



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Generación de vectores de expresión para el
análisis funcional de secuencias reguladoras del
virus huasteco del chile**

Tesis que presenta

Rosa Guadalupe Gómez Castañón

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2004.



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

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 007 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 31 días del mes de agosto del año 2004, se reunió a las 10:00 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
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Secretario	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Rosa Guadalupe Gómez Castañón

sobre la Tesis intitulada:

Generación de vectores de expresión para el análisis funcional de secuencias reguladoras del virus huasteco del chile

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 31 días del mes agosto de 2004.


Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



La presente tesis de maestría en ciencias en la especialidad de biología molecular fue elaborada por Rosa Guadalupe Gómez Castañón y aprobada el 27 de Agosto de 2004 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga



Dr. Angel Gabriel Alpuche Solís



Dr. Francisco Jiménez Bremont

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

Durante la realización de este trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 176109) y del IPICYT.

Dedicatorias

A mi mamá Margarita por todo el apoyo y cariño que siempre me ha dado, por impulsarme siempre a ser mejor persona y dar siempre lo mejor de mí y por darme el mejor ejemplo a seguir.

A mi hermano Agustín y mi prima Esperanza por estar siempre conmigo, apoyarme, escucharme y darme ánimos cuando lo necesite.

A mi abuelita Alejandra por estar siempre conmigo cuidarme y darme todo su cariño.

A toda mi familia por su cariño y apoyo, porque sin ellos no sería la persona que soy.

Agradecimientos

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga, por su dirección en el presente trabajo, por sus enseñanzas, paciencia y apoyo, y por contagiarme su amor a los geminivirus.

A los Drs. Ángel Gabriel Alpuche Solís y Francisco Jiménez Bremont, por aceptar fungir como mis sinodales y por todos sus consejos para mejorar mi trabajo.

A Salvador Ambriz por ayudarme, aconsejarme y apoyarme durante la realización de este proyecto.

A mis amigas Mireya, Carolina y Rocío por se lo que son porque no puedo tener unas mejores.

A mis compañeros de laboratorio Clara, Ruth, Sergio, Paola, Silvia, Armando, Astrid, Pablo, Rosy, Vero y Elvira, y todos mis compañeros del Instituto, por su ayuda cuando la necesite, su paciencia conmigo y sus consejos.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por la oportunidad que me brindaron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

A Dios por darme la oportunidad de estar aquí y permitirme llegar a donde estoy.

Índice

	Página
Dedicatorias.....	4
Agradecimientos.....	5
Lista de tablas.....	8
Lista de figuras.....	9
Resumen.....	10
Abstract.....	11
Introducción.....	12
Organización genómica de los geminivirus.....	13
Regulación de los genes “tempranos” en begomovirus.....	15
Regulación de los genes “tardíos”:	
descubrimiento de un silenciador viral.....	17
Delimitación de los elementos que responden a TrAP.....	19
Mecanismos de acción de TrAP.....	22
Algunas interrogantes en el campo de la regulación de los genes tardíos en begomovirus.....	23
Objetivos.....	25
Materiales y Métodos.....	26
Análisis de secuencias.....	26
Oligonucleótidos y plásmidos.....	26
Construcción y verificación de los vectores.....	26
Aislamiento y manipulación enzimática del DNA.....	30
PCR.....	31

Resultados.....	32
A.- Construcciones para delimitar el silenciador de PHV.....	32
A.1- Identificación de la región de PHV homóloga a la región silenciadora de TGMV.....	32
A.2 - Obtención de los fragmentos de tamaño decreciente de la potencial región silenciadora.....	32
A.3 - Modificación del vector pCP693GUS.....	37
A.4 - Generación de vectores de expresión transitoria con fragmentos de la región Sil de PHV.....	39
A.5- Generación de vectores de expresión transitoria con promotores híbridos TGMV-PHV.....	41
B.- Vectores para evaluar promotores sintéticos con múltiples copias del CLE.....	42
B.1- Diseño de oligonucleótidos con tres copias del CLE.....	42
B.2- Obtención de los vectores binarios pBI3CLE46S y pBI3CLE90S.....	42
B.3- Obtención del vector binario pBI6CLE46S.....	44
B.4- Obtención de los vectores de expresión transitoria pBS3CLE46S, pBS3CLE90S y pBS6CLE46S.....	44
C.- Delimitación teórica de potenciales elementos reguladores de promotores tardíos, y generación de vectores para caracterizarlos experimentalmente.....	45
C.1- Identificación de “módulos complejos conservados” en los promotores CP y V2.....	45
C.2- Construcciones para el análisis funcional de CMAs que contienen CLEs.....	56
C.2.1- Obtención de los vectores binarios pBI46S-CLE/G, pBI46S-T/CLE, pBI90S-CLE/G y pBI90S-T/CLE.....	56
C.2.2- Obtención de los vectores de expresión transitoria pBS46S-CLE/G, pBS46s-T/CLE, pBS90S-CLE/G y pBS90S-T/CLE.....	57
Discusión.....	60
Referencias.....	66

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación de la familia <i>Geminiviridae</i>	12
Tabla 2. Oligonucleótidos para la generación de vectores de expresión.....	27

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Organización de un begomovirus bipartita típico.....	14
Figura 2. Alineamiento obtenido por el método Clustal (DNASar) de la región de 300 pb que contiene el silenciador de TGMV con la región homóloga en PHV	33
Figura 3. Fragmentos de tamaño decreciente de la región silenciadora potencial de PHV	35
Figura 4. Plásmidos con los fragmentos derivados de la región silenciadora de PHV y TGMV	35
Figura 5. Iniciadores para la obtención de los fragmentos de 140 y 98 pb del silenciador potencial de P.....	36
Figura 6. Modificación del vector pCP693GUS	38
Figura 7. Polilinker diseñado para incrementar la versatilidad del vector pCP693GUS	38
Figura 8. Vectores de expresión transitoria con los segmentos del silenciador de PHV y TGMV	40
Figura 9. Vectores 3CLE	43
Figura 10. Vectores de expresión transitoria 3CLE	46
Figura 11. Vectores 6CLE	47
Figura 12. Combinación de secuencias de DNA conservadas (motifs) que componen la región “temprana/Ori” (origen de replicación) de los tres linajes principales de begomovirus.....	50
Figura 13. CMA tripartita encontrado en algunos begomovirus de Asia que aparentemente involucra diferentes CMAs	51
Figura 14. Elementos conservados en las regiones B y C de promotor TGMV que fueron definidas experimentalmente por Sunter y Bisaro (2003)	52
Figura 15. Algunas líneas de evolución de promotores tardíos de Begomovirus originarios de Asia y Australia	54
Figura 16. Hipótesis de la evolución del promotor Cp de Begomovirus del NM a partir del promotor V2 de Begomovirus asiáticos	55
Figura 17. Oligonucleótidos con los CMAs, “CLE-G” y “T-CLE”	58
Figura 18. Vectores binarios con CMAs	58
Figura 19. Vectores de expresión transitoria con CMAs	59

Resumen

El virus Huasteco del Chile (PHV) es un importante fitopatógeno que pertenece a la familia de los geminivirus, los cuales se caracterizan por un genoma circular de DNA de cadena sencilla (DNACs) y una cápside con apariencia de partícula geminada. Trabajos previos enfocados al estudio del control transcripcional de los genes de diferentes geminivirus, han conducido a la identificación de varios elementos reguladores, dos de los cuales son críticos en el control de la expresión de los llamados “genes tardíos”. Uno de ellos es un silenciador que funciona de modo promotor-específico, y el otro es el llamado “elemento tardío conservado” (CLE), que es un blanco funcional de la proteína viral que activa la expresión de los genes tardíos, como el que codifica a la proteína de la cápside (CP).

Este trabajo forma parte de un amplio proyecto de investigación orientado a la caracterización y análisis funcional de secuencias reguladoras del promotor *CP* de PHV y otros geminivirus. Se generaron cuatro vectores de expresión que contienen fragmentos progresivamente menores de la potencial región silenciadora de PHV, los cuales serán utilizados para definir con mayor precisión la localización genómica del silenciador. Se construyó también una serie de vectores de expresión transitoria y otra de vectores binarios para la transformación de plantas, que contienen diferente número de copias del llamado “elemento tardío conservado” (CLE) fusionados a dos tipos de promotores mínimos; estos vectores permitirán establecer, tanto en sistemas de expresión transitoria como estable, si la multimerización del CLE incrementa la activación del promotor por el transactivador viral (TrAP), y hasta qué límite.

Adicionalmente, se desarrolló un análisis filogenético-estructural de la región intergénica de 120 geminivirus, dando como resultado la identificación de nuevos elementos y módulos complejos conservados, que podrían estar involucrados en el control transcripcional del gen *CP* y otros genes tardíos. El análisis también reveló una serie de conexiones filogenéticas previamente insospechadas entre geminivirus de América y de Asia, las cuales contradicen algunas de las hipótesis más aceptadas acerca de la historia evolutiva de esta familia viral, y sugieren otras con amplias implicaciones biológicas y taxonómicas. Por último, se generaron vectores de expresión que contienen dos de los módulos complejos conservados identificados en el estudio comparativo, fusionados a promotores mínimos que controlan la expresión del gen reportero *GUS*; dichos vectores permitirán el análisis experimental de esos módulos conservados, proporcionando información importante acerca de la organización funcional del promotor *CP* de los geminivirus.

Abstract

Pepper Huasteco virus (PHV) is an important plant pathogen that belongs to the family of the geminiviruses, which are characterized for a single-stranded circular DNA genome (ssDNA) and virions with appearance of twinned isometric particles. Previous studies on geminivirus transcriptional control of genes have led to the identification of several regulatory elements, two of which are critical in controlling the expression of the so-called “late genes”. One of them is a promoter-specific silencer, and the other one is called the “conserved late element” (CLE), which is a functional target for the viral protein that activates late genes expression, including the gene that encodes the virus coat protein (CP).

This work is a part of an extensive research project aimed to delimitate and functionally characterize regulatory sequences of the *CP* promoter of PHV and other geminiviruses. Four expression vectors containing progressively smaller fragments from the potential silencer region of PHV were generated, which will be used to define more precisely the silencer genomic location. It was also constructed a series of plasmids for transient expression assays, and another one of binary vectors for plant transformation, containing a variable number of copies of the “conserved late element” (CLE), fused to different minimal promoters; these vectors will allow us to establish, both in transient expression assays and stable expression systems, if or not promoter activation by the viral transactivator (TrAP) is dependant on the CLE number of copies.

In addition, a phylogenetic-structural analysis of the intergenic region of 120 geminiviruses was carried out, leading to the identification of new putative regulatory elements and “conserved modular arrangements” (CMAs), which may be involved in the transcriptional control of *CP* gene and other viral genes. Our analysis also revealed previously unsuspected phylogenetic connections between geminiviruses from America and Asia, which disagree with prevalent hypotheses on the evolutionary history of this viral family, and suggest other ones with wide biological and taxonomical implications. Finally, expression vectors that contain two of the CMAs identified in the comparative study, fused to minimal promoters controlling the expression of a GUS gene reporter were generated; these vectors will make possible the experimental analysis of these evolutionarily conserved modules, providing important information about the functional organization of the geminivirus promoters.

Introducción

Los geminivirus constituyen un grupo muy diverso de virus fitopatógenos, que ocasionan daños considerables a cultivos agrícolas en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo; se caracterizan por poseer un genoma circular de DNA de cadena sencilla (DNACs) y una cápside que semeja dos icosaedros incompletos y fusionados, que al microscopio electrónico se observan como partículas “gemelas”, rasgo que los distingue de todos los virus conocidos (Zhang *et al.*, 2001). Los geminivirus tienen la capacidad de replicar su genoma en el núcleo de las células vegetales a través de un mecanismo de círculo rodante (RCR), usando las DNA polimerasas celulares. La transcripción es realizada por la RNA polimerasa II a partir de la forma replicativa (RF) de doble cadena que se genera por la acción de la maquinaria molecular del huésped (revisado por Bisaro, 1996; Gutiérrez, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).

La familia *Geminiviridae* se clasifica actualmente en cuatro géneros definidos en base al vector que los transmite, el hospedero que infectan y su estructura genómica, en: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus* (Tabla 1), (Rybicki *et al.*, 2000; Fauquet *et al.*, 2003). El género más diversificado y ampliamente distribuido, el de los *Begomovirus*, agrupa a los virus que son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), infectan plantas dicotiledóneas y poseen en su mayoría genomas bipartitas. A este género pertenecen virus de gran importancia económica que causan pérdidas cuantiosas a los productores agrícolas de muchos países, como el *virus del enrollamiento amarillo de la hoja del tomate* (TYLCV), el *virus africano del mosaico de la yuca* (ACMV), el *virus del enrollamiento de la hoja del algodón* (CLCuV), y el *virus Huasteco del chile* (PHV), entre otros.

Tabla 1. Clasificación de la familia *Geminiviridae*.

Género	Genoma	Tipo de Planta que Infecta	Vector
Mastrevirus	Monopartita	Monocotiledóneas y Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)
Curtovirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)
Topocuvirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas

			Saltadoras (<i>Membracidae</i>)
Begomovirus	Monopartita y Bipartita	Dicotiledóneas	Mosquita blanca (<i>Aleyrodidae</i>)

Organización genómica de los Begomovirus

El genoma de los begomovirus bipartitas, entre los que se encuentran todos los originarios del continente americano, se compone de dos moléculas de DNA, denominadas DNA-A y DNA-B, cada una de las cuales miden entre 2.6 y 2.8 kb. Ambos componentes están organizados en unidades de transcripción divergentes separados por una región intergénica (IR), la cual contiene el origen de replicación del virus y dos promotores divergentes (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). La organización genómica del *virus Huasteco del chile* (PHV), que se encuentra ampliamente distribuido en México, ilustra bien las características típicas de los begomovirus (Figura 1). Con la excepción de un segmento de aproximadamente 200 pb de la IR, conocida como la “región común” (RC) que se encuentra en ambos DNAs virales, los componentes genómicos de los begomovirus son completamente diferentes. El componente A típicamente codifica 5 genes, denominados AV1, AC1, AC2, AC3, AC4, en tanto que el DNA-B codifica 2 genes, BV1 y BC1. El componente A contiene toda la información necesaria para la replicación y encapsidación del virus, mientras que el componente B codifica a las proteínas involucradas en el movimiento viral célula-célula y sistémico (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).

El producto del gen AV1 es la proteína de la cápside o CP (Kallender *et al.*, 1988) y es necesaria para la transmisión por el insecto (Azzam *et al.*, 1994). El producto de AC1 es Rep, una proteína multifuncional que se une a secuencias específicas de DNA, posee actividad de endonucleasa y ATPasa, interactúa con reguladores del ciclo celular, y es esencial para la replicación de ambos componentes genómicos (Elmer *et al.*, 1988; Fontes *et al.*, 1992, 1994; Gutiérrez, 1999). El producto del gen AC2 es TrAP (proteína activadora de la transcripción), la cual está involucrada en la regulación de los genes virales que se expresan en etapas tardías de la infección (CP y BV1), y actúa como un supresor del mecanismo del silenciamiento de plantas (Sunter y Bisaro, 1991; Sunter *et al.*, 1994; Saunders y

Begomovirus

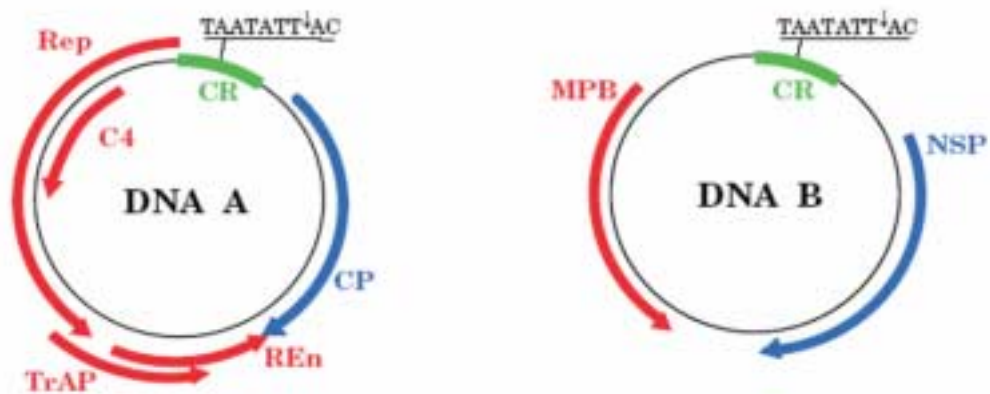


Figura 1. Organización genómica de un begomovirus bipartita típico, como PHV. Proteínas codificadas: Rep, proteína de replicación; TrAP, proteína activadora de la transcripción; REn, proteína potenciadora de la replicación; CP, proteína de la cápside; MP, proteína de movimiento y NSP, proteína de transporte nuclear; RC, región común de ambos componentes genómicos. La secuencia TAATATTAC es el sitio de inicio de la replicación por círculo rodante.

Stanley, 1995; van Wezel *et al.*, 2001; 2002; 2003). El producto de AC3 se ha denominado REn (proteína potenciadora de la replicación), la cual interactúa con Rep para hacer más eficiente la replicación (Elmer *et al.*, 1988; Sunter *et al.*, 1990; Sung y Coutts, 1995; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). El producto de BV1 es la proteína de transporte nuclear (NSP), la cual facilita el movimiento del DNA viral del núcleo hacia el citoplasma (Sanderfoot y Lazarowits, 1996), en tanto que el producto de BC1, la proteína de movimiento (MP), funciona como una proteína de movimiento clásica, promoviendo un incremento en el límite de exclusión de los plasmodesmos (Sudarshana *et al.*, 1998; Ward y Lazarowitz, 1999).

La nomenclatura para los genes de los geminivirus ha experimentado varios cambios en los últimos años, lo que ha derivado en el uso de diferentes designaciones para un mismo gen en la literatura especializada, provocando confusión. Para evitar esto, en el presente escrito se usará en lo sucesivo la nomenclatura moderna, en la que *Rep*, *TrAP*, *REn*, *CP*, *NSP* y *MP* sustituyen a las designaciones AC1, AC2, AC3, AV1, BV1 y BC1 (o AL1, AL2, AL3, AR1, BR1 y BL1), usadas anteriormente.

Regulación de los genes “tempranos” en Begomovirus

En todos los sistemas virales, sean estos bacterianos, vegetales o animales, la expresión coordinada de los genes es fundamental para que se realice adecuadamente el ciclo de infección. La mayoría de los virus codifican sus propias proteínas reguladoras, las cuales interactúan con factores del hospedero y modulan sus actividades. Al inicio de la infección, el virus depende por completo de la maquinaria transcripcional de la célula huésped; sin embargo, una vez que ciertas proteínas se han sintetizado, éstas participan en la regulación de un segundo grupo de genes, cuyas actividades son requeridas en etapas subsecuentes de la infección. Los genes virales que son expresados en la primera fase de la infección suelen denominarse “tempranos” mientras que los requeridos en las últimas etapas de la misma son llamados genes “tardíos” (Nevins, 1991; Martin y Green, 1992).

En el caso de los geminivirus, la transcripción de los genes que se expresan en etapas tempranas de la infección (*Rep*, *TrAP* y *REn*), se lleva a cabo sin la participación de los factores virales. Hasta ahora solo se ha estudiado en detalle la regulación de *Rep*, aunque se tiene ya alguna información acerca del control de la expresión de *TrAP* y *REn* en PHV (Shimada-Beltrán y Rivera-Bustamante, comunicación personal). En los primeros trabajos con promotores de *Rep* se encontró un hallazgo interesante: la proteína *Rep* regula negativamente su propia expresión. Varios grupos de investigación observaron, en ensayos de expresión hechos en protoplastos, que la co-transformación de plásmidos que expresan *Rep* y vectores que portan el promotor *Rep* del mismo virus fusionado a un gen reportero, resultaba en un descenso en el nivel de expresión del mismo, indicando que esta proteína reprime su propia expresión (Haley *et al.*, 1992; Sunter *et al.*, 1993). Posteriormente se formuló la hipótesis de que esta auto-represión es mediada por los mismos elementos de DNA que son reconocidos y unidos por *Rep* para iniciar la replicación viral, los “iterones” (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; a; b). Esta hipótesis fue luego confirmada experimentalmente en varios sistemas, incluyendo TGMV, BGMV y TYLCSV (Eagle *et al.*, 1994; Eagle y Hanley-Bowdoin, 1997; Brunetti *et al.* 2001).

El análisis funcional de los promotores *Rep* ha demostrado que éstos poseen propiedades muy variadas, las cuales dependen del virus del cual provienen. Por ejemplo, el promotor *Rep* de PHV fue examinado en plantas transgénicas de tabaco, y se encontró que es capaz de dirigir la expresión de un gen reportero a niveles que van de bajos a moderados, dependiendo del estado de desarrollo de la planta; esa expresión está restringida al tejido vascular y a los meristemos (Ruiz-Medrano, 1996). El promotor equivalente del *virus Taino del moteado del tomate* (ToMoTV) dirigió también una expresión específica de tejido vascular en plantas de tabaco transgénicas, que fue de 10 a 40 veces menor al nivel de actividad del promotor 35S (pr35S) del *virus del mosaico de la coliflor* (CaMV, un caulimovirus) (Ramos *et al.*, 2004). En contraste, el promotor *Rep* del *virus Multan del enrollamiento de la hoja del algodón* (CLCuMV) de la India, parece funcionar como un promotor constitutivo en plantas y es 4 o 5 veces más fuerte que el promotor 35S de CaMV, lo que lo

convierte quizás en el promotor natural más potente que se ha caracterizado en sistemas vegetales (Xie *et al.*, 2003).

Pocos son los estudios que se han orientado a delimitar en forma detallada los elementos específicos que determinan las propiedades de los promotores *Rep*. Uno de estos elementos reguladores, la llamada “caja G” (CACGTG), se encuentra conservada en posición y secuencia en todos los begomovirus de América (Argüello-Astorga *et al.*, 1994 a; b). La mutación experimental de la caja G presente en la IR del *virus del mosaico dorado del tomate* (TGMV) provocó una disminución drástica de la actividad del promotor *Rep*, indicando que este elemento es crucial para activar la expresión temprana de este virus y quizás también la de todos los begomovirus de este continente (Eagle y Hanley-Bowdoin, 1997). Los promotores *Rep* de begomovirus del Viejo Mundo (VM), que carecen de un elemento homólogo a la caja G, no han sido estudiados tan detalladamente. Sin embargo, se reportó recientemente el análisis funcional de variantes truncadas del promotor *Rep* de CLCuMV, en el que se descubrió que una secuencia de 35 pb en la región -146/-112 contribuye de modo particular a la excepcional fuerza de este promotor (Xie *et al.*, 2003). Esa secuencia incluye tres elementos conservados (identificados en este estudio; ver más adelante), ninguno de los cuales es homólogo a la caja G de los begomovirus americanos.

Regulación de los genes tardíos: descubrimiento de un silenciador viral

En uno de los primeros trabajos en los que se examinó de modo sistemático a los promotores de un begomovirus (ACMV), se realizaron experimentos para determinar si alguna de las proteínas virales interviene en su regulación. Para ello, se cotransfectaron construcciones en las que diferentes promotores virales dirigían la expresión del gen reportero GUS y vectores que expresaban a cada uno de los genes virales bajo el control del pr35S. Estos experimentos llevaron al descubrimiento de que el producto del gen *TrAP* incrementa la actividad de los promotores de *CP* y *NSP* (Haley *et al.*, 1992). Otros investigadores llegaron a una conclusión similar analizando los promotores de TGMV (Sunter y Bisaro, 1991,

1992). Estos hallazgos permitieron establecer la función de TrAP como un regulador de la transcripción de los genes tardíos *CP* y *NSP*.

Debido a que los estudios iniciales de los promotores tardíos fueron realizados en protoplastos, en los que su actividad fue apenas detectable en ausencia de TrAP, se supuso que el mecanismo por el cual esta proteína viral regula la expresión génica debía ser muy sencillo: básicamente, un proceso de activación por la unión de TrAP a secuencias específicas del promotor y la posterior interacción de la proteína con la maquinaria transcripcional del hospedero. Esta idea tuvo que ser descartada una vez que se analizaron las primeras plantas transgénicas con construcciones que incluían promotores *CP* de begomovirus. Ruiz Medrano (1996) observó que plantas de tabaco portadoras de un transgén compuesto por el promotor *CP* truncado de PHV, y la secuencia codificante del gen GUS, presentaban una fuerte actividad del gen reportero en tejido vascular, en ausencia completa de TrAP y cualquier otro factor viral. Lo mismo se encontró en plantas con construcciones que contienen a otro promotor tardío, *BV1* (*NSP*) fusionado a GUS (Ruiz-Medrano, 1996). Por otra parte, Sunter y Bisaro (1997) al examinar plantas de *Nicotiana benthamiana* portadoras de un transgén con el promotor *CP* truncado de TGMV, encontraron también una elevada expresión del gen reportero en el floema, en ausencia de infección alguna. Estos trabajos mostraron claramente que los promotores *CP* de begomovirus contienen secuencias que son reconocidas por factores activadores presentes en las células del tejido vascular. Este hallazgo sugería que los genes *CP* y *NSP* podrían expresarse en el floema en las etapas tempranas de la infección, lo cual no tenía mucho sentido; esas observaciones contradictorias fueron finalmente explicadas con el descubrimiento de un elemento silenciador, localizado más arriba del límite 5' de los promotores *CP* truncados que fueron examinados en los estudios mencionados. En ambos casos los investigadores observaron que plantas portadoras de una construcción con el promotor *CP* completo no expresaban al gen reportero en ningún tejido cuando TrAP estaba ausente. Sin embargo, cuando estas plantas fueron infectadas con el virus silvestre (PHV o TGMV, según el caso), la expresión de GUS se pudo observar tanto en el tejido vascular como en mesófilo. Estos

resultados llevaron a la conclusión de que debía existir un elemento silenciador arriba de los promotores *CP* truncados. En el caso de TGMV dicha secuencia silenciadora pudo ser mapeada en un fragmento de aproximadamente 300 pb, flanqueado por los sitios de restricción *NheI/BamHI*, y localizado en la región genómica que codifica a la misma proteína TrAP y una pequeña porción de la proteína Rep. Esta secuencia de 300 pb fue capaz de reprimir, en el tejido vascular, la actividad del promotor *CP* truncado, tanto cuando se colocó en posición 5' como en 3' respecto al mismo. El silenciador no mostró tener un efecto sobre ningún otro promotor del componente A, sino que parece reprimir en forma específica al promotor *CP* por un mecanismo no conocido (Sunter y Bisaro, 1997). El silenciador de PHV no ha sido todavía mapeado, pero puesto que el elemento análogo de TGMV reside en una región codificante, en la que las variaciones de secuencia están más restringidas que en regiones no codificantes, es razonable suponer que dicho elemento regulador puede estar bien conservado, tanto en secuencia como en posición relativa, en todos los begomovirus.

Delimitación de los elementos que responden a TrAP.

En el estudio de Sunter y Bisaro (1997) se demostró que TrAP es necesaria para la activación del promotor *CP* en células de mesófilo, y para la desrepresión del mismo en células del floema, sugiriendo que esa proteína viral interactúa con factores celulares específicos de tejido para hacer posible la expresión de *CP* por diferentes mecanismos. La siguiente cuestión a resolver fue la identificación de las secuencias virales que median estas acciones de TrAP sobre los promotores tardíos. Una serie de observaciones han mostrado claramente que la función del transactivador viral no es específica de virus, ya que la proteína de un begomovirus es capaz de activar promotores *CP* de otros virus del mismo género. Por ejemplo, se ha demostrado que los genes *TrAP* de ACMV, TPV (*virus texano del chile*), SLCV (*virus del enchinamiento de la hoja de la calabaza*), TYLCV y TGMV, son funcionalmente intercambiables entre ellos (Sunter *et al.*, 1994; 1997; Saunders y Stanley, 1995; Sung y Coutts, 1995). La ausencia de especificidad funcional sugiere que los promotores tardíos de la mayoría, si no es que todos los begomovirus,

contienen una o más secuencias conservadas que son reconocidas, directa o indirectamente, por el transactivador viral.

En un intento por identificar tentativamente las secuencias blanco de TrAP, Argüello-Astorga *et al.* (1994a) analizaron la región intergénica de los geminivirus entonces conocidos, con un enfoque comparativo “filogenético-estructural”. Como resultado de esto, se identificó a un elemento de secuencia que se encuentra conservado en los promotores *CP* y *NSP* de la mayoría de los begomovirus del VM y en una parte de los del Nuevo Mundo (NM), lo cual sugería una función potencial como elemento de respuesta a TrAP. Esta secuencia, con el núcleo octamérico GTGGTCCC, se denominó el “Elemento Tardío Conservado” o CLE (por sus siglas en inglés).

Para examinar la hipótesis del CLE como un blanco funcional de TrAP se realizaron dos clases de experimentos. Los primeros consistieron en realizar mutaciones dirigidas de tres elementos con el núcleo GGTC presentes en una versión del promotor *CP* de PHV, truncada en la posición -115, y cuya actividad es potenciada por TrAP. La mutación del CLE más proximal al gen *CP* abolió prácticamente la respuesta a ese transactivador viral, en tanto que la mutación de los dos elementos más distales disminuyó el nivel de inducibilidad, pero sólo parcialmente (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999; Monsalve- Fonnegra, 2002). Estos experimentos de “pérdida de función” demostraron que los CLEs son necesarios para la activación por TrAP, pero no prueban que ellos son suficientes para conferir al promotor la capacidad de responder a TrAP. Por lo tanto, se realizó un segundo tipo de experimentos, en los que se utilizaron construcciones con oligonucleótidos sintéticos que incluían una o dos copias del CLE, fusionados a diferentes versiones truncadas del promotor 35S, -90/+1 y -46/+8. Estas construcciones CLE-t35S-GUS fueron transfectadas por biobalística a hojas de tabaco y chícharo, junto con plásmidos que expresaban la proteína TrAP de PHV, observándose una clara transactivación del gen reportero en todos los casos; esto demostró que el CLE es necesario y suficiente para mediar la acción de TrAP sobre un promotor heterólogo (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). Un estudio posterior, en el que se analizó el nivel de

transactivación de promotores quiméricos con 1 o 2 copias del CLE, mostró de modo concluyente que la duplicación del elemento resulta en un mayor nivel de activación por TrAP (Monsalve-Fonnegra, 2002).

La participación del CLE en el proceso de activación de los promotores tardíos de otros begomovirus no ha sido confirmada por otros grupos de investigación, aunque en un estudio reciente del promotor *CP* de TGMV se demostró que una secuencia de 18 pb (región -125/-107), que incluye al único CLE presente en ese promotor, contiene un elemento de respuesta a TrAP (Sunter y Bisaro, 2003). Por otra parte, es un hecho que el CLE no está presente en la IR de todos los begomovirus; sin embargo, los promotores que contienen CLE y los que no lo tienen son funcionalmente equivalentes como lo indica la observación de que los promotores tardíos de BGMV (*Virus del mosaico dorado del frijol*) que no cuentan con CLE, son transactivados por la proteína TrAP de TGMV, en tanto que la proteína de BGMV también transactiva los promotores tardíos de TGMV. La conclusión es que en los promotores de estos virus deben existir secuencias funcionalmente equivalentes que responden al transactivador heterólogo (Quin y Petty, 2001).

En un estudio más reciente, Sunter y Bisaro (2003) demostraron que las secuencias requeridas para la transactivación del promotor *CP* de TGMV se encuentran dentro de los primeros 125 pb del mismo, y que uno o más elementos requeridos para la activación por TrAP se encuentra en la región -125/-107, ya que su delección abolió la inducibilidad del promotor por TrAP. Esta región de 18 pb contiene el CLE; sin embargo, experimentos en los que se fusionó dicha secuencia a un promotor mínimo heterólogo, mostraron que ella por sí sola no confiere la capacidad de responder a esa proteína viral, indicando que el proceso de transactivación involucra secuencias adicionales, las cuales fueron luego mapeadas en la región -96/-60. Una observación interesante es que esta región reprime la expresión basal del promotor *CP* cuando TrAP no está presente. Otra observación importante de este estudio, es que la delección parcial del CLE presente en la región activadora (-125/-107), en el contexto del promotor *CP* truncado (-657), no afectó la capacidad del promotor de ser transactivado por TrAP (Sunter y Bisaro, 2003). Esto

sugiere, entre otras explicaciones, que existe más de un elemento de respuesta a dicha proteína viral en el promotor (Sunter y Bisaro, 2003).

Mecanismos de acción de TrAP

Los estudios de promotores *CP* de begomovirus han mostrado que las secuencias localizadas en la región intergénica son capaces de dirigir la transcripción de los genes tardíos en el tejido vascular, independientemente de cualquier proteína viral. Sin embargo, estas actividades potenciales del promotor son normalmente reprimidas en ausencia de TrAP, por la acción de un silenciador específico de promotor. Estas observaciones sugieren que la transactivación de los promotores tardíos podría ocurrir por al menos dos mecanismos diferentes: por desrepresión en el floema y por activación en otros tejidos como el mesófilo. Puesto que TrAP interviene en ambos procesos, se concluye que esa proteína viral funciona como un desrepressor/ activador específico de tejido.

No se sabe con certeza si TrAP actúa solo o requiere la presencia de factores del hospedero para interactuar con el CLE y secuencias análogas como un complejo transcripcional. Sin embargo, se ha demostrado en ensayos de unión al DNA *in vitro* que el transactivador de TYLCV (*Virus del enchinamiento y amarillamiento de la hoja de tomate*) y de PYMV (*Virus del mosaico y amarillamiento de la papa*) se unen preferentemente a DNA de cadena sencilla, y de un modo inespecífico, independiente de la secuencia (Noris *et al.*, 1996; Sung y Coutts, 1996). En realidad, no hay actualmente ninguna evidencia de que TrAP se una al CLE o alguna otra secuencia específica en DNA de cadena doble (Sunter y Bisaro, 1997, 2003). Por otra parte, algunos datos experimentales sugieren que uno o más factores de las plantas hospederas pueden reconocer al CLE y afectar la actividad del promotor asociado, ya que plantas transgénicas de tabaco portadoras de construcciones sintéticas con una o dos copias de ese elemento viral fusionadas a promotores mínimos heterólogos, expresan el gen reportero a niveles más elevados y con un patrón tisular diferente al de plantas transgénicas con construcciones idénticas pero que carecen de CLEs (Monsalve-Fonnegra, 2002).

TrAP tiene una estructura modular que consiste de una región amino terminal de naturaleza básica y una región carboxilo terminal de carácter ácido. La región central de la proteína se caracteriza por una serie de residuos de cisteínas e histidinas conservadas que podrían dar lugar a estructuras análogas a los llamados “dedos de zinc”. Se ha demostrado que una porción del dominio carboxilo terminal ácido de TrAP, cuando se fusiona con dominios de unión a DNA heterólogos, es suficiente para activar la transcripción en sistemas de levaduras y mamíferos (Hartitz *et al.*, 1999). Es muy probable que TrAP dirija la respuesta de los promotores virales a través de interacciones proteína-proteína, de modo análogo a las proteínas transactivadoras de algunos virus de DNA de mamíferos, como las proteínas VP16 de HSV (*herpes virus simplex*) y EBNA2 del virus de Epstein-Barr, las cuales se requieren para la activación de genes virales y celulares, pero no se unen directamente al DNA, sino que interactúan con proteínas represoras de la célula huésped (Gester y Roeder, 1988; Triezamberg *et al.*, 1988; Kristie *et al.*, 1989).

Se han descubierto recientemente otras propiedades funcionales importantes de las proteínas TrAP. Por ejemplo, la proteína TrAP del *Virus del enchinamiento y amarillamiento de la hoja del tomate de China* (TYLCCV) induce necrosis y es un supresor activo del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), el cual es un mecanismo de protección de las plantas contra las infecciones virales (van Wezel *et al.*, 2001; 2002). En congruencia con esos resultados, se ha demostrado que la sobre-expresión de proteínas TrAP de TGMV y BCTV (*Beet curly top virus*, un curtovirus) aumentan la susceptibilidad de plantas transgénicas a infecciones virales (Sunter *et al.*, 2001; 2003).

Algunas interrogantes en el campo de la regulación de genes tardíos de begomovirus.

Varias preguntas acerca del control de los genes tardíos de begomovirus esperan todavía respuesta. Entre las más importantes se encuentran las relativas al tamaño del silenciador, y la naturaleza de los factores represores que interactúan con el mismo, pues es muy probable que sus dimensiones sean bastante inferiores a los 300 pb en los que dicho silenciador ha sido mapeado en el caso de TGMV. La

delimitación más precisa de este elemento hará posible un análisis detallado del mismo, que será importante tanto para definir las secuencias que son críticas para su función, como para lograr el aislamiento de los factores del huésped que interactúan con las mismas.

Otras preguntas se relacionan con la observación de que los transactivadores de begomovirus no relacionados pueden complementarse funcionalmente, a pesar de que tales virus presenten muy pocas similitudes en las secuencias de sus regiones intergénicas: ¿reconoce el transactivador varias secuencias específicas de DNA?; ¿existen características comunes a los promotores tardíos de begomovirus de diferentes continentes?; ¿por qué el CLE parece mediar la respuesta a TrAP en ciertos begomovirus, como PHV, pero no en otros, como TGMV?; ¿qué secuencias son el blanco funcional de TrAP en los begomovirus que carecen de CLEs, como BGMV?.

Finalmente, persisten otras cuestiones más específicas relacionadas a los CLEs de PHV, tales como ¿qué tanto puede incrementarse la respuesta a TrAP de un promotor mediante el aumento del número de copias de ese elemento? ¿ese efecto se da de igual manera y al mismo nivel en sistemas de expresión transitoria y en sistemas de expresión estable?. Algunas de estas preguntas se pretenden contestar en el amplio proyecto de investigación en el cual se enmarca el presente trabajo.

Objetivos

Objetivo general

El propósito global del proyecto de investigación en el cual se enmarca el presente trabajo, es obtener una mejor comprensión de la organización funcional de los promotores tardíos de los begomovirus, utilizando para ello un doble enfoque, tanto experimental como teórico. Por una parte, delimitando y caracterizando los elementos reguladores del promotor *CP* del *virus Huasteco del chile* (PHV), como modelo experimental de esos promotores tardíos; y por otro lado, desarrollando un análisis filogenético-estructural de los promotores de los begomovirus conocidos, a fin de identificar elementos comunes y arreglos modulares conservados (CMAs), que guíen futuros estudios experimentales de esos promotores virales.

Objetivos Específicos

- Generar construcciones que hagan posible el mapeo fino del elemento silenciador del promotor *CP* de PHV.
- Construir vectores con promotores quiméricos TGMV-Sil/PHV-*CP*, en los que pueda determinarse experimentalmente si el silenciador de TGMV puede reprimir al promotor *CP* de un virus no relacionado.
- Generar vectores de expresión transitoria y vectores binarios para la transformación estable de plantas, con promotores sintéticos que contengan un número variable de copias del CLE.
- Desarrollar un análisis comparado de la región intergénica de 120 begomovirus, para identificar potenciales elementos reguladores y trazar relaciones evolutivas entre diversos linajes virales.
- Construir vectores de expresión transitoria y estable que contengan algunos de los módulos complejos conservados identificados en el análisis comparado, para determinar experimentalmente sus propiedades reguladoras.

Materiales y Métodos

Análisis de secuencias

Las secuencias genómicas de los virus PHV (No. de acceso X70418) y TGMV (No. de acceso K02029) fueron obtenidas del banco de datos del NCB (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias de la región intergénica de los begomovirus mencionadas en Fauquet et al. (2003) fueron obtenidas del GenBank, accesible a través de PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Para el análisis filogenético-estructural de la región intergénica (IR) se generó un banco de datos específico para la IR de cada uno de los 120 begomovirus fue editada a partir de las secuencias genómicas completas disponibles en el GenBank. En muchos casos, la RI fue dividida en varios segmentos, utilizando algunas secuencias invariantes, como la caja TATA del gen *Rep* y el elemento tallo-asa del origen de replicación, como puntos de referencia para hacer las divisiones. Esta subdivisión de la IR permitió una comparación más apropiada de regiones genómicas homólogas entre virus de diferentes continentes, utilizando el programa MegAlign de DNASTAR, que utiliza los métodos alternativos Jotun Hein y Clustal para alinear las secuencias comparadas. Los alineamientos generados de esa manera fueron la base de datos utilizada para realizar el análisis filogenético-estructural, en el cual se lleva a cabo primeramente una separación de las secuencias comparadas de acuerdo a los linajes reconocidos, y se procede a la identificación de elementos conservados dentro de cada uno de ellos; en una fase posterior esos elementos se comparan entre sí, ajustando gradualmente las similitudes entre líneas de descendencia hasta obtener un sistema de equivalencias robustas, que permita definir las verdaderas relaciones de homología, las cuales pueden o no corresponder a similitudes significativas a nivel de secuencia nucleotídica (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1996; 1998).

Oligonucleótidos y plásmidos

La síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fue realizada por Invitrogen (AccesoLab); sus secuencias son descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleotidos utilizados para la generación de los vectores de expresión.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
SMC 1	5' -ctcgaggcctggatccgctcgacgctagctctagagggcccg-3'
SMC 2	5' -aattcccgggcccctctagagctagcgtcgacggatccaggcctcgaggta-3'
Sil-100	5' -caaagtactgtcgacttctccatggtgacgtagatggc-3'
Sil-140	5' -aaaccggggtcgactacgctgctatctgtctcttgc-3'
DGRSAR-Rev	5' -gagtctagacggcagatcwgctagaggagg-3'
A-3CLE	5' -agcttgactagtggccccgctagcagtggtcccaaggcctagtggccccgtaact-3'
A-3CLEcomp	5' -ctagagttaacgggaccactaggccttgggcaactgctagcggggaccactagtca-3'
B-3CLE	5' -agcttaagtgggtggcccccaagatctagtggccccatagtggtcccagttact-3'
B-3CLEcomp	5' -agctaagtactgggaccactcatatggggaccactagatctggggaccactta-3'
CLE-G	5' -agctttgtcgacaagtggcctttcacgtggcatgcaagtggcccaggcgct -3'
CLE-Gcomp	5' -ctagaggcgcctgggaccactgtcatgccacgtgaaaggaccactgtcgacaa-3'
T-CLE	5' -agctttgtcgacaccggatggccgcgcatTTTTAAGTGGTCCCgtaact-3'
T-CLEcomp	5' -ctagagttaacggggcaactaaaaaatcgcgccatccggtgtcgacaa-3'

Los oligonucleótidos complementarios, que requieren aparearse para formar DNA de cadena doble que puede entonces clonarse en plásmidos, se diseñaron de manera que al ser apareados generaran extremos cohesivos *Hind* III y *Xba* I, y se

pudieran insertar en los vectores binarios pBI46S y pBI90S, excepto en el caso de los oligonucleótidos SMC 1 y 2 (que se usaron para generar el polilinker), que contienen extremos Kpn I y Eco RI. Los iniciadores Sil100 y Sil140, utilizados en reacciones de PCR para obtener los fragmentos del silenciador más pequeños, contienen un sitio Sal I en su extremo 5´.

Los oligonucleótidos fueron apareados para formar DNA de doble cadena siguiendo el procedimiento recomendado por Sambrook y Russell (2001), en cual se describe a continuación:

Buffer de apareamiento 1X (Tris 20mM pH7.5, MgCl₂ 10mM y NaCl 250mM)

Loa solucipon "stock" de los oligonucleótidos se preparo a una concentración de 2µm/µl

El apareamiento se realizó en el bufer 1X. la concentración final de los oligonucleótidos fue de 250ng/µl cada uno. La solución se coloca en un baño a 75°C se deja bajar la temperatura, cuando llega a 55°C se mantiene a esa temperatura por 2 horas, posteriormente se deja a temperatura ambiente y finalmente se almacena a 4°C.

Plásmidos

Los plásmidos utilizados para la generación de las construcciones del presente trabajo fueron los siguientes:

pBI46S y **pBI90S**: vectores binarios que contienen las versiones mínima (-46/+8) y truncada (-90/+1) del promotor 35S de CaMV, colocado corriente arriba del gen reportero GUS, y el terminador *nos* (Argüello-Astorga, 1996)

pCP693GUS: es un vector de expresión transitoria que contiene el cassette GUS-*nos* fusionado a los ocho primeros codones del marco de lectura abierto (ORF) de la proteína de la cápside (CP) y dirigidos por el promotor *CP* truncado en la posición -693 respecto al codón de inicio del gen *CP* (Ruiz-Medrano *et al.* 1999).

pBS (pBluescript II SK+) (vector de clonación de Stratagene, Inc.).

pBI121: vector binario que incluye un cassette de expresión con el promotor 35S completo del virus del mosaico de la coliflor, fusionado al gen GUS (Jefferson *et al.*, 1989).

Construcción y verificación de los vectores

La construcción de los plásmidos pBS503Sil y pBS248Sil usados para incrementar la cantidad del fragmento y conferirle nuevos sitios de restricción, se obtuvo mediante la clonación de los fragmentos de 503 y 248 pb en pBS, que se obtuvieron a partir de un plásmido que contiene el genoma de PHV A completo; y la construcción de los vectores pBS300SilTGMV y pCP698GUS300SilTGMV, se obtuvo clonando el fragmento silenciador de 300 pb que se obtuvo a partir de un plásmido que contiene el genoma de TGMV A completo en pBS.

Para generar los vectores para análisis de expresión transitoria pCP693Sil503, pCP693Sil248, y pCP693TSil300, los fragmentos de 503 pb, 248 pb, de PHV, y 300 pb de TGMV, fueron insertados en el plásmido pBS-CP693B y pCP693Sil140, pCP693Sil100 fueron generados clonando los fragmentos de 140 pb y 100 pb de PHV el vector pCP693*GUS (modificación de pCP693GUS). Los vectores pBI3CLE46S, pBI3CLE9OS, pBI46S-CLE/G, pBI46S-T/CLE, pBI90S-CLE/G y pBI90S-T/CLE, fueron generados insertando cada uno de los oligonucleótidos (A-3CLE, CLE-G y T-CLE) corriente arriba de los promotores (46S, 90S) de los vectores pBI46S y pBI90S. los correspondientes vectores para análisis de expresión transitoria pBS3CLE46S, pBS3CLE9OS, pBS46S-CLE-G, pBS46S-T/CLE, pBS90S-CLE-G, pBS90S-T/CLE, pBS35S se obtuvieron clonando sus respectivos casetes de expresión en el caso de 3CLE9OSGUS, 90S-CLE-G, 90S-T/CLE y 35SGUS en pBS, y en el caso de 3CLE46SGUS, 46S-CLE-G, y 46S-T/CLE, se clonaron en pBS35SGUS.

La verificación de las diferentes construcciones se hizo por análisis de restricción y/o secuenciación. La verificación de pBS503Sil y pBS248Sil y pBS300SilTGMV se hizo mediante un análisis de restricción con Apa I/Xba I, Apa I/Pst I, y Bam HI/Nhe I respectivamente; para los vectores pCP693Sil503, pCP693Sil248, y pCP693TSil300, se realizó el mismo procedimiento utilizando Eco RI/Bam HI para las primeras dos y Bam HI/Nhe I para la tercera; pCP693Sil140 y pCP693Sil100 fueron analizadas utilizando las enzimas Sty I/Kpn I y Sty I respectivamente y se secuenciaron. El escrutinio de pBI3CLE46S y pBI3CLE9OS se realizó con Nhe I, y para pBS3CLE46S y pBS3CLE9OS con Hind III y Sac I;

pBI3CLE46S y pBI3CLE9OS también fueron secuenciadas; para verificar pBS35S, se extrajo el casete de expresión usando Hind III y Eco RI, o Hind III y Sac I. el escrutinio de pBI46S-CLE/G, pBI46S-T/CLE, pBI90S-CLE/G y pBI90S-T/CLE se realizó comparando su patrón de restricción respecto a los plásmidos solos al digerirlos con AvalI; pBS90S-CLE/G, pBS90S-T/CLE, pBS46S-CLE/G y pBS46S-T/CLE se verificaron utilizando las enzimas Hind III y Eco RI para las primeras dos y Hind III y Sac I para las dos restantes.

Los vectores con 6 CLEs (pBI6CLE46S y pBS6CLE46S), se obtuvieron digiriendo los vectores pBI3CLE46S, y pBS3CLE46S con Hind III donde se clonó el oligonucleótido B-3 CLE. Para el escrutinio se utilizó la enzima Sca I.

Aislamiento y manipulación enzimática del ADN

La extracción de ADN plasmídico y la transformación de células competentes de *Escherichia coli*, se realizaron de acuerdo a procedimientos estándar (Sambrook y Russell, 2001); la transformación por electroporación de *Agrobacterium tumefaciens* se realizó como lo describen Gelvin y Schilperoot (1997); se utilizó un aparato de electroporación Electro Cell Manipulator ECM 630, y las condiciones de electroporación fueron de 25 μ F, 400 Ω con un pulso de 2.5KV. Para la purificación del DNA se utilizaron los kits comerciales Wizard SV Gel and Clean-Up System de Promega, QIAquick PCR purification kit, y QIAquick Gel Extraction kit de QIAGEN, los cuales fueron utilizados según las recomendaciones del proveedor. Las enzimas de restricción Apa I, Eco RI, Bam HI, Xba I, Nhe I, Pst I, Kpn I, Spe I, Sal I y Sma I, y la Ligasa de T4 fueron de Invitrogen, inc.; Hind III, Sac I y Xba I, de Promega; Ava II, Nhe I y Sty I, de New England BioLabs.

El procedimiento para generar extremos romos con el Fragmento Klenow de la polimerasa fue el siguiente:

- DNAs con extremos cohesivos 5':
 - 800 ng DNA
 - 2 μ l Buffer 10X
 - 1 μ l dNTPs (10 mM)

1 µl Klenow (2 U/µl)

H₂O destilada estéril para 20 µl de volumen de reacción

20 min a 37°C

- DNAs con extremos salientes 3':

800 ng DNA

2 µl Buffer 10X

1 µl Klenow (2 U/µl)

H₂O para 20 µl de volumen de reacción

5 minutos a 37°C, y luego adición de 1 µl dNTPs (10 Mm).

15 minutos a 37°C

PCR

Para la amplificación de los fragmentos que contienen los segmentos del silenciador de 140 y 100 pb se utilizó un termociclador TouchGene (Techne), y un protocolo con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 2 min a 94°C, 35 ciclos de amplificación de 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C, y 1.5 min a 72°C, con una extensión final de 5 min. a 72°C.

RESULTADOS

A.- Construcciones para delimitar el silenciador de PHV

A.1- Identificación de la región de PHV homóloga a la región silenciadora de TGMV

Considerando la importancia de su función, es razonable suponer que el segmento genómico que funciona como silenciador en TGMV debe estar conservado, al menos en su posición dentro del genoma, en todos o la mayoría de los begomovirus. Por lo tanto, el primer paso para delimitar el silenciador de PHV fue localizar en este virus la región genómica que es homóloga al segmento con propiedades de silenciador de TGMV. Esto se llevó a cabo a través de la comparación de las secuencias de ambos geminivirus utilizando el programa MegAlign de DNASTar, que permitió identificar la región de PHV que es equivalente al segmento *NheI*/*Bam*HI de TGMV. Como puede apreciarse en la Figura 2, éste último comprende una secuencia que inicia 63 nucleótidos arriba del codón de inicio de TrAP (nt. 1660 en la secuencia publicada, # de acceso: K02029) y termina en los codones 81-82 (nt.1356) del mismo gen. La región homóloga de PHV (que denominaremos "HSil" de aquí en adelante) empieza 56 nt arriba del codón de inicio de TrAP, y termina en el codón 88 del gen. Los sitios *NheI* y *Bam*HI de TGMV no existen en PHV, aunque en éste último, un sitio Apa I se encuentra adyacente al extremo 5' de la región de homología. Otros sitios de restricción relevantes también se indican la Figura 2.

A.2- Obtención de fragmentos de tamaño decreciente de la potencial región silenciadora de PHV

Uno de los principales objetivos del proyecto de investigación del que forma parte el presente trabajo, es delimitar la secuencia mínima que funciona como silenciador en PHV. Dado que este virus no posee un sitio de restricción único cercano al extremo 3' de la potencial región silenciadora, análogo al sitio *Bam* HI de TGMV, decidimos utilizar como segmento inicial a un fragmento nativo de PHV de

```

PHV-Sil      Apa I
TGMV-Sil    GGGCCCAGTCTTCCTATAAAGACTACCTCAGCGAAGAG
              GCTAGCTATAAAGTTTTCTCGACAAAGAG
              Nhe I
AAAAATAGGAGCCTCAATGACTGGGTCCAAAAAACGCCA
GAAAACACTCCACTAAGAAGTGGACTTTCCATAATGCGA

TCTACGTCACCATCGAAGAAGCTATCTTCACCACCGGAAG
AATTCGTCTTCTCAA-----CTCCCCCTCTATCAAAGC

TCAAACCTTCCCATAGATTTGCAAGAGACAGATACGACG
TCAA--CACAGAGCAGCTAAACGAAGAGCTAT-TAGAAGG

TAGAAGGATTGATCTCGCTTGGGGCTGTTCAATTTATATA
C-GACGAATTGACCTGAACTGTGGCTGTTCCATATACATT

CATATTAACGTGTGTTAAACAATGGATTTACGCACCGGGTA
CACATCGACTGCAGAAACAATGGATTACGCACAGGGGAA
              Kpn I
              Pst I
CCCATCACTGCAGCTCAAGCAGCGAATGGCGTTTTTATCT
CCTATCACTGTGCCTCAAGCAGAGAATGGCGTCTATATCT

GGGAGCTTCGAAATCCCTATATTTCAAATACGGCTAGT
GGGAGATAACAATCCCTCTATTTCAAGATAATCAGCGT

GGGAGAGCCCAATGTACACACGCAGCCGGGTATTTACATT
AGAGGATCC
              Bam HI
CAAGTCAGAGCAAAC CACAACATGAGGACAGCGTTGGGTC

TCCACAAAGCCTACTTCAACTTCCAAGTCTGGACGACGTT

GACGACGATTTCTGGGCAGATTTACTTAAATAGATTTAAA

              Xba I
TTGCTTGT CATGTTTTATCTAGA

```

Figura 2. Alineamiento obtenido por el método Clustal (DNASar) de la región de 300 pb que contiene el silenciador de TGMV (en azul) con la región homóloga en PHV (en negro). Los sitios de restricción se indican en rojo: Apa I, Pst I, Kpn I y Xba I para PHV, y Nhe I y Bam HI para TGMV; el codón de inicio está indicado en azul claro, y las regiones de homología están marcadas en amarillo.

503 pb (*Apa*I/*Xba*I) que contiene toda la región de homología (HSil) con el silenciador de TGMV, y unos 200 nt adicionales, es decir, la totalidad del gen *TrAP* y parte del gen *REn* (ver Figura 3). A partir de este fragmento genómico, que muy probablemente contiene al silenciador completo, planeamos generar otros de menor tamaño, que luego se examinarán en sistemas de expresión transitorios o estables, y de ese modo delimitar con mayor precisión la localización de ese elemento regulador. El segundo fragmento (248 pb) de la serie decreciente planeada, está limitado por los sitios *Apa* I y *Pst* I (Figuras 2 y 3), por lo que su aislamiento no representó en principio mayor dificultad; sin embargo, para obtener fragmentos de menor tamaño fue necesario seguir una estrategia diferente, debido a la ausencia de sitios de corte apropiados (ver más adelante).

El fragmento de 503 pb se obtuvo a partir del vector pARA (el cual contiene al genoma A de PHV, clonado en pBlueScript) digiriéndolo con las enzimas *Apa* I /*Xba* I, y se subclonó en el vector pBlueScript SK+ (que para simplificar denotaremos “pBS” de aquí en adelante) con lo cual se generó el plásmido pBS503Sil (Figura 4a). El fragmento de 248 pb se obtuvo a partir de este último plásmido por digestión con las enzimas *Apa* I y *Pst* I; el fragmento se aisló del gel y se subclonó luego en pBS, dando lugar al vector pBS248Sil (Figura 4b). La inserción de los dos fragmentos de PHV en el vector fue verificada por un análisis de los patrones de restricción de los plásmidos recombinantes con las enzimas apropiadas (Figura 4d y 4e).

Para obtener fragmentos más pequeños del potencial silenciador, se diseñaron dos oligonucleótidos (“Sil140” y “Sil100”) con extremos a 140 y 98 pb de distancia, respectivamente, del sitio *Apal* adyacente al extremo 5´ de la región de homología con Sil300 de TGMV; estos oligonucleótidos, que incluyen un sitio *Sal* I artificialmente creado, fueron utilizados junto con los iniciadores universales prDGR y prWAR (que corresponden a secuencias conservadas del gen *Rep*), para amplificar un segmento de PHV de 700-660 pb (parejas con prDGR) (Figura 5a), o de 450-400 pb (parejas con prWAR) utilizando al plásmido pARA como molde molecular en la PCR (Figura 5). Los productos de amplificación fueron digeridos con *Apa*I y *Sal* I para producir los fragmentos de 140 y 98 pb, que fueron entonces directamente clonados en el vector pBS-CP693*GUS (ver más adelante).

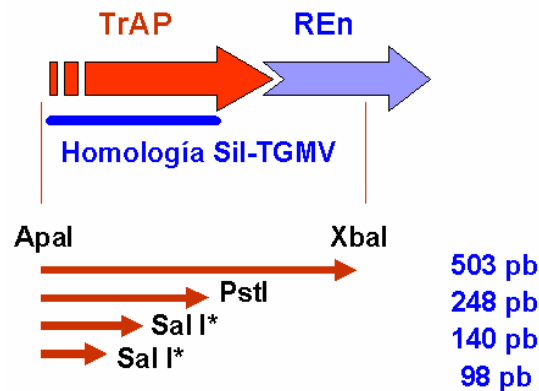


Figura 3. Fragmentos de tamaño decreciente de la región silenciadora potencial de PHV. Se muestra la región de homología de PHV con el silenciador de TGMV, así como los fragmentos de tamaño decreciente que se eligieron para delimitar la región del silenciador, y los sitios de restricción que los delimitan. Los sitios marcados con asterisco (Sal I) no se encuentran en la secuencia original, fueron introducidos en los iniciadores utilizados en la PCR.

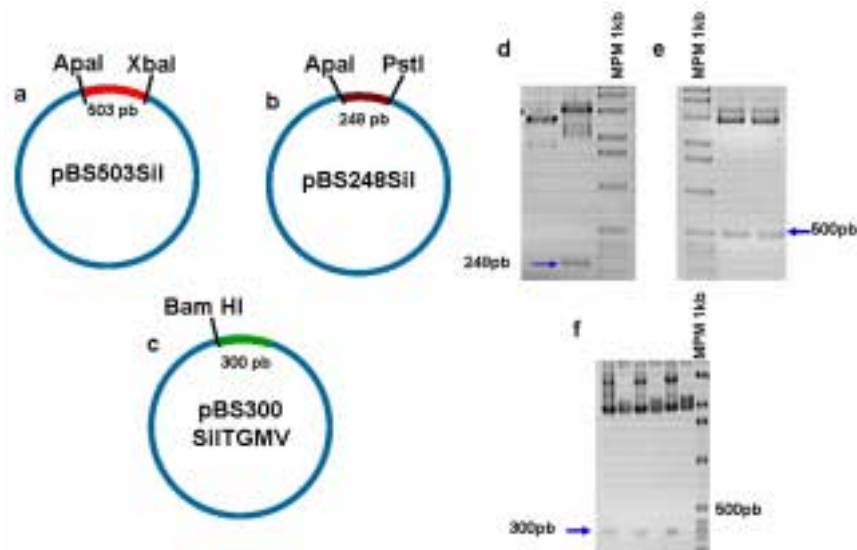


Figura 4. Plásmidos con fragmentos derivados de la región silenciadora de PHV y TGMV. (a) pBS503Sil, el fragmento de PHV de 503 pb delimitado por los sitios Apa I y Xba I, clonado en pBS; (b) pBS248Sil, el fragmento de PHV de 248 pb delimitado por los sitios Apa I y Pst I, clonado en pBS; (c) pBS300SiITGMV, el fragmento silenciador de TGMV de 300 pb clonado en pBS; (d, e, f) análisis con enzimas de restricción de los plásmidos antes mencionados; en el gel (d) se muestra la digestión de pBS248Sil con las enzimas Apa I/Pst I que libera el fragmento de 248 pb, el gel (e) muestra la digestión de pBS503Sil con Apa I/Xba I que libera el fragmento de 503 pb, y el gel (f) muestra la digestión de pBS300SiITGMV con Bam HI/Eco RI que libera el fragmento de 300 pb.

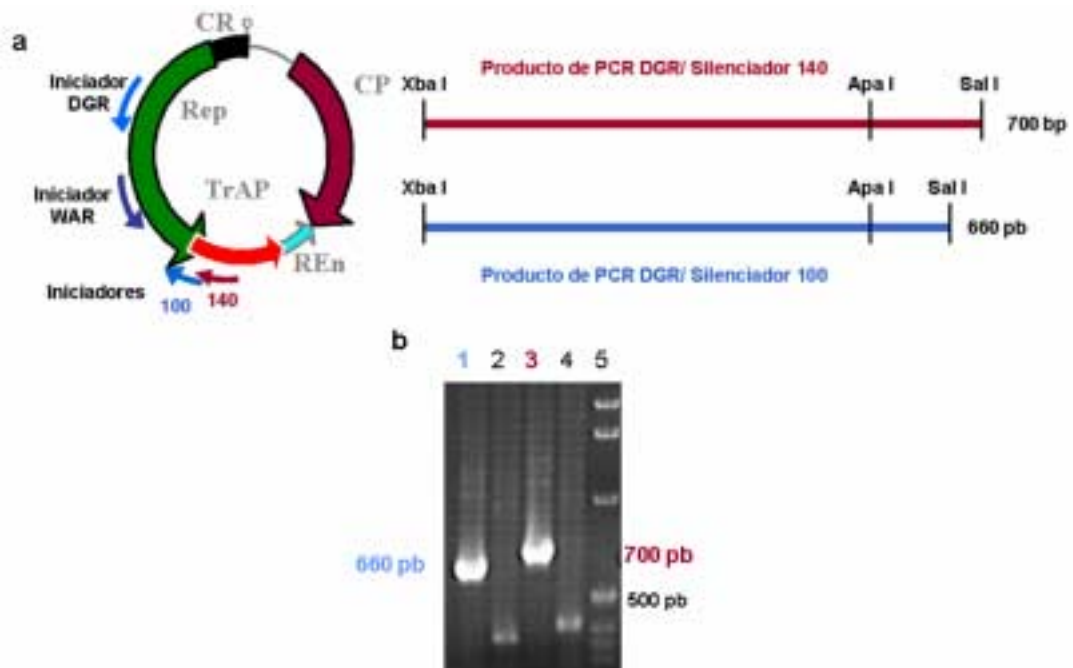


Figura 5. Iniciadores para la obtención de los fragmentos de 140 y 98 pb del silenciador potencial de PHV. (a) La figura muestra la región de PHV que amplifican los diferentes pares de iniciadores, y el tamaño de los productos de PCR que se generan con cada uno de ellos; (b) el DNA de PHV fue amplificado con los iniciadores DGR y Sil 100 o Sil 140 y WAR y Sil 100 o Sil 140; el gel muestra los productos de PCR amplificados con los diferentes pares de iniciadores, (1) DGR-Sil 100, (2) WAR-Sil 100, (3) DGR-Sil 140, (4)WAR-Sil 140 y (5) MPM 1kb.

A.3- Modificación del vector pCP693GUS

El plásmido pCP693GUS contiene un cassette de expresión que consta de un promotor *CP* de PHV, truncado en la posición –693 (relativa al codón de inicio del gen *CP*), y los primeros 8 codones del mismo gen viral, fusionados en fase con el gen reportero *uidA* (“GUS”) de *E. coli*, más el terminador del gen *nos* de *Agrobacterium tumefaciens* (Ruiz-Medrano, 1996). Las características más relevantes de dicho plásmido se ilustran en la Figura 6. Plantas transgénicas de tabaco que contienen dicho casete de expresión presentan una fuerte actividad del gen reportero en el tejido vascular, en ausencia de cualquier factor viral, como ya fue mencionado en la Introducción. Por lo tanto, este promotor truncado es un buen sistema para examinar las propiedades silenciadoras de los fragmentos genómicos de PHV, ya que al colocar a éstos arriba del promotor truncado se espera que la expresión del gen reportero será reprimida en las plantas transgénicas, si el fragmento de PHV contiene un silenciador íntegro; por el contrario, en aquellas construcciones en las que el silenciador haya sido afectado por las deleciones progresivas, el transgén se expresará normalmente en el tejido vascular de las plantas transformadas.

Los sitios para clonación presentes en el polilinker situado arriba del promotor CP693 no resultaban muy útiles para la subclonación de los fragmentos “silenciadores” de PHV y TGMV, razón por la cual se decidió introducir algunas modificaciones al plásmido pCP693GUS a fin de hacerlo más versátil como vector para el análisis de secuencias virales reguladoras. La primera modificación fue la eliminación del sitio *Eco* RI ubicado al final del terminador *nos*, a fin de poder utilizar un segundo sitio que se encuentra en uno de los extremos del polilinker; esta modificación se efectuó mediante una digestión parcial con *Eco* RI, seguida de la generación de extremos romos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, y la religación subsecuente del plásmido. La identificación de clones que perdieron el sitio *Eco*RI deseado se realizó digiriendo con *Eco* RI y *Pst* I. Este plásmido modificado fue luego digerido con *Xba* I y *Sma* I, seguido de un tratamiento con Klenow para rellenar el extremo cohesivo (*Xba* I), y religando finalmente al plásmido para generar

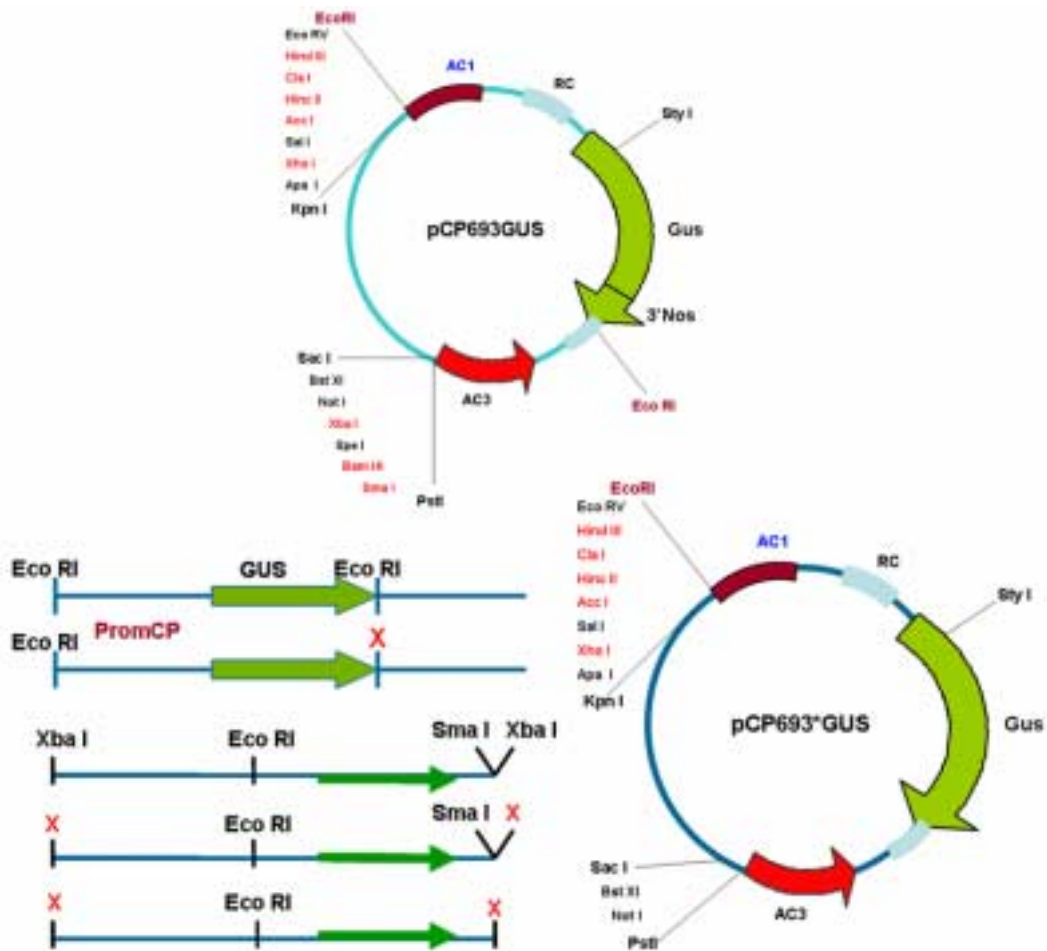


Figura 6. Modificación del vector pCP693GUS. Diagrama de los sitios de restricción que presentaba inicialmente el vector y sitios eliminados: Eco RI al final del terminador Nos; y los sitios Xba I, Spe I, Bam HI y Sma I del polilinker .

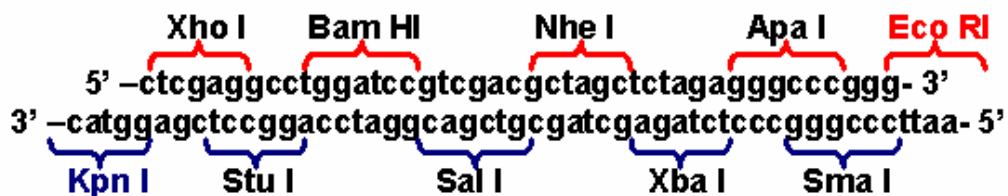


Figura 7. Polilinker diseñado para incrementar la versatilidad del vector pCP693GUS. Secuencia nucleotídica del polilinker y sitios de restricción que contiene (Kpn I, Xho I, Bam HI, Stu I, Sal I, Nhe I, Xba I, Apa I, Sma I y Eco RI).

pCP693*GUS, el cual carece de los sitios *Xba* I, *Spe* I, *Bam* HI y *Sma* I, que se encuentran corriente abajo del gen que codifica para GUS en pCP693GUS (Figura 6). Para completar las modificaciones planeadas, el polilinker original de este plásmido fue sustituido con un polilinker sintético, que diseñamos para hacer más versátil al vector, ahora denominado pBS-CP693B. En la Figura 7 se muestra la secuencia nucleotídica de dicho sitio múltiple de clonación, que se diseñó para incluir los sitios de restricción requeridos para la fácil transferencia de los fragmentos de PHV y TGMV con potencial función silenciadora.

A.4- Generación de vectores de expresión transitoria con fragmentos de la región Sil de PHV.

El fragmento “silenciador” de 503 pb se escindió de pBS-Sil503 digiriéndolo con *Apa*I/*Xba*I, y subclonándolo en pBS-CP693B (*Apa*I/*Nhe*I) para generar el plásmido pCP693-Sil503 (Figura 8a). El segundo vector, pCP693-Sil248, se obtuvo subclonando el fragmento *Apa*I/*Bam*HI de pBS-248Sil en los mismos sitios de pBS-CP693B. Los fragmentos menores, de 140 y 98 pb, fueron insertados río arriba del promotor *CP* truncado sin necesidad de reemplazar el polilinker de pCP693GUS, ya que este plásmido contiene sitios adecuados para la subclonación de esos fragmentos (*Apa* I y *Sal* I); de ese modo, se generaron los vectores de expresión pCP693-Sil140 y pCP693-Sil100 (Figura 8a). Es importante hacer notar que además de la diferencia en los tamaños de los fragmentos de PHV, hay una diferencia en la orientación de los mismos entre pCP693-Sil503 y pCP693-Sil248, por un lado, y pCP693-Sil140 y pCP693-Sil100, por el otro, pues mientras que los primeros tienen la orientación “nativa” respecto al promotor *CP*, es decir, con el extremo *Apa*I proximal al promotor *CP*, los segundos tienen la orientación opuesta. Esto se debe a que las construcciones con los fragmentos Sil140 y Sil100 se obtuvieron primero en el vector pCP693*GUS, en el cual el sitio *Apa* I se localiza en el extremo distal del polilinker. Esta ubicación inapropiada del sitio *Apa*I fue luego corregida en pCP693B por lo que será ahora muy sencillo subclonar los fragmentos (*Apa* I/*Sal* I) Sil140 y Sil100 en la misma orientación que los fragmentos mayores. En cualquier caso, dado que los silenciadores suelen funcionar en forma independiente de la orientación, no

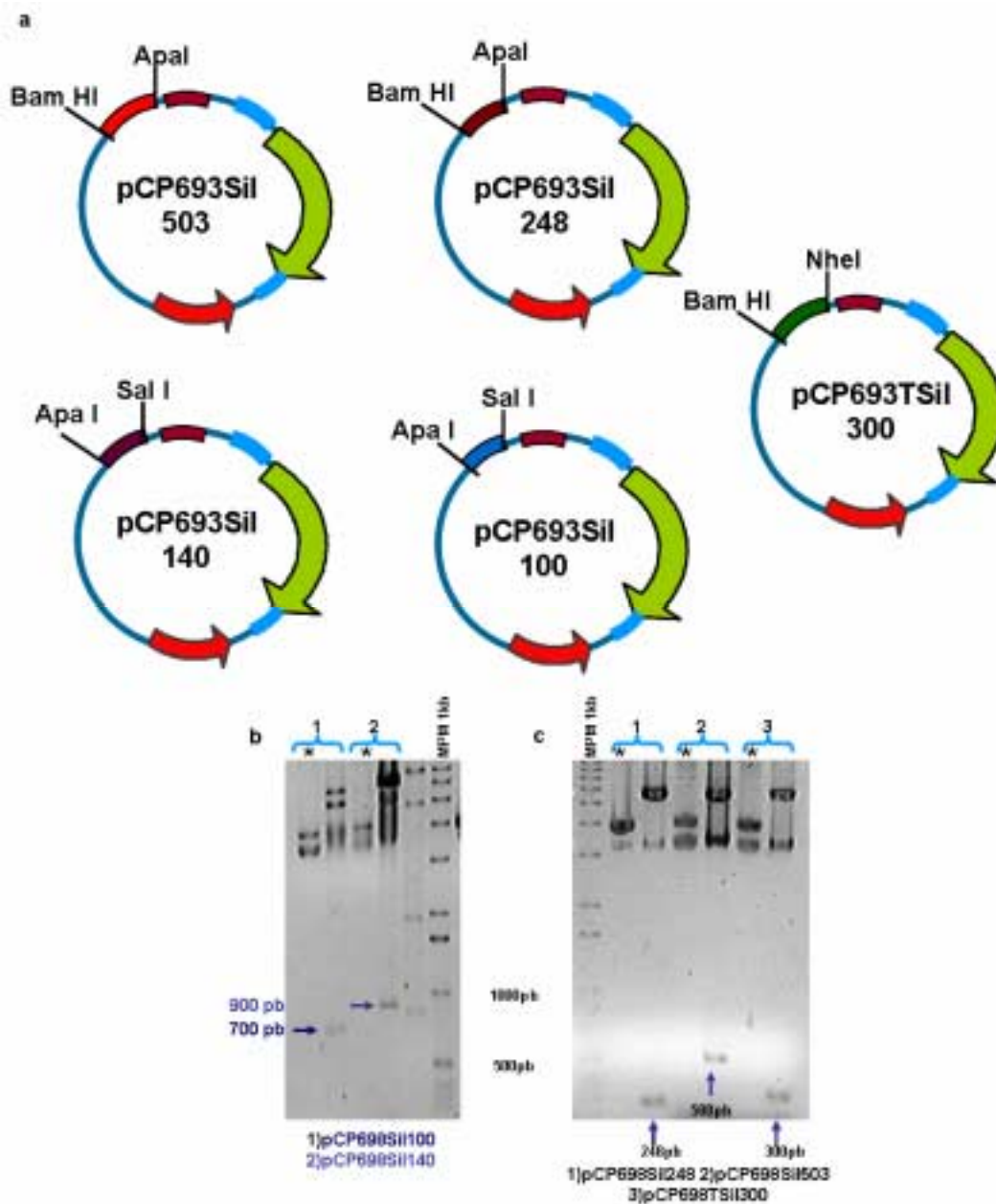


Figura 8. Vectores de expresión transitoria con los segmentos del silenciador de PHV y TGMV. (a) esquemas de los vectores de expresión transitoria pCP693Sil503, pCP693Sil248, pCP693Sil140, pCP693Sil100 y pCP693TSil 300. Se indican los sitios de restricción que flanquean las secuencias clonadas en el vector pCP698*GUS; (b) análisis de restricción de los plásmidos pCP698Sil100 y pCP698Sil140 con las enzimas Sty I y Kpn I/Sty I respectivamente; (c) el gel muestra la digestión de los vectores pCP698Sil503, pCP698Sil248 y pCP698TSil 300 con las enzimas Eco RI y Bam HI para los primeros dos y Bam HI y Nhe I para el tercero, con las que se liberaron los fragmentos de 248 y 503 pb de PHV, y 300 pb de TGMV. (*plásmido no digerido).

anticipamos diferencias significativas en los ensayos funcionales de las construcciones con orientaciones alternativas de un mismo fragmento viral.

Esta serie de vectores de expresión con fragmentos progresivamente menores de la región HSil que hemos generado, si bien pueden ser directamente utilizados en ensayos de expresión transitoria, serán empleados más bien en la generación de vectores binarios con los cuales se obtendrán plantas transgénicas, en las que será posible valorar el efecto funcional de los fragmentos HSil sobre el promotor CP693 en los diferentes tejidos vegetales.

A.5- Generación de vectores de expresión transitoria con promotores híbridos TGMV-PHV.

Una cuestión interesante que no ha sido todavía resuelta, es la de sí los silenciadores de begomovirus actúan específicamente sobre su promotor *CP* homólogo, o son capaces de reprimir promotores similares de otros begomovirus filogenéticamente distantes. Para responder a esta pregunta, decidimos construir un vector de expresión con un promotor híbrido (Sil-T)/ *CP693* en el cual fuese posible examinar el efecto del silenciador de TGMV sobre la actividad del promotor *CP* truncado de PHV. El silenciador de TGMV fue aislado de un plásmido con 1.5X genoma A de ese virus (amablemente proporcionado por el Dr. Rivera-Bustamante) mediante digestión con *NheI/BamHI*; el fragmento de 300pb fue aislado del gel y subclonado en pCP693B usando los mismos sitios de restricción, generándose así pCP693-Sil300T (Figura 8a). El mismo fragmento de TGMV fue transferido también a pBS (plásmido pBS-TSil300; Fig 4c), de donde podrá ser escindido con diversas enzimas de restricción para generar construcciones en las que el silenciador se encuentre en orientación inversa respecto al promotor *CP693*, o pueda ser insertado 3' respecto al gen reportero, a fin de evaluar todas las propiedades características de un silenciador típico. El casete de expresión de pCP693-TSil300 será transferido a un vector binario para transformar plantas de tabaco, en las que podrá determinarse si el silenciador de TGMV puede reprimir la actividad del promotor *CP* de PHV en tejido vascular.

B- Vectores para evaluar promotores sintéticos con múltiples copias del CLE.

B.1- Diseño de oligonucleótidos con tres copias del CLE

En dos estudios previos se pudo establecer que 1 o 2 copias del “Elemento Tardío Conservado” (CLE), cuyo consenso es GTGGTCCC, son suficientes para que promotores heterólogos mínimos adquieran la capacidad de ser activados por TrAP. En esos estudios se observó que los promotores sintéticos con dos copias del CLE experimentan mayor activación por TrAP que aquellos con un solo elemento (Ruiz Medrano et al., 1999; Monsalve-Fonnegra, 2002). Estas observaciones plantean lógicamente la interrogante de si se puede incrementar el nivel de activación por TrAP de un promotor hasta un límite determinado, mediante la simple multiplicación del CLE. De ser así, podrían diseñarse promotores sintéticos inducibles por infecciones begomovirales, con distintos niveles máximos de actividad. Para explorar esta interesante cuestión, se diseñaron y sintetizaron dos oligonucleótidos diferentes que contienen tres CLEs como repetidos directos, separados por sitios de restricción para diversas endonucleasas (A-3CLE y B-3CLE; Figura 9a). El oligonucleótido A-3CLE fue diseñado para insertarse río arriba de dos versiones truncadas del promotor 35S de CaMV, una que comprende la región -90/+1 (en pBI90S) y otra el segmento -46/+1 (en pBI46S); el oligonucleótido B-3CLE, por otra parte, se diseñó para ser subclonado corriente arriba de A-3CLE en los vectores correspondientes (pBI90S y pBI46S).

B.2- Obtención de los vectores binarios pBI3CLE46S y pBI3CLE90SGUS

El oligo-3CLE, en su forma de cadena doble, posee extremos cohesivos *Hind* III y *Xba* I, y fue subclonado en los sitios *Hind* III y *Spe* I de los vectores binarios pBI90S y pBI46S (Argüello-Astorga, 1996), generándose los vectores pBI3CLE46S y pBI3CLE90S (Figura 9 b y c). El escrutinio de potenciales clonas recombinantes se realizó digiriendo los plásmidos con la enzima *Nhe*I, ya que la inserción del oligonucleótido introduce un nuevo sitio para esa enzima, y los recombinantes se distinguen de los plásmidos sin inserto por generar un fragmento de 2248 pb (Figura

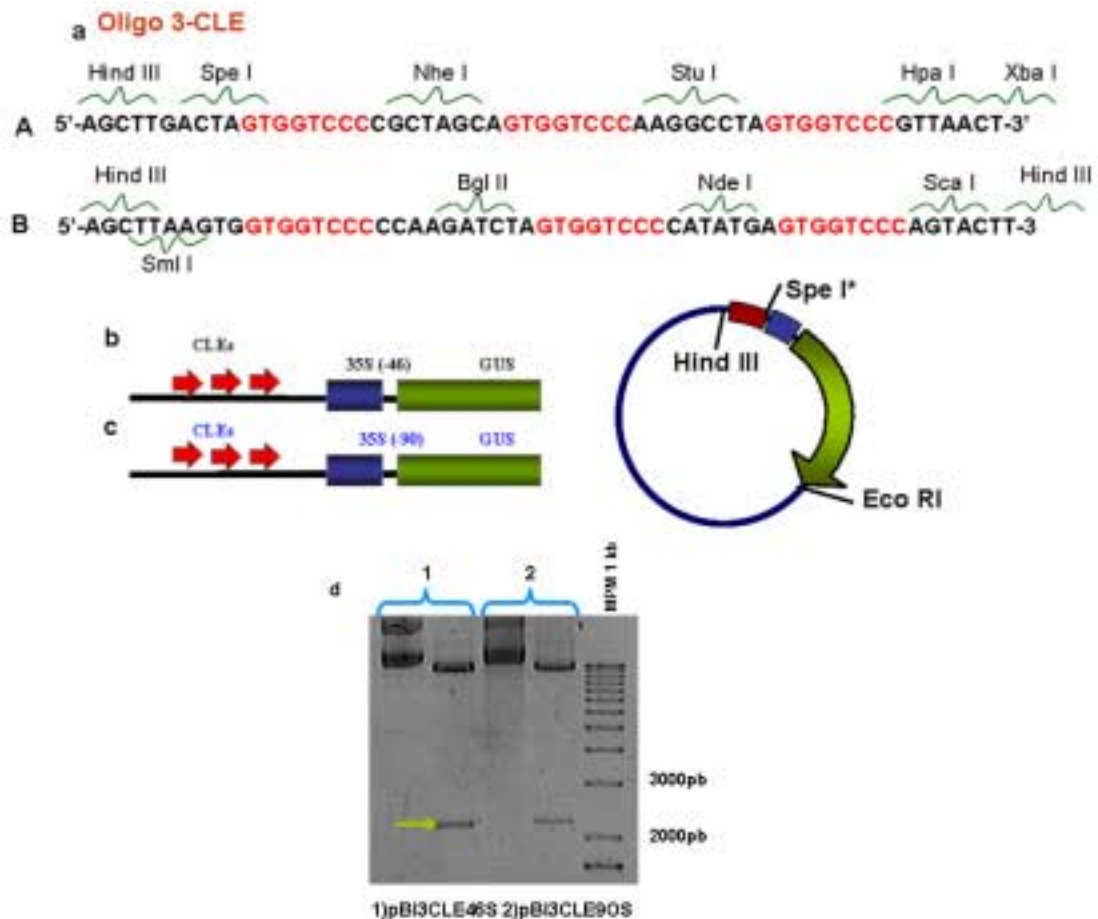


Figura 9. Vectores binarios 3CLE. (a) Oligonucleótidos 3CLE; los CLEs se destacan en rojo, y se indican los sitios de restricción que se crearon en el oligonucleótido; (b) casete de expresión de pBI3CLE46S y (c) pBI3CLE9OS; el oligonucleótido 3CLE se clona en los sitios Hind III y Spe I de los vectores pBI46S y pBI90S que contienen los promotores mínimo (46S) y truncado (90S) del promotor 35S del CaMV fusionado al gen reportero GUS; (d) el gel muestra el análisis de restricción con Nhe I, a los vectores pBI3CLE46S (1) y pBI3CLE9OS (2), que origina un fragmento de 2248 pb (indicado con la flecha), lo que confirma la introducción de los oligonucleótidos en los vectores pBI46S y pBI90S, que tienen un solo sitio Nhe I.

9d). Una clona positiva de cada construcción se secuenció, confirmando su identidad. Estos vectores binarios se transformaron por electroporación a *Agrobacterium tumefaciens*, y serán utilizados para generar plantas transgénicas de tabaco, en las que se evaluará el nivel y patrón de expresión tisular del gen reportero, tanto en ausencia como en presencia de una fuente de TrAP.

B.3- Obtención del vector binario pBI-6CLE46S

El oligonucleótido B-3CLE se diseñó con extremos cohesivos compatibles con sitios *HindIII*, pero sólo uno de ellos (el extremo 5' en la orientación deseada) regenera la secuencia reconocida por esa enzima, de tal forma que es posible determinar la orientación en la que B-3CLE se inserta en el plásmido receptor. Para generar un vector binario en el que el promotor mínimo 35S (-46/+1) tenga corriente arriba 6 copias del CLE, pBI-3CLE46S se digirió con *HindIII*, y el oligo B-3CLE de doble cadena se ligó a dicho vector. Las clonas recombinantes (pBI-6CLE46S) fueron identificadas mediante corte del DNA con *Scal*, y subsecuente electroforesis de los productos de digestión; B-3CLE, pero no A-3CLE, contiene un sitio *Scal*, lo que permite distinguir fácilmente las clonas con y sin inserto. Se obtuvieron varias clonas positivas, que serán verificadas por secuenciación.

B.4- Obtención de los vectores de expresión transitoria pBS-3CLE46S, pBS-3CLE9OS, y pBS-6CLE46S.

Con el fin de analizar y comparar, en ensayos de expresión transitoria, los niveles de activación de los promotores que contienen diferente número de copias del CLE, los casetes de expresión de los vectores binarios mencionados se escindieron enzimáticamente y se aislaron de gel, para ser transferidos posteriormente a un vector más pequeño (pBS); el casete de expresión 3CLE-9OS-GUS-Nos del vector pBI3CLE9OS se extrajo mediante digestión con *Hind III/Eco RI* y se clonó en pBS en los mismos sitios, obteniéndose así el vector pBS-3CLE9OS (Figura 10a); para obtener el vector análogo con el casete de expresión 3CLE-46S-GUS-Nos fue necesario generar una construcción adicional, ya que pBI3CLE46S posee un sitio *Eco RI* adicional entre el promotor y el gen reportero; ese plásmido

adicional se generó introduciendo el fragmento *HindIII/EcoRI* de 2.9 Kb del plásmido pBI121 (casete de expresión 35S-GUS-Nos) a un pBS modificado, del que eliminamos previamente el sitio *Sac I* del polilinker por tratamiento con Klenow. El plásmido resultante, pBS35SGUS (Figura 10b), fue luego digerido con *HindIII/SacI* para eliminar tanto el promotor 35S como el gen reportero, y dejando solo al terminador Nos, flanqueado por el sitio *Sac I* en su extremo 5'. En este plásmido se insertó el casete de expresión 3CLE-46S-GUS de pBI46S-3CLE (*Hind III/Sac I*), originándose el vector de expresión pBS3CLE46S (Figura 10c). La integridad de estos nuevos vectores se verificó mediante el análisis de sus patrones de restricción (Figura 10 d, e y f). Finalmente, el vector pBS-6CLE46S se generó insertando el oligonucleótido B-3CLE en el sitio *HindIII* de pBS3CLE46S, verificándose la incorporación del mismo mediante digestión con *Scal* (Figura 11).

Estos tres nuevos vectores serán utilizados en ensayos de expresión transitoria (mediante biobalística y/o transfección de protoplastos) para evaluar el nivel de expresión del gen reportero en presencia o ausencia de una fuente de TrAP, la cual puede ser un plásmido con el genoma A de PHV o un vector en el que la expresión del gen *TraP* sea dirigido por el promotor 35S. Para determinar el efecto del número de copias del CLE sobre la actividad de los promotores truncados 35S, se realizarán experimentos que involucren plásmidos de la misma serie (46S o 90S) con 1, 2, 3 o 6 copias del CLE y como controles negativos los plásmidos pBS46S y pBS90S.

C.- Delimitación teórica de potenciales elementos reguladores de promotores tardíos y generación de vectores para caracterizarlos experimentalmente.

C.1- Identificación de “módulos complejos conservados” en los promotores CP y V2

Los CLEs no están presentes en la RI de todos los geminivirus que codifican las proteínas TrAP, como los Begomovirus, Curtovirus y Topocuvirus. Este hecho sugiere, naturalmente, que deben existir otros elementos de respuesta a TrAP, cuya identificación es importante para lograr una comprensión más completa del control

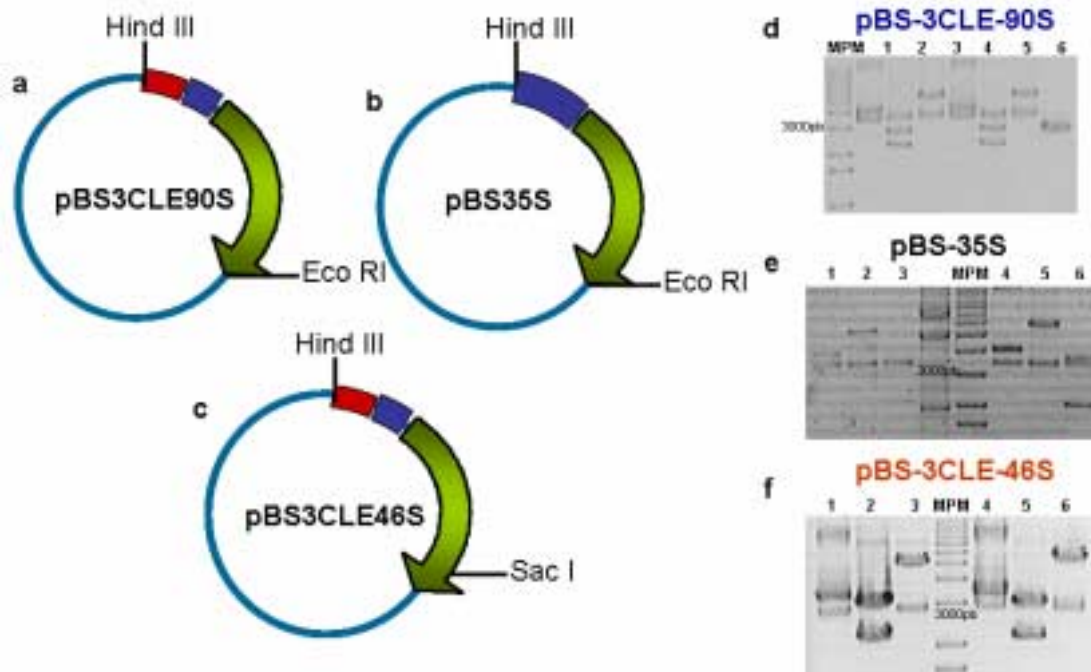


Figura 10. Vectores de expresión transitoria 3CLE. (a) pBS3CLE90S, se generó transfiriendo el casete de expresión 3CLE/90S/GUS/Nos (fragmento Hind III/Eco RI) de pBI3CLE90S al plásmido pBS; (b) pBS35S, se obtuvo subclonando el casete de expresión 35S/GUS/Nos (fragmento Hind III/Eco RI) de pBI121 en pBS; (c) pBS3CLE46S, se generó subclonando el fragmento Hind III/Sac I de pBI3CLE46S en un vector pBS35S digerido con las mismas enzimas; (d) patrones de restricción de dos clones del vector pBS3CLE90S con las enzimas Hind III/Eco RI (carriles 2 y 5) con las que se libera el casete de expresión (~2400 pb), y Eco RI (carriles 3 y 6) con la que se lineariza el vector, los carriles 1 y 4 corresponden al plásmido sin digerir; (e) patrones de restricción de dos clones del vector pBS35S (carriles 1 y 4, sin digerir) con las enzimas Eco RI (carriles 2 y 5) y Hind III/Sac I con las que se libera el promotor 35S y GUS formando un fragmento de poco más de 2 kb (carriles 3 y 6); (f) digestión de dos clones de pBS3CLE46S (1 y 4, sin digerir) con Hind III/Sac I (2 y 5), que libera el casete de expresión introducido (~2200 pb), y Hind III, con la que se lineariza el vector (3 y 6).

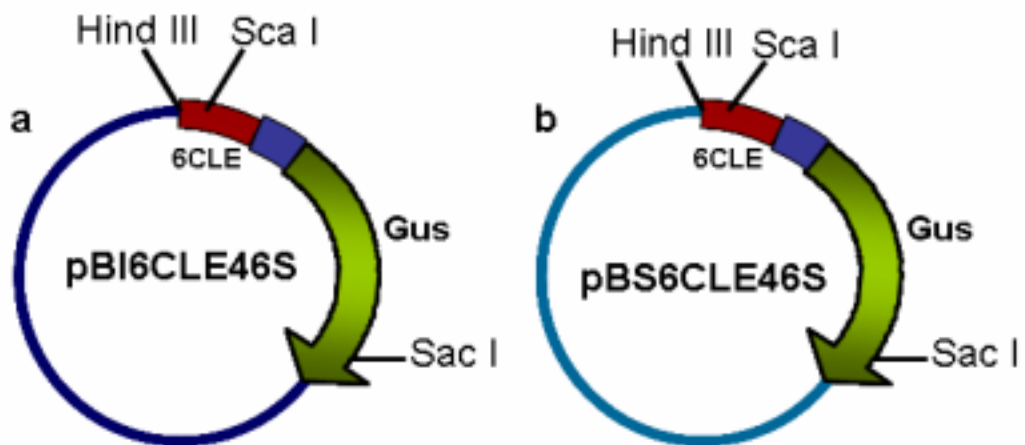


Figura 11. Vector binario, para expresión estable: (a) pBI6CLE46S Vector de expresión transitoria: (b) pBS6CLE46S.

génico de estos virus. Se plantea así la necesidad de utilizar enfoques generales para guiar los esfuerzos orientados a identificar esos hipotéticos elementos de respuesta a TrAP.

El análisis comparativo de promotores homólogos ha mostrado ser una metodología de gran utilidad para la identificación preliminar de secuencias reguladoras, en toda clase de sistemas biológicos. De hecho, varios elementos reguladores de geminivirus, como los CLEs y los iterones, fueron inicialmente identificados a través de esta clase de análisis (Argüello-Astorga *et al.*, 1994 a, b). Por esa razón, nuestro grupo de investigación emprendió un amplio estudio comparado de la región intergénica de los begomovirus identificados a la fecha, que suman cerca de 120 “especies” (reportados por Fauquet *et al.*, 2003), en un intento por identificar nuevos elementos potencialmente involucrados en la regulación del gen *CP* (*V2*, en el caso de begomovirus del VM). Razonando que el fracaso de estudios previos que intentaban delimitar elementos conservados en los promotores tardíos de geminivirus, podría deberse a que las secuencias reguladoras que comparten estos virus son en realidad, elementos complejos cuya similitud global en secuencia no es elevada y por ello escapan a la resolución de los métodos de comparación de DNA convencionales. Por lo anterior, decidimos utilizar el método de análisis “filogenético-estructural”, el cual permite identificar regiones reguladoras homólogas, pero con diversos grados de divergencia en su secuencia nucleotídica (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1996; 1998).

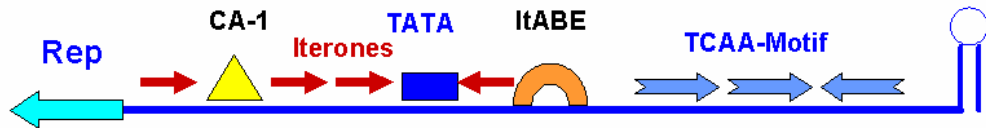
Para desarrollar este análisis fue necesario generar un banco de datos específico, en el que la región intergénica de cada uno de los 120 begomovirus conocidos fue editada a partir de las secuencias genómicas completas disponibles en el GenBank. Una explicación más detallada de la metodología utilizada se presenta en el apartado de “Materiales y Métodos”. Los principales resultados de este análisis comparado fueron los siguientes:

- a) Se identificaron varios “footprinting” filogenéticos (potenciales sitios de unión de proteínas reguladoras) en el segmento temprano de la IR, varios de los cuales son específicos de linaje viral. Por ejemplo, algunas secuencias

conservadas asociadas a los iterones, que denominamos ItABE, y una serie de motivos TCA conservados, que se encuentran exclusivamente en begomovirus del Viejo Mundo (Asia, Europa, África y Australia) (Figura 12a), en tanto que los virus del continente americano presentan a su vez una combinación de elementos GA-1 y caja G (definidos en estudios previos) que están completamente ausentes en virus de otros linajes (Figura 12b).

- b) Un pequeño linaje de begomovirus de América, el llamado “grupo del SLCV” que comprende 12 especies, presenta una combinación de elementos conservados única, que no tiene homólogos evidentes en otros virus de este u otro continente. Una observación interesante es que la presencia de estos arreglos específicos en la IR viral correlaciona de forma muy clara con características especiales de la mitad amino terminal de su proteína Rep, lo que sugiere que este linaje emergió como resultado de un evento de recombinación entre un begomovirus americano típico y un geminivirus de otro género (muy probablemente un curtovirus ancestral) (Figura 12c).
- c) En contraste con las marcadas diferencias en la región promotora “temprana” de los begomovirus del NM y del VM, se encontraron un gran número de semejanzas en el segmento “tardío” de la IR de todos ellos, y se pudieron identificar al menos 6 secuencias distintivas que podrían representar elementos *cis*-reguladores comunes a todos los begomovirus (Figuras 13 y 14). Estos elementos se encuentran en combinaciones o agrupamientos específicos que son genéricamente denominados “Arreglos Modulares Conservados” (CMAs, por sus siglas en inglés).
- d) Varios de los CMAs identificados contienen “motivos” idénticos o similares al CLE (GTGGTCCC). Estos arreglos incluyen las combinaciones horquilla-CLE-caja G; CLE-caja CCAAT; CLE-caja TATA; y caja TATA-TAPE/CLE (Figura 13 y 14).

a Begomovirus del Viejo Mundo



b Begomovirus del Nuevo Mundo



c Linaje SLCV de Begomovirus del NM

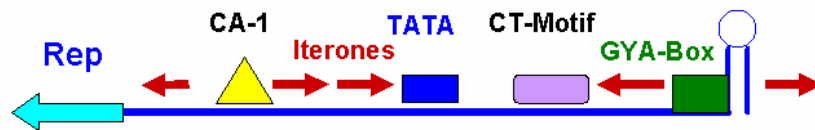
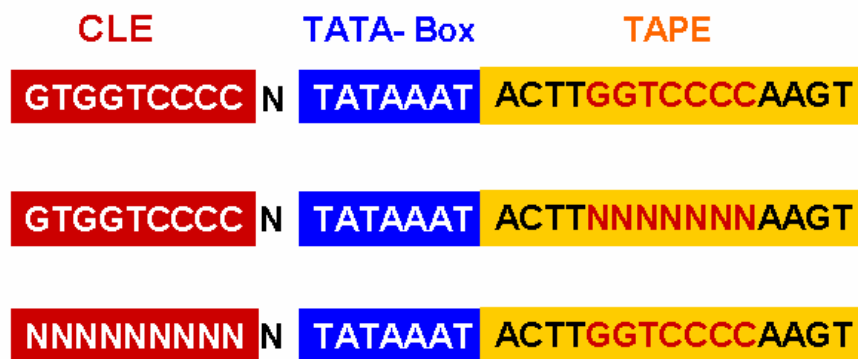
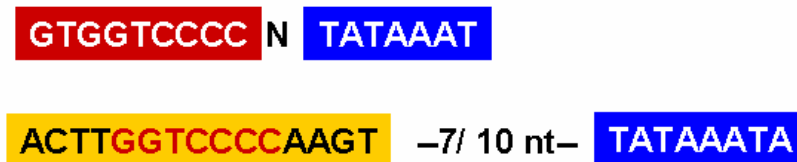


Figura 12. Combinación de secuencias de DNA conservadas (“motifs”) que componen la región “temprana/Ori” (origen de replicación) de los tres linajes principales de begomovirus. La mayoría de los begomovirus americanos tienen entre el elemento conservado “tallo-asa” y la caja TATA, a dos elementos característicos, GA-1 y caja-G. El linaje SLCV, también de América, muestra una combinación única de motivos conservados. Los begomovirus de otros continentes (virus del VM) incluyen varios “motifs” que no existen en los virus del Nuevo Mundo. Notese que el número y arreglo de los iterones también es diferente en los tres linajes virales.

a Begomovirus del Viejo Mundo



b Begomovirus del Nuevo Mundo



c Curtovirus (BSCTV)



Figura 13. CMA tripartita encontrado en algunos begomovirus de Asia que aparentemente involucra Diferentes CMAs, los cuales se encuentran en los begomovirus de los 5 continentes. Un CMA similar con arreglo diferente también se encuentra en curtovirus.

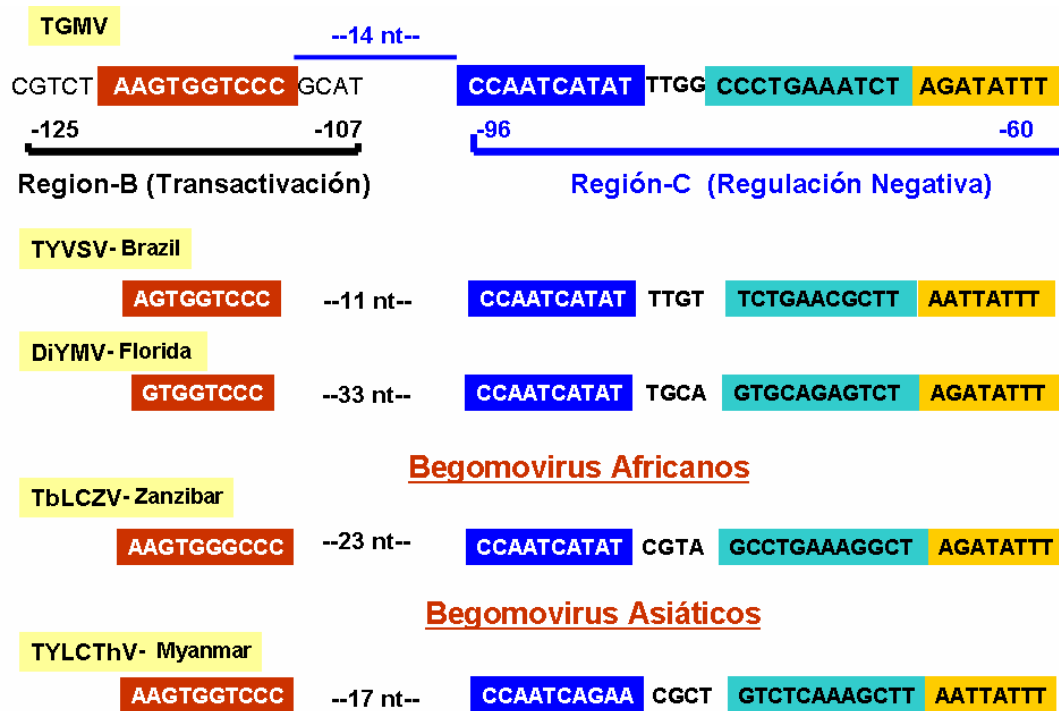


Figura 14. Elementos conservados en las regiones B y C del promotor TGMV que fueron definidas experimentalmente por Sunter y Bisaro (2003) como necesarias para la activación por TrAP. Los elementos marcados son el CLE (region B) y el motif CCAATCA, la caja H3 (azul claro) y la caja rica en A/T (región C). Estos últimos conforman un CMA prácticamente invariante en posición relativa, pero altamente variable en secuencia en la serie evolutiva de los begomovirus.

- e) Los promotores tardíos de un número importante de begomovirus de América carecen de CLEs, pero poseen CMAs que son claramente homólogos a los CMAs con CLEs presentes en otros virus de América y del VM. Estas relaciones proporcionan una explicación sencilla a observaciones paradójicas de que los promotores de los virus como BGMV y PYMV, que carecen de CLEs típicos, son transactivados por proteínas TrAP de virus que poseen dichos elementos.

Los CMAs identificados en este trabajo han resultado ser elementos muy útiles para trazar las principales líneas de evolución de los begomovirus. Por ejemplo un CMA de tres componentes, localizado muy cerca del inicio del gen V2 (presente solo en virus del VM e involucrado en movimiento) de algunos virus de China, Bangladesh e India, es aparentemente la unidad ancestral de varios CMAs bipartitas que se encuentran en los promotores tardíos de la mayoría de los begomovirus africanos, americanos, asiáticos y australianos. Estos datos, junto con otras evidencias obtenidas en el presente análisis (ver Figuras 12, 13 y 14), sugieren con fuerza que los begomovirus tienen un origen asiático y que se dispersaron luego hacia otros continentes, una hipótesis que se ha visto reforzada por el análisis comparado de la proteínas Rep y CP, en las que se encuentran ciertas secuencias conservadas de aminoácidos (“motifs”) que relacionan a los virus americanos con los asiáticos, pero no con los africanos (datos no mostrados).

En la figura 15 se presenta un esquema hipotético de cómo evolucionaron las regiones de control de begomovirus del continente asiático, a partir de un presunto virus ancestral, y en la figura 16 se traza el diagrama de la probable derivación del arreglo de elementos reguladores que se encuentra en los virus americanos, a partir de un ancestro cuya organización modular se asemeja más a los virus de la India y del Sudeste Asiático, que a las de África, geográficamente más cercanos.

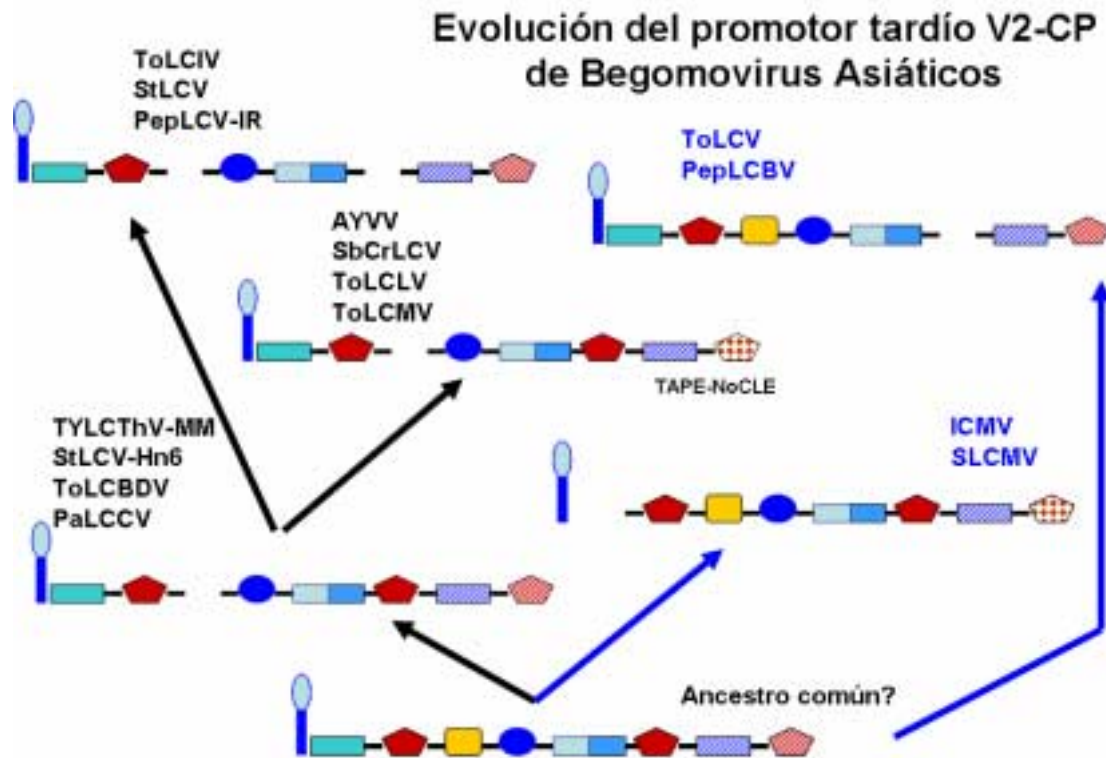


Figura 15. Algunas líneas de evolución de promotores tardíos de Begomovirus originarios de Asia y Australia, inferidas del análisis comparado realizado en el presente estudio. Virus: AYVV (*Ageratum yellow vein virus*), ICMV (*Indian cassava mosaic virus*), PaLCCV (*Papaya leaf curl China virus*), PepLCBV (*Pepper leaf curl Bangladesh virus*), PepLCV-IR (*Pepper leaf curl virus*), SbCrLCV (*Soybean crinkle leaf curl virus*), SLCMV (*Sri Lankan cassava mosaic virus*), StLCV (*Stachytarpheta leaf curl virus*), ToLCBDV (*Tomato leaf curl Bangladesh virus*), ToLCLV (*Tomato leaf curl Laos virus*), ToLCMV (*Tomato leaf curl Malasia virus*), ToLCV (*Tomato leaf curl virus*) y TYLCThV-MM (*Tomato yellow leaf curl Thailand virus-Myanmar*).

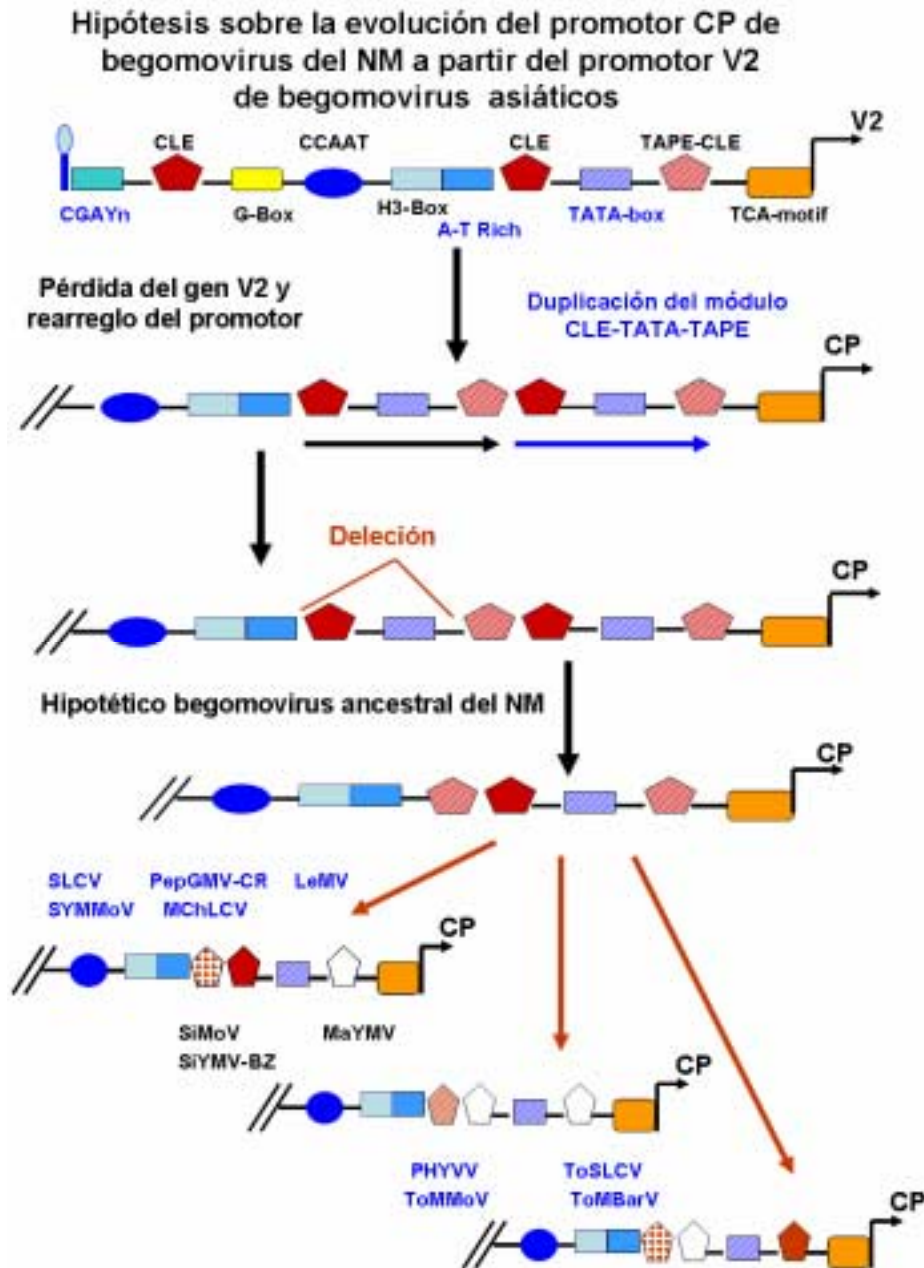


Figura 16. Hipótesis sobre la evolución del promotor CP de begomovirus del NM a partir del promotor V2 de begomovirus asiáticos. El análisis de promotores tardíos de begomovirus del NM sugiere que son derivados de begomovirus asiáticos. Virus: LeMV (*Leonorus mosaic virus*), MaYMV (*Macroptilium yellow mosaic virus*), MChLCBV (*Melon chlorotic leaf curl virus*), PepGMV-CR (*Peper golen mosaic virus-CR*), PHYVV (*Pepper huasteco yellow vein virus, PHV*), SiMoV (*Sida mottle virus*), SiYMV-BZ (*Sida yellow mosaic virus-(Brazil)*), SLCV (*Scuash leaf curl virus*), SYMMoV (*Squash yellow mild mottle virus*), ToMBarV (*Tomato mosaic Barbados virus*), ToMMoV (*Tomato mild mottle virus*) y ToSLCV (*Tomato severe leaf curl virus*).

C.2- Construcciones para el análisis funcional de CMAs que contienen CLEs

Los resultados del estudio comparado de promotores virales sugiere que los CMAs pueden constituir unidades reguladoras complejas, capaces de conferir por si mismas ciertas propiedades del control transcripcional que contribuyen a la actividad global de los promotores virales. A fin de determinar experimentalmente si los CMAs identificados en nuestro análisis participan en la regulación del gen *CP*, y de que manera, procedimos a diseñar y sintetizar oligonucleótidos con la secuencia consenso de algunos de los CMAs que incluyen CLEs. Dos tipos de oligonucleótidos se sintetizaron: a) "T-CLE", que contiene tres secuencias conservadas, "tallo", elemento CGATn, y CLE; este CMA es característico de la mayoría de los begomovirus de Asia y de algunos de América, y queda íntegramente comprendido en la secuencia de 35 pb (-146/-112) cuya delección redujo de modo drástico la actividad del promotor *Rep* de CLCMV, considerado uno de los más potentes que se han caracterizado en sistemas vegetales (Xie *et al.*, 2003); b) "CLE-G", que consta de una caja G flanqueada por dos CLEs, y se encuentra, en forma modificada en algunos virus asiáticos como ICMV, africanos como AREV, y australianos como ToLCV .

C.2.1-Obtención de los vectores binarios pBI46SCLE-G, pBI46S-T/CLE, pBI90SCLE-G y pBI90S-T/CLE

Para facilitar la clonación de los oligonucleótidos CLE-G y T-CLE corriente arriba de los promotores mínimos 35S, se les diseñó de tal manera que una vez apareadas las dos cadenas complementarias de DNA las moléculas presentaran extremos cohesivos *Hind* III y *Xba* I (Figura 17). Los oligos fueron clonados en los sitios *Hind*III y *Spe*I de pBI46S y pBI90S y de esta manera se obtuvieron los vectores pBI46S-CLE/G, pBI46S-T/CLE, pBI90S-CLE/G y pBI90S-T/CLE (Figura 18).

Para identificar los plásmidos que adquirieron el oligonucleótido correspondiente, se comparó el patrón de restricción con *Ava* II de los transformantes, por un lado, y los vectores sin inserto, por el otro. Ambos oligos contienen sitios *Ava* II y al ser digeridos con la enzima forman un patrón de

restricción diferente (Figura 18 e). Clonas positivas de pBI46S-CLE/G y pBI46S-T/CLE fueron además secuenciadas, para su verificación final.

Los nuevos vectores fueron introducidos posteriormente a *Agrobacterium tumefaciens*, y las diversas clonas harán posible la generación de plantas transgénicas de tabaco o *Arabidopsis thaliana*, en las que se podrán estudiar en detalle las propiedades reguladoras de los promotores quiméricos, e inferir al menos algunas de las funciones de los CMAs examinados, mediante el análisis del patrón de expresión del gen reportero en los diferentes tejidos y en el curso del desarrollo de la planta, lo mismo que en ausencia o presencia de begomovirus.

C.2.2- Obtención de los vectores de expresión transitoria pBS46S-CLE/G, pBS46S-T/CLE, pBS90S-CLE/G y pBS90-T/CLE

Una vez obtenidos los vectores binarios con CMAs se generaron los vectores para expresión transitoria aislando los casetes de expresión de ellos y transfiriéndolos a pBS; los casetes de expresión CLE/G-90S-GUS-Nos y T/CLE-90S-GUS-Nos se escindieron usando las enzimas *Hind* III y *Eco* RI, y fueron clonados en el vector pBS, generando los vectores pBS90S-CLE/G y pBS90S-T/CLE (figura 19 a y b). Los casetes de expresión CLE/G-46S-GUS y T/CLE-46S-GUS se obtuvieron usando las enzimas *Hind* III y *Sac* I y se clonaron en el vector pBS35SGUS digerido con las mismas enzimas, obteniéndose de esta manera las construcciones pBS46S-CLE/G y pBS46S-T/CLE (Figura 19 c y d). La verificación de las construcciones se realizó por análisis del patrón de restricción con las enzimas apropiadas (Figura 19e).

Estos vectores con CMAs, al igual que los que contienen solo CLEs, serán utilizados para una evaluación sencilla del nivel de inducibilidad por el transactivador viral, determinando el nivel de expresión del gen reportero al co-bombardear tejidos vegetales con vectores que sean una fuente de TrAP, y comparándolos con los niveles obtenidos en ausencia de esa proteína viral.



Figura 17. Oligonucleótidos con los CMAs, "CLE-G" y "T-CLE". En los extremos de ambos se indican los sitios de restricción que poseen, en rojo se marca la secuencia CLE, en azul se indica la caja G en el oligonucleótido CLE-G y la secuencia conservada del tallo-asa de inicio de replicación en el oligonucleótido T-CLE; y en café se indica el elemento CGATn.

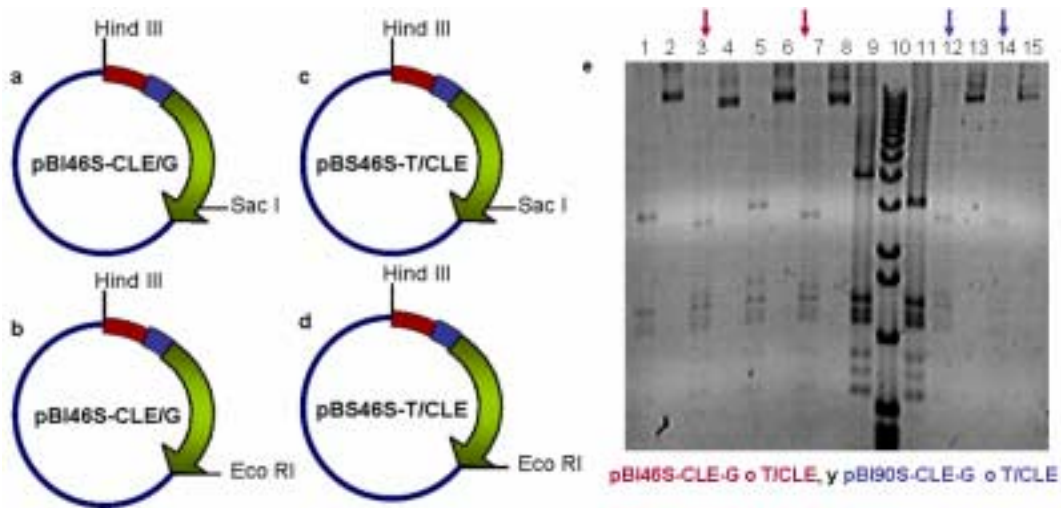


Figura 18. Vectores binarios con CMAs. (a) pBI46SCLE/G, (b) pBI90SCLE/G (c) pBI46S-T/CLE, y (d) pBI90S-T/CLE; las figuras indican en rojo el sitio donde se insertaron los oligonucleótidos CLE-G y T-CLE en los vectores que contienen los promotores mínimo y truncado del promotor 35S de CaMV (pBI46S y pBI90S respectivamente); se indican también los sitios que flanquean los respectivos casetes de expresión (Hind III, Eco RI y Sac I); (e) el gel muestra el patrón de restricción que generan los vectores que contienen los oligonucleotidos CLE-G (carriles 3 y 12) y T-CLE (carriles 7 y 14) comparados con los vectores sin inserto (carriles 9 y 11) al ser digeridos con la enzima Ava II.

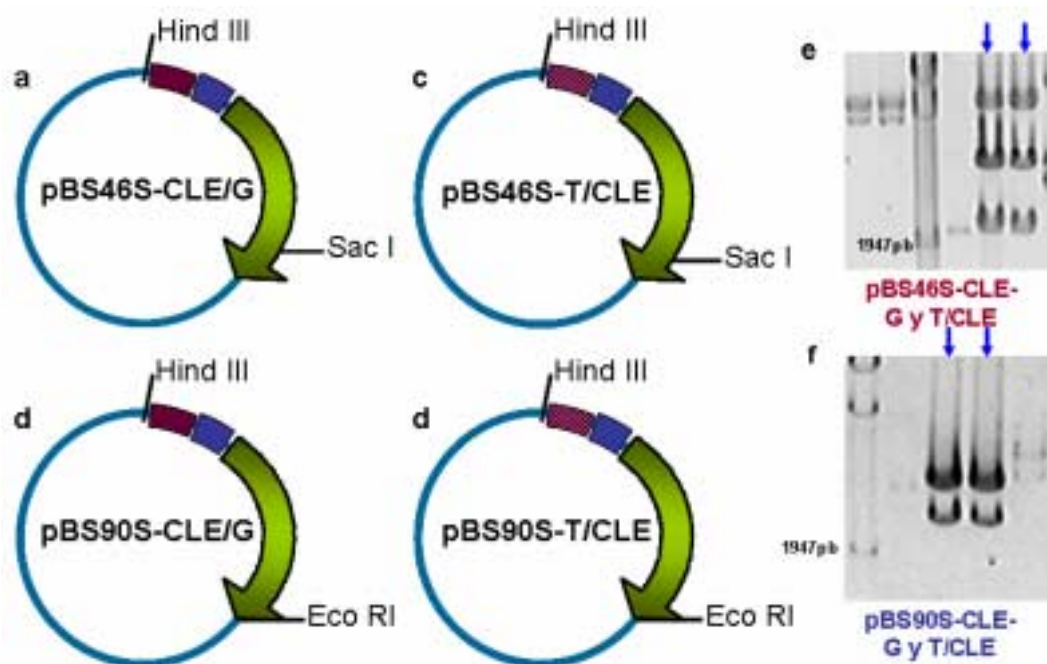


Figura 19. Vectores de expresión transitoria con CMAs. (a) pBS46S-CLE/G, (b) pBS90S-CLE/G, (c) pBS46S-T/CLE y (d) pBS90S-T/CLE, se indicaron las enzimas que se utilizaron para insertar los casetes de expresión 46SCLE-G y 46S-T/CLE, Hind III y Sac I para introducirlo en un vector pBS que contenía el terminador nos; para los casetes de expresión que se introdujeron en pBS, 90SCLE/G y 90S-T/CLE se utilizaron Hind III y Eco RI; (e) el gel muestra el patrón de restricción hecho a dos clonas de los vectores pBS46SCLE/G y pBS46S-T/CLE, y (f) pBS90SCLE/G y pBS90S-T/CLE, con los que se extrajo el casete de expresión de cada vector. (Se utilizaron las enzimas Hind III y Sac I para los dos primeros vectores, y Hind III y Eco RI para los dos vectores restantes).

Discusión

La mayor parte de los estudios sobre el proceso de regulación transcripcional en geminivirus, se han llevado a cabo en modelos begomovirales, como TGMV, ACMV y PHV. Varias líneas de evidencia sugieren que los geminivirus siguen programas de regulación temporal en la expresión de sus genes, que incluyen tanto procesos de represión como de activación. La transactivación de los genes *CP* y *NSP* por TrAP está bien documentada en un buen número de begomovirus; sin embargo, poco se sabe todavía acerca del mecanismo de activación, y de los elementos reguladores específicos que están involucrados en ese proceso. En el caso mejor estudiado, el de TGMV, se ha demostrado la existencia de un elemento que reprime al promotor *CP* en el tejido vascular, represión que es eliminada por la acción de TrAP. Este elemento funciona como un silenciador típico, y reprime la expresión del gen reportero tanto cuando se encuentra 5' como 3' respecto al mismo; sin embargo, a diferencia de silenciadores de otros organismos, éste parece actuar específicamente sobre el promotor *CP*, y no sobre otros presentes en el mismo genoma (Sunter y Bisaro, 1997).

En el presente trabajo se construyeron varios vectores que contienen secuencias potencialmente involucradas en la regulación positiva o negativa del promotor *CP* de PHV, los cuales podrán examinarse en ensayos de expresión transitoria, o en sistemas de expresión estable (plantas transgénicas) para obtener información significativa acerca del control de la actividad de ese promotor viral.

Nuevos vectores para el análisis del silenciador de begomovirus.

De especial interés es la serie de vectores que contienen segmentos progresivamente más cortos de la región genómica de PHV denominada aquí HSil, que corresponde a la secuencia que es homóloga al segmento silenciador de 300 pb de TGMV. El análisis experimental de estas construcciones hará posible delimitar con mayor precisión el silenciador presente en PHV, del cual sólo se sabe que está localizado arriba de la posición -693 (relativa al codón inicial de *CP*), ya que plantas transgénicas de tabaco con el promotor *CP* completo no expresan el gen reportero en ningún tejido, pero éste se activa en floema y mesófilo cuando la planta es

infectada con PHV (Ruiz-Medrano, 1996). En las construcciones realizadas en este trabajo, los fragmentos HSil se clonaron en un vector (pBS-CP693B) que contiene el promotor CP truncado, fusionado al gen reportero GUS. Ya se ha demostrado que dicho promotor tiene la capacidad de activar la expresión de GUS en el tejido vascular de plantas transgénicas, en ausencia de TrAP o cualquier otra proteína viral. Por lo tanto, al colocar los distintos fragmentos HSil arriba de CP693, podremos examinar la capacidad de las secuencias contenidas en ellos de reprimir la actividad del promotor en el tejido vascular. Esto hace necesaria la generación de plantas transgénicas, aunque se intentará también montar un ensayo de expresión transitoria en tejido vascular, basado en la transfección de las construcciones a células del tallo o nervaduras de las hojas por biobalística. En principio, se puede concluir que las construcciones que no expresen el gen reportero en floema contienen un silenciador funcional, y aquellas que expresen GUS deben contener sólo una parte (no funcional) o carecer por completo del mismo. Existe también la posibilidad de que el efecto silenciador se manifieste en todas las construcciones generadas, incluyendo la que contiene al segmento HSil más corto (Sil100), lo cual no resulta improbable, ya que se conocen varios ejemplos de silenciadores comparativamente pequeños (Ogbourne y Antalis, 1998). En tal caso, lo que podría hacerse posteriormente sería diseñar oligonucleótidos sintéticos correspondientes a segmentos más cortos de la región Sil100, parcialmente sobrelapados, y clonarlos corriente arriba del promotor CP presente en pCP693BGUS para evaluar su capacidad de represión.

Si el silenciador de PHV es mapeado dentro de alguno de los fragmentos presentes en pCP693-Sil248, pCP693-Sil140 y pCP693-Sil100, eso representaría un avance respecto a lo logrado en el caso de TGMV, en el que el elemento represor ha sido ubicado dentro de un segmento genómico de 300 pb; por otra parte, al reducir la extensión de la secuencia a examinar, se abrirá un campo para estudios más detallados, permitiendo el análisis del silenciador begomoviral por mutagénesis dirigida.

La cuestión de si los elementos silenciadores de begomovirus actúan específicamente sobre su promotor homólogo, o por el contrario, son equivalentes en función y potencialmente intercambiables, se podrá responder con el análisis

experimental de la construcción pCP693-Sil300T, en la que colocamos el fragmento de 300 pb NheI/BamHI de TGMV (el “silenciador”) arriba del promotor CP truncado de PHV. En el caso de que esta construcción exprese el gen GUS en el tejido vascular de la planta, se concluirá que el silenciador de TGMV no opera sobre el promotor CP heterólogo, y por lo tanto, que existe especificidad en su acción; en caso contrario, se mostrará que los silenciadores pueden operar sobre promotores de diferentes virus, lo que tiene interesantes implicaciones para el uso biotecnológico de promotores *CP*. Otras combinaciones que sería importante construir y analizar en un futuro, serían las fusiones del silenciador de PHV con el promotor *NSP* del mismo virus (localizado en su genoma B), y la del silenciador TGMV con ese mismo promotor de PHV. De esta manera, podría determinarse si el elemento silenciador presente en el genoma A de un virus es funcionalmente equivalente al que se supone existe también en el componente B.

En resumen, las cinco construcciones con fragmentos HSil de PHV o Sil de TGMV fusionados al promotor CP693 de PHV, que hemos generado en este trabajo, serán de gran utilidad para responder preguntas de interés general relacionadas a los silenciadores de begomovirus, que hasta donde sabemos son los elementos represores de sistemas vegetales más similares a los silenciadores clásicos que se han caracterizado en levaduras y células animales.

Efecto del número de CLEs en la respuesta a TrAP.

Como se mencionó antes, las únicas secuencias que han sido identificadas hasta ahora como un blanco funcional de TrAP son los “elementos tardíos conservados” (CLEs) (Ruiz-Medrano *et al*, 1999; Monsalve-Fonnegra, 2002). Estos estudios lograron demostrar que una sola copia del CLE es suficiente para la activación por TrAP de promotores no begomovirales; se determinó, además, que la duplicación del CLE da lugar a un incremento sustancial en la respuesta del promotor heterólogo al transactivador viral. En base a esas observaciones, surgió la idea de explorar cual es el número de copias de ese elemento que se requieren para alcanzar la respuesta máxima a TrAP. Para ello generamos construcciones que contienen la secuencia CLE repetida 3 ó 6 veces, tanto en vectores binarios como en

vectores de expresión transitoria; de las mismas construcciones se podrían también derivar fácilmente, en caso necesario, otras construcciones con 4, 5, y 9 copias del CLE, ya que los oligonucleótidos fueron diseñados con sitios de restricción únicos entre cada CLE.

Aunque los oligonucleótidos con CLEs fueron fusionados a dos tipos diferentes de promotores 35S truncados, la serie de mayor interés es la que contiene el promotor mínimo -46/+8, presente en pBI46S, ya que éste sólo incluye el mínimo de secuencias necesario para el reclutamiento de la RNA polimerasa (la caja TATA y el iniciador), y por tanto, permitirá evaluar las propiedades funcionales de los CLEs sin la interferencia de otros elementos *cis*-reguladores. En contraste, el promotor truncado -90/+1 contenido en pBI90S incluye, además de la caja TATA, un elemento transcripcional denominado AS-1 (“activation sequence-1”), que dirige una expresión claramente detectable en raíces y, en ciertas etapas del desarrollo de la planta, también en las nervaduras de las hojas (Benfey *et al.*, 1990b). Consecuentemente, las construcciones con las combinaciones CLE/ AS-1, presentes en la serie CLE-90S, aunque pueden producir resultados interesantes, no nos permitirían inferir las auténticas propiedades del CLE, por que las propiedades del promotor quimérico serán el resultado de la interacción sinérgica de dos elementos *cis*-reguladores distintos.

A diferencia de las construcciones que contienen secuencias virales potencialmente represoras, las que incluyen múltiplos del CLE pueden ser analizados tanto en sistemas de expresión transitoria como en plantas transgénicas. Los ensayos transitorios, ya sea por bombardeo de hojas con micropartículas, o electroporación de protoplastos, tienen la ventaja de producir resultados rápidos, y de permitir la comparación de construcciones que solo difieren en el número de CLEs, con cero (el control), 1, 2, 3 o 6 copias, bajo las mismas condiciones experimentales. Adicionalmente, estas construcciones pueden ser examinadas tanto en ausencia como en presencia de una fuente de TrAP. Las plantas transgénicas, por otra parte, permitirán responder de modo definitivo si los CLEs son también el blanco funcional de factores transcripcionales del huésped, y si éstos son constitutivos o específicos de tejido. En todo caso, los resultados de los ensayos de expresión transitoria y

estable aportarán información diversa y complementaria, que nos dará una comprensión más completa de la función de los CLEs, los cuales podrían llegar a ser en el futuro componentes comunes de promotores sintéticos cuya actividad pueda inducirse por infecciones virales, y que serán herramientas muy útiles en la generación de plantas resistentes a geminivirus por ingeniería genética.

Descubrimiento de CMAs en la región intergénica de los begomovirus.

El análisis comparativo que se desarrolló en el curso de este trabajo, condujo a varios hallazgos interesantes, entre los cuales destacan las drásticas diferencias en la organización estructural del segmento “temprano” de la región intergénica (el promotor Rep) de los principales linajes de begomovirus, lo que contrasta con la organización modular de la región tardía, la cual se encuentra comparativamente conservada en todos los miembros de este género viral. Las diferencias reveladas en la composición modular de la región intergénica de virus de diferentes continentes, proporcionan bases para explicar de un modo sencillo la observación de que los promotores *Rep* de TGMV, PHV y otros begomovirus americanos son relativamente “débiles”, en tanto que el promotor homólogo de un begomovirus asiático, CLCMV, exprese por el contrario una actividad extraordinariamente elevada.

El análisis filogenético-estructural hizo posible delimitar una serie de “arreglos modulares conservados” o CMAs, los cuales han experimentado a lo largo de la evolución ciertos cambios que hacen difícil su identificación por métodos convencionales de comparación de secuencias. Un rasgo interesante de estos CMAs es que muchos de ellos incluyen CLEs, o secuencias relacionadas a ese elemento, y el análisis filogenético lleva a la conclusión de que el promotor CP del hipotético ancestro común de los begomovirus contenía varios CMAs en los que el CLE se encontraba asociado a diferentes elementos *cis*-reguladores. Estos arreglos existen todavía en algunos virus de la India y el lejano Oriente, pero no en ninguno de los begomovirus de Africa, Europa o América conocidos, lo que lleva a la conclusión de que los begomovirus se originaron probablemente en el subcontinente Indio, en una época en el que los bloques continentales resultantes de la fragmentación del supercontinente Gondwana se estaban separando. Esta hipótesis se propone porque

explicaría las notables similitudes del segmento tardío de los begomovirus de América con los asiáticos, que contrastan con las marcadas diferencias en el mismo segmento de los virus americanos y los de Africa/Europa. Estas semejanzas y diferencias en el promotor tardío del genoma A de begomovirus se correlacionan además con la existencia de “motifs” en la proteína CP que comparten los virus de Asia y América, y que faltan en los de Africa (datos no mostrados). Así pues, los resultados de nuestro análisis proporcionan claves importantes para descifrar la compleja historia evolutiva de los begomovirus.

Otro descubrimiento relevante del análisis comparado es la de que los begomovirus que carecen de CLEs, todos los cuales son de América y parecen constituir un linaje relativamente moderno, presentan CMAs que son homólogos a CMAs con CLEs de los begomovirus de otros continentes y algunos americanos (como TGMV y PHV). Las secuencias en esos CMAs que son homólogas a los CLEs son también elementos ricos en G y C, pero carecen del núcleo GGTC. Será interesante explorar la cuestión de si esos CMAs que carecen de CLEs funcionan de modo similar a sus homólogos con CLEs.

No sabemos cuales son las funciones desarrolladas por los diferentes CMAs identificados en este estudio, pero se pueden establecer algunas correlaciones con datos experimentales recientes. Por ejemplo, la secuencia de 35 pb cuya delección eliminó prácticamente la actividad del promotor Rep truncado de CLCuMV (Xie et al., 2003) comprende exactamente el CMA “talco-CGATn-CLE” de ese virus; por otra parte, las regiones C y B del promotor CP de TGMV, que se han definido como esenciales para la regulación por TrAP, comprenden el CMA “CLE-CCAAT-Hbox” delimitado en nuestro análisis. Así pues, existe evidencia directa de que estos CMAs funcionan realmente como elementos reguladores complejos.

Las construcciones que involucran CMAs sintéticos, fusionados a promotores heterólogos mínimos, nos permitirán explorar las funciones de estos elementos reguladores multipartitas aislados de otros componentes de la región intergénica, lo que nos proporcionará información complementaria a la que pueda obtenerse en el estudio mutacional de promotores CP. De este modo, podremos mejorar en un corto plazo la comprensión del control de los genes tardíos en begomovirus.

Referencias

Argüello-Astorga, G. R. (1996). Determinación teórica y experimental de módulos de control transcripcional y replicativo en plantas: identificación de unidades mínimas de fotorrespuesta. Ph. D. Tesis. Irapuato, Gto., Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L., y Rivera-Bustamante, R. (1994). Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Mol. Biol.* 26, 553-556.

Argüello-Astorga, G., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L., y Rivera-Bustamante, R. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization or iterative elements: A model for replication. *Virology* 203, 90-100.

Argüello-Astorga, G. y Herrera-Estrella, L. (1996). Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways. *Plant Physiol.* 112, 1151-1166.

Argüello-Astorga, G. y Herrera-Estrella, L. (1998). Evolution of light-regulated plant promoters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 525-555.

Azzam, O., Frazer, J., De La Rosa, D., Beaver, J. S., Ahlquist, P., y Maxwell, D. P. (1994). Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204, 289-296.

Babb, R., Huang, C. C., Aufiero, D. J., y Herr, W. (2001). DNA recognition by the herpes simplex virus transactivator VP16: a novel DNA-binding structure. *Mol. Cell. Biol.* 21, 14, 4700-4712.

Benfey, P. N., y Chua, N-H. (1990). The cauliflower mosaic virus 35S promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250, 959-966.

Benfey, P. N., Ren, L., y Chua, N-H. (1990). Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J.* 9, 1677-1684.

Benfey, P. N., Ren, L., y Chua, N-H. (1990). Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J.* 9, 1685-1696.

Bisaro, D.M. (1996). Geminivirus replication. In "DNA Replication in Eukaryotic Cells" (M. DePamphilis, Ed.), pp. 833-854. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Brian, M. W., y Lazarowitz, S. G. (1999). Nuclear export in plants: Use of geminivirus movement proteins for a cell-based exported assay. *Plant Cell* 11, 1267-1276.

Brough, C. L., Sunter, G., Gardiner, W. E., y Bisaro, D. M. (1992). Kinetics of tomato golden mosaic virus DNA replication and coat protein promoter activity in *Nicotiana tabacum* protoplasts. *Virology* 187, 1-9.

Bruce, W. B., Deng, X-W., y Quail, P. H. (1991). A negative acting DNA sequence element mediates phytochrome-directed repression of *phyA* gene transcription. *EMBO J.* 10 3015-3024.

Brunetti, A., Tabaza, R., Noris, E., Lucioli, A., Accotto, G. P., y Tabaza, M. (2001) Transgenically expressed T-Rep of tomato yellow leaf curl Sardinia virus acts as a trans-dominant-negative mutant, inhibiting viral transcription and replication. *J Virol.* 75(22),10573-10581.

Davies, J. W., y Stanley, J. (1989). Geminivirus genes and vectors. *Trends Genet.* 3(3), 77-81.

Dong, X., Van Wezel, R., Stanley, J., y Hong, Y. (2003). Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 77, 7026-7033.

Eagel, P. A., Orozco, B. M. y Hanley-Bowdoin, L. (1994). A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell* 6, 1157-1170.

Eagle, P. A., y Hanley-Bowdoin, L. (1997). Cis-elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and efficient DNA replication. *J. Virol.* 71, 6947-6955

Elmer, J. S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W., Bisaro, D. M., y Rogers, S. G. (1988). Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic. Acids Res* 16, 7043-7060.

Fauquet, C. M., Bisaro, D. M., Bridoon, R. W., Brown, J. K., Harrison, B.D., Rybicki, E. P., Stenger, D.C. y Stanley, J. (2003). Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and updated list of begomovirus species. *Archiv. Virol.* 148, 405-421.

Flint, J., y Shenk, T. (1989). Adenovirus E1A protein as a paradigm viral transactivator. *Annu. Rev. Genet.* 23, 141-161.

Fondong, V. N., Pita, J. S., Rey, M. E. C., de Kochko, A., Beachy, R. N., y Fauquet, C. M. (2000). Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and the new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *J. Gen. Virol* 81, 287-297.

Fontes, E. P. B., Luckow, V. A., y Hanley-Bowdoin, L. (1992). A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* 4, 597-608.

Fontes, E. P. B., Eagle, P. A., Sipe, P. S., Luckow, V. A., y Hanley-Bowdoin, L. (1994). Interaction between geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J. Biol. Chem.* 269, 8459-8465.

Fontes, E. P. B., Gladfelter, H. J., Schaffer, R. L., Petty, I. T. D., y Hanley-Bowdoin, L. (1994). Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* 6, 405-416.

Gelvin, S. B., Schilperoot, R. A. (1997). *Plant Molecular Biology Manual*. 2nd Ed. Kluwer Academic Publishers. Dodrecht, Boston, London.

Gerster, T., y Roeder, R. G. (1988). A herpes trans-activating protein interacts with transcription factor OGT-1 and other cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6347-6351.

Gröning, B. R., Hayes, R. J., y Buck, K. W. (1994). Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein AL1 gene expression: Expression of the AL4 may contribute to suppression of the AL1 gene. *J. Gen. Virol.* 75, 721-726.

Guevara-García, A., Mosqueda-Cano, G., Argüello-Astorga, G., Simpson, J., y Herrera-Estrella, L. (1993). Tissue-specific and wound-inducible pattern of expression of the mannopine synthase promoter is determined by the interaction between positive and negative cis-regulatory elements. *Plan J.* 4, 495-505.

Gutierrez, C. (1999). Geminivirus DNA replication. *Cell Mol. Life Sci.* 56, 313-329.

Gutierrez, C. (2000). DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* 3, 2197-2205.

Gutierrez, C. (2002). Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60, 219-230.

Haley, A., Zhan, X., Richardson, K., Head, K., y Morris, B. (1992). Regulation of the activities of African cassava mosaic virus promoters by the AC1, AC2, and AC3 gene products. *Virology* 188(2), 905-909.

Hamilton, W. D. O., Sanders, R. C., Coutts, R. H. A., y Buck, K. W. (1981). Characterization of tomato golden mosaic virus as a geminivirus. *FEMS Microbiol. Lett.* 11, 263-267.

Hamilton, W. D. O., Stein, V. E., Coutts, R. H. A., y Buck, K. W. (1984). Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: Potential coding regions and regulatory sequences. *EMBO J.* 3, 2197-2205.

Hanley-Bowdoin, L., Elmer, J. S., y Rogers, S. G. (1989). Functional expression of the leftward open reading frames of the A component of tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 1, 1056-1067.

Hanley-Bowdoin, L., Elmer, J. S., y Rogers, S. G. (1990). Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1446-1450.

Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S., Orozco, B. M., Nagar, S., y Robertson, D. (2000). Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18(1), 71-106.

Hao, L., Wang, H., Sunter, G., y Bisaro, D. M. (2003). Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell* 15, 1034-1048.

Hartz, M. D., Sunter, G., y Bisaro, M. D. (1999). The tomato golden mosaic virus transactivator (TrAP) is a single-stranded DNA and zinc-binding phosphoprotein with an acidic activation domain. *Virology*, 263, 1-14.

Hsieh, J. J-D., y Hayward, S. D. (1995). Masking of the CBF1/RPJK transcriptional repression domain by the Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560-563.

Hung, H. C., y Petty, I. T. D. (2001). Functional equivalence of late gene promoters in bean golden mosaic virus with those of tomato golden mosaic virus. *J. Gen Virol.* 82, 667-672.

Jefferson, R. A., Kavanaugh, T. A., y Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.

Kristie, T. M., LeBowits, J. H., y Sharp, P. A. (1989). The octamer-binding proteins form multi-protein-DNA complexes with the HSV α TIF regulatory protein. *EMBO J.* 8, 4229-4238.

Lazarowitz, S. G. Wu, L. C., Rogers, S. G., y Elmer, J. S. (1992). Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell* 4, 799-809.

Lazarowitz, S. G. (1992). Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Crit. Rev Plant Sci.* 11, 327-349.

Lillie, J. W., y Green, M. R. (1989). Transcription activation by the adenovirus E1A protein. *Nature* 339, 39-44.

Liu, F., y Green M. R. (1994). Promoter targeting by adenovirus E1A through interaction with different cellular DNA-binding domains. *Nature* 368, 520-525.

Martin, K. J., y Green, M. R. (1992). Transcriptional activation by viral immediate early proteins: Variations on a common theme. In "Transcriptional Regulation" (S. L. McKnight and K. R. Yamamoto, Eds.) pp 695-725. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Morra, M. R., y Petty, I. T. D. (2000). Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell* 12, 2259-2270-

Monsalve Fonnegra, Z. I. (2002). Caracterización funcional de los Elementos Tardíos Conservados (CLEs) presentes en el gen de la proteína de la cápside del *Virus huasteco del chile*. Ph. D. Tesis. Irapuato, Gto., Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Nevins, J. R. (1991). Transcriptional activation by viral regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 11, 435-439.

Norris, E., Jupin, I., Accotto, G. P., y Gronenborn, B. (1996). DNA binding activity of the C2 protein of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Virology* 217, 607-612.

Ogbourne, S. y Antalis, T. M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* 1, (331) 1-14.

Petty, I. T. D., Coutts, R. H. A., y Buck, K. W. (1988). Transcriptional mapping of the coat protein gene of tomato golden mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 69, 1359-1365.

Quin, Y., y Petty, I. T. D. (2001). Genetic analysis of bipartite geminivirus tissue tropism. *Virology* 291, 311-323.

Ramos, P. L., Guevara-Gonzalez, R. G., Peral, R., Ascencio-Ibanez, J. T., Polston, J. E., Arguello-Astorga, G. R., Vega-Arreguin, J. C., y Rivera-Bustamante, R. F. (2003). Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Arch Virol.* 148(9), 1697-1712.

Ruiz Medrano, R. (1996). Análisis de la expresión de los principales promotores del geminivirus huasteco del chile. Ph. D. Tesis. Irapuato, Gto., Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Ruiz-Medrano, R., Guevara-González, R. G., Argüello-Astorga, G. R., Monsalve-Fonnegra, Z. I., Herrera-Estrella, L. R., y Rivera-Bustamante, R. F. (1999). Identification of a sequence element involved in AC2-mediated activation of the pepper huasteco virus coat protein gene. *Virology* 253, 162-169.

Rybicki, E. P., Bridson, R. W., Brown, J. K., and other authors. (2000). Family Geminiviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp 285-297. Edited by M. H. V. van Regenmortel, C. M.

Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle & R. B. Wickner, San Diego: Academic Press.

Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanderfoot, A., y Lazarowitz, S. G. (1995). Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell* 7, 1185, 1194.

Sanderfoot, A., y Lazarowitz, S. G. (1996). Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol.* 6, 353-358.

Saunders, K., y Stanley, J. (1995). Complementation of African cassava mosaic virus AC2 gene function in a mixed bipartite geminivirus infection. *J. Gen. Virol.* 76, 2287-2292.

Stenger, D. C., Revington, G. N., Stevenson, M. C., y Bisaro, D. M. (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling circle replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8029-8033.

Sudarshana, M. R., Wang, H. L., Lucas, W. J. y Gilbertson, J. R. (1998). Dynamics of bean Dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed using the green fluorescent protein. *MPMI* 11, 277-291.

Sung, Y. K., y Coutts, R. H. A. (1995). Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. *J. Gen. Virol.* 76, 2809-2815.

Sung, Y. K., y Coutts, R. H. A. (1996). Potato yellow mosaic geminivirus AC2 protein is a sequence non-specific DNA binding protein. *FEBS Lett.* 383, 51-54.

Sunter, G., y Bisaro, D. M. (2003). Identification of a minimal sequence required for activation of the tomato golden mosaic virus coat protein promoter in protoplasts. *Virology* 305, 452-462.

Sunter, G., y Bisaro, D. M. (2001). Plant expressing tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology* 285, 59-70.

Sunter, G., y Bisaro, D. M. (1991) Transactivation in a geminivirus, AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 180, 416-419.

Sunter, G., y Bisaro, D. M. (1992). Transactivation of geminivirus AR1 and geminivirus BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4, 1321-1331.

Sunter, G., y 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.

Sunter, G., Hartitz, M.D., y Bisaro, D. M. (1993). Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Auto-regulation of geminivirus replication protein. *Virology* 195, 275-280.

Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S. G., Brough, C. L., y Bisaro, D. M. (1990). Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* 179, 69-77.

Sunter, G., Stenger, D. C., y Bisaro, D. M. (1994). Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. *Virology* 203, 203-210.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Herrera-Estrella, L. R., y Rivera-Bustamante, R. F. (1993). Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *J. Gen. Virol.* 74, 2225-2231.

Triezenberg, S. J., LaMarco, K. L., y McKnight, S. L. (1988). Evidence of DNA-protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev.* 2, 730-742.

Van Regenmontel, M. H., Mayo M. A., Fauquet C. M. y Maniloff J. (2000). Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Archives of Virology* 145, 2227-2232.

Van Wezel, R., Lui, H., Wu, Z., Tien, P., Stanley, J., y Hong, Y. (2003). Contribution of the zinc finger to zinc and DNA binding by a suppressor of transcriptional gene silencing. *J. Virol.* 77, 696-700.

Van Wezel, R., Lui, H., Tien, P., Stanley, J., y Hong, Y. (2001). Gene C2 of the monopartite geminivirus *Tomato yellow curl virus-China* encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1125-1128.

Van Wezel, R., Dong, X., Lui, H., Tien, P., Stanley, J., y Hong, Y. (2002). Mutation of three cysteine residues in *Tomato yellow curl virus-China* C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and post-transcriptional gene silencing suppression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 203-208.

Voinet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17, 449-459.

Voinet, O., Pinto, Y., y Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14147-14152.

Ward, B. M. y Lazarowitz, S. G. (1999). Nuclear export in plants: use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *The Plant Cell* 11, 1267-1276.

Xie, Y., Lui, Y., Meng, M., Chen, L. y Zhu, Z. (2003). Isolation and identification of a super strong plant promoter from cotton leaf curl Multan virus. *Plant Mol. Biol.* 53, 1-14.

Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W., McKenna, R. (2001). Structure of the Maize streak virus geminate particle. *Virology* 279 (2), 471-477.