

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Desarrollo de un vector de expresión tripartita
derivado de *Euphorbia mosaic virus***

Jorge Alberto Salazar González

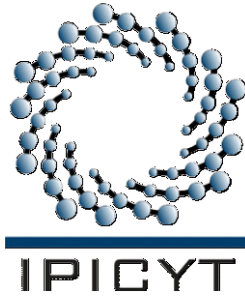
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre del 2012



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Desarrollo de un vector de expresión tripartita derivado de Euphorbia mosaic virus**” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jorge Alberto Salazar González** y aprobada el **25 de Octubre del 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
(Director de la tesis)

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Miembro del Comité Tutoral)

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
(Miembro del Comité Tutoral)

Dr. Sergio Casas Flores
(Miembro del Comité Tutoral)

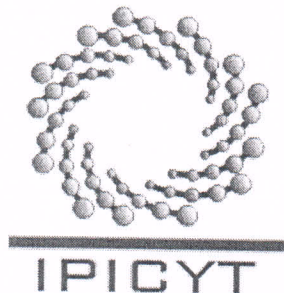


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro: 250289) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El proyecto de investigación descrito en esta Tesis fue financiado con recursos otorgados al Dr. Gerardo Argüello Astorga por el CONACYT (Proyecto SEP 84004)



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 105 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de noviembre del año 2012, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Sinodal	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Jorge Alberto Salazar González

sobre la Tesis intitulada:

Desarrollo de un vector de expresión tripartita derivado de EuMV

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga


El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de noviembre de 2012.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mis padres y hermanos que en todo momento estuvieron ahí para apoyarme y salir adelante en el transcurso de mi formación personal y académica.

A mi esposa Valeria que ha sido mi constante inspiración y motivo para salir a delante y superarme.

Agradecimientos

Al Dr. Gerardo Argüello que sin su guía no hubiera sido posible concretar este proyecto.

Al Dr. Ángel Alpuche que ha formado parte de mi desarrollo profesional y personal y con el cual estoy constantemente en deuda por todo lo que me ha aportado.

A mis amigos quienes han estado en esos momentos importantes siendo parte de felicidades y amarguras, pero siempre apoyándome para seguir adelante.

A todos los profesores de la división de Biología Molecular que han sido pieza clave en mi desarrollo profesional impartiendo conocimiento y plantando la semilla de la curiosidad científica que hoy me ha llevado a complementar toda la información que ellos me han proporcionado.

Al Biol. Salvador Ambriz Granados por su colaboración y apoyo técnico en distintas etapas del proyecto.

Al IPICYT institución que me ha acogido y a todos sus planta de trabajadores en el transcurso de la maestría.

Al CONACYT por la beca otorgada y la aprobación del proyecto.

A Dios que es mi todo, por quien soy lo que soy y me debo enteramente a Él, que sin su amor y ayuda no hubiera logrado y sido la persona que soy, le agradezco por todas las bendiciones que me ha dado y por poner a todas las personas que me han formado personal y profesionalmente en mi vida.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	ix
Anexos	x
Resumen	Xi
Abstract	Xii
Introducción	1
Estrategia y resultados	14
Diseño de un sistema tripartita con componentes interdependientes	14
Generación de primer componente del sistema de expresión tripartita, el componente DNA-A $TrAP^sREn^s$	16
Generación de otra variante del primer componente del sistema de expresión tripartita, el componente DNA-A $TrAP^fREn^f$	21
Caracterización biológica de la mutante DNA-A $TrAP^sREn^s$	24
Generación del tercer componente del sistema de expresión tripartita, el componente DNA-C ΔCP	27
Ensayo <i>in-vitro</i> de actividad de la construcción pGEM 1350+GFP	29
Discusión	32
Materiales y métodos	35
Plásmidos	35

Generación de componentes del sistema tripartita	35
Ensayo <i>in-vitro</i> de actividad de la construcción pGEM 1350+GFP	38
Ensayos de infección	39
Referencias	40
Figuras suplementarias	45

Lista de figuras

1. Clasificación de la familia <i>Geminiviridae</i>	3
2. Organización genómica de begomovirus del continente americano	5
3. Arreglo de los sitios de unión potenciales de la proteína Rep (“iterones”) en el origen de replicación de EuMV-Jal y sus parientes	7
4. Esquema simplificado del Sistema Tripartita de Componentes Interdependientes	17
5. Generación de mutaciones silenciosas por PCR splicing	19
6. Generación del primer componente DNA A $TrAP^sREn^s$	20
7. Generación de una variante del primer componente, el DNA A $TrAP^fREn^f$	23
8. Caracterización biológica de la mutante DNA-A $TrAP^sREn^s$	26
9. Generación del componente EuMV C+GFP	30
10. Ensayo de expresión en protoplastos	31

Lista de tablas

1. Proteínas expresadas utilizando vectores virales derivados de geminivirus.	11
-------------------------------------------------------------------------------	----

Anexos

Figuras suplementarias

S1. Figura suplementaria:Desarrollo de la construcción pGEM 1350+GFP	45
S2. Figura suplementaria: Expresión de GFP en protoplastos vista bajo filtro de luz azul en estereoscopio	46
S3. Figura suplementaria: Amplicones generados por oligonucleótidos XXX para producir una serie de componentes DNA-C	47

Resumen

Desarrollo de un sistema de expresión tripartita derivado de *Euphorbia mosaic virus*.

Los geminivirus constituyen una de las dos familias más diversificadas de virus de plantas, y se caracterizan por la especial morfología de sus viriones y su genoma de DNA de cadena sencilla, que se replica en el núcleo de las células. El subgrupo más numeroso de la familia *Geminiviridae* es el género *Begomovirus*, que incluye algunos de los patógenos más devastadores de cultivos agrícolas en el mundo. La naturaleza de su material genético y el reducido tamaño de sus componentes genómicos (<3 Kb) hacen a los begomovirus muy atractivos para el desarrollo de vectores de expresión en sistemas vegetales. Sin embargo, los vectores derivados de estos virus no han mostrado ser eficaces para expresar genes heterólogos mayores a ~800 pb. en tejidos vegetales, ya que los vectores con un tamaño superior a los componentes genómicos nativos son inestables, y sufren rearrreglos genéticos al moverse de célula a célula. En el presente trabajo describimos una nueva estrategia para la generación de vectores de expresión derivados de begomovirus, y construimos un sistema de tres componentes virales interdependientes a partir de los componentes genómicos de *Euphorbia mosaic virus*-Jal, un begomovirus que tiene características poco comunes entre los miembros de su género, como la capacidad de infectar células del mesófilo, donde la producción de proteínas es más elevada. Se generaron los tres componentes del nuevo sistema de vectores, y se demostró que el componente que porta el gen reportero es funcional, ya que su producto, la proteína verde fluorescente (GFP), fue producida eficientemente en protoplastos de tabaco.

PALABRAS CLAVE:

Begomovirus, vector de expresión, proteínas recombinantes, plantas

Abstract

Development of a tripartite vector system derived from *Euphorbia mosaic virus* for expression of recombinant proteins in plants

The geminiviruses constitute the most diverse family of DNA plant viruses, and are characterized by a unique morphology of their virions, and a genome composed by one or two circular, single stranded DNA molecules, that replicate in the cell nucleus. The largest subgroup of the family *Geminiviridae* is the genus *Begomovirus*, which includes some of the most devastating pathogens of agricultural crops in the world. The nature of their genetic material, and the small size of the genomic components (<3 Kb) of begomoviruses make them very attractive for the development of expression vectors in plants. However, the begomovirus-based vectors have not been shown to be effective in expressing heterologous genes over a ~ 800 bp. length in plant tissues, because of vectors larger than the native genomic components are unstable and undergo genetic rearrangements when moving from cell to cell. In this paper we describe a new strategy for generating begomovirus-based expression vectors, and generated a system of three interdependent viral components from *Euphorbia mosaic virus* genomic components. EuMV is a begomovirus that has unusual features among members of the family *Geminiviridae*, e.g., the ability to infect mesophyll cells, where protein production is higher than that in vascular tissues, where most geminiviruses are confined. All components of the new vector system were generated, and it was demonstrated that the viral component which carries the reporter gene is functional because its product, the green fluorescent protein (GFP), was produced efficiently in tobacco protoplasts.

KEYWORDS

Begomovirus, expression vector, recombinant proteins, plants

Introducción

Los geminivirus son un grupo muy diversificado de patógenos de plantas cuyo genoma consiste de una o dos moléculas circulares de DNA de cadena sencilla (ssDNA), de ~2.6 a 3 Kb de longitud, encapsuladas dentro de viriones que semejan dos icosaedros incompletos fusionados, con un diámetro de ~18 nm y una longitud de ~30 nm (Zhang et al., 2001). Los geminivirus son transmitidos por insectos fitófagos del orden Hemiptera, e infectan a una gran variedad de plantas mono- y dicotiledóneas en todas las regiones cálidas y templadas del mundo (Goodman, 1977; Harrison et al., 1977; Zhang et al., 2001; Stanley et al., 2005). Estos virus han sido clasificados en cuatro géneros con base en su organización genómica, planta huésped e insecto vector: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus* (Fauquet y Stanley, 2005; Fauquet et al., 2008). El género *Mastrevirus* incluye virus con genomas monopartitas que son transmitidos por diversas especies de chicharritas de la familia *Cicadellidae* (v.gr: *Cicadulina mbila*, *Nesoclutha pallida* y *Psammotettix alienus*) e infectan tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Los miembros del género *Curtovirus* poseen un solo componente genómico, infectan plantas dicotiledóneas y son transmitidos por chicharritas de las especies *Circulifer tenellus* y *Circulifer haematoceps* (*Cicadellidae*). El género *Topocuvirus* incluye un solo miembro, *Tomato pseudocurly top virus*, el cual posee un genoma monopartita, infecta a plantas dicotiledóneas y es transmitido por la chicharrita saltadora *Micrutalis malleifera*, de la familia *Membracidae*. El cuarto género, *Begomovirus*, agrupa a los geminivirus transmitidos por la mosquita blanca, *Bemisia tabaci* (familia *Aleyrodidae*), los cuales poseen un genoma monopartita o bipartita, constituido en

este último caso por dos componentes genómicos, designados A y B, e infectan solamente a plantas dicotiledóneas. Los begomovirus (BGVs) conforman el grupo más diversificado de la familia *Geminiviridae*, con más de 230 especies descritas, y es el único género que incluye virus con genomas bipartitas (Fig. 1a). Las relaciones filogenéticas entre la mayoría de los geminivirus reflejan su distribución geográfica; por ejemplo, la mayoría de los BGVs se agrupan en linajes biogeográficos, de acuerdo a sus secuencias genómicas completas (Rybicki, 1994; Harrison y Robinson, 1999). Todos los BGVs nativos del Nuevo Mundo (NM) son bipartitas, en tanto que los BGVs del Viejo Mundo (VM) incluyen tanto especies bipartitas como monopartitas, estos últimos asociados frecuentemente a un DNA satélite (Rybicki, 1994; Rojas et al., 2005). Entre las características que distinguen a los BGVs del NM destaca la ausencia del gen V2, que en los BGVs del VM codifica a una proteína involucrada en el movimiento del virus, y la conservación del motivo PWRsMaGT en el dominio N-terminal de la proteína de la cápside (CP), el cual está ausente en los virus del VM (Harrison et al., 2002).

La organización genómica de un representante típico de cada uno de los géneros de la familia *Geminiviridae* se ilustra en la figura 1. En general, los genomas constan de una o dos moléculas circulares de ssDNA, las cuales contienen varios genes en un arreglo que maximiza el almacenamiento de información, incluyendo el traslape parcial de los genes que se transcriben en el mismo sentido. El BGV bipartita *Euphorbia mosaic virus* (EuMV), que infecta malezas y plantas cultivadas como chile y frijol en México (Hernández-Zepeda et

al., 2009, Gregorio-Jorge et al., 2010) presenta la organización genómica característica de los BGVs del continente americano (Fig. 2).

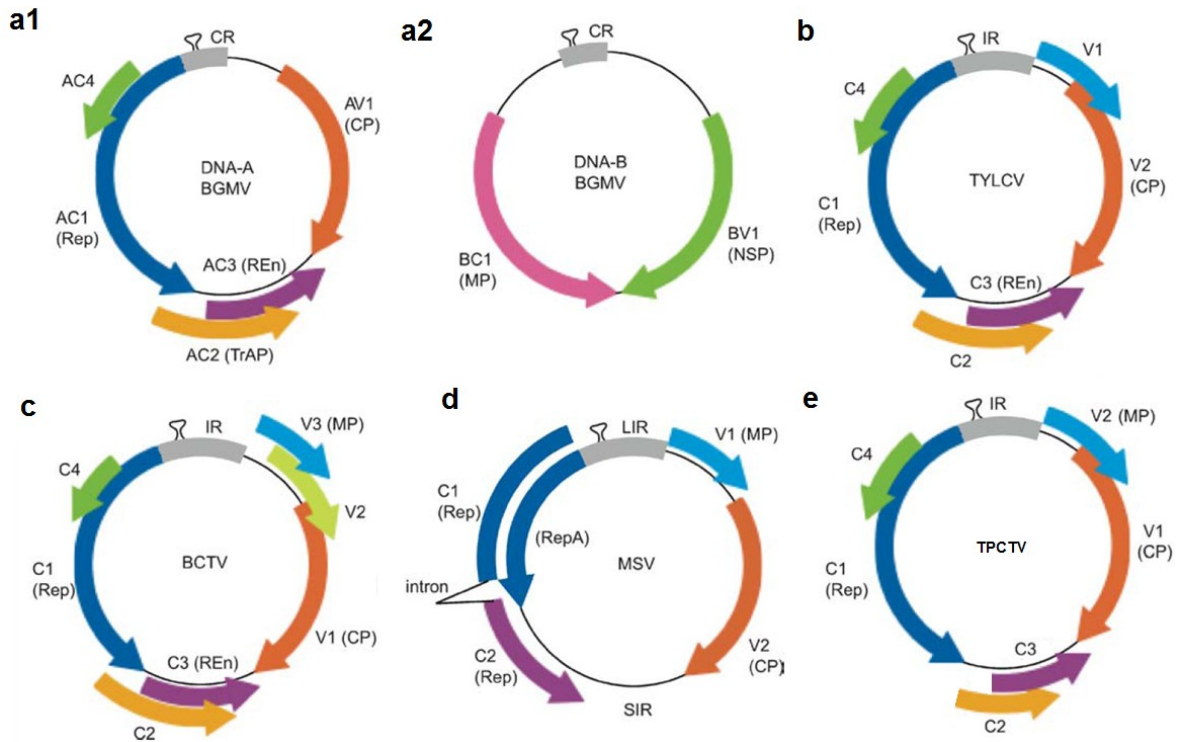


Figura 1. Clasificación de la familia *Geminiviridae*. Los cuatro géneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*) en los que se divide a la familia se definen con base en la organización genómica, en los vectores transmisores (*Cicadulina mbila*, *Circulifer tenellus*, *Micrutalis malleifera* y *Bemisia tabaci*), así como los hospederos que infectan (mono- o dicotiledóneas). En el esquema se muestra la organización genómica de un representante de cada género. Los marcos de lectura se representan como flechas anchas de diferente color. Dentro de la región común (CR) se señala el origen de replicación como una estructura tallo-asa, conservada en todos los geminivirus. (a1, a2) Organización genómica del begomovirus bipartita *Bean golden mosaic virus*. (b) Organización genómica del begomovirus monopartita *Tomato yellow leaf curl virus*. (c) Organización genómica del curtovirus *Beet curly top virus*. (d) Organización genómica del mastrevirus *Maize streak virus*. (e) Organización genómica del topocuvirus *Tomato pseudo-curly top virus*.

Su genoma está compuesto por dos moléculas denominadas DNA-A y DNA-B. La molécula del DNA-A mide 2609 nt y contiene cinco ORFs (*AC1 (Rep)*, *AC2 (TrAP)*, *AC3 (REn)*, *AC4*, y *AV1 (CP)*) involucrados en la replicación y transcripción del virus, así como en la supresión de las respuestas de silenciamiento de la planta. El gen *AV1* o *CP* codifica para la proteína de la cápside, que se organiza en 22 pentámeros (110 unidades monoméricas de CP) para darle forma a la cápside bigeminada (Zhang et al., 2001). Además de su función estructural la CP posee en su dominio N-terminal señales de localización nuclear o SLN (Unsel et al., 2001, Guerra-Peraza et al., 2005), y el dominio central contiene secuencias de exporte nuclear, que dirigen las proteínas del núcleo al citoplasma y a la periferia celular, y también interactúa con carioferinas (importinas) alfa, lo que es congruente con su función como proteína de transporte núcleo-citoplasma en los BGVs monopartitas. (Kunik et al., 1999, Gafni y Epel, 2002, Kass et al., 2006).

En los genomas de los BGVs bipartitas, un segmento de ~ 200 pb de la región intergénica (IR) está altamente conservada entre los componentes A y B del mismo virus, por lo que se denomina Región Común (CR). Este segmento genómico alberga un elemento conservado con el potencial de formar una estructura de tallo-asa, la cual exhibe en su ápice un nonanucleótido (TATAATT*AC) altamente conservado en todos los geminivirus, que es un blanco funcional de la proteína Rep. Esta proteína inicia la replicación del DNA viral por un mecanismo de círculo rodante (RCR) al introducir un corte endonucleolítico en la cadena (+) dentro de la secuencia nonamérica antes mencionada.

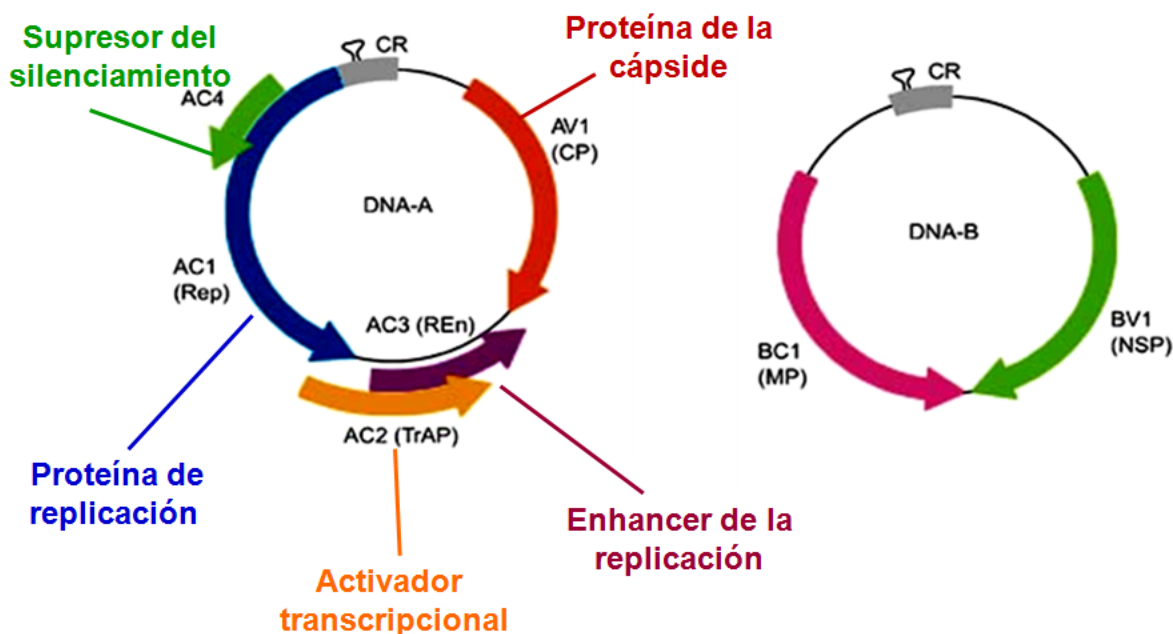


Figura 2. Organización genómica de los begomovirus del continente americano. Representación gráfica del genoma de *Euphorbia mosaic virus* y las principales funciones de sus proteínas (Modificado de Rojas et al., 2005).

Una vez generado un extremo 3'-OH libre, las polimerasas del huésped extienden la cadena de DNA usando como molde la cadena viral de sentido negativo (-), que permanece intacta. Cuando la DNA polimerasa copia un nuevo origen de replicación, Rep introduce un corte en la secuencia TAATATT*AC regenerada, e inmediatamente liga los extremos de la molécula de ssDNA circular generada en el proceso (Heyraud-Nitschke et al., 1995; Laufs et al., 1995). A pesar de que todos los geminivirus poseen un elemento tallo-asa similar, la proteína Rep de un virus dado no es capaz, por lo general, de promover la replicación de los componentes genómicos de especies virales diferentes. Esto se debe a que la

proteína Rep no se une con alta afinidad a las secuencias de la horquilla, sino a otros elementos presentes en múltiples copias en la región del origen de replicación, llamados “iterones” (Argüello-Astorga et al., 1994). Estos elementos son secuencias cortas (5-8 nt) que se encuentran como repetidos directos e invertidos organizados en una configuración característica de cada linaje viral, y que funcionan como sitios de unión de Rep (Fig. 3). Los iterones son elementos críticos para el reconocimiento específico del origen de replicación por parte de Rep, y para la represión transcripcional de su propio gen (Sunter et al., 1993; Eagle y Hanley-Bowdoin, 1997). En adición a su función como proteína iniciadora de la RCR, Rep interfiere el ciclo celular del huésped, interactuando con un regulador crítico de dicho ciclo, la proteína relacionada a retinoblastoma (pRBR), y con el antígeno nuclear de células en proliferación, PCNA (Bagewadi et al., 2004) promoviendo el tránsito de las células infectadas a la fase S del ciclo celular (Gutierrez, 2000; Hanley-Bowdoin et al., 2004). El gen AC3 codifica para la proteína REn (“Replication Enhancer protein”) que es un potenciador de la replicación, y que al igual que Rep tiene la capacidad de unirse a pRBR (Kong et al., 2000;), a PCNA (Settlage et al., 2001; Hanley-Bowdoin et al., 2004) y a factores de transcripción de la superfamilia NAC (Selth et al., 2005). REn es también un factor de patogenicidad, ya que virus mutantes en esta proteína inducen síntomas atenuados, además de mostrar una replicación reducida (Hormuzdi y Bisaro, 1995; Morris et al., 1991; Sung y Coutts, 1995).

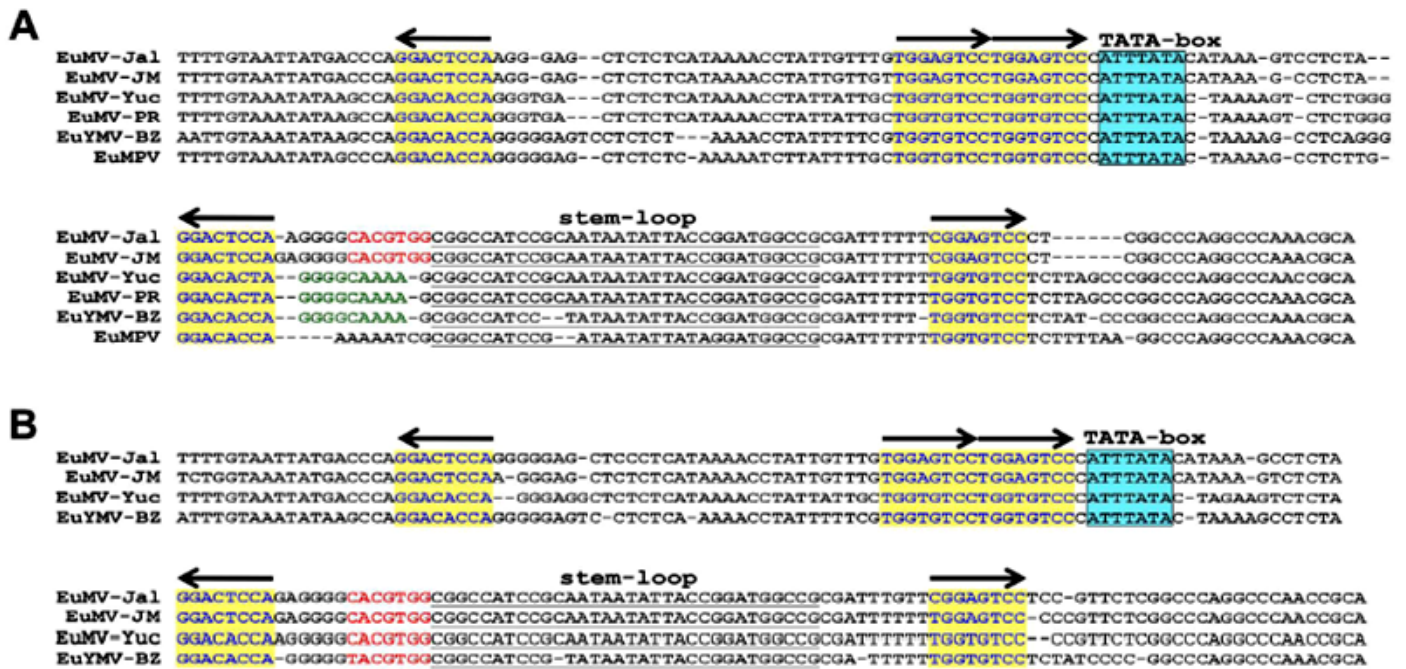


Figura 3. Arreglo de los sitios de unión potenciales de la proteína Rep (“iterones”) en el origen de replicación de EuMV-Jal y sus parientes. Los iterones son indicados con flechas. A, origen de replicación del DNA-A; B, origen de replicación del DNA-B. EuMV-Jal, *Euphorbia mosaic virus*- Jalisco; EuMV-JM, *Euphorbia mosaic virus*-Jamaica; EuMV-Yuc, *Euphorbia mosaic virus*- Yucatán; EuMV-PR, *Euphorbia mosaic virus*- Puerto Rico; EuYMV-BZ, *Euphorbia yellow mosaic virus*- Brasil; EuMPV, *Euphorbia mosaic Peru virus*. (Reproducido de Gregorio-Jorge et al., 2010)

REn interactúa directamente con Rep e induce la acumulación de DNA viral, y se ha observado que el grado de homo-oligomerización de REn es proporcional a la actividad de ATPasa de Rep (Pasumarthy et al., 2010).

El gen *AC2* codifica para la proteína TrAP (Trans-Activation Protein) la cual activa a los genes tardíos *CP* y *NSP* (Sunter y Bisaro, 1992; Sunter y Bisaro, 1997). Esta transactivación es mediada, al menos en algunos casos, por secuencias denominadas “Elementos Tardíos Conservados” (CLEs) presentes en los promotores de esos genes (Argüello-Astorga et al., 1994; Ruiz-Medrano et al., 1999). TrAP también actúa como un supresor del silenciamiento transcripcional uniéndose a la adenosín-cinasa (ADK), interacción que reduce el silenciamiento mediado por metilación de DNA (Wang et al., 2005). TrAP posee en su dominio N-terminal una SLN que permite el acceso al núcleo para trans-activar genes virales, así como algunos genes de la planta; este dominio también está relacionado con el mecanismo de silenciamiento post-transcripcional (PTGS), pues activa los genes que codifican supresores del silenciamiento endógenos del huésped (Trinks et al., 2005). La función de la proteína codificada por el gen *AC4* no ha sido bien caracterizada en BGVs del continente americano (Pooma & Petty, 1996; Fontenelle et al., 2007), pero en BGVs bipartitas del VM actúa como un supresor del silenciamiento y como un determinante de patogenicidad (Vanitharani et al., 2004; Piroux et al., 2007), y en algunos begomovirus monopartitas se ha visto involucrada en el movimiento célula a célula (Rojas et al., 2001).

El segundo componente genómico de EuMV, el DNA-B, mide 2590 nt y contiene dos ORFs, *BV1* o *NSP*, y *BC1* o *MP* (Gregorio-Jorge et al., 2010)

involucrados en el movimiento intra- e inter-celular del virus a lo largo de la planta. Como su predecesor evolutivo (CP), la proteína NSP se une a ssDNA y dsDNA de modo no específico de secuencia, pero sí del tamaño y forma de la molécula de DNA (Sanderfoot y Lazarowitz, 1996; Ward y Lazarowitz, 1999; Rojas et al., 1998; Kass et al., 2006). Está bien establecido que las proteínas NSP (o BV1) y MP (o BC1) coordinan el movimiento del DNA viral a través de la membrana nuclear y de los plasmodesmos (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot y Lazarowitz, 1996; Gafni y Epel, 2002). Se han identificado varios factores del huésped que interactúan con NSP, incluyendo una acetil-transferasa de *Arabidopsis thaliana* y una proteína-kinasa de tipo receptor (RLK) de tomate y soya (Mariano et al., 2004, McGarry et al., 2003). Basándose en las interacciones diferenciales de las acetiltransferasas con NSP y CP, se ha propuesto que la acetilación puede estar involucrada en la segregación de las moléculas de ssDNA viral para el movimiento y la encapsidación, respectivamente. La proteína de movimiento (MP) codificada por el gen *BC1*, desempeña la función de movilizar el DNA viral de célula a célula, en conjunto con NSP. Esta proteína interactúa con algunos factores de la célula para aumentar el tamaño de exclusión de los plasmodesmos, condición necesaria para realizar la función de movilización intercelular del DNA viral (Noueiry et al. 1994).

Desde que se caracterizaron molecularmente los primeros geminivirus y se describió su mecanismo de replicación, los biotecnólogos interesados en expresar proteínas recombinantes en sistemas vegetales los consideraron entidades ideales para desarrollar vectores de expresión. Su capacidad para replicarse dentro del núcleo de la célula, así como la naturaleza de su material genético

(DNA) y el tamaño reducido de su genoma, características que facilitan su manipulación y clonación en plásmidos de *E. coli*, los hace atractivos para diversas aplicaciones biotecnológicas. En las últimas dos décadas se han realizado varios esfuerzos para producir vectores derivados de geminivirus. En uno de los primeros trabajos en que se exploró el potencial de los BGVs como vectores, se utilizó a *African cassava mosaic virus* (ACMV) como modelo, reemplazando al gen *CP* con el gen reportero *CAT*, que codifica para la enzima cloranfenicol acetil-transferasa. Con este vector se logró una producción de 80 U/mg de proteína soluble total (Ward et al., 1988). Subsecuentemente, varios grupos desarrollaron geminivirus recombinantes para crear sistemas de amplificación de DNA y producción de proteínas heterólogas (ver Tabla 1), los cuales tienen ventajas sobre otros vectores virales de plantas por su capacidad para replicar varios genes simultáneamente (Huang et al., 2010). Entre los vectores derivados de geminivirus que han mostrado mayor versatilidad y capacidad de producción proteínica en sistemas vegetales, destacan los derivados del mastrevirus *Bean yellow dwarf virus*, que ha sido utilizado de modo muy exitoso para la producción de vacunas y de anticuerpos monoclonales en plantas

Tabla 1. Proteínas expresadas utilizando vectores virales derivados de geminivirus.

Proteína expresada	Nombre del virus	Proteína producida	Referencia
CAT	ACMV	80 U*/mg PTS	Ward et al., 1988
NPTII, CAT, β Galactosidasa	WDV	NR	Matzeit et al., 1991
BAR	MSV	NR	Palmer et al., 1999
GUS, GFP	BeYDV	NR	Mor et al., 2003
NVCP	BeYDV	1.2% PST	Zhang y Mason, 2006
GFP	BCTV	NR	Kim et al., 2007
HBcAG	BeYDV	0.8 mg/g PF	Huang et al., 2009
NVCP	BeYDV	0.34 mg/g PF	Huang et al., 2009
mAb6D8	BeYDV dual	0.5 mg/g PF	Huang et al., 2010
HVP L1 Cápside	BeYDV	0.55 mg/g PF	Regnard et al., 2010
HIV p24	BeYDV	0.003 mg/g PF	Regnard et al., 2010

Abreviaturas: CAT: Cloranfenicol acetil-transferasa; NPT II: neomicina fosfotransferasa; *BAR*: gen de resistencia a fosfotricina; GUS: β -glucuronidasa; GFP: proteína verde fluorescente; NVCP: proteína de la cápside del virus Norwalk; HBcAG: proteína del núcleo del virus de hepatitis B; mAb6D8: anticuerpo contra la glicoproteína GP1 del virus del Ebola; HVP: virus del papiloma humano; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; PST: proteína soluble total, U*: unidades de actividad específica; PF: peso fresco; NR: no reportado.

(revisado en Chen et al., 2011). En contraste, los vectores derivados de begomovirus no han mostrado ser muy efectivos para aplicaciones análogas. Una seria limitación que tiene el uso de BGVs en biotecnología estriba en que el tamaño del vector (con el gen de interés incluido) debe ser similar al de los componentes genómicos del virus. En efecto, diversos trabajos experimentales han demostrado que los vectores con un tamaño superior (~ 200 pb o más) al DNA viral nativo experimentan re-arreglos genéticos, de tal forma que el vector se reduce a un tamaño similar al los componentes genómicos silvestres, con la pérdida concomitante (y aparentemente aleatoria) de una parte de las secuencias que no son esenciales para la replicación y movimiento del virus (Hayes et al., 1989; Elmer et al., 1990; Gilbertson et al., 2003).

Entre las estrategias propuestas para superar esa limitación de los vectores derivados de begomovirus, está el desarrollo de sistemas tripartitas, que incluye el uso de los dos componentes genómicos (A y B) silvestres, y un tercer componente genómico generado artificialmente, el cual debe contener el origen de replicación del mismo virus, y un gen de interés fusionado a un promotor viral fuerte. Este tipo de sistemas se ha construido y probado en diferentes laboratorios, sin mayor éxito hasta el momento, pues en el curso de la infección de la planta el tercer componente tiende a perderse. Observaciones en nuestro grupo y otros laboratorios (Rivera-Bustamante y González-Guevara, comunicación personal) llevan a la conclusión de que este fenómeno se debe al hecho de que los dos componentes virales silvestres, que sustentan la replicación y el movimiento del componente artificial, no requieren al tercer componente para el proceso de

infección, y por lo tanto no existe presión selectiva alguna para mantener la combinación de tres componentes virales.

En el presente trabajo desarrollamos una estrategia alternativa para la construcción de un sistema de vectores derivados de BGVs, que podría superar algunas de las limitaciones de sistemas anteriores, e iniciamos su implementación utilizando los componentes genómicos del BGV bipartita EuMV-Jal. Este virus, nativo de México, posee algunas características poco comunes entre los BGVs, como son las de infectar a plantas pertenecientes a distintas familias (*Euphorbiaceae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae* y *Fabaceae*) (Costa y Bennett, 1950; Hernández-Zepeda et al., 2007), y la de no quedar confinado al floema de la planta, sino que se moviliza tanto al tejido vascular como al mesófilo de las hojas, donde la producción de proteínas es más abundante (Kim y Fulton, 1983). Estas características resultan muy convenientes para un vector de expresión de proteínas recombinantes en sistemas vegetales.

Estrategia y resultados.

Diseño de un sistema tripartita con componentes interdependientes.

Examinando las causas probables por las que los sistemas de vectores tripartitas no son estables en las plantas, concluimos junto con otros investigadores que han examinado experimentalmente esa clase de sistemas (Ramón González-Guevara, Roberto Ruiz-Medrano y Rafael Rivera-Bustamante, comunicación personal) que la razón más plausible de esa inestabilidad es que el componente sintético portador del gen de interés (el “tercer componente”) no influye en modo alguno en la replicación y movimiento de los dos componentes silvestres del sistema. Consecuentemente, el tercer componente tiende a “diluirse” y finalmente a perderse, conforme los elementos virales se mueven en la planta desde la zona de inoculación. Razonando que este problema podría resolverse haciendo indispensable al tercer componente para el funcionamiento de todo el sistema viral, diseñamos varios esquemas posibles para crear un sistema tripartita de componentes interdependientes, y elegimos uno de esos esquemas para implementarlo y someterlo a prueba experimental. Descrito de modo sucinto, el sistema ideado incluye los siguientes componentes: 1) un derivado del DNA-A de EuMV-Jal en el que los genes *AC2 (TrAP)* y *AC3 (REn)* estarán mutados, y que por lo tanto requerirá de la aportación en *trans* de las proteínas codificadas por esos genes para replicarse eficientemente, y también para expresar al gen tardío *CP*, dependiente de TrAP; 2) el componente B silvestre de EuMV, que proveerá las proteínas BV1 y BC1 para el movimiento de todos los componentes virales, pero que requiere de TrAP para que la expresión de ambos genes se active; 3) un

componente “C”, derivado del DNA-A de EuMV, el cual tendrá intactos los genes *AC2* (*TrAP*) y *AC3* (*REn*), pero que carecerá de genes *AC1*, *AC4* y *CP* funcionales. En este componente “C” se colocará al gen que se desea expresar, bajo el control del promotor *CP*, que es activado por TrAP. El esquema simplificado de este sistema se presenta en la figura 4.

Si bien el esquema previo describe una forma sencilla de crear un sistema de tres componentes interdependientes, resulta claro que existen varias combinaciones alternativas para generar ese tipo de sistemas. Por ejemplo, podría mutarse *AC4* y *AC3* en el componente A* (el asterisco indica un componente genómico modificado), y construir un componente C que contenga y exprese esos genes, pero que carezca de *AC1* y *AC2* funcionales. De modo similar, podría generarse un componente B* que careciera del gen *BV1*, y un componente A* en el que el gen *CP* sea reemplazado por *BV1*, etc. También es factible generar sistemas tripartitas en los que los componentes A* y B* sean invariables, pero que difieran en su tercer componente, de tal modo que podrían examinarse una variedad de componentes “C” con distintas configuraciones de regiones codificantes y no codificantes, y determinar cuál de ellas resulta más eficiente para la expresión de genes heterólogos en plantas. Estos potenciales componentes C con diferente estructura genética tendrían, como rasgo común, un gen *CP* parcialmente deletado, y un sitio múltiple de clonación (MCS) en fase traduccional con el primer codón (ATG) de *CP*, a efecto de producir proteínas de fusión.

Generación del primer componente del sistema de expresión tripartita, el componente DNA-A *TrAP^sREn^s*.

Se utilizaron dos estrategias para generar mutantes del DNA-A de EuMV con pérdida de función de los genes *TrAP* y *REn*, esto con el objeto de incluir los correspondientes genes funcionales en un tercer componente sintético, y crear así una interdependencia entre todos los elementos del sistema. Para llevar a cabo la primera estrategia se diseñaron un par de oligonucleótidos mutagénicos con el propósito de generar codones de paro prematuros en los genes *TrAP* y *REn*, generando de ese modo un DNA-A mutante que presumiblemente codifica proteínas no funcionales. Esto se llevó a cabo por medio de la técnica de “PCR-splicing” (ver Materiales y métodos).

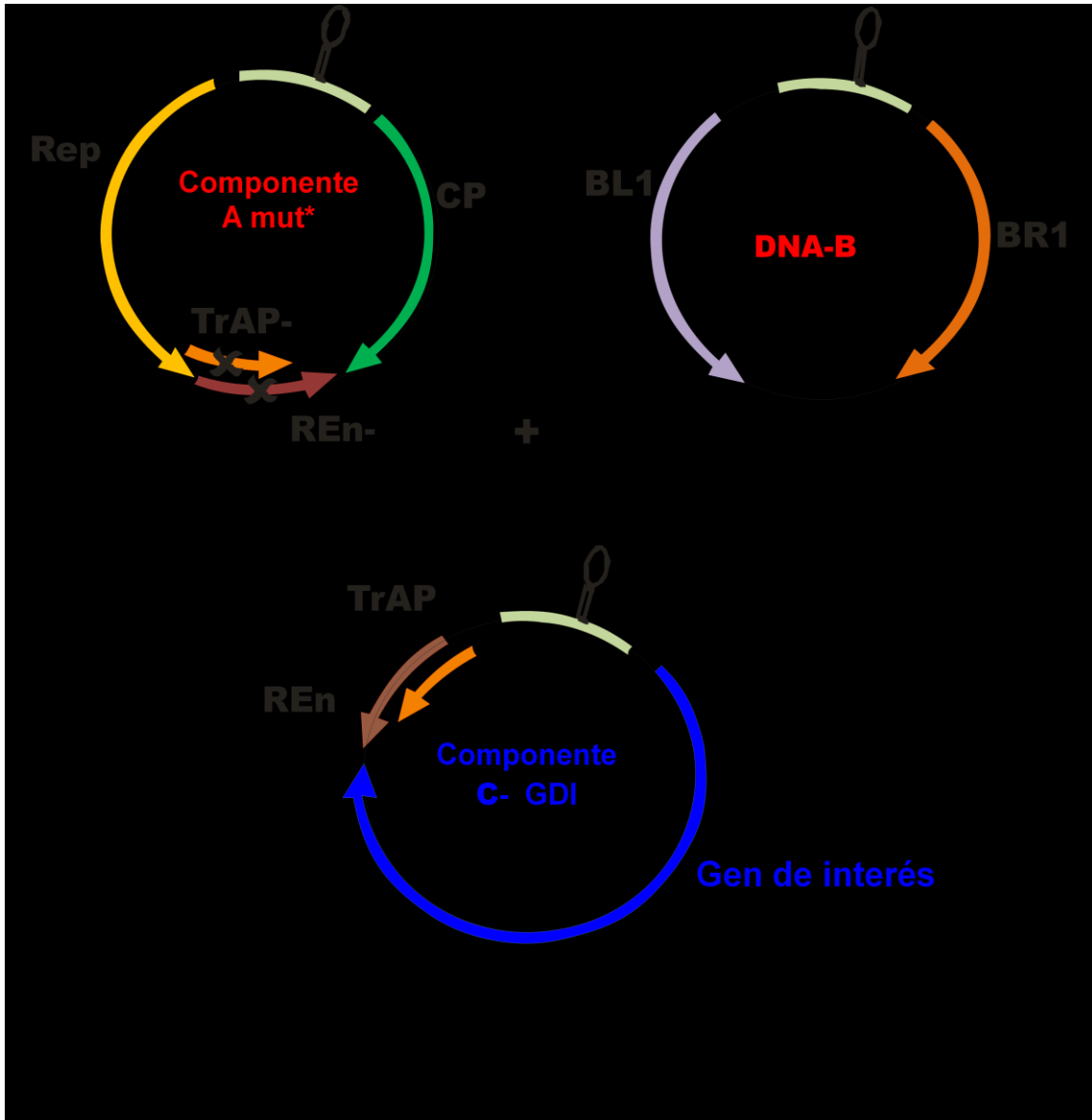
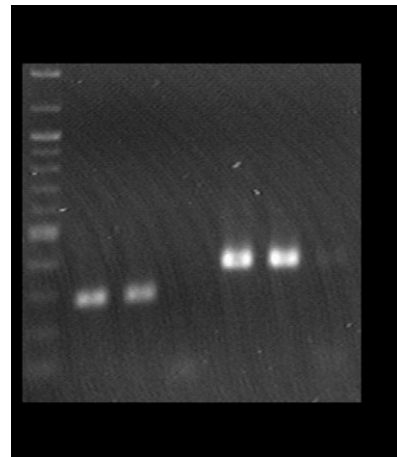
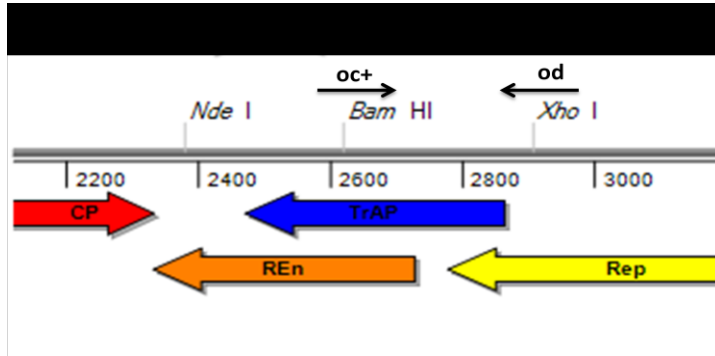


Figura 4. Esquema simplificado del sistema tripartita de componentes Interdependientes. Representación gráfica del componente A* con mutaciones puntuales en los ORF *TrAP* y *REn*; componente B; y componente C, con los genes *TrAP*, *REn*, y el gen de interés (GDI). BR1 y BL1 son sinónimos de BV1 y BC1, respectivamente. La estructura tallo-asa en cada uno de los componentes representa el origen de replicación del componente viral. La cruz sobre las flechas que representan ORFs indican mutaciones en los mismos.

En la figura 5a se detallan las regiones que son amplificadas con los oligonucleótidos diseñados (ver Materiales y métodos); en la figura 5b se pueden observar los productos de PCR individuales; los carriles 1 y 2 corresponden a la amplificación con los pares de oligonucleótidos oa y ob+, utilizando como DNA molde el hemidímero de EuMV A; los carriles 3 y 4 muestran los productos de amplificación con el par de oligonucleótidos oc+ y od. Estos productos individuales de PCR parcialmente traslapados, en una segunda amplificación dirigida con los oligonucleótidos oa y od sirvieron de molde para la generación de un producto único de 588 pb, como se muestra en la Figura 5c.

El producto de PCR de 588 pb está flanqueado por dos sitios de restricción, *XhoI* y *NdeI*, que hacen posible su inserción en el hemidímero de EuMV A, pero dado que este último contiene 2 sitios *XhoI*, fue necesario realizar digestiones parciales para obtener la parte del vector requerida para insertar el amplicón con las mutaciones puntuales. En la Figura 6a se puede observar la banda de interés correspondiente a 5.8 Kb, que se aisló del gel, se purificó y ligó con el amplicón de 588 pb. Como resultado de las mutaciones puntuales introducidas se pierde un sitio *BamHI*, por lo que las clonas obtenidas se digirieron con esa enzima para determinar si contenían la mutación. La pérdida de dicho sitio de restricción se refleja en la aparición de una banda de 2.6 Kb. En la Fig. 6b se puede observar que la clona 4 tiene el patrón esperado, que corresponde al nuevo componente DNA-A *TrAP^sREn^s*. Posteriormente se confirmó por secuenciación la presencia de la mutación dirigida (Fig. 6c). El segundo componente del sistema corresponde al DNA-B nativo de EuMV-Jal, el componente genómico que contiene los genes

involucrados en el movimiento intra- e intercelular del virus en la planta.



c

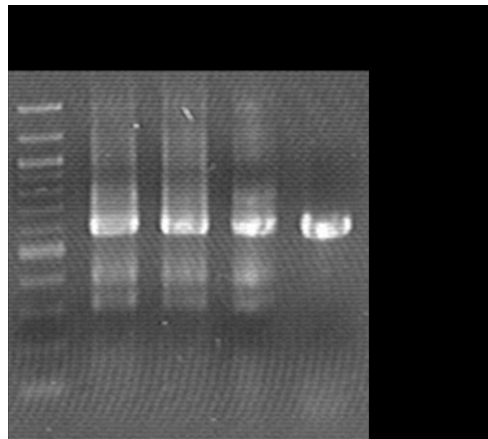


Figura 5. Generación de mutaciones silenciosas por PCR-splicing. (a) representación gráfica de las regiones amplificadas con los pares de oligonucleótidos mutagénicos (*ob+*, *oc+*), el par de oligonucleótidos *oa* y *ob+* generan un amplicón de 270pb y el par de oligonucleótidos *oc+* y *od* generan un amplicón de 352pb. (b) Gel de agarosa al 2%. Carriles 1 y 2, amplicones producidos por la combinación de oligonucleótidos *oa* y *ob+* con 100 ng y 50 ng de EuMV-Jal como ADN molde, respectivamente Carriles 3 y 4, amplicones producidos por la combinación de oligonucleótidos *oc+* y *od* con 100 ng y 50 ng de DNA molde, respectivamente. (c) Gel de agarosa al 2% que muestra el amplicón de 588pb generado con los oligonucleótidos *oa* y *od*, teniendo como moldes los productos individuales de PCR generados anteriormente. Carriles 1, 2 y 3 con diluciones de ambos productos de PCR, 1/10, 1/20 y 1/30, respectivamente. (+) amplicón generado por los oligonucleótidos *oa* y *od*, utilizando a EuMV Jal como DNA molde.

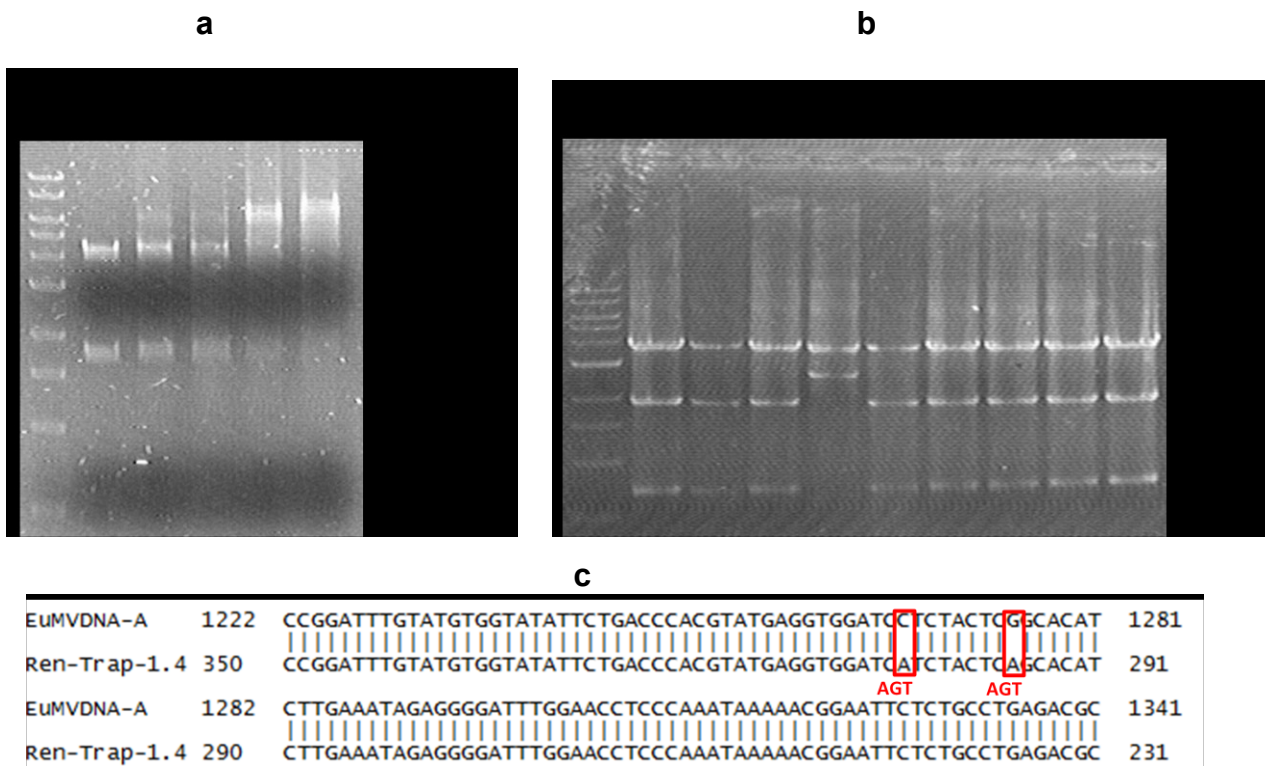


Figura 6. Generación del primer componente del sistema tripartita, DNA A *TrAP^sREN^s*. (a) Digestión parcial del hemidímero de EuMV-Jal; carril 1, digestión total con *NdeI/XhoI*, carriles 2, 3, 4 y 5, diluciones seriadas 1/10 de la mezcla enzimática. (b) Digestión total con *BamHI* de las mutantes putativas DNA A *TrAP^sREN^s* (carriles 1-8), + control positivo. (c) Secuencia de la mutante 1.4 (carril 4 en la figura 6b); los rectángulos y las letras de color rojo señalan las mutaciones sin sentido.

Generación de una segunda variante del primer componente del sistema, el componente DNA-A *TrAP^fREn^f*.

La segunda estrategia empleada para generar una mutante carente de genes *TrAP* y *REn* funcionales fue producir una inserción de 4pb en la región de traslape de ambos genes, lo que recorre la fase de lectura de los mismos. La secuencia de la clona infectiva EuMV-Jal A incluye dos sitios *EcoRI*, uno de los cuales forma parte del sitio múltiple de clonación presente en el vector pBluescript SK- en el cual está clonado el DNA-A del virus. El segundo sitio *EcoRI* se localiza en la región donde se encuentran traslapados los genes *TrAP* y *REn*. Si este segundo sitio *EcoRI* se corta, los extremos cohesivos se rellenan con Klenow y el DNA cortado se religa, se eliminará la secuencia *EcoRI* y se añadirán 4 pb a la cadena de DNA, desfasando de esa manera los marcos de lectura de los dos genes traslapados. Esto, naturalmente, resultará en la producción de proteínas no funcionales. Para llevar a cabo esta mutación por inserción, se generó primero una clona de EuMV-A de la que se eliminaron los sitios *ClaI*, *HindIII*, *EcoRV*, *EcoRI* y *PstI* del sitio múltiple de clonación, por digestión del vector con *ClaI* y *PstI*. Posteriormente, con el fragmento grande (Klenow) de la DNA polimerasa I, se rellenoó el extremo 5' saliente generado por *ClaI* y se rasuró el extremo 3' saliente generado por la digestión con *PstI*, procediendo a religar el vector en el último paso. Para comprobar que uno de los dos sitios *EcoRI* se había eliminado efectivamente, se realizó un perfil de restricción con *EcoRI* (Fig. 7a). Al momento de linearizar el vector observamos que el tamaño de la banda era menor a la esperada (cerca de 500 pb menor), posiblemente como resultado de la actividad

exonucleasa del fragmento Klenow, por lo que se tuvo que verificar que el origen de replicación viral (parte fundamental del componente A*) no estuviese afectado. Por medio de análisis de restricción y finalmente por secuenciación se constató la integridad del origen de replicación, por lo que se procedió a realizar la mutación del segundo sitio *EcoRI*, presente en la región donde se traslapan los ORFs *REn* y *TrAP*. Para esto se digirió con *EcoRI* y los extremos 5' salientes generados se rellenaron con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. Como se indicó antes, esta modificación crea un desfase +4 en los marcos de lectura de *REn* y *TrAP*, lo que daría como consecuencia la producción de proteínas trucas y sin función. Se obtuvieron 11 clonas al transformar el DNA viral relleno y religado (Fig. 7b), de las cuales se amplificó por PCR la región donde se localiza el sitio *EcoRI* y se digirieron los amplicones con *EcoRI* para confirmar la pérdida del sitio de restricción (Fig. 7c). Se envió a secuenciar una de las clonas que presentaron el patrón de restricción esperado, para confirmar que la mutación se había logrado correctamente (Fig. 7d).

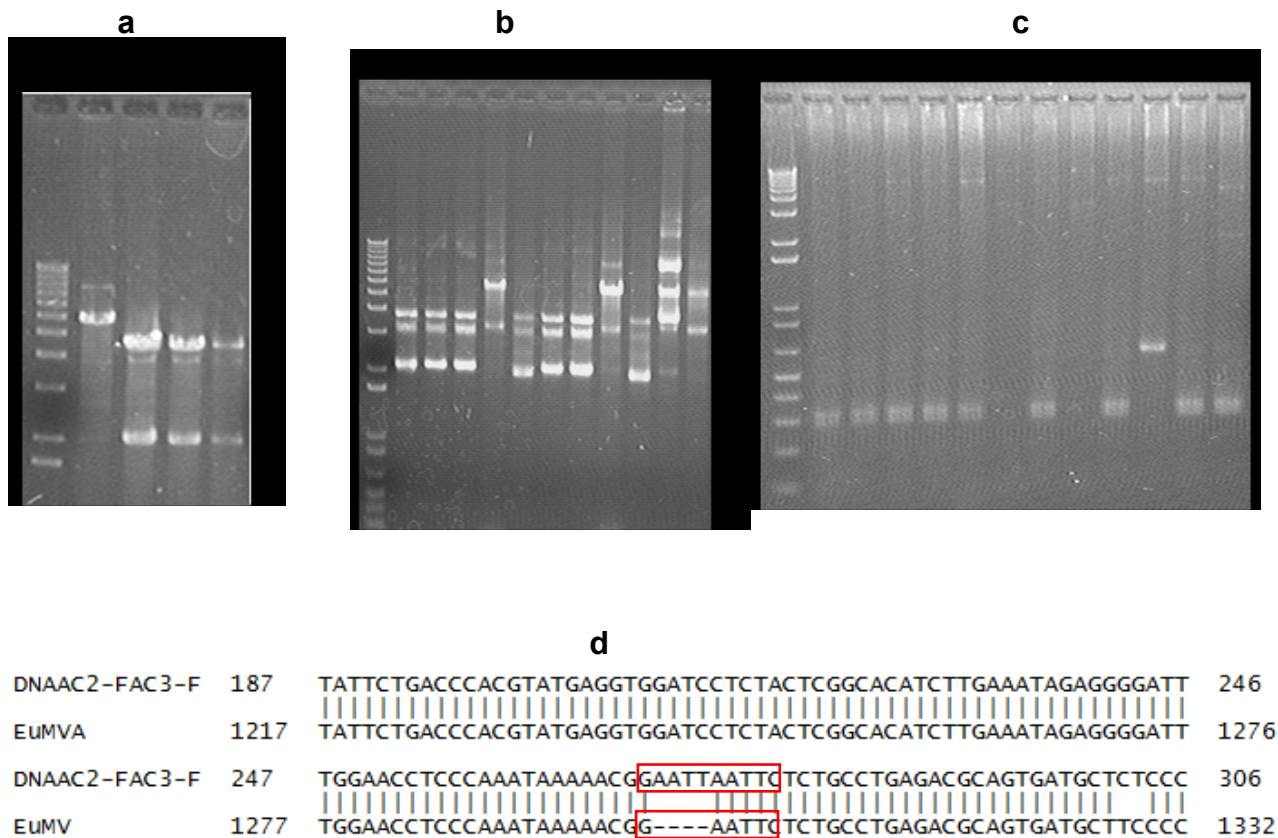


Figura 7. Generación de una variante del primer componente, el DNA A *TrAP^fREN^f*. (a) Eliminación del primer sitio *EcoRI* en el hemidímero de *EuMVJal.A*. Carriles 1-3, digestión de las clonas mutantes putativas con *EcoRI*; carril +, digestión del hemidímero *EuMVJal A* *EcoRI*. (b) Perfil de restricción con *EcoRI* de la mutante DNA A *TrAP^fREN^f*. Carriles 1-11 digestión con *EcoRI* de las clonas mutantes putativas sin el sitio *EcoRI* interno en los marcos de lectura de *AC2* y *AC3* tras ser rellenado con fragmento largo (Klenow) de la ADN polimerasa I. (c) Perfil de restricción con *EcoRI*. Carriles 1 a 11, digestiones de los productos de PCR generados con los oligonucleótidos flanqueantes de la secuencia con la mutación con *EcoRI*. Carril +, producto de PCR con *EuMV A* como molde. (d) Secuenciación de la mutante DNA-A *TrAP^fREN^f*.

Caracterización biológica de la mutante DNA-A *TrAP^sREn^s*.

Las proteínas codificadas por los genes *TrAP* y *REn* están involucradas en importantes funciones del virus. Por ejemplo, *TrAP* activa la expresión de los genes *CP*, *BV1* y *BC1* en la fase tardía de la infección, en tanto que *REn* interactúa con la proteína *Rep* para incrementar la replicación del virus. Por lo tanto, puede anticiparse que la inactivación de estos genes en *EuMV* resultará en un fenotipo de infección atenuada o asintomática. Para evaluar el primer componente del sistema tripartita se realizó la co-inoculación mecánica del DNA-A *TrAP^sREn^s* y el DNA-B silvestre en hojas jóvenes de *Nicotiana benthamiana*, usando el abrasivo carborundum. Se utilizaron 3 grupos de plantas, con 3 repeticiones, a las que se inoculó DNA-A *TrAP^sREn^s*/DNA-B, los componentes silvestres de *EuMV*, y el plásmido pBlueScript como control negativo. Tras 14 días post-inoculación la planta inoculada con la construcción DNA-A *TrAP^sREn^s*/DNA-B exhibió un fenotipo de síntomas atenuados, intermedio entre una planta sana y la inoculada con el virus nativo de *EuMV*Jalisco (Fig. 8a). Las hojas de la planta inoculadas con el DNA-A mutante no presentaron enchinamiento ni arrugamiento severo, y su crecimiento apical fue mayor que el observado en la planta infectada con el virus silvestre (Fig. 8b) Esto es consistente con lo reportado por Sung y Coutts (1995) que observaron que mutantes en los genes *AC2* y *AC3* de *Potato yellow mosaic virus* (PYMV), indujeron síntomas atenuados en plantas.

A los 21 días post-inoculación se observó una remisión de síntomas en las hojas más nuevas de las plantas inoculadas con la construcción DNA-A *TrAP^sREn^s*/DNA-B, ya que presentaron un fenotipo similar al control negativo (Fig. 8c,

8d). Se extrajo entonces DNA total de las plantas inoculadas y se realizó una PCR con los oligonucleótidos YMAC-Fwd y SL2200-Rev, los cuales son específicos para detectar la presencia del virus del clado SLCV, como EuMV. En la figura 8f se puede observar que el producto esperado de 1323 pb está presente en todos los extractos provenientes de las plantas inoculadas con EuMV, y en cambio no se observa amplificación en los extractos provenientes de las plantas inoculadas con DNA-A *TrAP^sREn^s*/DNA-B.

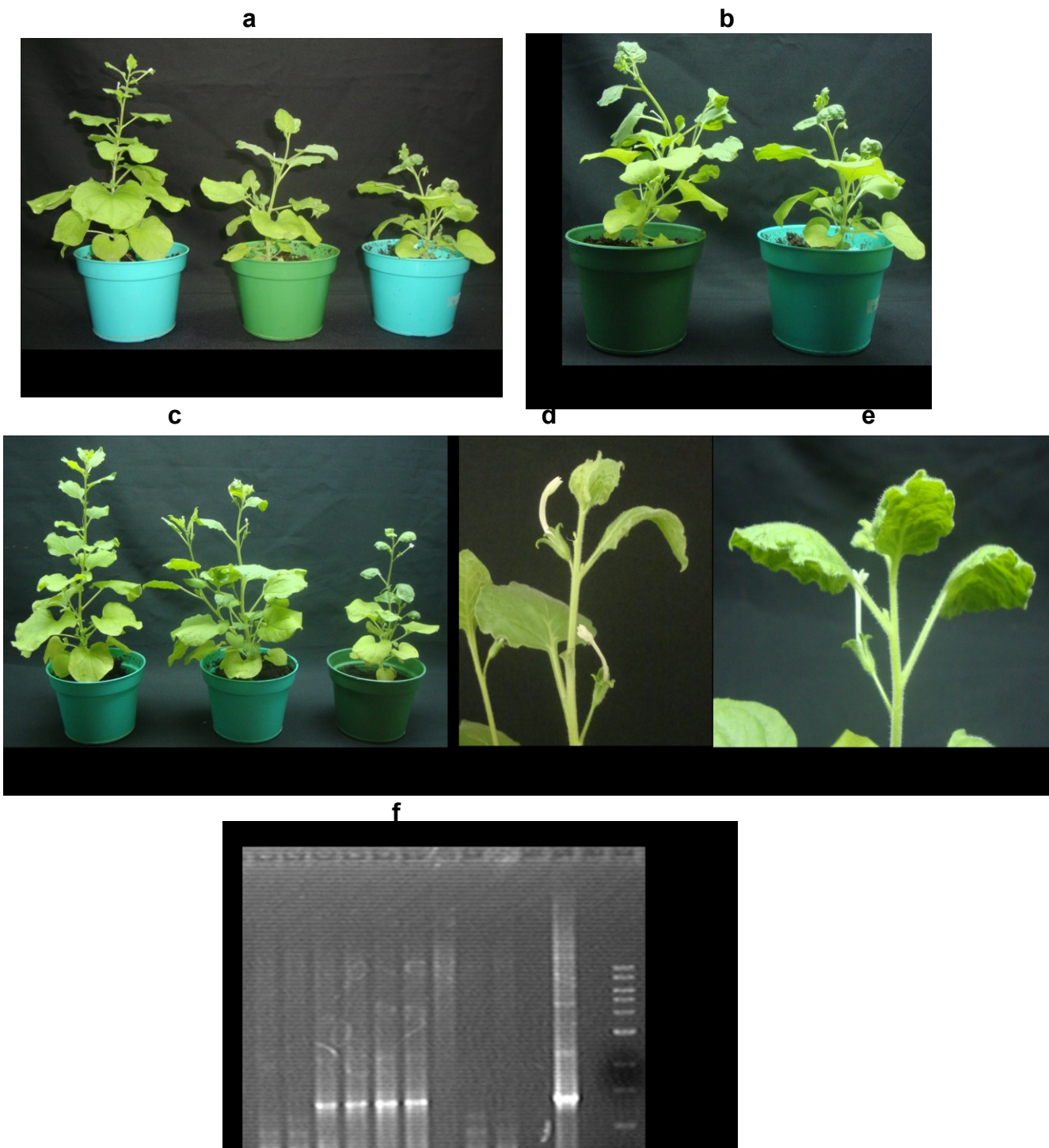


Figura 8. Caracterización biológica de la mutante DNA-A *TrAP^sREN^s*. (a-e) Fotografías que muestran plantas representativas para comparar síntomas entre la planta inoculada con pBlueScript (control negativo de la infección), la planta con la construcción DNA-A *TrAP^sREN^s*/DNA-B y la planta inoculada con EuMV-Jal silvestre (control positivo). (f) Productos de PCR que indican la presencia del virus en las hojas nuevas de las plantas. Carriles: 1-2, plantas inoculadas con DNA no

viral, 3-6, plantas inoculadas con *EuMV-Jal*, 7-10, plantas inoculadas con la construcción DNA-A *TrAP^sREn^s*/DNA-B.

Generación del tercer componente del sistema de expresión tripartita, el componente DNA-C ΔCP .

Se diseñaron un par de oligonucleótidos mutagénicos específicos para crear una amplia deleción en el gen *CP*, introduciendo además un sitio múltiple de clonación (SMC) con sitios *HindIII*, *Clal*, *SpeI*, *PstI* y *EcoRV*, lo que permite insertar genes de interés en el vector. Nuevamente se recurrió a la técnica de “PCR splicing” para generar dos productos de PCR individuales de 900 pb y 450 pb, respectivamente, los cuales se traslapan en la región del SMC (Fig. S1a). Estos amplicones fueron utilizados como moldes para realizar una segunda amplificación con los iniciadores externos, y generar de ese modo un producto de PCR que contiene al SMC y una pequeña fracción de las secuencias del gen *CP* adyacentes al segmento suprimido por la mutagénesis (ver Materiales y métodos). Como se muestra en la figura S1b se obtuvo el producto esperado de 1350 pb, pero también se observó una banda inespecífica no deseada, por lo que fue necesario aislar del gel el producto de PCR para clonarlo en el vector pGEM-T easy. A las clonas recuperadas se les hizo un análisis de restricción con *EcoRI* para liberar el inserto; las clonas 7, 9, 10, 13 y 15 liberaron el fragmento esperado de 1350 pb (Fig. S1c). Posteriormente, se confirmó que la banda de 1350 pb procedía de los productos de PCR traslapados mediante una digestión con *HindIII*, sitio que está presente en el SMC (segmento en el que los amplicones se

traslapan) obteniéndose los fragmentos correspondientes a los productos de PCR individuales. de 900 pb y 450 pb (Fig. S1d).

En nuestro laboratorio contamos con un plásmido que contiene el gen reportero *GFP* (que codifica a la proteína verde fluorescente) bajo el promotor 35S de CaMV. Para amplificar ese gen se diseñaron oligonucleótidos específicos con sitios *HindIII*, a fin de facilitar la clonación del producto de amplificación en el SMC del componente DNA-C ΔCP . En la figura.S1e se muestra la banda de 960 pb amplificada con el uso de dichos iniciadores. Este producto de PCR se clonó en el SMC, y se esperaba una banda de ~2300 pb.. Como el amplicón está flanqueado por sitios *HindIII*, se evaluó la orientación del inserto en el SMC, para lo que se realizó una digestión con *NdeI*. El patrón de restricción esperado para la orientación funcional corresponde a 4110 pb, 870 pb y 360 pb. En la figura S1f se puede observar como las clonas 3, 4, 5, 6, 8 y 10 presentan dicho patrón.

Tanto el DNA-A de EuMV como la clona que contiene el inserto SMC+GFP se digirieron con *EcoRI* para posteriormente aislarlos del gel y ligarlos con el fin de remplazar las secuencias análogas de EuMV con la construcción que contiene el origen de replicación, el promotor de *CP* unido en fusión traduccional a la GFP dentro del SMC generado. En la figura 9a se puede observar como la digestión con *EcoRI* de la clona con GFP libera el inserto, y el DNA de EuMV-A libera el fragmento deseado; tras la ligación y transformación se recuperaron clonas a las cuales se les hizo un perfil de restricción con *XbaI* para confirmar la presencia del inserto en el componente EuMV C. Un patrón de bandas de 3700 pb, 2100 pb y 800 pb, es lo que se espera obtener si el fragmento con *GFP* se subclonó

efectivamente en el DNA viral; en la Figura 9c se puede observar dicho patrón. La clona identificada se secuenció y la presencia del inserto fue confirmada.

Ensayo *in-vitro* de actividad de la construcción pGEM 1350+GFP

Para determinar si el gen reportero *GFP* se expresa bajo el control del promotor nativo de *CP*, se realizó un experimento de expresión en protoplastos de tabaco usando la línea celular NT1, donada amablemente por el Dr. Rafael Rivera Bustamante. Se transfectó la construcción de pGEM 1350+GFP junto con el componente A de EuMV Jal. Como control positivo se utilizó el vector pBS-35S en el que el gen *GFP* se encuentra bajo el promotor 35S de CaMV y como control negativo se transfectó con EuMV-A Jal silvestre. En un trabajo previo se mostró que los genes de *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) alcanzan su expresión máxima en protoplastos a las 15 horas post-transfección (Shimada-Beltrán y Rivera-Bustamante, 2007), por lo que evaluamos la expresión de GFP a ese tiempo. En la figura 10f se muestra la expresión de GFP bajo el promotor nativo *CP* en los protoplastos transfectados, demostrando de ese modo que la construcción es funcional y que el gen reportero se encuentra en fase con el ATG del gen *CP* de EuMV.

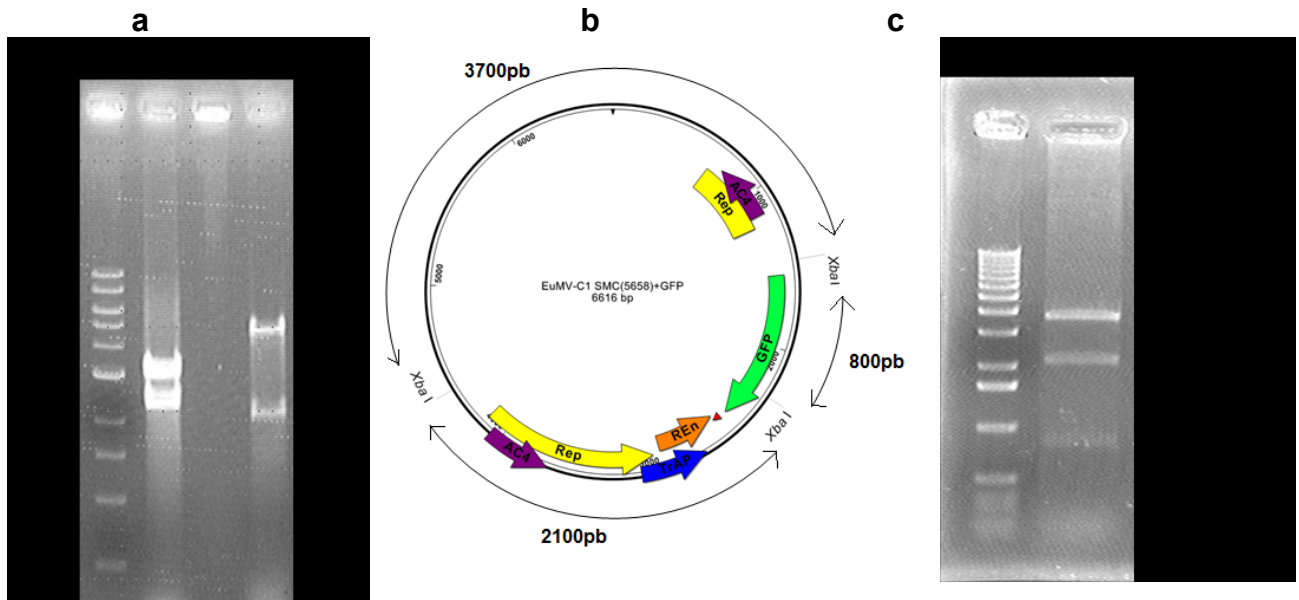


Figura 9. Generación del componente EuMV C+GFP: (a) Carril 1 digestión *EcoRI* EuMV C+GFP, carril 2 digestión *EcoRI* EuMV A. (b) Representación gráfica del tamaño de las bandas generadas tras la digestión con la enzima de restricción *XbaI*. (c) Digestión con *XbaI* de la construcción EuMV C+GFP.

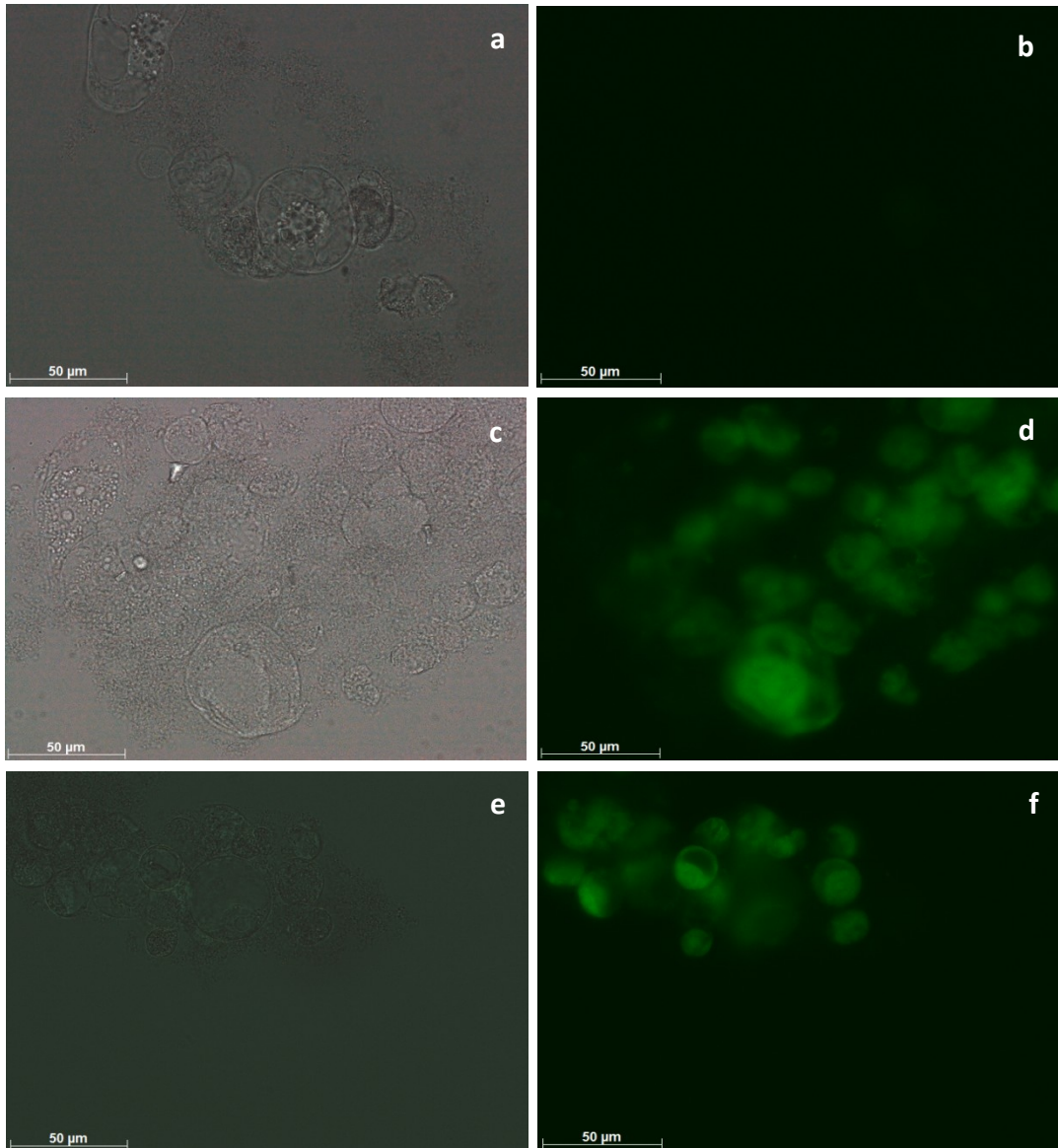


Figura 10. Ensayo de expresión en protoplastos. (a) Observación 40X en campo claro de los protoplastos transfectedos con EuMV A. (b) Observación 40X luz UV, tiempo de excitación 57ms, protoplastos transfectedos con EuMV-A, (control negativo). (c) Observación 40X campo claro protoplastos transfectedos con la construcción pGEM 35S+GFP. (d) Observación 40X luz UV, tiempo de excitación 57ms, protoplastos transfectedos con la construcción pGEM 35S+GFP, (control positivo). (e) Observación 40X campo claro protoplastos transfectedos con las construcciones EuMV A y 1350+GFP. (f) Observación 40X luz UV, tiempo de excitación 57ms protoplastos transfectedos con las construcciones EuMV A y 1350+GFP.

Discusión

En el curso de este trabajo diseñamos y construimos un sistema de expresión derivado del begomovirus bipartita EuMV-Jal, el cual incluye tres componentes virales interdependientes. El componente 1 (A*) de este sistema tripartita se derivó del DNA-A de EuMV, y contiene tres de los cinco genes nativos intactos y dos genes mutados e inactivos. Se generaron dos tipos diferentes de componentes A*: uno en el que se introdujeron por mutagénesis dirigida (“PCR-splicing”) codones de paro en los genes *TrAP* y *REn*, y otro en el que se insertaron 4 nucleótidos para producir un cambio de fase de lectura en ambos genes. Se examinó el efecto de esas mutaciones en la capacidad del virus para producir una infección sistémica en plantas de *N. benthamiana*, y se observó una clara atenuación de los síntomas en las plantas inoculadas, un fenotipo similar reportado de mutantes en AC2 y AC3 de otras especies begomovirales (Hormuzdi y Bisaro, 1995; Morris et al., 1991; Sung y Coutts, 1995). Adicionalmente, generamos un tercer elemento viral (“componente C”) del sistema tripartita, derivado también de DNA-A de EuMV, en el cual se eliminó la mayor parte de la secuencia del gen *CP* para introducir un sitio múltiple de clonación, a fin de hacer posible la inserción (en fase traduccional con el codón de inicio de *CP*) de genes heterólogos que se quiere expresar en plantas. Para probar la funcionalidad de este tercer componente, Insertamos en el mismo al gen reportero *GFP*, y determinamos, en ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco, que la proteína verde fluorescente se expresa de modo eficiente, confirmando la funcionalidad de esta construcción cuya característica más relevante es que el

promotor *CP* de EuMV dirige la expresión del gen heterólogo. En su estado actual, el vector probablemente será estable en plantas con insertos menores a 1000 pb, pero se tienen contempladas modificaciones adicionales que permitirán incrementar su capacidad hasta un poco más de 1500 pb,

El sistema tripartita generado no pudo ser probado en el período que cubrió este trabajo de tesis, pero pronto será probado en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Datura stramonium* (“toloache”), dos huéspedes bien caracterizados de EuMV-Jal, a fin de determinar el nivel de expresión del gen *GFP* en diversos tejidos. Esto nos permitirá establecer con claridad el potencial del sistema para la producción de proteínas en plantas. Si la eficiencia del actual sistema es significativa, podríamos aumentarla transfiriendo los tres componentes a vectores binarios de *Agrobacterium tumefaciens*, lo que haría factible usar la agroinfiltración de hojas como el método de rutina para la inoculación de los DNAs virales, que ha mostrado ser la forma más efectiva y menos costosa de introducir vectores derivados de geminivirus a las plantas (Chen et al., 2011).

Dado que el concepto de sistema de tres componentes interdependientes es flexible y admite, por lo tanto, varias configuraciones potenciales de los componentes que los pueden integrar, diseñamos otra serie de oligonucleótidos para construir varios tipos de “tercer componente”. Por ejemplo, las combinaciones de oligonucleótidos mostrada en la Figura S3 están diseñadas para generar deleciones en *Rep* y colocar también a *TrAP* y *REn* bajo el control del promotor *Rep*. En otro caso, los iniciadores permitirían obtener versiones truncas del gen *Rep*, sin un promotor funcional, y colocarían a *TrAP* y *REn* bajo el control

exclusivo del promotor nativo de *TrAP*, que se encuentra traslapado con la región codificante de *Rep*. Por último, algunos oligonucleótidos serían útiles para generar mutaciones sin sentido en *AC4* y en *Rep*. Con este conjunto de oligonucleótidos sintéticos será factible construir varios vectores alternativos, los cuales podrían ser evaluados *in planta* con respecto a su estabilidad y eficiencia para producir proteínas recombinantes, en adición al vector descrito en este trabajo.

Materiales y métodos

Plásmidos.

Todas las construcciones se realizaron a partir de los hemidímeros (dímeros incompletos) de los componentes genómicos A y B de EuMV Jal descritos por Gregorio-Jorge et al. (2010), los cuales están clonados en los vectores pBS SK- (Stratagene) y pGEM-T Easy (Promega), respectivamente. Un plásmido que contiene el ORF de GFP con uso de codones optimizado para la expresión en plantas, donado por el Dr. Rafael Rivera del CINVESTAV, fue utilizado para la amplificación por PCR de la GFP.

Generación de los componentes A* y C del sistema tripartita

Para la generación del componentes DNA-A *TrAP^sREn^s* se recurrió a la técnica de PCR-splicing para lo cual se diseñaron un par de oligonucleótidos mutagénicos específicos, denominados ob+Rev y oc+Fwd (ob+Rev: 5'-GAGGTGGATCATCTACTCAGCACATCTTG-3'; oc+Fwd: 5'-CAAGATGTGCTGAGTAGATGATCCACCTC-3'; y un par de oligonucleótidos externos que flanquean a la región con las mutaciones (oa Fwd: 5' TTTACATATG AACGGTCTGTTGCGAAACGC 3'; od Rev: 5' CATCAATCGTGCTGTGCAATCC AGGAGAG 3'. Las condiciones de amplificación para un volumen total de mezcla de reacción de 25 µl fueron las siguientes: buffer de reacción *Taq* 1X (NEB); MgCl₂ 1.5mM (NEB); dNTP's 200 µM; oligonucleótidos 1 µM; *Taq* polimerasa 0.5 unidades; temperatura de desnaturalización 94°C por 5 min; temperatura de

alineamiento 55°C, por un lapso de 15 s; temperatura de extensión 72°C por 30 s; 35 ciclos, y una extensión final por 10 min a 72 °C. Los productos de PCR individuales fueron diluïdos 1/10, 1/20 y 1/30 y reamplificados con los oligonucleótidos externos oa y od para la obtención de una banda de 588 pb que posteriormente fue digerida con *NdeI* y *XhoI* (NEB) y purificada por columna con Wizard® SV Gel y PCR clean-up system (Promega). El fragmento obtenido fue subclonado en un hemidímero de EuMV-A, previamente digerido con *NdeI* y luego con diluciones seriadas de *XhoI* (NEB) (8.8 unidades de enzima diluidas 1/10, 1/100, 1/1 000), para generar una digestión parcial con esta última endonucleasa. Las ligaciones fueron realizadas con 400 unidades de T4 DNA ligasa (NEB), y transformadas en *Escherichia coli* Top 10 por choque térmico. Transcurridas 12 hrs de crecimiento de la bacteria el DNA fue extraïdo por una versión modificada del método descrito por Birnboim y Doly (1979). Para identificar las mutantes se llevó a cabo el análisis de patrones de corte con la enzima *BamHI* (NEB).

Para la generación de DNA-A *TrAP^fREN^f* se realizó una digestión con *ClaI* y *PstI* (NEB), posteriormente los extremos cohesivos generados por la digestión se hicieron romos con el fragmento largo (Klenow) de la ADN polimerasa I (Promega), incubando 30 min con 10pM de dNTP's, e inactivando la enzima con un tratamiento térmico a 75°C por 20 minutos. Se ligó el DNA con 400 unidades de T4 DNA ligasa (NEB), y se transformó en *E. coli* Top 10. Transcurridas 12 hrs de crecimiento bacteriano el DNA plasmídico fue extraïdo por el método de Birnboim y Doly (1979), y se realizó una digestión de las clonas obtenidas con *HindIII*, *EcoRI* y *EcoRV* (NEB), para verificar que los sitios se habían perdido. Para

generar un desfase en los marcos de lectura de *REn* y *TrAP* se digirió con *EcoRI* (NEB) y posteriormente con el fragmento largo (Klenow) de la DNA polimerasa I (NEB) se rellenaron los extremos salientes para su posterior ligación. Tras la obtención de transformantes las clonas fueron digeridas con *EcoRI* para confirmar la eliminación del sitio original.

Para la delección del gen *CP* de *EuMV* se recurrió nuevamente a la técnica de PCR-splicing, para lo cual se mandaron sintetizar un par de oligonucleótidos, *smcFwd* y *smcRev*, con un sitio múltiple de clonación que incluye elementos *HindIII*, *Clal*, *SpeI*, *PstI* y *EcoRV* al extremo 5' de cada oligonucleótido (*smcFwd*: 5' ACTAGTCTGCAGGATATCACTCATGCATCTAACCCCGTG 3'; *smcRev*: 5' ACTAGTATCGATAAGCTTCATTTTGAATTAAGAGGTATGGG 3') y otro par de oligonucleótidos que flanquean esa región con sitios de restricción *EcoRI* (*EcosmcFwd*: 5' CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGC 3'; *smcEcoRev*: 5' CGTC TGAGGCAGAGAATTCCGTTTTTATTTGGG 3'), para su posterior clonación en el hemidimero de *EuMV* A. Las condiciones de amplificación para un volumen total de reacción de 25 μ l fueron las mismas mencionadas antes. Los productos de PCR individuales obtenidos fueron diluidos 1/30 y reamplificados con los oligonucleótidos externos *EcosmcFwd* y *smcEcoRev*; el amplicón resultante (de 1350pb) fue clonado en el vector pGem-T Easy (Promega), para la obtención de la construcción pGem 1350 *CP*::SMC. Posteriormente, a partir de la construcción pGem 35S GFP se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el ORF de la GFP con sitios de restricción *HindIII* en su extremo 5' (Fwd GFP-*HindIII* 5' AGAGAAGCTTATGGGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC 3', Rev GFP- *HindIII* 5'

ATATAAGCTTGCATACCTGCAGGTCCTGGATTTTGG 3'). El amplicón resultante (~960pb) fue clonado en pGem-T Easy y digerido con *Hind*III (NEB) y subclonado en la construcción pGem 1350 CP::SMC previamente digerida con *Hind*III para crear la construcción pGem 1350+GFP. Esta construcción está flanqueada por sitios *Eco*RI, por lo que se digirió con esa enzima para clonarla luego en el hemidímero de EuMV A, previamente digerido con *Eco*RI para generar la construcción EuMV C+GFP.

Ensayo *in-vitro* de actividad de la construcción pGem 1350+GFP

Células en cultivo de la línea NT1 de *Nicotiana tabacum* de 4 días de crecimiento, fueron colectadas por centrifugación y sometidas a una digestión enzimática con celulasa de *Trichoderma viride* y pectoliasa de *Aspergillus japonicum* (KARLAN Research Products).a fin de eliminar la pared celular y hacer posible la transformación por electroporación de las células. Las construcciones se transfectaron a los protoplastos utilizando el equipo Bio-Rad GenePulser Xcell con los siguientes parámetros: Capacitancia 500 μ F, voltaje 250 V y resistencia $\infty\Omega$; después del pulso se incubaron a 25°C en medio de cultivo para protoplastos por 15 horas, y se observó bajo el filtro de luz azul en un estereoscopio LEICA MZ12.5 (fig. S2) y de un microscopio Zeiss Axio Imager M2 con un filtro de excitación a BP 470/40 y un filtro de emisión a BP 525/50 para GFP, las imágenes fueron tomadas con una cámara AxioCam MRc Rev.3 con FireWire y editadas con el software AxioVision Rel 4.8 (fig. 6).

Ensayos de infección

Plantas de *Nicotiana benthamiana* de 45 días de edad fueron inoculadas con 10µg de DNA de acuerdo al método de inoculación mecánica descrito por Ascencio-Ibañez y Settlege (2007). Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero tras la inoculación, y se evaluaron los síntomas 15 y 21 días post-inoculación, el DNA de la planta fue extraído por un método modificado de Dellaporta y se determinó la presencia del DNA viral en los tejidos nuevos por medio de la técnica de PCR usando iniciadores degenerados específicos para los componentes genómicos A y B de begomovirus.

Referencias

- Argüello-Astorga, G.R., Guevara-González, R.G., Herrera-Estrella, L.R., Rivera-Bustamante, R.F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* **203**, 90-100.
- Ascencio-Ibañez, J.T., Settlage, S.B. (2007). DNA abrasion onto plants is an effective method for geminivirus infection and virus induced gene silencing. *J Virol Met* **142**, 198-203.
- Bagewadi, B., Chen, S., Lal, S.K., Choudhury, N.R., Mukherjee, S.K. (2004). PCNA interacts with *Indian mung bean yellow mosaic virus* Rep and downregulates Rep activity. *J Virol* **78**, 11890–11903.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1978). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513–1523.
- Chen, Q., He, J., Phoolcharoen, W., Mason, H.S. (2011). Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants. *Human Vaccines* **7**, 331-338
- Costa, A.S. & Bennett, C.W. (1950). White-fly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology* **40**, 266-283.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**, 19–21.
- Eagle, P.A. y Hanley-Bowdoin, L. (1997). *Cis* elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *J Virol* **71**, 6947-6955.
- Elmer, S. y Rogers, S.G. (1990). Selection for Wild Type Derivatives of Tomato Golden Mosaic Virus during Systemic Infection. *Nucleic Acids Res* **18**, 2001-2006.
- Etessami, P., Watts, J., Stanley, J. (1989). Size reversion of *African cassava mosaic virus* coat protein deletion mutants during infection of *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol* **70**, 277-289.
- Fauquet, C.M. & Stanley, J. (2005). Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for standardized isolated descriptors. *Arch Virol* **150**, 2151-2179.
- Fauquet, C.M. & Stanley, J. (2003). Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Ann Appl Biol* **142**, 165-189.
- Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., Zhou, X. (2008). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol*, 153(4): 783-821.
- Fontenelle, M.R., Luz, D.F., Gomes, A.P.S., Florentino, L.H., Zerbini, F.M., Fontes, E.P.B. (2007). Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. *Virus Research* **126**, 262-7.
- Gafni, Y. & Epel, B.L. (2002). The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Mol Plant Pathol* **60**, 231–241.
- Gilbertson, R.L., Sudarshana, M., Jiang, H., Rojas, M.R., Lucas, W.J. (2003). Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: insights into DNA trafficking. *The Plant Cell* **15**, 2578-2591

- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol.* **18**, 134-141.
- Gregorio-Jorge, et al. (2010). Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology* **7**, 275.
- Goodman, R.M. (1977). Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology* **83**, 171–179.
- Guerra-Peraza, O., Kirk, D., Seltzer, V., et al. (2005). Coat proteins of Rice tungro bacilliform virus and *Mung bean yellow mosaic virus* contain multiple nuclear-localization signals and interact with importin alpha. *J Gen Virol* **86**, 1815–1826.
- Gutierrez, C. (2000). DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J* **19**, 792–799.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S.B., Robertson, D. (2004). Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol Plant Pathol* **5**, 149–156.
- Harrison, B.D., Barker, H., Bock, K.R., et al. (1977). Plant-viruses with circular single-stranded DNA. *Nature* **270**, 760–762.
- Harrison, B.D., Robinson, D.J. (1999). Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annu Rev Phytopathol* **37**, 369–398.
- Harrison, B.D., Swanson, M.M. Fargette, D. (2002). Begomovirus coat protein: serology, variation and functions. *Physiol Mol Plant Pathol* **60**, 257–271.
- Hayes, R.J., Coutts, R.H.A., Buck, K.W. (1989). Stability and expression of bacterial genes in replicating geminivirus vectors in plants. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2391-2403.
- Hernández-Zepeda, C., Idris, A.M., Carnevali, G., Brown, J. K., Moreno-Valenzuela, O.A. (2007). Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathology* **56**, 763-770.
- Heyraud, F., Matzeit, V., Schaefer, S., Schell, J., Gronenborn, B. (1993). The conserved nonanucleotide motif of the geminivirus stem-loop sequence promotes replicational release of virus molecules from redundant copies. *Biochimie* **75**, 605-615.
- Hormuzdi, S., Bisaro, D.M. (1995). Genetic analysis of *Beet curly top virus*: Examination of the roles of L2 and L3 genes in viral pathogenesis. *Virology* **206**, 1044-1054.
- Huang, Z., Chen, Q., Hjelm, B., Arntzen, C., Mason, H.A. (2009). DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnol Bioeng* **103**, 706-714.
- Huang, Z., Phoolcharoen, W., Lai, H., Piensook, K., Cardineau, G., Zeitlin, L., et al. (2010). High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnol Bioeng* **106**, 9-17.
- Jupin, I., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., et al. (1994). Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCSV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* **204**, 82–90.
- Kass, G., Arad, G., Rosenbluh, J., Gafni, Y., Graessmann, A., Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Loyter, A. (2006). Permeabilized mammalian cells as an experimental system for nuclear import of geminiviral karyophilic proteins and of synthetic peptides derived from their nuclear localization signal regions. *J Gen Virol* **87**, 2709-2720.

- Kim, K.S. & Fulton, R.W. (1983). Ultrastructure of *Datura stramonium* Infected with an Euphorbia virus suggestive of a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* **74**, 236-241.
- Kim, K.I., Sunter, G., Bisaro, D.M., Chung, I.S. (2007). Improved expression of recombinant GFP using a replicating vector based on *Beet curly top virus* in leaf-disks and infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Mol Biol* **64**, 103–112.
- Kong, L.J., Orozco, B.M., Roe, J.L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H.S., Durfee, T., Miller, A.B., Grisse, W., Robertson, D., Hanley-Bowdoin, L. (2000). A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J* **19**, 3485–3495.
- Kunik, T., Mizrachy, L., Citovsky, V., et al. (1999). Characterization of a tomato karyopherin alpha that interacts with the *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) capsid protein. *J Exp Bot* **50**, 731–732.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S.G., Schell, J., Gronenborn, B. (1995). *In vitro* cleavage and ligation at the viral origin of replication by the replication protein of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 3879-3883.
- Lico, C., Chen, Q., Santi, L. (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J Cell Physiol* **216**, 366-377.
- Mariano, A.C., Andrade, M.O., Santos, A.A., Carolino, S.M., Oliveira, M.L. et al. (2004). Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology* **318**, 24–31.
- Matzeit, V., Schaefer, S., Kammann, M., Schalk, H.J., Schell, J., Gronenborn, B. (1991). *Wheat dwarf virus* vectors replicate and express foreign genes in cells of monocotyledonous plants. *Plant Cell* **3**, 247-258.
- McGarry, R.C., Barron, Y.D., Carvalho, M.F., Hill, J.E., Gold, D. et al. (2003). A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell* **15**, 1605–1618.
- Mor, T.S., Moon, Y.S., Palmer, K.E., Mason, H.S. (2003). Geminivirus vectors for high-level expression of foreign proteins in plant cells. *Biotechnol Bioeng* **81**, 430-437.
- Morris, B., Richardson, K., Eddy, P., Zhan, X.C., Haley, A., Gardner, R. (1991). Mutagenesis of the AC3 open reading frame of *African cassava mosaic virus* DNA A reduces DNA B replication and ameliorates disease symptoms. *J Gen Virol* **72**, 1205-1213.
- Noeiry, A.O., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* **76**, 925–932.
- Palmer, K.E., Thomson, J.A., Rybicki, E.P. (1999). Generation of maize cell lines containing autonomously replicating maize streak virus-based gene vectors. *Arch Virol* **144**, 1345–1360.
- Pasumarthy, K.K., Choudhury, N.R., Mukherjee, S.K. (2010). *Tomato leaf curl Kerala virus* (ToLCKeV) AC3 protein forms a higher order oligomer and enhances ATPase activity of replication initiator protein (Rep/AC1) *Virol J* **7**, 128. doi: 10.1186/1743-422X-7-128.
- Piroux, N., Saunders, K., Page, A., et al. (2007). Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with Arabidopsis thaliana shaggy-related protein kinase AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology* **362**, 428–440.
- Pooma, W., Petty, I.T.D. (1996). *Tomato golden mosaic virus* open reading frame AL4 is genetically distinct from its C4 analogue in monopartite geminiviruses. *J Gen Virol* **77**, 1947–1951.

- Pooma, W., Gillette, W.K., Jeffrey, J.L., Petty, I.T.D. (1996). Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology* **218**, 264-268.
- Qin, S.W., Ward, B.M., Lazarowitz, S.G. (1998). The bipartite geminivirus coat protein aids BR1 function in viral movement by affecting the accumulation of viral single-stranded DNA. *J Virol* **72**, 9247-9256.
- Regnard, G.L., Halley-Stott, R.P., Tanzer, F.L., Hitzeroth, I.I., Rybicki, E.P. (2010). High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *Plant Biotechnol J* **8**, 38-46.
- Rojas, M.R., Noueir, A.O., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L. (1998). Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* **95**, 105-113.
- Rojas, M.R. et al. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol.* **43**, 361-394.
- Rojas, M.R., Jiang, H., Salati, R., et al. (2001). Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology* **291**, 110-125.
- Ruiz-Medrano R, R. G. Guevara-Gonzalez, G. R. Arguello-Astorga, et. al. (1999) Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the Pepper Huasteco Virus coat protein gene. *Virology* **253**: 162- 169.
- Rybicki, E.P. (1994). A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Arch Virol* **139**, 49-77.
- Sanderfoot, A.A. & Lazarowitz, S.G. (1996). Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol* **6**, 353-58.
- Selth, L.A., Dogra, S.C., Rasheed, M.S., Healy, H., Randles, J.W., Rezaian, M.A. (2005). A NAC domain protein interacts with *Tomato leaf curl virus* replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell* **17**, 311-325.
- Settlage, S.B., Miller, A.B., Grisse, W., Hanley-Bowdoin, L. (2001). Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology* **279**, 570-576.
- Shimada-Beltrán, H., & Rivera-Bustamante, R.F. (2007). Early and late gene expression in *Pepper huasteco yellow vein virus*. *J Gen Virol* **88**, 3145 - 3153.
- Stanley, J. (1995). Analysis of *African cassava mosaic virus* recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA-replication. *Virology* **206**, 707-712.
- Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., Stenger, D.C. (2005). Geminiviridae: Eighth Report of the ICTV on Virus Taxonomy. Pages 301-326 in: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L.A. *Virus Taxonomy-Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press 1257 pp.
- Sung, Y.K., Coutts, R.H. (1995). Mutational analysis of Potato yellow mosaic geminivirus. *J Gen Virol* **76**, 1773-1780.
- Sunter, G., Bisaro, D.M. (1992). Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* **4**, 1321-1331.
- Sunter, G., Hartitz, M.D., Bisaro, D.M. (1993). *Tomato golden mosaic virus* leftward gene expression: autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology* **195**, 275-280.

- Sunter, G., Bisaro, D.M. (1997). Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology* **232**, 269–280.
- Timmermans, M.C.P., Das, O.P., Messing, J. (1994). Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Ann Rev Plant Mol Biol* **45**, 79-112.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T., Pooggin, M.M. (2005). Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J Virol* **79**, 2517-2527.
- Unsold, S., Höhnle, M., Ringel, M., et al. (2001). Subcellular targeting of the coat protein of African cassava mosaic geminivirus. *Virology* **286**, 373–383.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S., et al. (2004). Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* **78**, 9487–9498.
- Ward, A., Etesami, P., Stanley, J. (1988). Expression of a bacterial gene in plants mediated by infectious geminivirus DNA. *EMBO J* **7**, 1583-1587.
- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C., and Bisaro, D.M. (2005). Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J Virol* **79**, 7410–7418.
- Ward, B.M., Lazarowitz, S.G. (1999). Nuclear export in plants. Use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *Plant Cell* **11**, 1267–1276.
- Zhang, W., Olson, NH, Baker, TS, et al. (2001). Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology* **279**, 471–477.
- Zhang, X., Mason, H. (2006). *Bean yellow dwarf virus* replicons for high-level transgene expression in transgenic plants and cell cultures. *Biotechnol Bioeng* **93**, 271-279.

Figuras suplementarias

Figura S1

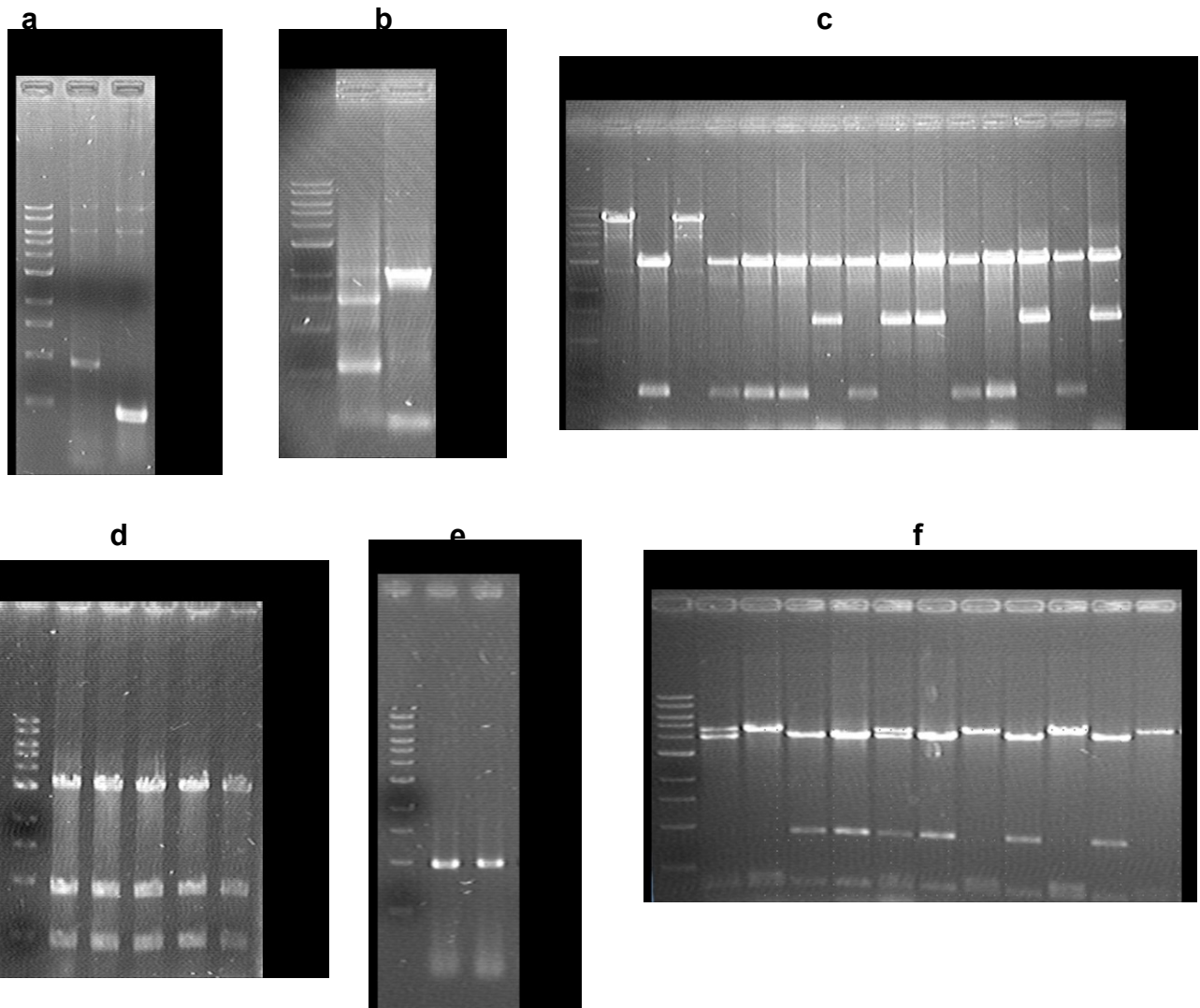


Figura S1. Etapas de la construcción de pGem 1350+GFP. (a) Carril 1, amplicón generado por el par de oligonucleótidos smcFwd/smcRev, carril 2, amplicón generado por el par de oligonucleótidos EcosmcFwd/ smcEcoRev. (b) Carril1 reamplificación con los oligonucleótidos externos smcFwd/smcEcoRev, control positivo EuMV A, se amplifica una banda de 2000 pb correspondiente a la región que incluye al gen *CP*. (c) Digestión con *EcoRI* de las colonias pGem 1350 *CP*::SMC. (d) Doble digestión con *EcoRI* y *HindIII* de la construcción pGem 1350 *CP*::SMC. (e) Carril 1, amplicón del ORF de GFP con 250 ng de templado, carril 2, amplicón del ORF de GFP con 500 ng de templado. (f) Perfil de restricción con *NdeI* de clonas que tienen la construcción pGem 1350+GFP.

Figura S2

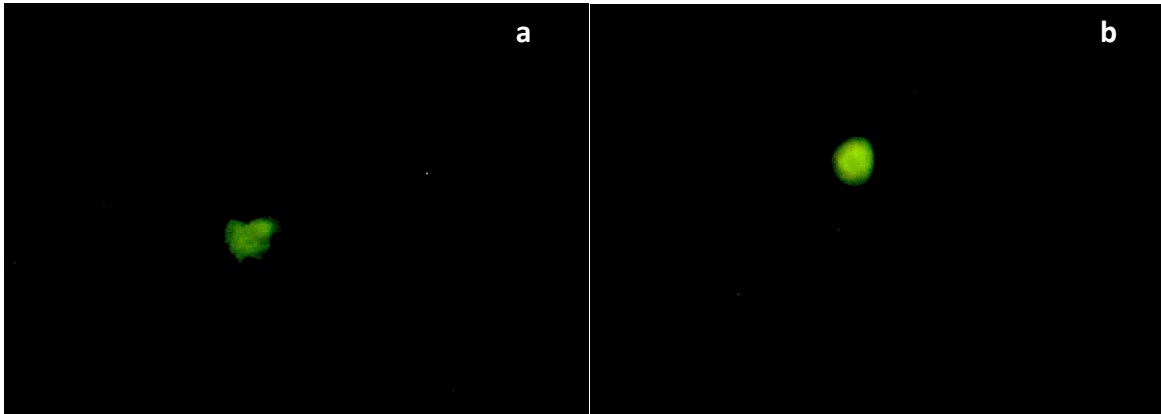


Figura S2. Expresión de GFP en protoplastos, vista bajo filtro de luz azul en un microscopio estereoscópico. (a) Expresión de GFP en protoplasto transfectado con la construcción pGem 35S+GFP, (control positivo). (b) Expresión de GFP en protoplasto transfectado con la construcción EuMV A y 1350+GFP.

Figura S3

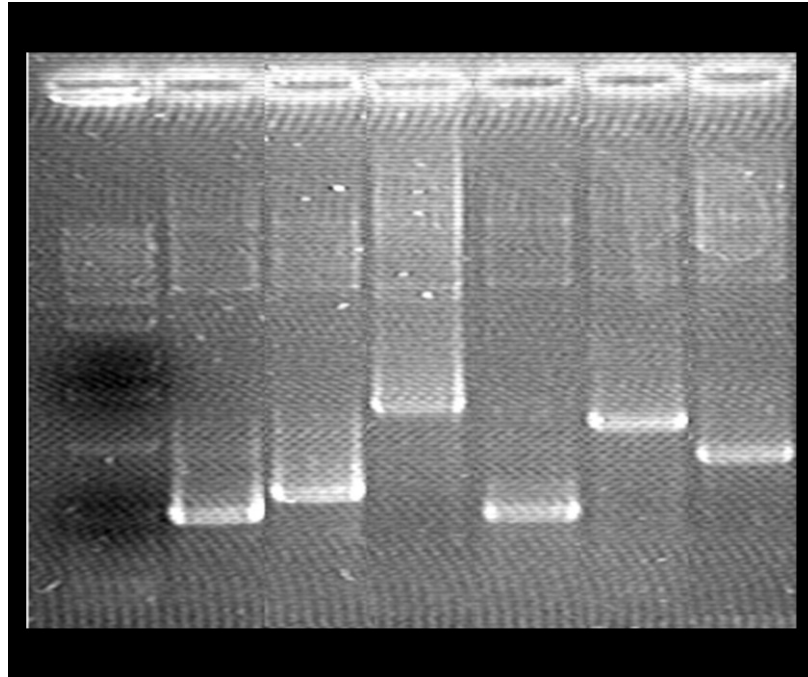


Figura S3. Amplicones obtenidos con oligonucleótidos sintéticos para producir una serie de componentes DNA-C de sistemas tripartitas alternativos. Los oligonucleótidos 1 y 4 están diseñados para eliminar una parte de *Rep* y poner a *TrAP* y *REn* bajo el promotor nativo de *Rep*; la combinación de oligonucleótidos 1 y 5 dan origen a una versión corta con 342 pb de *Rep* y la combinación 1 y 6 dará origen a una versión con 641pb de *Rep*. Estas versiones serán generadas con el fin de obtener el promotor nativo de *TrAP*; La combinación de oligonucleótidos 2 y 3 generará un DNA-A* con mutaciones sin sentido en *AC4* y *Rep*.