Delección aas 1-17	+	<i>N. benthamiana</i>	Datos propios
		Delección aas 22-27			
		Delección aas 33-36			
		Delección aas 22-27 + 33-36			
		Delección aas 39-57			
		S <sup>40</sup> → A <sup>40</sup>			
		S <sup>42</sup> → A <sup>42</sup>			
		Delección aas 62-65			
Rad35 (IB)	No	Delección aas 95-110	Sí (AGO1)	<i>Arabidopsis</i>	Xu <i>et al.</i> 2013
		P <sup>55</sup> → L <sup>55</sup>			

