

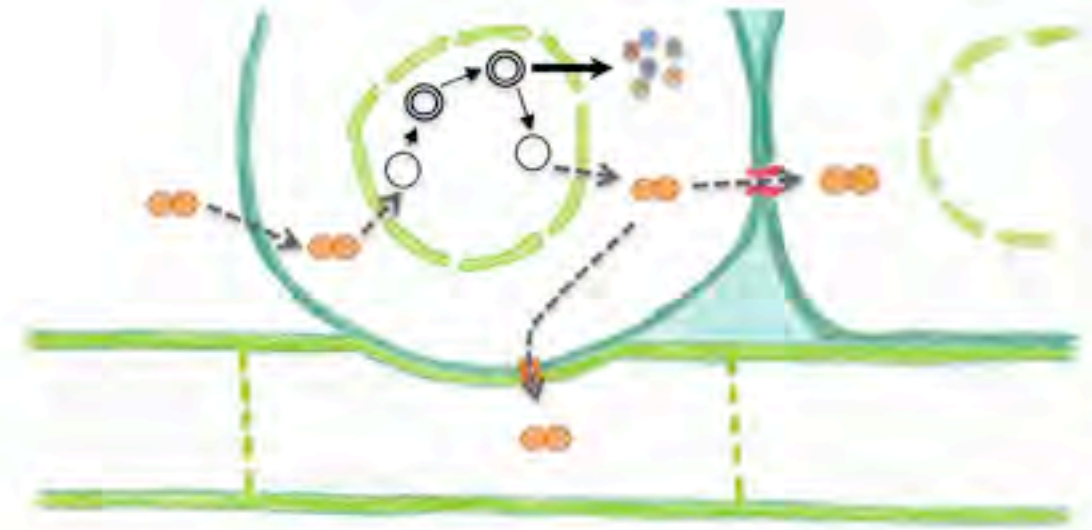


Tesis Doctoral ESTUDIO SOBRE LA INTERACCIÓN PLANTA GEMINIVIRUS Manuel Arroyo Mateos

UMA
2015

Tesis Doctoral

ESTUDIO SOBRE LA INTERACCIÓN PLANTA GEMINIVIRUS



Manuel Arroyo Mateos



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Manuel Arroyo Mateos

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Manuel Alberto Arroyo Mateos

**Estudio sobre la interacción planta-
geminivirus.**

TESIS DOCTORAL

Málaga, 2015

Memoria presentada por

Manuel Alberto Arroyo Mateos

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga

Estudio sobre la interacción planta- geminivirus.

Director:

Dr. Eduardo Rodríguez Bejarano

Área de Genética

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”

(IHSM)

Universidad de Málaga

IHSM-UMA-CSIC

Málaga, 2015

Este trabajo ha sido financiado por la ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador de referencia BES-2008-005912 asociada al proyecto de investigación AGL2007-66062-C02-02 (2008-2012), concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Área de Genética.

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM).

Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

El Doctor Eduardo Rodríguez Bejarano, del Área de Genética del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

INFORMA:

Que la tesis doctoral titulada “Estudio sobre la interacción planta-geminivirus.”, presentada por Manuel Alberto Arroyo Mateos en esta memoria para optar al título de Doctor por la Universidad de Málaga, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión en el Área de Genética, y de que reúne los requisitos exigidos para su defensa pública.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, extiende el presente informe,

en Málaga a 26 de febrero de 2015

Eduardo Rodríguez Bejarano

COMITÉ EVALUADOR

Presidente

Dr. Enrique Moriones Alonso

Departamento de Interacciones Planta-Patógeno,
IHSM-CSIC-UMA "La Mayora", Algarrobo Costa, Málaga

Secretario

Dr. Javier Ruiz Albert

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología,
Universidad de Málaga

Vocal #1

Dr. José Antonio Darós Arnau

Biotecnología de virus de Plantas
CSIC-UPV, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia

Vocal #2

Dr. José Trino Ascencio Ibáñez

Department of Molecular and Structural Biochemistry
North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

Vocal #3

Dr. Miguel Ángel Botella Mesa

Biología Molecular y Bioquímica
Universidad de Málaga

Suplente #1

Dr. Jesús Navas Castillo

Departamento de Interacciones Planta-Patógeno,
IHSM-CSIC-UMA "La Mayora", Algarrobo Costa, Málaga

Suplente #2

Dr. Carmen Beuzón López

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología,
Universidad de Málaga

A Mariví
A mis padres

Agradecimientos

Son más de las cuatro de la mañana sigo en blanco delante del ordenador. ¿Qué hago aquí? Alguien dijo una vez que es imposible saber dónde estamos si no sabemos de dónde venimos... y si no, alguien debería decirlo. Mirar atrás en estos momentos es un ejercicio duro, pero sólo así puedo acordarme de como mi abuelo despertó mi interés por el cómo funcionan las cosas a lomos de una vetusta enciclopedia Monitor. De cómo mi madre me enseñó que hacer “experimentos” era la mejor manera de aprender. De como mi padre despertó mi interés por los por qué y por todo lo demás, en conversaciones alrededor de mis “deberes” de Historia hasta las tantas, con mil libros que aparecían por casa y que parecían darme las respuestas a todas las preguntas que tenía, siempre a condición de hacerme cien preguntas más.

Y un buen día, buscando respuestas, empecé a estudiar Biología y me encontré con unos fueros de serie, Juan Jiménez, Eduardo y Amando, que me hablan de genes, polímeros, macromoléculas, códigos, reguladores... un Lego monumental en cuatro dimensiones del que no conocemos todas las piezas y que no terminamos de entender como funciona. Y el no va más, Maribel y luego Gabriel, me dicen que si quiero jugar con ellos con este gran Lego. Y me enamoro, porque ya no es sólo hablar y leer. Ahora, además, puedo hacer.

Y, cuando menos me lo espero acabo la carrera y Eduardo me dice que sí a trabajar con él en el departamento. Y me da la oportunidad de mi vida. Y con una paciencia infinita me lo enseña todo. A trabajar, a pensar, a leer, a interpretar, a hacer lo más sensato... Y mucho más. Y allí me encuentro con Javi, gran científico y mejor persona. Siempre con tiempo para ayudar. Siempre con la solución a cualquier entuerto que le plantease. Siempre con una sonrisa. Siempre Zen. The Force is strong with you, live long and prosper. Y a Carmen, siempre con un consejo sensato y un buen humor inquebrantable. Y no acaba ahí, también están Cayo, Araceli, Enrique, Ana,

Mari Carmen, que soportan mis preguntas y me ayudan siempre que pueden.

Además de profesores también hay doctorandos, compañeros de grupo, de camino, de alegrías y sinsabores. No puedo empezar de otra manera que mencionando a Pérfidas Arpías S.L. No sólo por temor a las represalias, si no porque las quiero. Por muchas cosas. Y porque nunca me he reído tanto destilando veneno. Con Ana compartí horas y horas respirando trizol, haciendo transgénicas, infiltrando tomates, esquivando salpicones de P³², currando en experimentos malditos, por el camino cantamos The Bard Song, hablamos de mil libros, de lo humano y lo divino, arreglamos el mundo... Rosa siempre estuvo ahí. Ya fuera para hablar de ciencia o de corazones rotos. Para ayudar con el inglés o para embarcarse en un road-trip a Almería con una furgoneta que se caía a pedazos (literalmente), con el maletero lleno de tomateras y bocata de calamares incluido. Todo ello destilando sabios consejos y serenidad.

Por fin encontré a alguien a quien poder presentar como “un compañero y un amigo”. Si el día se terciaba malo siempre conseguimos arreglarlo con unas cervezas y una barbacoa improvisada en la terraza. Alberto siempre estuvo ahí. Para ayudar con las Arabidopsis e incluso después de la sexta cerveza para escuchar pacientemente mis historias de la guerra.

Con Natasa compartí conversaciones balcánicas y cafés “negros como la vida”. Aunque tengamos opiniones distintas sobre John Snow, ambos sabemos que estos jovencitos irrespetuosos nunca comprenderán porqué con Tito se vivía mejor.

Y los demás del grupo, Migue, Carlos, Tábata, Edgar, María, Rocío, con los que he compartido muchos años y experiencias y de los que he aprendido muchísimo. Los padawans Inma, Tamara, Carlos, Pepe, Álvaro, Blanca, ánimo chavales, seguid empujando los límites un pasito más allá. No quisiera olvidarme de Lucía y Mayte, Isa Pérez, Isa Chi, Clara, Luis, Pilar, Isabel Aragón y Eloy, Inma, Adela, JuanJo, Jose y Diego, Inma de la

Viuda, Mely y Eli, Brau y Patri... Ha sido mucha la gente que ha pasado por mi vida en el labo en estos años.

No puedo dejarme en el tintero a los Malvados Cylons A.K.A. Malditas tostadoras: Paco, Tolo, Artu, Joselito, Juanillo y Chetos, en breve volveré a daros escotilla. Ni a Javi y Dani, vecinos recíprocos, ni a Antonio Gabriel, un hombre sensato. Ni a Navas (mi querido Melkor, estoy acabando “esto”, así que prepárese, porque vamos a acabar “eso”). Ni a todos los demás, Jesule, Oscar, Mesa, Antonio, Blanquito (D****n), Moyano... Os quiero a todos, cabrones.

Y la última en apuntarse a esto de aguantarme, Mariví. La culpa de que haya llegado hasta aquí es sólo tuya. De no ser por ti, por tu paciencia, por tu cariño, tu fe en mi, y, porqué no decirlo, porque eres la persona más maravillosa del mundo, es probable que hubiera hecho alguna brurdinariez hace tiempo. Te quiero.

A todos, gracias por traerme hasta aquí. Sin vosotros no hubiera sido así ni yo sería yo. Gracias una y mil veces. Simplemente con conoceros y haber compartido estos años con vosotros, hacéis que haya merecido la pena.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.

Los geminivirus.	19
El género Begomovirus.	20
Geminivirus: como reprogramar la célula con un puñado de genes.	23
Reprogramando los controles del ciclo celular de la planta.	24
El endociclo y la replicación del DNA viral.	26
Rutas de señalización de la planta.	28
Rutas de la ubiquitinación y similares a la ubiquitinación.	32
Rutas de silenciamiento en plantas.	33
Bibliografía.	37

CAPÍTULO 1

ANÁLISIS DE LA INTERFERENCIA DE REP EN LA SUMOILACIÓN DE PCNA

1.1 INTRODUCCIÓN.....	45
1.1.1 Sumoilación.	45
El péptido SUMO.	46
Maduración.	49
El ciclo de la sumoilación.	49
Funciones de SUMO en plantas.	53
Sumoilación y virus.	55
1.1.2 PCNA: estructura.	63
Funciones de PCNA: un “hub” para interacciones con otras proteínas.	64
1.2 RESULTADOS.	68
1.2.1 Identificación de las lisinas sumoilables de SIPCNA.	68
Construcción de mutantes y ensayos de sumoilación.	73
1.2.2. Determinación y caracterización de la interferencia de Rep en la sumoilación de SIPCNA.	79

1.2.3 Identificación de los dominios de Rep implicados en la interferencia.	81
1.2.4 Interferencia de la sumoilación de PCNA en planta.	84
Ensayos de expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i> .	84
Expresión de proteínas de fusión.	86
1.2.5 Sistema de Arabidopsis in vitro.	90
1.2.6 Interferencia de Rep en la sumoilación in vivo.	94
Detección de PCNA endógeno en <i>A. thaliana</i> .	94
Generación de plantas transgénicas que expresen Rep de TGMV.	96
Detección de la sumoilación de PCNA en plantas pER8Rep.	99
Cambios en el sumoiloma de <i>Arabidopsis</i> al inducir Rep.	101
1.3 DISCUSIÓN.	104
1.3.1 Identificación de las lisinas sumoilables de SIPCNA.	104
1.3.2 Ensayos en plantas.	106
1.3.3 Sistema de Arabidopsis in vitro.	108
1.3.4 Rep reduce la sumoilación de PCNA.	108
1.4 BIBLIOGRAFÍA.	111

CAPÍTULO 2

DESARROLLO DE NUEVAS HERRAMIENTAS PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DEL COMPLEJO TYLCD: PLANTAS 2IR

2.1 INTRODUCCIÓN.	117
2.2 RESULTADOS.	121
2.2.1 Construcciones 2IR.	121
Construcciones de TYLCV.	121
Construcciones de TYLCSV.	122
2.2.2 Análisis de las construcciones 2IR.	123
2.2.3 Obtención de plantas transgénicas de <i>N. benthamiana</i> con las construcciones 2IR.	127
2.2.4 Ensayos de infección.	129

2.3 DISCUSIÓN.	137
2.4 BIBLIOGRAFÍA.	140

CAPÍTULO 3

EFFECTO DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN LA INFECCION DE TYLCSV

3.1 INTRODUCCIÓN.	143
3.2 RESULTADOS.	146
3.2.1 Diseño experimental.	146
3.2.2 Fenotipado de las plantas.	147
Tamaño, número y color de las hojas.	148
Síntomas y virus.	149
3.2.4 GFP y moléculas extracromosómicas.	152
3.3 DISCUSIÓN.	154
3.4 BIBLIOGRAFÍA.	158

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos y medios de cultivo.	163
4.1.1 Cepas bacterianas.	163
4.2 Material vegetal.	164
4.2.1 <i>Nicotiana benthamiana</i>	164
4.2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	164
4.3 Plásmidos.	164
4.3.1 Plásmidos de expresión en <i>E. coli</i>	164
4.3.3 Plásmidos de expresión en plantas.	168
4.4 Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.	169
4.5 Análisis de proteínas de plantas.	170
4.6 Ensayos de sumoilación en <i>E. coli</i>	170
4.7 Transformación de plantas.	170
4.8 Microscopía y fotografía.	171
4.9 Ensayos de infecciones virales.	171
4.10 Ensayos de expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	172

4.11 Oligonucleótidos usados en este trabajo.	173
4.12 Anticuerpos usados en este trabajo.	176
4.13 Bibliografía.	177
CONCLUSIONES	179
CONCLUSIONS	183
Anexo I: Alineamiento múltiple de PCNA	187
Anexo II: Extracto de la Tesis de M. A. Sánchez Durán	197
Anexo III: Resumen	211
Anexo IV: Artículos publicados durante el desarrollo de esta tesis	237

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los geminivirus.

Los geminivirus son un grupo de virus de plantas (familia *Geminiviridae*) transmitidos por insectos que causan algunas de las enfermedades con mayor impacto económico a nivel mundial (Mansoor, *et al.*, 2003; Rojas, *et al.*, 2005; Navas-Castillo *et al.*, 2011). Los geminivirus comparten varias características comunes: (i) sus genomas están formados por una o dos moléculas circulares de DNA de cadena simple de 2,5 a 3 Kb; (ii) sus viriones muestran una estructura gemela cuasiicosoédrica (figura I.1); (iii) sus genomas contiene de 6 a 8 fases abiertas de lectura que solapan parcial o completamente; (iv) codifican una única proteína vírica imprescindible para su replicación (Rep) y (v) la replicación asistida por Rep se inicia en una estructura con forma de horquilla localizada en una secuencia denominada IR (intergenic region) (Rojas *et al.*, 2005; Jeske, 2009) (Figura I.1).

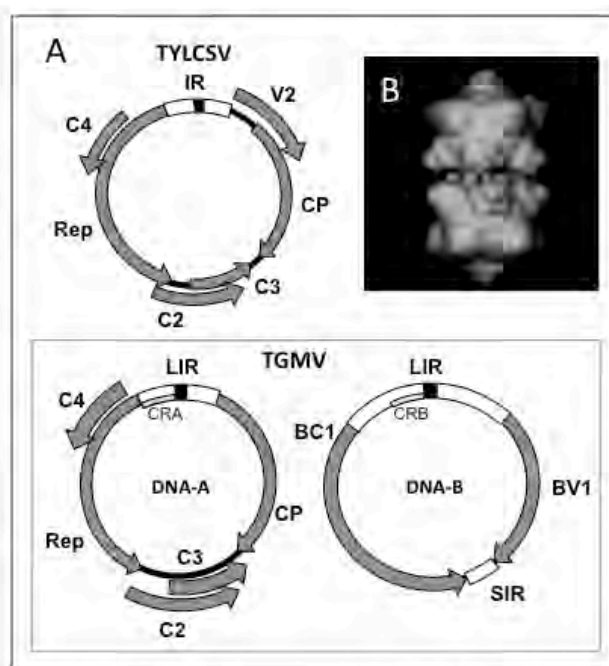


Figura I.1: Estructura del genoma y la cápside de los begomovirus. A) Representación esquemática de la estructura de los genes de TYLCSV (Arriba) y de TGMV (abajo), representados como flechas grises y de las regiones intergénicas, representadas como cajas blancas (IR: región intergénica; LIR: región intergénica larga; SIR: región intergénica corta; CRA: región común A; CRB: región común B). La horquilla en la que se inicia la replicación se representa como una caja negra. Adaptado de Varsani *et al.*, 2013. B) Modelo generado *in silico* de la estructura de la cápside típica de la familia Geminiviridae. (MSV, Zhang *et al.*, 2001).

Además de estas propiedades básicas, los miembros de esta familia exhiben una considerable diversidad en términos de secuencia, rango de hospedador, especificidad de tejido diana (tropismo tisular) e insecto vector. Basándose en estas características, los geminivirus se han clasificado en siete géneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus* y *Turncurtovirus* (Tabla I1). Los genomas de los curtovirus, topocuvirus, turncurtovirus y begomovirus monopartitos tienen una organización y unas características similares (Fondong, 2013).

Tabla I.1. Clasificación de los Geminivirus

Género	Miembro tipo	Rango de hospedador	Vector	Genoma
Mastrevirus	<i>Maize streak virus</i> (MSV)	Monocotiledóneas y dicotiledóneas	Cicadélidos	Monopartito
Curtovirus	<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	Dicotiledóneas	Cicadélidos	Monopartito
Begomovirus	<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)	Dicotiledóneas	<i>Bemisia tabaci</i>	Mono o bipartito
Topocuvirus	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i> (TPCTV)	Dicotiledóneas	Membrácidos	Monopartito
Becurtovirus	<i>Beet curly top Iran virus</i> (BCTIV)	Dicotiledóneas	Cicadélidos	Monopartito
Eragrovirus	<i>Eragrostis curvula streak virus</i> (ECSV)	Monocotiledónea	Desconocido	Monopartito
Turncurtovirus	<i>Turnip curly top virus</i> (TCTV)	Dicotiledónea	Cicadélido	Monopartito

Géneros reconocidos actualmente en la familia Geminiviridae, especies tipo y características.

El género *Begomovirus*.

El género *Begomovirus* contiene la mayor parte de las especies de geminivirus. Los miembros de este género son transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* e infectan a una gran variedad de dicotiledóneas tanto del Viejo como del Nuevo Mundo. Sin embargo cada especie de begomovirus, generalmente, tiene un estrecho rango de hospedadores.

El genoma de los begomovirus está compuesto por una (monopartitos) o dos moléculas de DNA (bipartitos), denominadas DNA A y DNA B, cada una de ellas de entre 2,5 y 3 Kb, que no comparten ninguna similitud de secuencia excepto por una región común (CR), muy conservada, de aproximadamente 200 nucleótidos. Esta región se localiza en la región intergénica, equivalente a la IR de begomovirus monopartitos, donde se

localizan la estructura en lazo que sirve de inicio para la replicación, y los promotores para la expresión de las fases abiertas de lectura que codifican proteínas requeridas para la replicación (Rep y C3), la transcripción (C2) y la encapsidación (CP). El DNA-B contiene dos fases abiertas de lectura, que codifican proteínas implicadas en el movimiento viral y ligadas al desarrollo de síntomas (BR1 y BL1 o NS). El DNA-A y el DNA-B se encapsidan individualmente y ambos son esenciales para completar la infección (Rojas *et al.*, 2005).

El genoma de los begomovirus monopartitos es homólogo al DNA-A de los bipartitos. En el sentido de la hebra del virión se codifican dos fases abiertas de lectura, V2 (también conocida como pre-coat protein) y la proteína de la cápside (también CP, V1 o coat protein). La cadena de sentido complementario a la del virión contiene cuatro fases abiertas de lectura: Rep (proteína asociada a la replicación, también C1, AL1, AC1 o L1), C2 (también AL2, AC2, L2 o TrAP -por transcription activating protein-), C3 (también AL3, AC3, L3 o REn -por replication enhancer-) y C4 (también AC4 o L4) (Figura I.1).

Además de ser la única proteína viral con función estructural (Stanley 1993), la **CP** interviene en la infección sistémica, en la llegada del DNA viral al núcleo del hospedador y en la transmisión mediante insectos (Bridson *et al.*, 1990; Noris *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Wartig *et al.*, 1997). Consecuentemente con su función de encapsidar las partículas virales, la CP se localiza en el núcleo, gracias a una señal de localización nuclear (NLS) en su extremo N-terminal y a la interacción con la maquinaria de la alfa-importina (Kunik *et al.*, 1998; Kunik *et al.*, 1999); también se la ha relacionado con una función en el movimiento viral (Rojas *et al.*, 2001; Sharma e Ikegami, 2010).

V2 es un determinante de virulencia y de respuesta hipersensible (HR) (Mubin *et al.*, 2010; Sharma e Ikegami, 2010). Además, V2 es un supresor de silenciamiento génico probablemente porque impide el acceso de SGS3 a su ARN sustrato (Fukunaga y Doudna, 2009), sin ser necesaria una interacción directa entre ambas proteínas, (revisado en Raja *et al.*, 2010).

C2 es una proteína nuclear multifuncional (Sharma e Ikegami, 2010; van Wezel *et al.*, 2001) que parece estar implicada en la transactivación: C2 actúa como un factor de transcripción para la expresión de genes virales necesarios para las fases más tardías de la infección, como la CP (Sunter y Bisaro, 1991; Sunter Bisaro, 1992), y también dispara la transactivación de genes del hospedador (Trinks *et al.*, 2005). C2 es también un factor de patogenicidad y un supresor de silenciamiento génico, (revisado en Raja *et al.*, 2010). C2 interacciona con el signalosoma, complejo implicado en la rubilación de E3 ligasas (complejos SCF) del sistema de ubiquitinación del hospedador. Fruto de esta interacción, se alteran procesos regulados por los complejos SCF, incluida la señalización por jasmonato, modificando así la respuesta del hospedador frente a la infección (Lozano-Durán *et al.*, 2011).

C3 es una proteína nuclear (Nagar *et al.*, 1995; Selth *et al.*, 2005), y se ha descrito que es un potenciador de la replicación viral, aunque no es esencial para la misma (Sung y Coutts, 1995). C3 interactúa con Rep así como con algunos de los interactores de ésta, como PCNA (proliferating-cell nuclear antigen) o RBR (retinoblastoma related protein) (Castillo *et al.*, 2003; Settlage *et al.*, 2001; Settlage *et al.*, 2005). También se ha descrito que la interacción de C3 con Rep incrementa la actividad ATPasa de esta última, relacionada con la replicación del DNA viral (Pasumarthy *et al.*, 2010).

C4 es la proteína menos conservada entre los geminivirus. Es un determinante de patogenicidad localizado en la membrana celular (Sharma e Ikegami, 2010) que participa en el movimiento viral (Rojas *et al.*, 2001) y en la supresión del silenciamiento génico (Dogra *et al.*, 2009; Gopal, *et al.*, 2007; Raja *et al.*, 2010).

Rep es una proteína multifuncional que tiene actividad helicasa e inicia y termina la replicación de la hebra del virión uniéndose a una secuencia específica en la IR e introduciendo un corte en una secuencia cercana (Clerot y Bernardi, 2006); (Choudhury *et al.*, 2006). Se ha propuesto que Rep media en la replicación no sólo uniéndose al DNA viral, si no también induciendo un ambiente celular propicio para este proceso, principalmente interaccionando con factores celulares: además de

interaccionar con C3, Rep interactúa con una plétora de proteínas del hospedador, incluyendo PCNA, (Bagewadi *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2003), el homólogo vegetal de retinoblastoma (Xie *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 2000; Desvoyes *et al.*, 2006), el factor C de replicación (Luque *et al.*, 2002), la histona 3, una quinasa de mitosis (Kong y Hanley-Bowdoin, 2002), la quinasa GRIK (Selth *et al.*, 2005), y la enzima conjugadora de SUMO (SCE1), un regulador de la homeostasis celular (Castillo *et al.*, 2004).

Geminivirus: como reprogramar la célula con un puñado de genes.

Los geminivirus se replican en el núcleo, y lo hacen por dos mecanismos, círculo rodante y replicación dependiente de recombinación. Debido a la limitada capacidad para codificar genes, los geminivirus se ven obligados a aprovechar la maquinaria celular de sus hospedadores para llevar a cabo sus funciones vitales (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004). El establecimiento de una infección es una tarea compleja que implica varios retos. Por un lado, los geminivirus tienen que replicar su genoma, lo que requiere llegar al núcleo y “raptar” la maquinaria de replicación del DNA: los geminivirus no codifican sus propias DNA polimerasas y dependen totalmente de las proteínas celulares para llevar a cabo este proceso. Más aún, los geminivirus infectan células que no se están dividiendo, donde esta maquinaria de replicación no está disponible; así, los virus se ven obligados a reprogramar la célula, haciéndose con el control del ciclo celular. Por otra parte, los virus deben tener la capacidad de moverse de una célula a otra y, al mismo tiempo, ser capaces de diseminarse sistémicamente a través de la planta. Con este fin, deben contar con algún mecanismo para moverse a través de los plasmodesmos, al mismo tiempo que se introducen en la corriente floemática de transporte a larga distancia. Otro requisito esencial para establecer una infección es tener la capacidad de suprimir o esquivar las respuestas de defensa del hospedador. Por último y no por ello de menor importancia, los geminivirus tienen que ser capaces de ser adquiridos por los insectos vectores y ser transmitidos a plantas sanas para iniciar nuevas

infecciones. Como puede suponerse, el éxito de la infección depende del logro de cada uno de estos objetivos (Figura I.2).

Debido a las limitaciones de espacio impuestas por un genoma tan reducido, las proteínas de los geminivirus son de pequeño tamaño (de 80 a 360 aminoácidos). Más aún, estas proteínas son multifuncionales y, al mismo tiempo, diferentes proteínas codificadas por el mismo genoma viral, pueden afectar a procesos similares. Por ejemplo, hay geminivirus que codifican varias proteínas supresoras del silenciamiento diferentes con funciones complementarias (Nawaz-ul-Rehman y Fauquet, 2009).

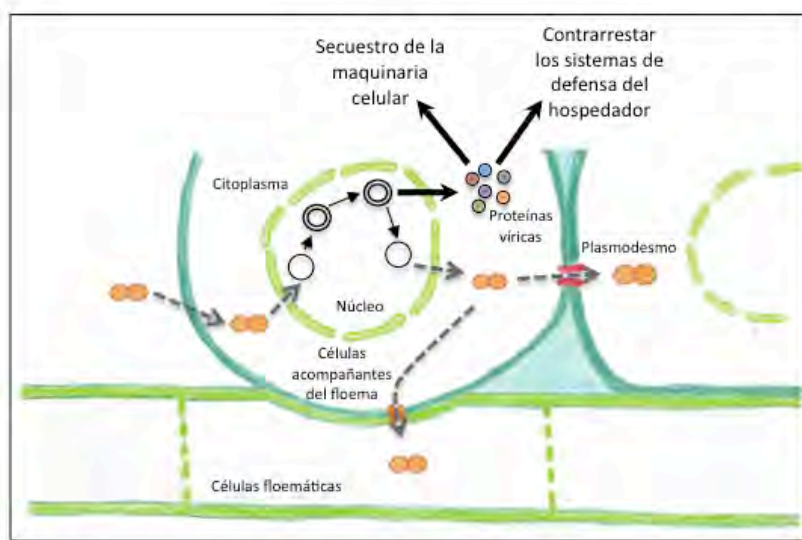


Figura I.2: Representación esquemática de la infección por geminivirus. Para establecer una infección exitosa, el virus debe llegar al núcleo, alterar los sistemas de control de ciclo celular del hospedador, replicarse, bloquear los sistemas de defensa de la planta y extenderse a otras células, tanto a las más próximas, vía plasmodesmos, como a otras más lejanas, a través del sistema vascular de la planta, desde el que pueden ser adquiridos por insectos vectores que los transmitan a otro hospedador.

Reprogramando los controles del ciclo celular de la planta.

Los geminivirus suelen infectar células de la hoja o del sistema vascular, que no se están dividiendo activamente y que no disponen de la maquinaria completa para la síntesis de DNA de la planta. Para sobrepasar esta barrera, los geminivirus alteran la regulación del ciclo celular provocando la expresión de los genes de fase S necesarios para su

replicación (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004). Esta capacidad de inducción se demostró por primera vez con PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), un gen que codifica para una proteína esencial para la replicación del DNA que se acumula específicamente en las células que contienen virus en las hojas infectadas (Nagar *et al.*, 1995; Egelkrout *et al.*, 2001). Posteriormente, el análisis del perfil transcriptómico del hospedador muestra que la infección por parte de los geminivirus, activa preferentemente genes asociados al ciclo celular expresados durante las fases S y G2 e inhibe genes que están activos durante las fases M y G1 (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008). La infección induce específicamente la expresión de genes asociados con la reentrada en ciclo celular y con la fase G1 tardía, la fase S y la fase G2 temprana, mientras que reprime aquellos ligados a la fase G1 temprana y a la fase G2 tardía, facilitando de esta forma la transición de las células infectadas a fase S (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008; Lageix *et al.*, 2007).

Un regulador clave del ciclo celular de la planta es RBR (retinoblastoma related protein) (Gutierrez, 2000, Dudits *et al.*, 2011). De forma similar a su homólogo en animales, el RBR de plantas controla la entrada en fase S del ciclo celular, la especialización y la diferenciación celular (Gutzat *et al.*, 2012). RBR interacciona con los factores de transcripción E2F para suprimir la expresión de genes que codifican las proteínas implicadas en la replicación del genoma del hospedador. La fosforilación de RBR impide su unión a E2F lo que permite la transcripción de genes diana de E2F en la fase G1 tardía en preparación para la fase S (Gutzat *et al.*, 2012). La inactivación de RBR para permitir la entrada en fase S es una característica conservada en muchos virus con pequeños genomas de DNA que infectan a hospedadores vegetales y animales. Los geminivirus desmantelan los complejos RBR-E2F a través de la unión de RBR y Rep o su homólogo en mastrevirus, RepA (Kong *et al.*, 2000; Desvoyes *et al.*, 2006). RepA, contiene un motivo LXCXE canónico de unión a RBR que está presente también en oncoproteínas de virus de mamíferos y en la proteína Clink (cell cycle link) de nanovirus (Lageix *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1999). En contraste, las Rep de begomovirus y curtovirus se unen a RBR

mediante motivos diferentes a la secuencia canónica (Arguello-Astorga *et al.*, 2004). La mutación de estos motivos de RepA o Rep, dan como resultado síntomas más tenues y una reducción en la acumulación de DNA viral (Kong *et al.*, 2000; McGivern *et al.*, 2005). En ambos casos, la distribución de las células infectadas por los virus cambia, y los virus mutantes se encuentran más estrechamente asociados con los haces vasculares que los virus silvestres. La otra proteína de los begomovirus implicada en replicación del virus, REn, también se une a RBR. Se ha sugerido que esta interacción debe estar implicada en la superación de la inhibición ejercida por RBR en las hojas maduras (Settlage *et al.*, 2001; Bruce *et al.*, 2011).

Aunque todos los geminivirus utilizan mecanismos similares para la inducción de genes de fase S, las consecuencias sobre la regulación del ciclo celular difieren entre los begomovirus y los curtovirus. Los primeros inducen a las células vegetales a reentrar en endociclo sin que se produzca proliferación celular evitando que se formen tumores (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008; Lageix *et al.*, 2007; Nagar *et al.*, 2002). Por el contrario los curtovirus, inducen a la célula a que entre en ciclo mitótico (Bass *et al.*, 2000), lo que provoca hinchazón en las venas y engrosamientos (Bridson, 2003; Park *et al.*, 2004).

El endociclo y la replicación del DNA viral.

Durante el desarrollo temprano de las hojas, las células están programadas para completar un ciclo celular en el que la fase S está acoplada con la mitosis. Más tarde en el desarrollo, muchas células de las hojas pasan a estar en un endociclo, una variación del ciclo celular que se caracteriza por un incremento de la ploidía y un incremento en el tamaño de las células sin que haya división. Contrariamente a los virus tumorigénicos de mamíferos, los geminivirus generalmente no inducen proliferación celular. En lugar de eso, muchos geminivirus y nanovirus inducen a las células vegetales a reentrar en endociclo y a replicar tanto el DNA viral como el cromosómico de la planta (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008; Lageix *et al.*, 2007; Nagar *et al.*, 2002) (Figura I.3). Otros geminivirus inducen que la

célula entre en ciclo mitótico pero provocan un arresto en profase (Bass *et al.*, 2000), y algunos causan hinchazón en las venas y engrosamientos, que son sintomáticas de ciclos mitóticos (Briddon, 2003; Park *et al.*, 2004).

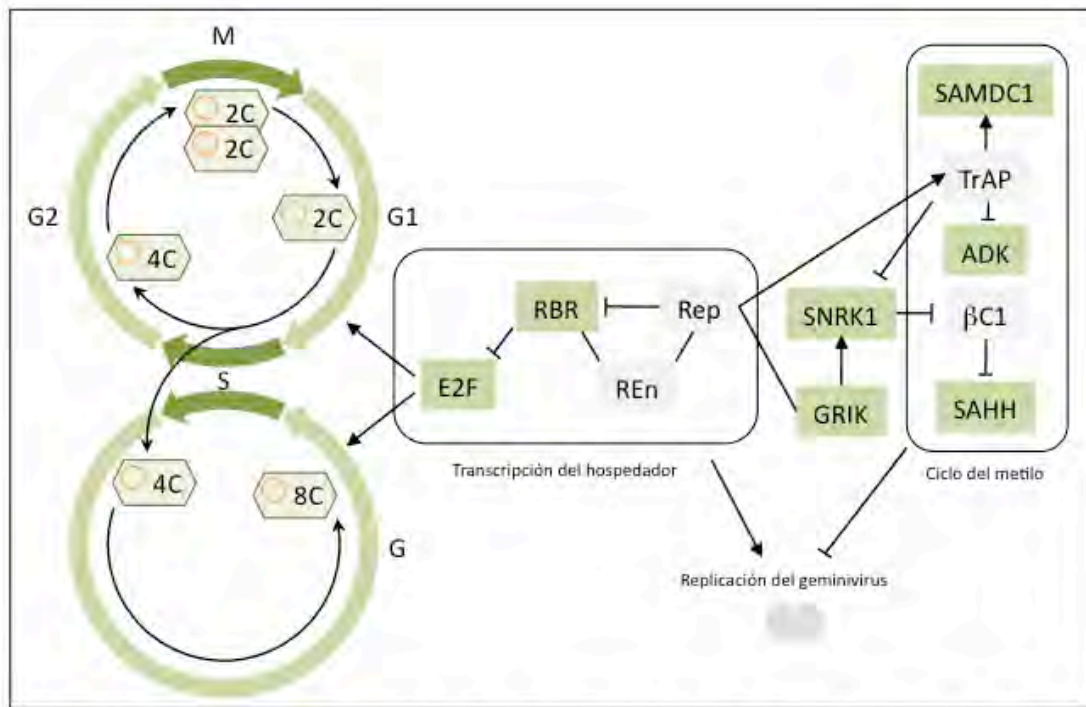


Figura I.3: Reprogramando los controles del ciclo celular y del ciclo del metilo. Se representan las interacciones entre el virus y el hospedador necesarias para crear un ambiente celular favorable para la replicación del DNA de geminivirus. Adaptado de Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013.

Aunque la interacción con RBR esta conservada en todos los geminivirus, las consecuencias en la acumulación de ciclinas G1 y sus CDK (ciclinas dependientes de kinasa) que actúan más abajo del RBR en la cascada de señalización del control de entrada en fase S varían. Por ejemplo, los begomovirus que inducen endociclo reducen la expresión de las ciclinas de la familia D3, que regula las CDKs durante la fase G1 y que, en condiciones normales, inhiben el endociclo; la expresión ectópica de una ciclina D3 produce resistencia contra este virus (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008). Por el contrario, la proteína C4 de curtovirus induce hiperplasia, activando la degradación de inhibidores de quinasas de ciclinas lo que induce la mitosis (Lai *et al.*, 2009). Estas interacciones también se ven afectadas por el tipo de célula en que tengan lugar; diferentes tipos celulares dentro de una hoja responden de forma distinta (Lageix *et al.*, 2007; Kong *et al.*

al., 2000; McGivern *et al.*, 2005; Bass *et al.*, 2000). Además, existen otras proteínas codificadas por beta-satélites, como β C1, que altera el control del desarrollo de la hoja para inducir división celular (Yang *et al.*, 2008).

La caracterización del transcriptoma reveló también que las infecciones por geminivirus incrementan la expresión de genes que codifican enzimas de reparación y recombinación del DNA (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008). Una posible explicación para la inducción de estos procesos celulares, es que en los primeros momentos de la infección la desregulación del ciclo celular producida por la interacción entre Rep y RBR, conlleva la acumulación de maquinaria de replicación del hospedador y la puesta en marcha de la replicación por círculo rodante. La acumulación de productos de la replicación del DNA viral y sus intermediarios son percibidas por la célula como DNA dañado, disparando una respuesta a estrés genotóxico con la consiguiente síntesis de proteínas de reparación del hospedador, lo que conllevaría el cambio a replicación dependiente de recombinación (Jeske *et al.*, 2001).

Rutas de señalización de la planta.

Las quinasas y su intercomunicación con las rutas de señalización de hormonas tienen un papel clave en el crecimiento y desarrollo de la planta, al igual que en el reconocimiento y respuesta contra patógenos. Los geminivirus interactúan con varias de estas rutas para reclutar procesos y rutas del hospedador en favor de la propagación del virus y para interferir con las defensas del hospedador.

RLKs (Receptor-like kinases). Algunas RLKs de plantas son capaces de detectar patógenos y disparar una respuesta de defensa. Las RLKs mejor caracterizadas implicadas en la infección por geminivirus son NIK1 (NSP-interacting kinase), NIK2 y NIK3. Las NIKs son proteínas de membrana con repeticiones ricas en leucina (LRR) que sufren autofosforilación. NSP se une al dominio quinasa de las NIKs, interfiriendo con su autofosforilación, que es imprescindible para su actividad quinasa

sobre otras dianas (Fontes *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2009). De esta manera las proteínas NIK son incapaces de fosforilar entre otras proteínas, a la proteína ribosomal RPL10, lo que provoca su translocación al núcleo, donde se piensa que interfiere con la infección viral (Rocha *et al.*, 2008). Las actividades de las proteínas NIK y de RPL10 correlacionan con el desarrollo de síntomas; su sobreexpresión atenúa y retrasa la aparición de síntomas, mientras que la pérdida de su función incrementa la susceptibilidad a la infección (Carvalho *et al.*, 2008). La señal que activa a las proteínas NIK y a sus dianas por debajo de RPL10 aún se desconoce (Santos *et al.*, 2010).

Cascada de las quinasas GRIK-SNRK1. Rep interacciona con dos quinasas muy emparentadas, GRIK1 (geminivirus Rep-interacting kinase 1) y GRIK2 (Xie *et al.*, 1999; Kong y Hanley-Bowdoin, 2002; Shen y Hanley-Bowdoin, 2006). La acumulación de ambas está regulada por el proteosoma, dándose en tejidos jóvenes, células en cultivo y células infectadas por geminivirus. Las GRIKs son activadores de SNRK1 (SNF1-related protein kinase 1) (Shen *et al.*, 2009), un regulador clave del metabolismo vegetal que está involucrado en el desarrollo y en las respuestas a estreses bióticos y abióticos. Las plantas que sobreexpresan SNRK1 presentan síntomas de la infección más tarde y contienen menor cantidad de DNA viral que las plantas silvestres, mientras que las plantas en las que se silencia la expresión de SNRK1, desarrollan síntomas antes y acumulan más DNA viral que las silvestres. SNRK1 se une a C2/TrAP y a la proteína satélite β C1 (Hao *et al.*, 2003, Shen *et al.*, 2011). β C1 es fosforilado por SNRK1 y una sustitución aminoacídica que mimetiza la fosforilación en β C1 retrasa la infección, indicando que la fosforilación de β C1 por parte de SNRK1 interfiere con la infección.

El papel de GRIK1 y SNRK1 durante la infección por geminivirus no está claro. SNRK1 puede ser parte de la respuesta de defensa del hospedador y su actividad defensiva podría estar contrarrestada por C2/TrAP. La cascada GRIK1-SNRK1 podría activarse durante la infección para asegurarse un suministro adecuado de energía y nutrientes.

Shaggy-related kinases. Estas quinasas están implicadas en varios procesos de desarrollo de las plantas, incluyendo la división celular y la elongación, en parte a través de sus interacciones con la ruta de señalización por brasinosteroides. C4 interacciona con quinasas shaggy-related (Piroux *et al.*, 2007; Dogra *et al.*, 2009) y el silenciamiento de estas, retrasa la infección (Lozano-Durán *et al.*, 2011). La proteína C4 de curtovirus es fosforilada por la quinasa shaggy-related BIN2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2) de *A. thaliana*, que es un regulador negativo de la señalización por brasinosteroides, mientras que la C4 de begomovirus bipartitos, se fosforila menos eficientemente aunque también se une a BIN2 (Piroux *et al.*, 2007). Consistentemente con esta diferencia, la C4 de un curtovirus induce hiperplasia y suprime la señalización por brasinosteroides (Mills-Lujan y Deom, 2010) mientras que la de begomovirus bipartitos incrementa la expresión de genes diana de los brasinosteroides y su expresión no altera la morfología de la planta (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008; Piroux *et al.*, 2007; Dogra *et al.*, 2009). Una posibilidad es que las proteínas AC4 de begomovirus bipartitos se unan e interfieran con BIN2, produciendo la activación de la ruta de brasinosteroides, mientras que la fosforilación de la C4 de virus monopartitos mediada por BIN2, evita la inactivación de la misma BIN2, manteniendo así activa la inhibición de la ruta por brasinosteroides. No está claro porqué los geminivirus interaccionan de formas diferentes con las quinasas shaggy-related y la ruta de los brasinosteroides, pero esta diferencia subraya la importancia de no asumir que todas las interacciones entre virus y hospedador están conservadas.

Rutas de señalización de hormonas. Los geminivirus interaccionan con diversas rutas de señalización de hormonas, como la del ácido salicílico, el etileno, y el ácido jasmónico, además de la de brasinosteroides citada anteriormente. Los geminivirus activan la ruta del ácido salicílico y la del etileno, que intervienen en la respuesta de defensa contra patógenos (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008), y plantas con niveles más elevados de ácido salicílico o una mayor expresión de los componentes de su

ruta muestran una reducción en la severidad de los síntomas y en la acumulación de los virus (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Garcia-Neria y Rivera-Bustamante, 2011). Normalmente los genes de la ruta del ácido jasmónico están reprimidos durante la infección (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008). La expresión ectópica de algunas de las proteínas virales pueden inhibir o activar la ruta del ácido jasmónico pero la relevancia biológica de estos cambios aún se desconoce (Yang *et al.*, 2009; Lozano-Duran *et al.*, 2011; Soitamo *et al.*, 2012).

Los geminivirus también interaccionan con las rutas de las citoquininas y las auxinas que promueven la proliferación celular y modulan la diferenciación en las plantas. La infección activa la expresión de genes de respuesta rápida a auxina (Park *et al.*, 2004) y de genes de respuesta primaria a citoquininas (Baliji *et al.*, 2010). La activación de genes de respuesta a citoquininas puede ser resultado de la inhibición de la adenosina quinasa mediada por C2. La adenosina quinasa fosforila las citoquininas y las convierte en formas nucleotídicas de baja actividad (Wang *et al.*, 2003). La expresión ectópica de C2 incrementa la expresión de genes de respuesta primaria a citoquininas y la aplicación de citoquininas exógenas aumenta la susceptibilidad a la infección (Baliji *et al.*, 2010). La inhibición de la adenosina quinasa durante la infección podría incrementar los niveles de citoquininas bioactivas facilitando así el restablecimiento de la capacidad de las células infectadas para replicar DNA.

Rutas de muerte celular programada. La expresión transitoria de algunas proteínas virales, como Rep, V2 y NSP pueden provocar la muerte celular (Hussain *et al.*, 2005; Amin *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2012). La unión de Rep a RBR puede disparar la muerte celular en células maduras del hospedador (Jordan *et al.*, 2007), pero no se sabe como la inducen V2 o NSP. Se ha demostrado que C2 bloquea la muerte celular inducida por V2 y NSP (Mubin *et al.*, 2010), pero esta proteína también se ha asociado con la aparición de síntomas severos y muerte celular (Luna *et al.*, 2012; Trinks *et al.*, 2005). Estos resultados contradictorios podrían reflejar diferencias entre

distintas especies virales y/o limitaciones de los ensayos de expresión transitoria usados para caracterizar las proteínas virales de forma individual, fuera de un proceso infectivo. Generalmente, las plantas infectadas no presentan evidencias fenotípicas de senescencia o muerte celular localizada (Nagar *et al.*, 1995), aunque durante la infección se induce la expresión de muchos genes del hospedador asociados con la muerte celular (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008).

Rutas de la ubiquitinación y similares a la ubiquitinación.

La modificación de proteínas mediante la unión covalente de pequeños péptidos como ubiquitina (Ub) o similares a ella como SUMO (small ubiquitin-like modifier) son eventos post-traduccionales que modulan la función de las proteínas y que regulan numerosos procesos de la planta, incluidos el desarrollo, el ciclo celular y las respuestas a estreses bióticos y abióticos (Marino *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2012). Estos péptidos se unen covalentemente a un residuo de lisina en la proteína diana a través de una cascada enzimática que comprende una enzima activadora E1, una enzima conjugadora E2 y una ligasa E3 que se une al sustrato y confiere especificidad. La poliubiquitinación marca a las proteínas para su degradación en el proteosoma, mientras que la monoubiquitinación o la sumoilación pueden alterar las actividades de las proteínas, su localización y/o sus interactores. Estas rutas de regulación post-traduccionales juegan un papel muy relevante en la respuesta a estreses tanto bióticos como abióticos por lo que son una de las dianas prioritarias de los muchos patógenos incluidos los virus (Alcaide-Loridan y Jupin, 2012).

Los geminivirus utilizan las maquinarias de ubiquitinación y la sumoilación para llevar a cabo la infección. Así, la reducción en la expresión de UBA1 (ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1), de componentes o reguladores de las ligasas de ubiquitina como: RHF2A, SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2) o COP9 signalosome 3 (CSN3) o de la enzima E2 conjugadora de SUMO (SCE1, SUMO conjugating enzyme) afecta

negativamente a la infección (Lozano-Duran *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2004). Se han descrito interacciones entre las proteínas de geminivirus y componentes de estas rutas. La proteína β C1 se une a la enzima E2 conjugadora de ubiquitina 3 (UBC3) de *Solanum lycopersicum*, reduciendo la acumulación global de proteínas poliubiquitinadas y causando fuertes síntomas (Eini *et al.*, 2009; Bachmair *et al.*, 1990). La proteína C2 interacciona e interfiere con el complejo CSN, complejo que controla el funcionamiento de las ligasas E3 que contiene culinas (SCF) (Lozano-Duran *et al.*, 2011). Dado que estas ligasas SCF son reguladores clave en muchos procesos celulares, la capacidad de los geminivirus para secuestrar estos complejos, representa una poderosa estrategia para modular las funciones del hospedador. De acuerdo con esto, la sobreexpresión de C2 altera varias respuestas hormonales reguladas por las ligasas (Lozano-Duran *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que las proteínas C4 de algunos curtovirus y begomovirus podrían inducir la proliferación celular en la planta mediante la activación de la expresión de una proteína RKP (RING finger protein) del hospedador que marcan los inhibidores de quinasas de ciclinas para su degradación en el proteosoma (Lai *et al.*, 2009).

Rep interacciona con SCE1, la enzima conjugadora de SUMO E2 de *N. benthamiana* (Castillo *et al.*, 2004). El silenciamiento de SCE1 o la alteración de la interacción Rep-SCE1 reduce la acumulación de DNA viral, sugiriendo que esta interacción es esencial para la replicación viral (Sanchez-Duran *et al.* 2011; Castillo *et al.*, 2004). La expresión transitoria de Rep modifica el estado de sumoilación de determinadas proteínas que podrían estar implicadas en la replicación viral (Sanchez-Duran *et al.*, 2011). Este tema se tratará más en profundidad a lo largo del capítulo 1 de la presente tesis doctoral.

Rutas de silenciamiento en plantas.

El silenciamiento del RNA es una respuesta de defensa adaptativa que usa siRNAs (small interfering RNAs) como defensa frente a virus y

transposones. En respuesta, los virus suprimen este sistema mediante el uso de proteínas antisilenciamiento denominadas VSRs (viral suppressors of RNA silencing), que interfiere en varios pasos de la respuesta de silenciamiento.

Inducción de los geminivirus de la respuesta de defensa del silenciamiento. Todas las rutas de silenciamiento implican el corte de moléculas de dsRNA (double stranded RNA) en siRNAs mediado por los enzimas DCLs (Dicer-like proteins). Diferentes DCLs se localizan en distintos compartimentos celulares. En el núcleo, DCL3 produce siRNAs de 24 nucleótidos que se unen a la proteína AGO4 (ARGONAUTE4) sirviendo de guía para la metilación del DNA. Esta metilación que interfiere con la expresión de genes es denominada silenciamiento génico transcripcional (TGS, transcriptional gene silencing). En el silenciamiento post-transcripcional (PTGS post-transcriptional gene silencing), los mRNAs son las dianas de RISC (RNA-induced silencing complex) para su degradación o arresto traduccional. Las versiones más activas de RISC contra los virus de plantas contienen las proteínas AGO1 y AGO2, que están cargadas con siRNAs de 21 y 22 nucleótidos generados por DCL4 o DCL2 respectivamente (García-Ruiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Bologna y Voinnet 2014).

Al contrario que en el caso de los virus de RNA, las infecciones por geminivirus se asocian con la acumulación de siRNAs de 24 nucleótidos (Akbergenov *et al.*, 2006) que provocan la metilación del DNA de su genoma. La metilación del DNA viral puede darse a lo largo de todo el genoma, aunque la distribución varía en diferentes combinaciones de virus y hospedadores (Akbergenov *et al.*, 2006; Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011; Aregger *et al.*, 2012). En dos de los análisis realizados los perfiles de siRNAs localizan a los de 24 nucleótidos principalmente en la región intergénica, que contiene los promotores (Blevins *et al.*, 2006; Akbergenov *et al.*, 2006), pero en otros casos, los siRNA que se acumulan, proceden mayoritariamente de las regiones codificantes (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009). La metilación *in vitro* de los replicones virales antes de su

introducción en células vegetales reduce la acumulación de DNA viral de 5 a 20 veces con respecto al no metilado, aunque finalmente, termina produciendo una población de DNA no metilada (Brough *et al.*, 1992). En hojas infectadas, sólo se metilan los DNAs virales lineales heterogéneos, que representan replicación viral no productiva (Paprotka *et al.*, 2011). Así, los geminivirus podrían escapar a la metilación “resucitando” DNA no metilado durante la replicación viral y/o a través de la acción de sus supresores de silenciamiento, inhibiendo la ruta de metilación del hospedador.

Varias de las proteínas de geminivirus son capaces de suprimir el silenciamiento interfiriendo en el ciclo del metilo de la planta. La proteína C2 de begomovirus interacciona e inactiva la adenosina kinasa (ADK) del hospedador, que es necesaria para la síntesis de S-adenosil metionina (SAM) (Wang *et al.*, 2005). La C2 de curtovirus también interacciona con SAMDC1 para promover la descarboxilación de la S-adenosil metionina (Zhang *et al.*, 2011). La inactivación de la ADK y la estabilización de la SAMDC1 afectan al ciclo del metilo, lo que resulta en una reducción de la metilación del DNA y en la supresión del TGS. β C1 interacciona con la S-adenosil homocisteina hidrolasa (SAHH), una enzima del ciclo del metilo que también es necesaria para el TGS (Yang *et al.*, 2011). Además de los supresores virales del silenciamiento que afectan al ciclo del metilo, Rep y C4 suprimen la expresión de la DNA metil-transferasa1 (MET1) y de la cromometilasa 3 (CMT3) (Rodriguez-Negrete *et al.*, 2009), lo que podría ser necesario para generar moldes de DNA viral libres de metilación en una célula con las rutas de silenciamiento activadas.

El papel de las RDRs en las infecciones por geminivirus. Los siRNAs secundarios, que son producidos por las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs) amplifican la respuesta de silenciamiento y tienen un papel crucial en la defensa contra virus de RNA (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Donaire *et al.*, 2008). Estos siRNA también están implicados en el silenciamiento a larga distancia (Liang *et al.*, 2012; Brosnan y Voinnet, 2011) que se mueve por delante de la diseminación del

virus y podría ser importante para la metilación asociada a recuperación. RDR2 es necesaria para la producción de dsRNAs nucleares que son cortados por DCL3 en siRNAs de 24 nucleótidos, mientras que RDR6 está asociada con DCL4 y siRNAs de 21 nucleótidos. RDR6 es reclutada por RNAs aberrantes a través de la acción de SGS3 (suppressor of gene silencing 3), una proteína que es única en plantas y que se une a dsRNAs con extremos 5' protuberantes (Fukunaga y Doudna, 2009).

Los siRNAs, primarios que se producen directamente desde los dsRNAs en ausencia de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR polimerase) codificada por el hospedador, constituyen la mayoría de los siRNAs en la infección por geminivirus (Aregger *et al.*, 2012). Aun así, la mutación de una las RDR, RDR6, lleva a modestos incrementos en la acumulación de DNA viral, sugiriendo que los siRNAs secundarios también son importantes (Blevins *et al.*, 2006; Aregger *et al.*, 2012; Muangsan *et al.*, 2004). El supresor viral del silenciamiento V2 compite con SGS3 para evitar la unión con RDR6 (Fukunaga y Doudna, 2009; Glick *et al.*, 2008). Mutaciones en RDR6, SGS3 o DCL4 causan incrementos modestos en la acumulación de DNA viral durante la infección de geminivirus que pueden escapar de las células floemáticas e invadir células del mesófilo y de la epidermis en hojas infectadas (Blevins *et al.*, 2006; Aregger *et al.*, 2012; Muangsan *et al.*, 2004). Esto sugiere la amplificación de los siRNAs no afectan a los geminivirus en el tejido vascular (Brosnan y Voinnet, 2011).

El primer gen de resistencia a geminivirus en ser clonado, *TY1*, codifica una RDR de tomate con homología con RDR3, RDR4 y RDR5 de *A. thaliana* (Verlaan *et al.*, 2013). Aunque las RDRs están conservadas en todas las plantas su función es desconocida. Como *TY1* no confiere resistencia a los virus de RNA, se ha propuesto que su actividad RDR es necesaria para la metilación del DNA (Verlaan *et al.*, 2013). El locus de *TY1* contiene un polimorfismo que incrementa la expresión de RDR (Verlaan *et al.*, 2013), sugiriendo que algún tipo de siRNA secundario, o de dsRNA, es importante para la atenuación de los síntomas y la reducción en la acumulación de DNA viral.

Bibliografía.

- Akbergenov, R., A. Si-Ammour, et al. (2006). "Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species." Nucleic Acids Res **34**(2): 462-71.
- Alcaide-Loridan, C. and I. Jupin (2012). "Ubiquitin and plant viruses, let's play together!" Plant Physiol **160**(1): 72-82.
- Amin, I., K. Hussain, et al. (2011). "Suppressors of RNA silencing encoded by the components of the cotton leaf curl begomovirus-betasatellite complex." Mol Plant Microbe Interact **24**(8): 973-83.
- Amin, I., B. L. Patil, et al. (2011). "Comparison of phenotypes produced in response to transient expression of genes encoded by four distinct begomoviruses in *Nicotiana benthamiana* and their correlation with the levels of developmental miRNAs." Virology **8**: 238.
- Aregger, M., B. K. Borah, et al. (2012). "Primary and secondary siRNAs in geminivirus-induced gene silencing." PLoS Pathog **8**(9): e1002941.
- Arguello-Astorga, G., L. Lopez-Ochoa, et al. (2004). "A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein." J Virology **78**(9): 4817-26.
- Ascencio-Ibanez, J. T., R. Sozzani, et al. (2008). "Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection." Plant Physiol **148**(1): 436-54.
- Bachmair, A., F. Becker, et al. (1990). "Perturbation of the ubiquitin system causes leaf curling, vascular tissue alterations and necrotic lesions in a higher plant." The Embo Journal **9**: 4543-.
- Bagewadi, B., S. Chen, et al. (2004). "PCNA interacts with Indian mung bean yellow mosaic virus rep and downregulates Rep activity." J Virology **78**(21): 11890-903.
- Baliji, S., G. Lacatus, et al. (2010). "The interaction between geminivirus pathogenicity proteins and adenosine kinase leads to increased expression of primary cytokinin-responsive genes." Virology **402**(2): 238-47.
- Bass, H. W., S. Nagar, et al. (2000). "Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells." J Cell Sci **113 (Pt 7)**: 1149-60.
- Blevins, T., R. Rajeswaran, et al. (2006). "Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing." Nucleic Acids Res.
- Briddon, R. W. (2003). "Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex." Mol Plant Pathol **4**(6): 427-34.
- Briddon, R. W., M. S. Pinner, et al. (1990). "Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity." Virology **177**(1): 85-94.
- Brosnan, C. A. and O. Voinnet (2011). "Cell-to-cell and long-distance siRNA movement in plants: mechanisms and biological implications." Curr Opin Plant Biol **14**(5): 580-7.
- Brough, C. L., W. E. Gardiner, et al. (1992). "DNA methylation inhibits propagation of tomato golden mosaic virus DNA in transfected protoplasts." Plant Mol Biol **18**(4): 703-12.
- Bruce, G., M. Gu, et al. (2011). "Influence of retinoblastoma-related gene silencing on the initiation of DNA replication by African cassava mosaic virus Rep in cells of mature leaves in *Nicotiana benthamiana* plants." Virology **8**: 561.
- Carvalho, C. M., A. A. Santos, et al. (2008). "Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus." PLoS Pathog **4**(12): e1000247.
- Castillo, A. G., D. Collinet, et al. (2003). "Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Rep) and viral replication protein (Rep)." Virology **312**(2): 381-94.
- Castillo, A. G., L. J. Kong, et al. (2004). "Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system." J Virology **78**(6): 2758-69.
- Castro, P. H., R. M. Tavares, et al. (2012). "SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses." Cell Mol Life Sci **69**(19): 3269-83.

- Chen, H., Z. Zhang, et al. (2010). "Up-regulation of LSB1/GDU3 affects geminivirus infection by activating the salicylic acid pathway." Plant J **62**(1): 12-23.
- Choudhury, N. R., P. S. Malik, et al. (2006). "The oligomeric Rep protein of Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) is a likely replicative helicase." Nucleic Acids Res **34**(21): 6362-77.
- Clerot, D. and F. Bernardi (2006). "DNA helicase activity is associated with the replication initiator protein rep of tomato yellow leaf curl geminivirus." J Virol **80**(22): 11322-30.
- Desvoyes, B., E. Ramirez-Parra, et al. (2006). "Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf development." Plant Physiol **140**(1): 67-80.
- Dogra, S. C., O. Eini, et al. (2009). "A novel shaggy-like kinase interacts with the Tomato leaf curl virus pathogenicity determinant C4 protein." Plant Mol Biol **71**(1-2): 25-38.
- Donaire, L., D. Barajas, et al. (2008). "Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs." J Virol **82**(11): 5167-77.
- Dudits, D., E. Abraham, et al. (2011). "Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway." Ann Bot **107**(7): 1193-202.
- Egelkrout, E. M., D. Robertson, et al. (2001). "Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves." Plant Cell **13**(6): 1437-52.
- Eini, O., S. Dogra, et al. (2009). "Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA beta satellite." Mol Plant Microbe Interact **22**(6): 737-46.
- Fondong, V. N. (2013). "Geminivirus protein structure and function." Mol Plant Pathol **14**(6): 635-49.
- Fontes, E. P., A. A. Santos, et al. (2004). "The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity." Genes Dev **18**(20): 2545-56.
- Fukunaga, R. and J. Doudna (2009). "dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants." EMBO J **28**(5): 545-555.
- Garcia-Neria, M. A. and R. F. Rivera-Bustamante (2011). "Characterization of Geminivirus resistance in an accession of Capsicum chinense Jacq." Mol Plant Microbe Interact **24**(2): 172-82.
- Garcia-Ruiz, H., A. Takeda, et al. (2010). "Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection." Plant Cell **22**(2): 481-96.
- Glick, E., A. Zrachya, et al. (2008). "Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(1): 157-61.
- Gopal, P., P. Pravin Kumar, et al. (2007). "Differential roles of C4 and betaC1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: evidence for transactivation by the C2 of Bhendi yellow vein mosaic virus, a monopartite begomovirus." Virus Res **123**(1): 9-18.
- Gutierrez, C. (2000). "Geminiviruses and the plant cell cycle." Plant Mol Biol **43**(5-6): 763-72.
- Gutzat, R., L. Borghi, et al. (2012). "Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development." Trends Plant Sci **17**(3): 139-48.
- Hanley-Bowdoin, L., S. B. Settlage, et al. (2004). "Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication." Mol. Plant Pathol. **5**(149-156).
- Hao, L., H. Wang, et al. (2003). "Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase." Plant Cell **15**(4): 1034-48.
- Hussain, M., S. Mansoor, et al. (2005). "The nuclear shuttle protein of Tomato leaf curl New Delhi virus is a pathogenicity determinant." J Virol **79**(7): 4434-9.
- Jeske, H. (2009). "Geminiviruses." Curr Top Microbiol Immunol **331**: 185-226.
- Jeske, H., M. Lutgemeier, et al. (2001). "DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus." Embo J **20**(21): 6158-67.

- Jordan, C. V., W. Shen, et al. (2007). "Geminivirus-induced gene silencing of the tobacco retinoblastoma-related gene results in cell death and altered development." Plant Mol Biol **65**(1-2): 163-75.
- Kong, L. J. and L. Hanley-Bowdoin (2002). "A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection." Plant Cell **14**(8): 1817-32.
- Kong, L. J., B. M. Orozco, et al. (2000). "A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants." EMBO J **19**(13): 3485-95.
- Kunik, T., L. Mizrachy, et al. (1999). "Characterization of a tomato karyopherin alpha that interacts with the Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) capsid protein." Journal of Experimental Botany **50**(334): 731-732.
- Kunik, T., K. Palanichelvam, et al. (1998). "Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells." Plant J **13**(3): 393-9.
- Lageix, S., O. Catrice, et al. (2007). "The nanovirus-encoded Clink protein affects plant cell cycle regulation through interaction with the retinoblastoma-related protein." J Virol **81**(8): 4177-85.
- Lai, J., H. Chen, et al. (2009). "RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle." Plant J **57**(5): 905-17.
- Liang, D., R. G. White, et al. (2012). "Gene silencing in Arabidopsis spreads from the root to the shoot, through a gating barrier, by template-dependent, nonvascular, cell-to-cell movement." Plant Physiol **159**(3): 984-1000.
- Liu, H., M. Boulton, et al. (1999). "Maize streak virus coat protein is karyophilic and facilitates nuclear transport of viral DNA." Molecular Plant Microbe Interact **12**(10): 894/900.
- Liu, L., K. Saunders, et al. (1999). "Bean yellow dwarf virus RepA, but not rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif." Virology **256**(2): 270-9.
- Lozano-Duran, R., T. Rosas-Diaz, et al. (2011). "Geminiviruses Subvert Ubiquitination by Altering CSN-Mediated Derubylation of SCF E3 Ligase Complexes and Inhibit Jasmonate Signaling in Arabidopsis thaliana." Plant Cell.
- Lozano-Duran, R., T. Rosas-Diaz, et al. (2011). "Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in Arabidopsis thaliana." Plant Cell **23**(3): 1014-32.
- Luna, A. P., G. Morilla, et al. (2012). "Functional analysis of gene silencing suppressors from Tomato yellow leaf curl disease viruses." Mol Plant Microbe Interact.
- Luque, A., A. Sanz-Burgos, et al. (2002). "Interaction of Geminivirus Rep protein factor C and its potential role during geminivirus DNA replication." Virology **302**: 83-94.
- Mansoor, S., R. W. Bridson, et al. (2003). "Geminivirus disease complexes: an emerging threat." Trends Plant Sci **8**(3): 128-34.
- Marino, D., N. Peeters, et al. (2012). "Ubiquitination during plant immune signaling." Plant Physiol **160**(1): 15-27.
- McGivern, D. R., K. C. Findlay, et al. (2005). "An intact RBR-binding motif is not required for infectivity of Maize streak virus in cereals, but is required for invasion of mesophyll cells." J Gen Virol **86**(Pt 3): 797-801.
- Mills-Lujan, K. and C. M. Deom (2010). "Geminivirus C4 protein alters Arabidopsis development." Protoplasma **239**(1-4): 95-110.
- Muangsan, N., C. Beclin, et al. (2004). "Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants." Plant J **38**(6): 1004-14.
- Mubin, M., I. Amin, et al. (2010). "The hypersensitive response induced by the V2 protein of a monopartite begomovirus is countered by the C2 protein." Mol Plant Pathol **11**(2): 245-54.
- Nagar, S., L. Hanley-Bowdoin, et al. (2002). "Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells." Plant Cell **14**(12): 2995-3007.
- Nagar, S., T. J. Pedersen, et al. (1995). "A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells." Plant Cell **7**(6): 705-19.

- Navas-Castillo, J., E. Fiallo-Olive, et al. (2011). "Emerging virus diseases transmitted by whiteflies." *Annu Rev Phytopathol* **49**: 219-48.
- Nawaz-ul-Rehman, M. S. and C. M. Fauquet (2009). "Evolution of geminiviruses and their satellites." *FEBS Lett* **583**(12): 1825-32.
- Noris, E., A. M. Vaira, et al. (1998). "Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission." *J Virol* **72**(12): 10050-7.
- Paprotka, T., K. Deuschle, et al. (2011). "Conformation-selective methylation of geminivirus DNA." *J Virol* **85**(22): 12001-12.
- Park, J., H. Hwang, et al. (2004). "Altered cell shapes, hyperplasia, and secondary growth in Arabidopsis caused by beet curly top geminivirus infection." *Mol Cells* **17**(1): 117-24.
- Pasumarthi, K. K., N. R. Choudhury, et al. (2010). "Tomato leaf curl Kerala virus (ToLCKeV) AC3 protein forms a higher order oligomer and enhances ATPase activity of replication initiator protein (Rep/AC1)." *Virology* **7**: 128.
- Piroux, N., K. Saunders, et al. (2007). "Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with Arabidopsis thaliana shaggy-related protein kinase AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway." *Virology* **362**(2): 428-40.
- Raja, P., J. N. Wolf, et al. (2010). "RNA silencing directed against geminiviruses: post-transcriptional and epigenetic components." *Biochim Biophys Acta* **1799**(3-4): 337-51.
- Rocha, C. S., A. A. Santos, et al. (2008). "The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling." *Virology* **380**(2): 165-9.
- Rodriguez-Negrete, E. A., J. Carrillo-Tripp, et al. (2009). "RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery." *J Virol* **83**(3): 1332-40.
- Rojas, M., H. Jiang, et al. (2001). "Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite Begomovirus, Tomato Yellow Leaf Curl Virus." *Virology* **291**: 110-125.
- Rojas, M. R., C. Hagen, et al. (2005). "Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses." *Annu Rev Phytopathol* **43**: 361-94.
- Sanchez-Duran, M. A., M. B. Dallas, et al. (2011). "Interaction between Geminivirus Replication Protein and the SUMO-Conjugating Enzyme Is Required for Viral Infection." *Journal of Virology* **85**(19): 9789-9800.
- Santos, A. A., C. M. Carvalho, et al. (2009). "Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling." *PLoS One* **4**(6): e5781.
- Santos, A. A., K. V. Lopes, et al. (2010). "NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signalling." *J Exp Bot* **61**(14): 3839-45.
- Selth, L. A., S. C. Dogra, et al. (2005). "A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication." *Plant Cell* **17**(1): 311-25.
- Settlage, S. B., A. B. Miller, et al. (2001). "Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator." *Virology* **279**(2): 570-6.
- Settlage, S. B., R. G. See, et al. (2005). "Geminivirus C3 protein: replication enhancement and protein interactions." *J Virol* **79**(15): 9885-95.
- Sharma, P. and M. Ikegami (2010). "Tomato leaf curl Java virus V2 protein is a determinant of virulence, hypersensitive response and suppression of posttranscriptional gene silencing." *Virology* **396**(1): 85-93.
- Shen, Q., Z. Liu, et al. (2011). "Tomato SlSnRK1 protein interacts with and phosphorylates betaC1, a pathogenesis protein encoded by a geminivirus beta-satellite." *Plant Physiol* **157**(3): 1394-406.
- Shen, W. and L. Hanley-Bowdoin (2006). "Geminivirus infection up-regulates the expression of two Arabidopsis protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases." *Plant Physiol* **142**(4): 1642-55.
- Shen, W., M. I. Reyes, et al. (2009). "Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop." *Plant Physiol* **150**(2): 996-1005.

- Soitamo, A. J., B. Jada, et al. (2012). "Expression of geminiviral AC2 RNA silencing suppressor changes sugar and jasmonate responsive gene expression in transgenic tobacco plants." *BMC Plant Biol* **12**: 204.
- Stanley, J. (1993). "Geminiviruses: plant viral vectors." *Curr Opin Genet Dev* **3**(1): 91-6.
- Sung, Y. K. and R. H. Coutts (1995). "Mutational analysis of potato yellow mosaic geminivirus." *J Gen Virol* **76**(Pt 7): 1773-80.
- Sunter, G. and D. M. Bisaro (1991). "Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression." *virology* **180**(1): 416-419.
- Sunter, G. and D. M. Bisaro (1992). "Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription." *Plant Cell* **4**: 1321-1331.
- Trinks, D., R. Rajeswaran, et al. (2005). "Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes." *J Virol* **79**(4): 2517-27.
- van Wezel, R., H. Liu, et al. (2001). "Gene C2 of the monopartite geminivirus tomato yellow leaf curl virus- China encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus." *Mol Plant Microbe Interact* **14**(9): 1125-8.
- Verlaan, M. G., S. F. Hutton, et al. (2013). "The Tomato Yellow Leaf Curl Virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases." *PLoS Genet* **9**(3): e1003399.
- Wang, H., K. J. Buckley, et al. (2005). "Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins." *J Virol* **79**(12): 7410-8.
- Wang, H., L. Hao, et al. (2003). "Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins." *Plant Cell* **15**(12): 3020-32.
- Wang, X. B., J. Jovel, et al. (2011). "The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* **23**(4): 1625-38.
- Wartig, L., A. Kheyr-Pour, et al. (1997). "Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis." *Virology* **228**(2): 132-40.
- Xie, Q., P. Suarez-Lopez, et al. (1995). "Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication." *Embo J* **14**(16): 4073-82.
- Yang, B., Y. Jiang, et al. (2009). "Identification and expression analysis of WRKY transcription factor genes in canola (*Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments." *BMC Plant Biol* **9**: 68.
- Yang, J. Y., M. Iwasaki, et al. (2008). "betaC1, the pathogenicity factor of TYLCCNV, interacts with AS1 to alter leaf development and suppress selective jasmonic acid responses." *Genes Dev* **22**(18): 2564-77.
- Yang, X., Y. Wang, et al. (2011). "Characterization of small interfering RNAs derived from the geminivirus/betasatellite complex using deep sequencing." *PLoS One* **6**(2): e16928.
- Yang, X., Y. Xie, et al. (2011). "Suppression of Methylation-Mediated Transcriptional Gene Silencing by betaC1-SAHH Protein Interaction during Geminivirus-Betasatellite Infection." *PLoS Pathog* **7**(10): e1002329.
- Zhang, X., J. Singh, et al. (2012). "Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1." *J Virol* **86**(12): 6847-54.
- Zhang, Z., H. Chen, et al. (2011). "BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **23**(1): 273-88.
- Zhang, W., Olson, NH. et al. (2001). "Structure of the Maize Streak Virus Geminated Particle." *Virology* **279**: 471-77.

CAPÍTULO 1

ANÁLISIS DE LA INTERFERENCIA DE REP EN LA SUMOILACIÓN DE PCNA

1.1 INTRODUCCIÓN.

Las modificaciones post-traduccionales añaden diversidad al proteoma, alterando la función o actividad de las proteínas e introduciendo nuevos niveles de complejidad funcional. Estas modificaciones son esenciales para el funcionamiento de los seres vivos, sobre todo en las respuestas fisiológicas que deben ocurrir rápida y reversiblemente, como es el caso de la adaptación a cambios ambientales o la respuesta a patógenos. Estas modificaciones consisten en la adición a las proteínas diana de radicales (fosfatos, metilo, acetilo) o de pequeñas moléculas (lípidos, azúcares o péptidos). El más conocido de los péptidos modificadores es la ubiquitina. No obstante, en los últimos años se han descrito un amplio grupo de péptidos similares en estructura a la ubiquitina, o UBL (Ub like modifiers), que se unen covalentemente a las proteínas diana mediante maquinarias de conjugación similares a la utilizada en la ubiquitinación. Entre estos sistemas de modificación por adición de UBL destaca la sumoilación, que está presente en todos los organismos eucariotas incluidas las plantas.

1.1.1 Sumoilación.

La sumoilación consiste en la unión covalente y reversible de SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) a una lisina de una proteína diana (Figura 1.1). Esta unión se cataliza mediante una cascada enzimática análoga a la de la ubiquitinación. Además existen proteasas específicas que revierten la modificación. La mayor parte de las proteínas que se sumoilan están sometidas a un ciclo rápido de sumoilación y desumoilación, que en general mantiene unos niveles bajos de proteína sumoilada. No obstante, el porcentaje de proteína sumoilada puede cambiar drásticamente como respuesta a estímulos internos o externos. Las consecuencias de la sumoilación dependen de cada proteína, pero en general conllevan cambios en las características de interacción de las proteínas dianas con otras macromoléculas incluyendo DNA, RNA u otras proteínas. Debido a que

tanto ubiquitinación como sumoilación comparten los residuos de lisina como diana, en un principio se las señaló como procesos antagónicos, pero esta visión ha ido evolucionando y volviéndose más compleja con el tiempo, ya que en algunos casos, las cadenas de SUMO reclutan a las ligasas de ubiquitina (Geoffroy y Hay 2009).

El péptido SUMO.

La familia de los SUMOs esta formada por péptidos de 100 a 108 aminoácidos de longitud estructuralmente similares a la ubiquitina. Todos los organismos eucariotas expresan al menos un péptido de SUMO. En el genoma de levaduras, *Chaenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* sólo se ha identificado un gen que codifica SUMO. Por el contrario, otros genomas de eucariotas, incluidos vertebrados y plantas, contienen varios genes para expresar SUMO. En mamíferos, se conocen cuatro parálogos nombrados como SUMO1, SUMO2 (Smt3A), SUMO3 (Smt3B) y SUMO4. Aunque se han detectado mRNA de los cuatro, *in vivo* sólo se han identificado conjugados de los tres primeros. SUMO2 y SUMO3 son idénticos a excepción de los tres últimos aminoácidos, por lo que a menudo son referidos como SUMO2/3 y comparten un 47% de identidad de secuencia con SUMO1. La expresión de SUMO2/3 se induce por distintos estreses, al contrario que SUMO1, que no es inducible (Bohren *et al.*, 2004; Johnson, 2004; Saitoh y Hinchey, 2000). Se ha descrito que este último, forma cadenas en ensayos *in vitro*, pero este resultado no se han encontrado *in vivo*, al contrario de lo que ocurre con SUMO2/3, para cuyas cadenas, parece que SUMO1 podría actuar como terminador (Matic *et al.*, 2008). Esta diferencia en la formación de polímeros se debe a la presencia en SUMO2/3 de una secuencia consenso de sumoilación, (de la que se hablará en detalle más adelante) que está ausente en SUMO1.

El primer SUMO de plantas fue aislado en tomate, como interactor de EIX (ethilene-inducing xylanase), del hongo *Trichoderma viridae* (Hanania *et al.*, 1999). El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene 9 parálogos del gen (AtSUM1-AtSUM9) (Novatchkova *et al.*, 2004). AtSUM-9 es un pseudogén

que no codifica la proteína completa. AtSUM-1 y AtSUM-2, AtSUM-4 y AtSUM-6 y, AtSUM-7 y AtSUM-8 son muy similares, mientras que el grado de homología con AtSUM-5 y AtSUM-3 es menor. Sólo se han detectado transcritos de AtSUM-1, AtSUM-2, AtSUM-3 y AtSUM-5. *In vivo* se han detectado conjugados de AtSUM1/2, (Kurepa *et al.*, 2003; Lois *et al.*, 2003; Murtas *et al.*, 2003), y AtSUM-3 (Kurepa *et al.*, 2003) tanto en el núcleo como en el citoplasma. Para poder detectar los conjugados de AtSUM-5 ha sido necesario sobreexpresar una versión etiquetada de la proteína (Novatchkova *et al.*, 2004). La acumulación de los conjugados de AtSUM1/2, pero no los de AtSUMO3, se incrementa con tratamientos de estrés por choque térmico, H₂O₂, etanol o adición del aminoácido no proteínogénico canavanina (Kurepa *et al.*, 2003).

AtSUMO1/2 tienen patrones de expresión similares entre sí pero diferentes al de AtSUMO3 (van den Burg y Takken, 2010). AtSUMO1/2 están implicados en el desarrollo de la planta, en la transición floral y en la supresión de la respuesta a ácido salicílico en plantas sanas. AtSUMO3 se sobreexpresa en respuesta a patógenos y parece estar implicado en la respuesta a ácido salicílico (van den Burg y Takken, 2010). Los cuatro SUMOs en los que se ha detectado su expresión en *Arabidopsis* tiene además diferentes afinidades por la proteína conjugadora del sistema de sumoilación AtSCE1 (Sumo conjugating enzyme). AtSUMO1/2 se unen más fácilmente a AtSCE1 que AtSUM3 y AtSUM5 (Castano-Miquel *et al.*, 2011).

La sumoilación es un proceso esencial para la mayor parte de los organismos con la notable excepción de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Ho y Watts, 2003) y el hongo *Aspergillus nidulans* (Wong *et al.*, 2008) en los que los mutantes nulos de SUMO son viables, aunque muestran alteraciones importantes en su crecimiento. En los organismos que tienen varios SUMOs la viabilidad de los mutantes simples de cada uno depende de la capacidad de complementación de los otros. Así, en *Arabidopsis*, la ausencia de AtSUMO1 o AtSUMO2 no altera el fenotipo de las plantas, pero el mutante doble AtSUMO1/2 no es viable (Saracco *et al.*, 2007).

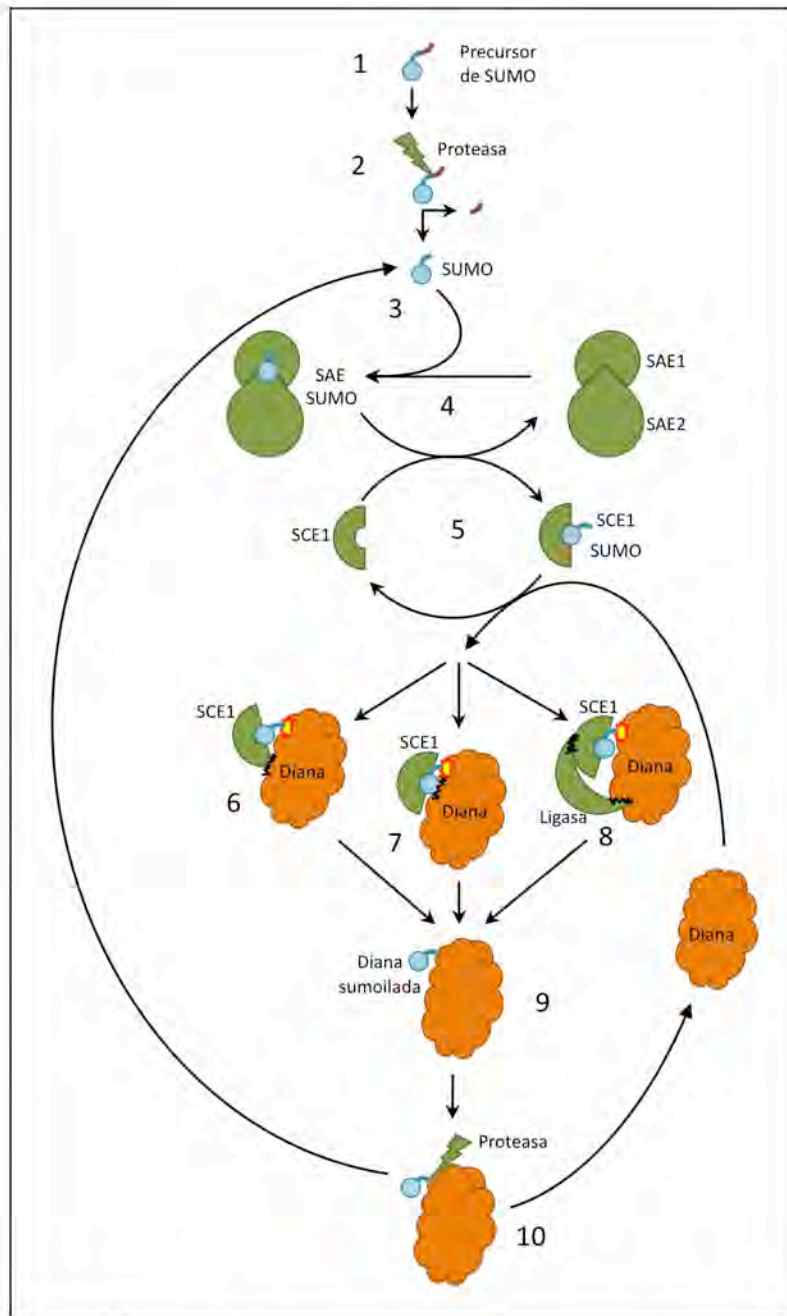


Figura 1.1: El ciclo de la sumoilación. SUMO es sintetizado como un precursor (1) que debe ser procesado por proteasas específicas (2) para poder ser funcional (3). El SUMO maduro se une a SAE, que lo activa (4) y lo transfiere a SCE1 (5). Ésta lo une covalentemente a lisinas diana específicas, a las que accede mediante interacción directa de la diana con SCE1 (6), de SUMO con un SIM de la diana (7) o con la mediación de una ligasa E3 de SUMO (8), para generar el producto sumoilado (9). Este es un proceso reversible, ya que los productos sumoilados pueden ser procesados por proteasas específicas de SUMO (10) liberando la diana sin modificar y el SUMO libre (3).

Maduración.

Como en el caso de la ubiquitina, los SUMOs se sintetizan como precursores inmaduros. Para obtener la forma madura, una familia de proteasas denominadas SEMP (sentrin/SUMO-specific protease) catalizan la proteólisis de un pequeño péptido en extremo carboxilo terminal del precursor (Johnson y Blobel, 1997) tras un residuo de glicina muy conservado. Esta proteólisis deja expuesto un motivo Gly-Gly en el extremo carboxilo por el que SUMO se une covalentemente a la lisina de la proteína diana. Mientras que en la mayor parte de los SUMOs de plantas, animales y hongos el motivo Gly-Gly esta conservado, los SUMOs 4, 6 y 7 de *Arabidopsis* tienen una sustitución en la penúltima posición. AtSUM-7 tiene Ala-Gly y los AtSUM-4 y AtSUM-6 tienen Ser-Gly. Cuando se muta esta posición de AtSUM1 a Ala-Gly, el SUMO sintetizado no puede ser procesado (Murtas *et al.*, 2003), pero si se sobreexpresa ya procesado, sí es capaz de formar conjugados (Novatchkova *et al.*, 2004).

El ciclo de la sumoilación.

El ciclo de la sumoilación consta de tres fases, activación, conjugación y desumoilación, en las que participan enzimas específicas, cuyo número es menor que en la ubiquitinación (Figura 1.1).

Activación.

La fase de activación es catalizada por la enzima E1 o SAE (SUMO Activating Enzyme), formada por dos subunidades: SAE1 y SAE2. En *Arabidopsis*, la mayor, AtSAE2, está codificada por un gen de copia única, mientras que para AtSAE1 existen dos genes AtSAE1a y SAE1b. La activación de SUMO consiste en dos pasos enzimáticos. En primer lugar, la unión del residuo de glicina de su extremo carboxilo a una molécula de ATP para formar un acil-adenilato (AMP-SUMO). El siguiente es la unión de la glicina de SUMO a una cisteína en SAE2 a través de la formación de un enlace tioéster y liberando AMP.

Conjugación.

Tras la activación, SAE transfiere SUMO a la enzima conjugadora, SCE1 o E2 (también conocida como UBC9) a la que se une mediante un enlace tioéster a un residuo de cisteína. Seguidamente SCE1 transfiere SUMO a la proteína diana, formándose un enlace isopeptídico entre la glicina del extremo carboxilo de SUMO y el grupo ε-amino de un residuo de lisina. La transferencia de SUMO a la proteína diana se puede realizar por reconocimiento y unión entre SCE1 y la proteína que se va a modificar, o requerir, como en la ubiquitinación, de una tercera enzima, la ligasa o E3. El genoma de *Arabidopsis*, al igual que de todos los organismos eucarióticos, AtSCE1 es codificada por un único gen.

Existe una secuencia consenso de sumoilación, YKXE/D, donde Y es un residuo hidrofóbico alifático, X puede ser cualquier residuo. Esta secuencia debe localizarse en una zona accesible de la proteína (Bernier-Villamor *et al.*, 2002). Además de la sumoilación en los sitios consenso, SUMO puede unirse a lisinas localizadas en secuencias no canónicas.

Hasta la fecha se han descrito tres tipos de ligasas de SUMO en animales y hongos:

- (i) El grupo de las ligasas SP-RING (con miembros representativos como SIZ1 y NFI1/SIZ2 de *Sacharomyces cerevisiae* y la familia PIAS de animales), usan un dominio RING-like (similar al dominio RING del mayor grupo de ligasas de ubiquitina) para unirse al complejo SCE-SUMO (Johnson y Gupta, 2001); (Kahyo *et al.*, 2001). En *Arabidopsis* se ha encontrado dos ligasas SR-RING implicadas en distintos procesos: AtSIZ1 y HPY2/MNS21 (Ishida *et al.*, 2012). La pérdida de función de AtSIZ1 conlleva una reducción en el tamaño de la planta, inducción de la respuesta inmune mediada por ácido salicílico, floración temprana en día corto e hipersensibilidad a frío y a condiciones limitantes de fósforo. También se ha descrito que AtSIZ1 está implicado en la acumulación de conjugados de SUMO1/2 en respuesta a choque térmico (Saracco *et al.*, 2007). La otra ligasa de SUMO descrita en

Arabidopsis, MMS21 (methyl methanesulfonate sensitive 21), también conocida como HPY2 (High ploidy 2) está implicada en proliferación celular, y mantenimiento del meristemo radicular (Huang *et al.*, 2009; Ishida *et al.*, 2009). Además, en *Arabidopsis* se han identificado otras dos proteínas que contienen dominios SP-RING: PIAL1 y PIAL2 (Tomanov *et al.*, 2014). Los análisis de expresión *in silico* indican que PIAL1 se induce por estrés. Se han identificado homólogos a los dos tipos de ligasas en otras especies de plantas como tomate, arroz, uva, chopo o sorgo (Novatchkova *et al.*, 2012).

- (ii) Ligasas de tipo RanBP2 (Ran-binding protein 2; Pichler *et al.*, 2002). Este tipo de ligasas está probablemente restringido a vertebrados porque su sustrato más prominente, RanGAP1, no se sumoila en hongos ni plantas, ya que la proteína carece del dominio aceptor de SUMO (Rose y Meier, 2001).
- (iii) Ligasas de tipo Policomb. Entre ellas se encuentra un miembro de la familia Policomb, Pc2 (Kagey *et al.*, 2003). Es difícil identificar candidatos a ligasas de este tipo en *Arabidopsis*, ya que no se dispone de una descripción precisa del dominio o dominios implicados en la sumoilación.

Mecanismos implicados en la especificidad de la sumoilación.

Se han propuesto tres mecanismos no excluyentes para la selección del residuo de lisina que se va a sumoilar (Figura 1.1):

- (i) La lisina se localiza en un motivo que es reconocido directamente por SCE1 (dominio consenso de sumoilación).
- (ii) La proteína diana tiene motivo SIM (SUMO interacting motif) que permite que SUMO se transfiera a un residuo de lisina cercano
- (iii) La ligasa E3 determina el residuo que se sumoila por la orientación específica de su interacción con SCE1 y la proteína diana.

Desumoilación.

Las proteasas de SUMO son responsable tanto en la maduración de SUMO, como de la desumoilación de las proteínas sumoiladas. Aunque la maduración de SUMO es un paso esencial para el funcionamiento de la ruta, no existen evidencias de que sea un factor limitante o que este sometido a regulación. Por el contrario, el nivel de desumoilación es clave para determinar la fracción sumoilada de una proteína.

Todas las proteasas de SUMO caracterizadas hasta la fecha se clasifican como cistein-proteasas (Li y Hochstrasser, 1999). La primera proteasa se identificó en una búsqueda de mutantes alterados en el ciclo celular (Li y Hochstrasser, 1999). Posteriormente en mamíferos se identificaron por homología otras proteasas que se denominan SENPs. En *S. cerevisiae* existen dos proteasas (Ulp1 y Ulp2) mientras que en mamíferos se han identificado hasta seis (SENP1, -2, -3, -5, -6 y -7). En *Arabidopsis* se han encontrado siete proteasas específicas de SUMO: ESD4, AtULP1a/ELS1, AtULP1d/OST1, AtULP1c/OST2, AtULP1b, AtULP2a y AtULP2b, aunque sólo las cuatro primeras han sido caracterizadas. Las proteasas difieren en su actividad relativa para activar SUMO o desumoilar proteínas y en su preferencia por el parálogo de SUMO (Hickey *et al.*, 2012).

ESD4 y AtULP1c/d se localizan en el núcleo (Conti *et al.*, 2008; Murtas *et al.*, 2003). ESD4 (early in short days 4) se identificó a partir de un mutante con floración temprana y desarrollo anormal de los tallos y flores (Murtas *et al.*, 2003). Los mutantes simples de AtULP1d y AtULP1c (*ots1-1* y *ots2-1*) son similares a la plantas silvestres, pero el doble mutante *ots1-1 ots2-1* presenta floración temprana y mayor sensibilidad a estrés salino. La sobreexpresión de AtULP1d produce una mayor tolerancia a sal (Conti *et al.*, 2008). ULP1a tiene actividad proteasa de SUMO y sorprendentemente muestra una localización citosólica, asociada a membrana (Hermkes *et al.*, 2011). Ensayos *in vitro* mostraron que las cuatro proteasas son capaces de procesar los conjugados de AtSUMO1/2, mientras que sólo ULP1a actúa sobre los conjugados de AtSUMO3. Ninguna de las proteasas analizadas fue capaz de desumoilar proteínas modificadas con AtSUMO5 (Chosed *et al.*,

2006). Las cuatro proteasas son capaces de producir AtSUMO1/2 maduro, pero ninguna es capaz de procesar los precursores de AtSUMO3 ni de AtSUMO5 (Colby *et al.*, 2006).

Funciones de SUMO en plantas.

La sumoilación en plantas está implicada en numerosos procesos celulares incluyendo respuesta a stress abiótico y biótico, el desarrollo y el crecimiento. Existen numerosas y exhaustivas revisiones sobre el tema, pero aquí nos centraremos principalmente en la respuesta a estrés de origen biótico.

Respuesta a estrés abiótico.

La acumulación de proteínas sumoiladas en condiciones de estrés es un fenómeno general en los organismos eucarióticos (Golebiowski *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2004; Kurepa *et al.*, 2003). En plantas se ha descrito este aumento en respuesta a choque térmico (Kurepa *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2006; Cheong *et al.*, 2009; Saracco *et al.*, 2007; van den Burg *et al.*, 2010), frío (Miura *et al.*, 2007); sequía (Catala *et al.*, 2007), estrés salino (Conti *et al.*, 2008), presencia excesiva de cobre (Chen *et al.*, 2011), H₂O₂, etanol o canavanina (Kurepa *et al.*, 2003). El incremento de proteínas sumoiladas correlaciona con una disminución en la cantidad de SUMO libre y con la duración del estrés (Kurepa *et al.*, 2003; Miller y Vierstra, 2011). Cuando el estímulo cesa, los niveles de conjugados de SUMO disminuyen muy rápidamente (Golebiowski *et al.*, 2009; Kurepa, *et al.*, 2003).

Respuestas a estreses bióticos.

La sumoilación juega un papel relevante en la interacción planta-patógeno. Como se menciona anteriormente, el SUMO de tomate fue aislado por interactuar con el efector fúngico EIX. La sobreexpresión de SUMO de tomate en tabaco suprime la muerte celular y la producción de etileno inducida por EIX (Hanania *et al.*, 1999). Posteriormente, se han obtenido

otros resultados que confirman la importancia que tiene la sumoilación en la interacción de la planta con bacterias y virus. Los mutantes de la ligasa *AtSiz1* presentan una expresión constitutiva de genes de respuesta a patógenos, lo que les confiere mayor resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000. Esta resistencia se pierde cuando se expresa *NahG*, lo que sugiere que la resistencia conferida por la falta de función de la ligasa se debe a un aumento en los niveles de SA (Lee *et al.*, 2007). La activación de genes de defensa dependientes de SA que se produce en plantas transgénicas que sobreexpresan *AtSUMO1* o *AtSUMO2* hace que tengan menor sensibilidad a la infección por *P. syringae*. Curiosamente el tratamiento con Flg22 incrementa rápidamente y de forma dependiente de SA los niveles de transcrito de *AtSUMO3*, pero no los de *AtSUMO1/2* (van den Burg *et al.*, 2010).

La importancia de la sumoilación en la interacción planta-bacteria se pone de manifiesto con la identificación de efectores bacterianos de virulencia (*XopD*, *AvrBsT* o *AvrXV4*) que funcionan como proteasas de SUMO. *XopD* es un efector de *Xanthomonas euvesicatoria* que posee actividad proteasa específica de SUMO en tomate y *Arabidopsis* (Chosed *et al.*, 2006; Hotson *et al.*, 2003) y es capaz de desumoiar algunas proteínas de plantas (Chosed *et al.*, 2006; Colby *et al.*, 2006; Hotson *et al.*, 2003; Roden *et al.*, 2004). Proteínas homólogas a *XopD* capaces de procesar los pre-SUMOs existen en otras especies de *Xanthomonas*, *Acidovorax*, y *Pseudomonas* (Canonne *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). *XopD* contiene un dominio de unión no específica a DNA, dos dominios ERA típicos de supresores de la transcripción inducida por estrés y un dominio de proteasa de SUMO en su extremo C-terminal. La naturaleza de estos dominios sugiere que *XopD* reprime la transcripción durante la infección bacteriana. En este sentido se ha comprobado que *XopD* reprime la producción y la expresión dependiente de SA (Hotson y Mudgett, 2004; Kim *et al.*, 2008). En un trabajo publicado recientemente se demuestra que *XopD* funciona como un factor de tolerancia en *X. euvesicatoria* interfiriendo con la producción y las respuestas de

defensa mediada por etileno (ET) interaccionando con el factor de transcripción SIERF4 (Kim *et al.*, 2013).

El factor de avirulencia AvrBsT de *X. campestris pv. campestris*, un homólogo de YopJ (un factor de virulencia de *Yersinia pestis*), contiene también una la triada catalítica (H/G/C) típica de proteasas de SUMO. Mientras que AvrBsT silvestre induce una respuesta de hipersensibilidad (HR) en hojas de *N. benthamiana*, el mutante en el centro activo no es capaz de provocar HR (Orth *et al.*, 2000). Otro factor de virulencia, AvrXV4, de *X. campestris pv. vesicatoria 4*, tiene actividad proteasa específica de SUMO. Como en el caso de AvrBsT, la mutación del centro catalítico de AvrXV4 tiene como resultado la supresión de la HR en tabaco (Roden *et al.*, 2004).

Sumoilación y virus.

La mayor parte de la información sobre la interferencia de los virus con el sistema de sumoilación provienen de trabajos realizados con virus de animales (Everett *et al.*, 2013; Alvisi y Palu, 2013; Wimmer *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). De forma resumida, los virus utilizan dos mecanismos para interaccionar con el proceso de sumoilación (Figura 1.2): (i) la interacción física de proteínas del virus con proteínas del sistema o con proteínas sumoiladas del hospedador generalmente a través de dominios SIM (Tabla 1.1 y 1.2) o (ii) la presencia de actividad de enzimas de la ruta, principalmente ligasas, en algunas de la proteínas virales (Tabla 1.3). Como consecuencia de esta interacción entre virus y el sistema de sumoilación se puede producir la sumoilación de proteínas virales (Tabla 1.4) y/o la alteración general o específica de la sumoilación de las proteínas del hospedador.

Los virus, principalmente los de DNA, explotan la sumoilación para llevar a cabo pasos clave de su vida intracelular, por ejemplo la transcripción de genes virales o el ensamblado de los viriones, y/o para crear las condiciones apropiadas en el hospedador inhibiendo la respuesta inmune o alterando la regulación del ciclo celular. Es remarcable que un único virus puede explotar la ruta de sumoilación a través de varias proteínas, o que

una única proteína viral pueda interactuar con SUMO usando varios mecanismos, quizás para promover también diferentes pasos de la infección viral. Así mismo, llama la atención que la inmensa mayoría de las proteínas víricas que interactúan con el sistema de sumoilación se expresan en los primeros estadios de la infección, sugiriendo un papel crucial para SUMO en la defensa contra la infección viral. En este apartado se muestran algunos ejemplos de estas interacciones en sistemas animales.

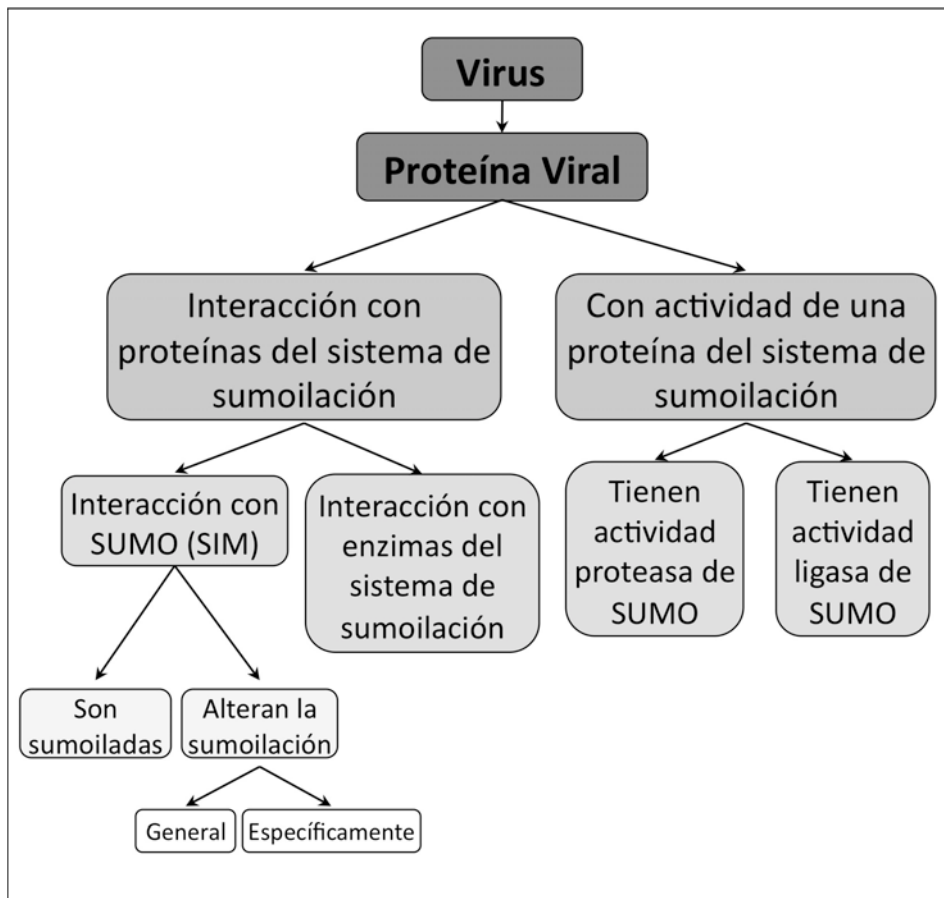


Figura 1.2: Efectos de la interacción de virus y el sistema de sumoilación.

Alteración general del sumoiloma mediado por la proteína Gam1. Un sello característico de las infecciones virales es incrementar los niveles de transcripción del hospedador para mantener la replicación viral. La proteína Gam1 es un gen de expresión temprana del adenovirus CELO (*Chicken embryo lethal orphan virus*) que tiene la capacidad de inhibir la sumoilación de forma global por medio de su interacción y subsecuente degradación del heterodímero SAE1 y SAE2 (Boggio *et al.*, 2004; Boggio *et*

al., 2007). Ya que la sumoilación de muchos factores de transcripción reprime su actividad, el descenso generalizado de la conjugación de SUMO provocada por Gam1, podría promover el incremento generalizado de la actividad transcripcional para facilitar la replicación del virus. Gam1 también interfiere con la sumoilación de proteínas del hospedador, como la deacetilasa de histonas HDAC1 (Colombo *et al.*, 2002). Curiosamente, un mutante Δ Gam1 del virus CELO (Glotzer *et al.*, 2000) sólo es infectivo si se tratan las células hospedadoras con inhibidores de HDCA, lo que sugiere una interconexión entre la sumoilación y la acetilación (Chiocca *et al.*, 2002).

Supresión del sistema inmune mediada por ICP0. Los organismos pluricelulares disponen de dos vías canónicas de defensa frente a los virus, la inmunidad innata y la inmunidad intrínseca. La resistencia innata representa la primera línea de defensa intracelular. Esta resistencia emplea los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), tales como TLRs (Toll-like receptors) y RLRs (RIG-I-like receptors). Estos sistemas de reconocimiento están asociados a rutas de señalización que inducen la producción de moléculas antivirales. En vertebrados este tipo de respuesta conlleva la expresión de interferones de tipo I (IFNs) y la expresión de genes dependientes de IFN cuyos productos inhiben la infección durante sus estadios iniciales. Por el contrario la inmunidad intrínseca se produce a nivel celular y viene determinada por la expresión constitutiva de unas proteínas específicas con actividad antiviral.

Entre las proteínas que confieren una resistencia intrínseca están las proteínas de la familia TRIM (tripartite motif) varias de las cuales tienen actividad ligasa de ubiquitina o de UBLs. Una de estas proteínas TRIM, denominada PML (Promyelocytic Leukemia Protein) está implicada en la formación y mantenimiento de los PML nuclear bodies (PML-NB). Los PML-NB son inclusiones nucleares de proteínas que juegan un papel muy importante en la inmunidad intrínseca antiviral situados corriente abajo de la respuesta antiviral mediada por INF (Everett y Chelbi-Alix, 2007).

Tabla 1.1. Proteínas virales que interactúan con las enzimas E1, E2 y/o E3.

Familia	Virus	Genoma	Proteína	Interactor	Efecto	Referencia
Adenoviridae	CELO	DNA	Gam1	E1 y E2	Descenso de los niveles de los conjugados de SUMO. Disgregación de los PML-NB.	(Boggio <i>et al.</i> , 2004; Boggio <i>et al.</i> , 2007).
	HAdV5	DNA	E1A	E2		(Ledl <i>et al.</i> , 2005).
Bunyaviridae	Hantavirus	RNA	NP	E2 y E3	-	(Kaukinen <i>et al.</i> , 2003; Lee <i>et al.</i> , 2003).
Coronaviridae	SARS-CoV	RNA	N	E2	-	(Fan <i>et al.</i> , 2006; Li <i>et al.</i> , 2005).
Filoviridae	EBOV	RNA	VP35	E3	Induce la sumoilación de IRF7 lo que reprime la transcripción de IFNB.	(Chang <i>et al.</i> , 2009).
Flaviviridae	DV2	RNA	env	E2	-	(Chiu <i>et al.</i> , 2007).
Herpesviridae	HCMV	DNA	IE2	E2 y E3	Dispersión de los PML-NB.	(Ahn <i>et al.</i> , 2001).
	EBV	DNA	Zta /Rta	E2 y E3	Bajan los niveles de PML sumoiado. Se dispersan los PML-NB.	(Li <i>et al.</i> , 2012).
KSHV	KSHV	DNA	K-bZip	E2	Degradación de PML. Disrupción de los PML-NB.	(Izumiyu <i>et al.</i> , 2005).
						(Xu <i>et al.</i> , 2011).
Orthomyxoviridae	Influenza	RNA	NS1/PB1/M P/M1/NS2	E2	-	(Xu <i>et al.</i> , 2011).
Papillomaviridae	HPV	DNA	E1/E2	E2 y E3	-	(Yasugi <i>et al.</i> , 1997).
Picornaviridae	EV71	RNA	3C	E2	-	(Chen <i>et al.</i> , 2011).
Retroviridae	HIV-1	RNA	gag/p6	E2	-	(Gurer <i>et al.</i> , 2005).
	HTLV	RNA	Tax	E2	-	(Kfoury <i>et al.</i> , 2012).
Geminiviridae	TGMV	DNA	Rep	E2	-	(Castillo <i>et al.</i> , 2004).
Potiviridae	TuMV	RNA	NIb	E2	-	(Xiong y Wang, 2013).

Tabla 1.2. Proteínas virales que interaccionan con SUMO

Familia	Virus	Genoma	Proteína	Efecto	Referencia
Herpesviridae	HSP1	DNA	ICP0	Marca para degradar PML y SP100 en el proteosoma.	(Boutell <i>et al.</i> , 2011).
	BHV1	DNA	BICP0	Marca para degradar PML y SP100 en el proteosoma.	(Boutell <i>et al.</i> , 2011; Everett <i>et al.</i> , 2009).
	EHV1	DNA	EICP0	Marca para degradar PML y SP100 en el proteosoma.	(Boutell <i>et al.</i> , 2011; Everett <i>et al.</i> , 2009).
	Pseudorabies virus	DNA	PICP0	Marca para degradar PML y SP100 en el proteosoma.	(Boutell <i>et al.</i> , 2011; Everett <i>et al.</i> , 2009).
	HCMV	DNA	IE2	Sumoilación de IE2 y transactivación de los promotores virales.	(Berndt <i>et al.</i> , 2009; Kim <i>et al.</i> , 2010).
	EBV	DNA	Rta	Bajan los niveles de PML sumoilado. Se dispersan los PML-NB.	(Li <i>et al.</i> , 2012).

Tabla 1.3. Proteínas virales con actividad de una enzima del sistema de sumoilación.

Familia	Virus	Genoma	Proteína	Actividad	Diana	Referencia
Adenoviridae	HAdV5	DNA	AVP	Proteasa	-	(Lee y Hruby 1994; López-Otín, 1984).
	HAdV5	DNA	E1B-55K	Ligasa	p53	(Muller y Dobner 2008; Pennella <i>et al.</i> , 2012).
Herpesviridae	KSHV	DNA	K-bZip	Ligasa	p53, RB y PML	(Chang <i>et al.</i> , 2010; Izumiya <i>et al.</i> , 2005).
	EBV	DNA	LMP1	Ligasa	IRF7	(Bentz <i>et al.</i> , 2012)
Poxviridae	VV	DNA	I7	Proteasa	-	(Li y Hochstrasser, 1999; Mukhopadhyay Dasso, 2007).

Tabla 1.4. Proteínas virales sumoiladas.

Familia	Virus	Genoma	Proteína	Referencia
Adenoviridae	HAdV5	DNA	E1b-55K	(Endter <i>et al.</i> , 2001; 2005).
Coronaviridae	SARS-Co	RNA	N	(Li <i>et al.</i> , 2005; Li <i>et al.</i> , 2006).
Herpesviridae	HCMV	DNA	IE1 / IE2	(Spengler <i>et al.</i> , 2002; Nevels <i>et al.</i> , 2004; Berndt <i>et al.</i> , 2009; Kim <i>et al.</i> , 2010).
			Zta	(Adamson y Kenney 2001; Haegemier <i>et al.</i> , 2010; Murata <i>et al.</i> , 2010).
	EBV	DNA	(BZLF1) / Rta (BGLF4)	(Gravel <i>et al.</i> , 2002; Gravel <i>et al.</i> , 2004).
	HHV-6	DNA	IE1	(Izumiga <i>et al.</i> , 2005).
Orthomyxoviridae	Influenza	RNA	K-bZip / LANA2	(Pal <i>et al.</i> , 2010; 2011; Wu <i>et al.</i> , 2011; Xu <i>et al.</i> , 2011).
			NS1 / M / PB1 / NP / NS2	(Wu <i>et al.</i> , 2007; 2008; 2009).
Papillomaviridae	HPV	DNA	E1 / E2 / L2	(Sun <i>et al.</i> , 2011).
Paramixoviridae	PIV5	RNA	P	(Chen <i>et al.</i> , 2011).
Picornaviridae	EV71	RNA	3C	(González-Santamaría <i>et al.</i> , 2011).
Poxviridae	A40R	DNA	E3L	(Gurer <i>et al.</i> , 2005).
Retroviridae	HIV-1	RNA	gag / p6 / IN	(Kfoury <i>et al.</i> , 2011; Lamsoul <i>et al.</i> , 2005).
	HTLV-1	RNA	Tax	

Durante fases tempranas de la infección, las células reclutan los componentes de los PML nuclear bodies mediante la sumoilación, entre otras, de las dos proteínas que forman el núcleo de los PML nuclear bodies (PML y SP100) (Cuchet-Lourenco *et al.*, 2011). Los PML-NB se desensamblan durante la mayor parte de las infecciones virales, lo que sugiere que su dispersión puede ser una estrategia de los virus para evadir el efecto del IFN (Everett y Chelbi-Alix, 2007). Los virus de DNA inducen la dispersión de los PML-NB mediante el secuestro de la maquinaria de sumoilación. El ejemplo más estudiado de esta interferencia es el cambio que produce la proteína ICP0 de HSV (*Herpes simplex virus*). ICP0 desmonta los PML-NB al inducir la degradación vía proteosoma de la proteína PML (Boutell y Everett, 2013; Hagglund y Roizman, 2004), y la reducción en la sumoilación de SP100 (Everett *et al.*, 2006). ICP0 es una STUbL (SUMO targeted ubiquitin ligases), una clase de ligasas de

ubiquitina del grupo RING finger que contienen SIM (Uzunova *et al.*, 2007). De este modo, a través de estos dominios SIM, ICP0 se une además a factores de transcripción sumoilados en los PML-NB, que son degradados vía proteosoma. Este mecanismo de virulencia parece estar conservado en otros alphaherpesvirus, ya que sus genomas codifican proteínas ortólogas a ICP0 con dominios SIM, que afectan a la integridad de los PML-NB y reducen los niveles de sumoilación de proteínas del hospedador (Boutell *et al.*, 2011; Everett *et al.*, 2009; Parkinson y Everett 2000; Wang *et al.*, 2011).

Desregulación del ciclo celular: el caso de E1B-55K y K.bZIP.

E1B-55K de HAdV5 (*Human Adenovirus 5*) es una proteína de expresión temprana de un adenovirus que funciona como una E3 ligasa que conjuga específicamente SUMO1, pero no SUMO2/3, a p53, inhibiendo su actividad transcripcional (Pennella *et al.*, 2012). La sumoilación de p53, conlleva la localización de la proteína en los PML-NB (Muller y Dobner, 2008) que precede a su degradación en el proteosoma (Liu *et al.*, 2005). Ya que p53 es uno de los principales reguladores del arresto del ciclo celular y la apoptosis, la conjugación de SUMO1 a p53 puede ser un evento clave en la transformación oncogénica de células primarias inducida por los adenovirus.

Un caso similar es el de la proteína K.bZIP codificada por el virus asociado con el sarcoma de Kaposi (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*, KSHV). Esta proteína también muestra actividad E3 ligasa pero conjuga preferentemente los parálogos SUMO2/3 a p53, lo que potencia su capacidad de actuar como factor de transcripción y provoca la detención del crecimiento por el bloqueo del ciclo celular en la fase G1 (Chang *et al.*, 2010). Este bloqueo promueve la replicación viral y protege a la célula hospedadora de la subsiguiente apoptosis (Flemington, 2001).

Sumoilación y virus de plantas.

Hasta el momento sólo se ha identificado la interacción de dos proteínas de virus de plantas con el sistema de sumoilación: la proteína NIB del potivirus *Turnip mosaic virus* (TuMV) y la proteína Rep de begomovirus.

En el caso de NIB, una RNA polimerasa dependiente de RNA, se ha descrito que su interacción con AtSCE1 provoca su sumoilación y que el establecimiento de la infección en la planta requiere tanto la interacción como la modificación de la proteína viral (Xiong y Wang 2013). Así mismo, se ha descrito que interacción de la proteína Rep begomovirus con SCE1 de *Nicotiana benthamiana* es necesaria para la replicación del virus sin que se detecte sumoilación de la proteína viral (Castillo *et al.*, 2004; Sánchez-Durán *et al.*, 2011).

Consecuencias de la interacción de Rep con SCE1.

Ensayos de expresión transitoria de Rep en *N. benthamiana* sugieren que Rep produce cambios específicos en la sumoilación de algunas proteínas de la planta, y no un cambio generalizado del sumoiloma como el descrito para la proteína Gam de CELO (Sánchez-Durán *et al.*, 2011; Boggio *et al.*, 2004; Boggio *et al.*, 2007). Rep es una proteína multifuncional imprescindible para la replicación de los geminivirus capaz de interactuar con una plétora de proteínas de la planta. La tabla 1.5 resume las interacciones y actividades descritas para esta proteína. Entre las proteínas que interactúan con Rep destaca Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Castillo *et al.*, 2003; Bagewadi *et al.*, 2004), cuya sumoilación ha sido demostrada en varias especies de eucariotas incluida *A. thaliana* (Miller y Vierstra, 2011; Elrouby y Coupland, 2010). PCNA es una proteína presente en todos los eucariotas y en arqueas cuya secuencia está muy conservada. Funcionalmente, PCNA sirve de anclaje para enzimas que modifican y replican el DNA, enzimas modificadoras de cromatina y enzimas implicadas en sistemas de reparación del DNA. Aunque se desconoce la importancia biológica de su interacción con Rep, el hecho de que ésta esté implicada en el reconocimiento del origen de replicación del virus, que tenga actividad helicasa y que introduzca un corte en una secuencia nucleotídica del virus que sirve de señal para el inicio de la replicación, sugiere que su interacción con PCNA debe jugar un papel clave para la generación de nuevas copias del genoma del virus.

Tabla 1.5. Actividades de Rep de TGMV

Actividad	Dominio	Referencia
Interacción con la IR	1-130	(Orozco y Hanley-Bowdoin, 1998).
Helicasa	1-130	(Laufs <i>et al.</i> , 1995).
Endonucleasa	1-130	(Hoogstraten <i>et al.</i> , 1996).
Dimerización	121-181	(Orozco <i>et al.</i> , 2000).
Interacción con SCE1	1-181	(Castillo <i>et al.</i> , 2004).
Interacción con Retinoblastoma	101-181	(Kong <i>et al.</i> , 2000)
Interacción con REn	101-180	(Settlage <i>et al.</i> , 2005).
Interacción con PCNA	134-183	(Bagewadi <i>et al.</i> , 2004).

1.1.2 PCNA: estructura.

PCNA pertenece a la familia de las “sliding clamps”, que también incluye la subunidad β de la DNA polimerasa III de *Escherichia coli* y la proteína gp45 del fago T4, caracterizadas por tener una estructura de anillo cerrado y ser capaces de deslizarse a lo largo de la molécula de DNA (Stukenberg *et al.*, 1991). La estructura del anillo de PCNA esta formada por un homotrímero con un diámetro interno de 3,4nm (Figura 1.3). En su estructura se pueden diferenciar además dos caras, la frontal o C, de la que sobresalen los extremos carboxilo de los monómeros y la posterior o del lazo (Krishna *et al.*, 1994; Gulbis *et al.*, 1996; Matsumiya *et al.*, 2001; Strzalka *et al.*, 2009). Esto permite que las DNA polimerasas, que interaccionan con el lado posterior de PCNA, queden orientadas hacia el extremo sobre el que se están añadiendo nucleótidos (Moldovan, 2007). La superficie interna del anillo de PCNA, que se encuentra próxima al DNA, contiene dominios α -hélice cargados positivamente, mientras que la superficie externa está formada por hoja- β cargada negativamente (Krishna *et al.*, 1994; Gulbis *et al.*, 1996; Matsumiya *et al.*, 2001; Strzalka *et al.*, 2009).

La interacción de los monómeros de PCNA se da en una orientación cabeza-cola. Cada uno contiene un lazo de conexión entre dominios o IDCL (inter-domain connection loop) que sirve de conector entre los dominios N y C-terminales de cada monómero. Se ha descrito que el IDCL es un importante sitio para el contacto con distintos interactores de PCNA, como la DNA pol δ , p21, DNA ligasa1 (DNA lig1), la endonucleasa flap (Fen1) o la DNA-citosina-5 metil transferasa. Otras regiones importantes se localizan

en el extremo amino, donde se encuentra la interacción entre las α -hélices de PCNA y la ciclina-D y en el extremo carboxilo, que está implicado en la interacción con proteínas como la DNA pol δ , RFC (replication factor C, implicado en la carga del PCNA en el DNA), la quinasa dependiente de ciclina 2 y la proteína 45 de parada del crecimiento y daño del DNA (Maga y Hubscher, 2003).

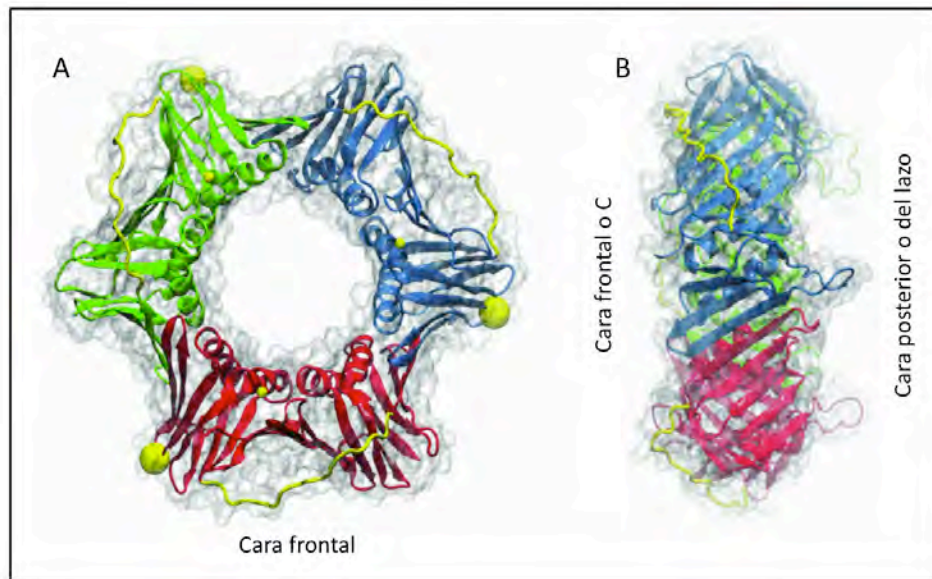


Figura 1.3: Estructura de PCNA. Representación tridimensional de la estructura del trímero de PCNA humano. A) Vista de la cara frontal. B) Vista lateral. Se representan en colores distintos los tres monómeros, como una cinta amarilla el IDCL (interdomain connection loop) y como una esfera amarilla la lisina 164. (Imágenes: www.biochemsoctrans.org/bst/037/0605/bst0370605f01.htm)

Funciones de PCNA: un “hub” para interacciones con otras proteínas.

PCNA, actúa como un coordinador central de las transacciones del DNA proporcionando una superficie de interacción multivalente para proteínas implicadas en la replicación del DNA, en su reparación, en la dinámica de las cromátidas y en la regulación del ciclo celular (Moldovan, 2007; Mailand *et al.*, 2013). Estas interacciones generalmente tienen lugar entre el IDCL y un motivo del interactor denominado PIP (PCNA-interacting peptide) (Warbrick, 1998). En eucariotas superiores, se ha descrito un segundo motivo de interacción con PCNA, denominado APIM (AlkB homologue 2 PCNA-interacting motif), aunque la región de PCNA a la

que se une este motivo todavía no ha sido caracterizada (Gilljam *et al.*, 2009).

PCNA está sometido además a modificaciones post-traduccionales como la ubiquitinación y la sumoilación que aumentan o modulan su repertorio de interactores. Adicionalmente, algunos residuos de PCNA también pueden fosforilarse o acetilarse, modificaciones que parecen estabilizar la proteína impidiendo su degradación.

La ubiquitinación juega un papel central en la interacción de PCNA con los sistemas de reparación post-replicativos (post-replication repair, PRR). Los daños en el DNA, que no son reparados antes de la replicación en la fase S, bloquean la progresión de la horquilla de replicación. Las horquillas de replicación bloqueadas activan la PRR de la que se conocen dos rutas en células eucariotas: (i) la TLS (translesion DNA synthesis) que utilizan DNA-polimerasas tolerantes al daño y (ii) una vía que evita el daño y que probablemente usa la cromátida hermana ya replicada como molde para la reparación (Ulrich, 2007). Esta segunda ruta no introduce errores al reparar el DNA (error free), mientras que la primera es propensa a cometerlos ya que las polimerasas propias de TLS pueden incorporar nucleótidos erróneos para sobrepasar la lesión (error prone), que son reparados posteriormente por escisión de bases o de nucleótidos o por recombinación homóloga. En respuesta al bloqueo de la horquilla de replicación se produce la ubiquitinación de la Lys 164, un residuo conservado en todos los PCNA de eucariotas (Figura 1.4 y anexo 1). La unión de una molécula de ubiquitina (mono-ubiquitinación) induce la interacción de PCNA con polimerasas TLS de la familia Y, que remplazan a las polimerasa replicativas, y permiten copiar el DNA en la zona dañada. Una vez superada dicha zona, la polimerasa TLS es remplazada por la polimerasa replicativa para continuar la síntesis. Se asume que dicho reemplazamiento viene precedido por la desubiquitinación de PCNA. En algunas ocasiones, la Lys164 puede poliubiquitinarse (Hoege *et al.*, 2002). Parece que esta modificación induce el funcionamiento de la ruta

alternativa de reparación de DNA libre de error cuyos mecanismos no se conocen aún.

En levaduras, durante la fase S del ciclo celular, los trímeros de PCNA enhebrados por el DNA pueden ser además sumoilados, pero al contrario que con la ubiquitinación, que ocurre principalmente en respuesta al bloqueo de la replicación, la sumoilación se produce en condiciones en las que el funcionamiento de la horquilla de replicación no está alterado (Hoege *et al.*, 2002; Stelter y Ulrich, 2003; Parker *et al.*, 2008). La sumoilación de PCNA en levaduras está catalizada por la ligasa Siz1 y ocurre preferentemente en la Lys164 y con menor frecuencia en la Lys127 (Hoege *et al.*, 2002), evitando por tanto que se carguen polimerasas de TLS al impedir la ubiquitinación de este residuo. En *S. cerevisiae* la sumoilación de PCNA provoca la unión de SRS2, una proteína antirrecombinogénica con actividad helicasa 3'-5' que suprime la recombinación durante la replicación del DNA al interferir con la unión de Rad51 a las cadenas sencillas de DNA que se forman en la horquilla (Pfander *et al.*, 2005; Veaute *et al.*, 2003; Papouli *et al.*, 2005). Estudios cristalográficos recientes han demostrado que el SUMO unido a PCNA ocupa una posición en la cara posterior de la proteína muy similar a la que se ha descrito para la ubiquitina (Freudenthal *et al.*, 2011; Armstrong *et al.*, 2012). La aparente falta de sumoilación del PCNA de otra levadura, *S. pombe*, y la ausencia en algunos vertebrados de claros homólogos a *SRS2* planteó dudas sobre la importancia de esta modificación (Hoege *et al.*, 2002; Arakawa *et al.*, 2006; Leach y Michael, 2005). Sin embargo, la demostración de que el PCNA de mamíferos se sumoila (Ulrich, 2009; Ulrich y Takahashi, 2013; Gali *et al.*, 2012; Moldovan *et al.*, 2012) y la identificación de homólogos de *SRS2* en estos organismos (Moldovan *et al.*, 2012; Blanck *et al.*, 2009) sugieren que la sumoilación de PCNA en estos casos podría tener un papel similar al descrito en *S. cerevisiae*.

Otro factor celular que parece interactuar selectivamente con PCNA sumoilado en *S. cerevisiae* es ELG1 (Parnas *et al.*, 2010). No se conoce con seguridad la función de ELG1, aunque su falta provoca un aumento en la

recombinación y reorganizaciones cromosómicas (Kubota *et al.*, 2013). Un efecto sinérgico entre las mutaciones de ELG1 con SRS2 indica que las dos proteínas no actúan en la misma ruta, aunque ambas responden a SUMO. Curiosamente, la delección de ELG1 causa una acumulación de PCNA en su forma sumoilada en la cromatina, sugiriendo que la proteína podría actuar como un “descargador” para el PCNA sumoilado (Parnas *et al.*, 2010).

Los datos sobre las modificaciones post-traduccionales de PCNA en plantas son muy escasos. En dos análisis del sumoiloma de *A. thaliana* se identificó PCNA como una de las proteínas sumoiladas en esta planta (Elrouby y Coupland 2010; Miller y Vierstra 2011). Este resultado ha sido confirmado mediante ensayos de sumoilación en *E. coli* del PCNA de tomate y *Arabidopsis* (Sánchez-Durán *et al.*, 2011; Strzalka *et al.*, 2012).

Trabajos previos del grupo de investigación (Sánchez-Durán *et al.*, 2011) demostraron que la expresión en *E. coli* de la proteína Rep del begomovirus TGMV (*Tomato golden mosaic virus*) reduce la sumoilación de PCNA de plantas y que dicha interferencia no depende de la interacción de la proteína vírica con SCE1 (un resumen de dichos resultados se muestra en el anexo II de esta tesis). En este capítulo quisimos profundizar en el conocimiento de la interacción PCNA-Rep para lo que nos propusimos tres objetivos: (i) identificar los residuos de PCNA que se sumoilan, (ii) confirmar y caracterizar la interferencia de Rep sobre la sumoilación de PCNA y (iii) determinar si dicha interferencia se produce en la planta.

1.2 RESULTADOS.

1.2.1 Identificación de las lisinas sumoilables de SIPCNA.

Para identificar las lisinas que se sumoilan en PCNA de *Solanum lycopersicum* (SIPCNA) analizamos la secuencia de la proteína teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- 1.- Grado de conservación.
- 2.- Residuos sumoilados en PCNA de levaduras y mamíferos.
- 3.- Predicción de dianas de sumoilación.
- 4.- Localización espacial.

El genoma de todos los organismos eucarióticos contiene al menos una copia del gen que codifica PCNA. En algunas especies existe además una copia adicional (*Drosophila melanogaster* y *Toxoplasma gondii*) o varios pseudogenes (ratón y humanos).

En plantas existen especies cuyos genomas contienen solo una copia (*Oryza sativa*, *Catharanthus roseus*, *Pinus nigra*, *Pisum sativum*, *P. vulgaris*, *Brassica napus* o *Glycine max*) y otras que tienen al menos dos (*A. thaliana*, *Z. mays*, *Daucus carota*, *Nicotiana tabacum* y *Phaseolus coccineus*) (Strzalka y Ziemienowicz, 2011). En la base de datos de Sol Genomics (www.solgenomics.net), donde se almacena la información sobre el genoma de *S. lycopersicum*, sólo aparece una secuencia para PCNA (SIPCNA), lo que indica que sólo existe un locus para este gen en tomate.

La secuencia de PCNA está muy conservada entre organismos eucariotas tal y como se muestra en el alineamiento de la figura 1.4 que incluye secuencias de PCNA de *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, humanos y varias especies de plantas (de las plantas que poseen dos genes de PCNA se incluyó la secuencia de la proteína con mayor homología a SIPCNA).

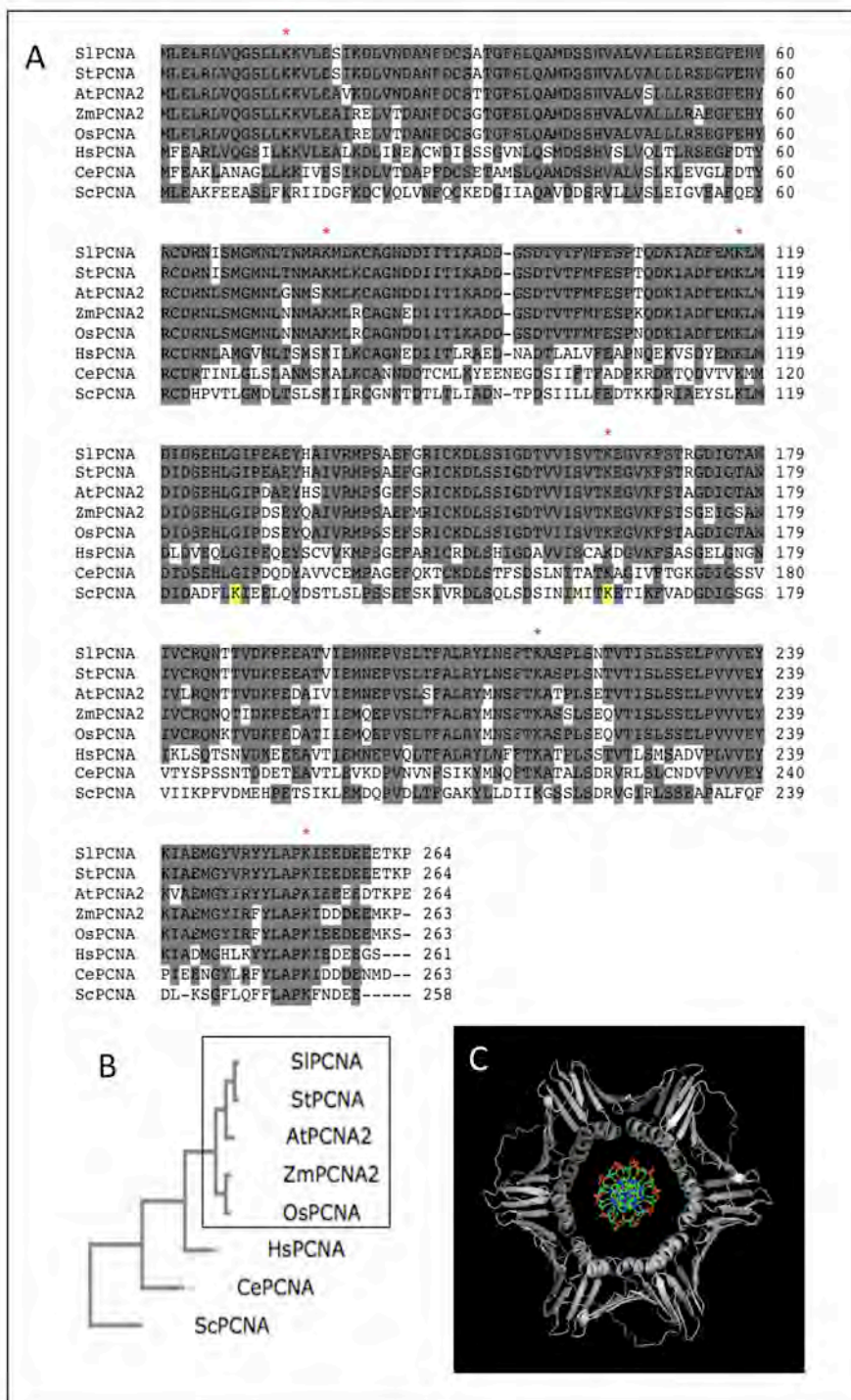


Figura 1.4: PCNA, secuencia y estructura. A) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los PCNA de *Solanum lycopersicum* (AJ515747.1), *Solanum tuberosum* (XM_006350753), *Arabidopsis thaliana* (NM_128510.2), *Zea Mays* (NM_001111991.1), *Oriza sativa japonica* (NM_128510.2), *Homo sapiens* (BC000491.2), *Caenorhabditis elegans* (NM_068065.6) y *Saccharomyces cerevisiae* (X16676.1) (Clustal Omega). Se han marcado en amarillo las lisinas (K127 y K164) que se sumoilan en levaduras y las conservadas en todos los organismos comparados, con un asterisco rojo. Se han sombreado en gris los residuos de S1PCNA conservados. B) Cladograma obtenido de la comparación de dichas secuencias (Clustal W2). C) Estructura del trímero de PCNA rodeando el DNA (adaptado Protein Data Bank 3U5Z y 1AXC con PyMOL).

Tabla 1.6. Lisinas sumoilables según SUMOsp 2.0.

Gen	Aa	Secuencia	Puntuación	Corte	Diana
SIPCNA	254	LAPKIEE	0,502	0,17	Ψ-K-X-E
StPCNA	254	LAPKIEE	0,502	0,13	Ψ-K-X-E
AtPCNA2	260	LAPKIEE	0,502	0,13	Ψ-K-X-E
	268	EDTKPE*	3,691	2,64	No consenso
ZmPCNA2	262	EEMKP**	3,515	2,64	No consenso
OsPCNA	254	LAPKIEE	0,502	0,17	Ψ-K-X-E
	262	EEMKS**	4,088	3,33	No consenso
HsPCNA	254	LAPKIED	0,697	0,17	Ψ-K-X-E
CePCNA	51	VSLKLEV	1,427	0,17	Ψ-K-X-E
	91	CMLKYEE	0,341	0,17	Ψ-K-X-E
ScPCNA	5	LEAKFEE	0,242	0,17	Ψ-K-X-E
	127	DFLKIEE	0,810	0,17	Ψ-K-X-E
	196	TSIKLEM	2,569	0,17	Ψ-K-X-E

Resultados de la predicción de dianas de sumoilación obtenidas con el programa SUMOsp 2.0 (Ren *et al.*, 2009)

Para determinar el grado de conservación de los residuos de lisina presentes en SIPCNA, se llevo a cabo un alineamiento utilizando la secuencias de PCNA de 32 especies, incluyendo 12 de plantas, 5 de mamíferos, 2 de aves, 2 de peces, 1 de tunicados, 1 de anfibios, 3 de insectos, 1 de nematodos, 4 de microorganismos y 1 especie de arqueas (anexo I). Como se aprecia en el alineamiento del anexo 1 y en la tabla 1.7, el grado de conservación de las lisinas de SIPCNA es, en general, bastante alto.

Al inicio de este trabajo se había descrito la sumoilación de la lisina 164 (K164) de PCNA de *S. cerevisiae*, de algunos mamíferos y de *Xenopus laevis* (Hoegge *et al.*, 2002; Ulrich, 2009). Esta lisina está conservada en todas las secuencias de PCNA (Figura 1.3 y anexo I). El otro residuo de lisina que se sumoila en *S. cerevisiae*, la lisina 127 (K127, Hoegge *et al.*, 2002), sólo está presente en la secuencia de esta especie (Figura 1.4 y anexo I). En un trabajo publicado recientemente se detectó la sumoilación de varias lisinas PCNA de *A. thaliana*, entre las que no se incluye la K164. A partir del análisis de la posición que ocupan los residuos, los autores sugieren como

diana de la sumoilación la K254 de esta proteína (Strzalka *et al.*, 2012), un residuo que está muy conservado en todos los PCNA (Figura 1.4 y anexo I).

Para predecir que lisinas se enmarcan en dominios identificados como dianas de sumoilación se usó el programa SUMOsp 2.0 (Ren *et al.*, 2009) en las condiciones más astringentes. Este programa se basa en la búsqueda de secuencias consenso de sumoilación incluyendo aquellas dependientes de fosforilación. Los resultados indican que la lisina K254 de SIPCNA y sus homólogas en patata, arroz y humanos, están incluidas en una secuencia consenso de sumoilación (Tabla 1.6). Curiosamente el programa no identificó como sumoilable la lisina 164 en ninguna de las secuencias analizadas.

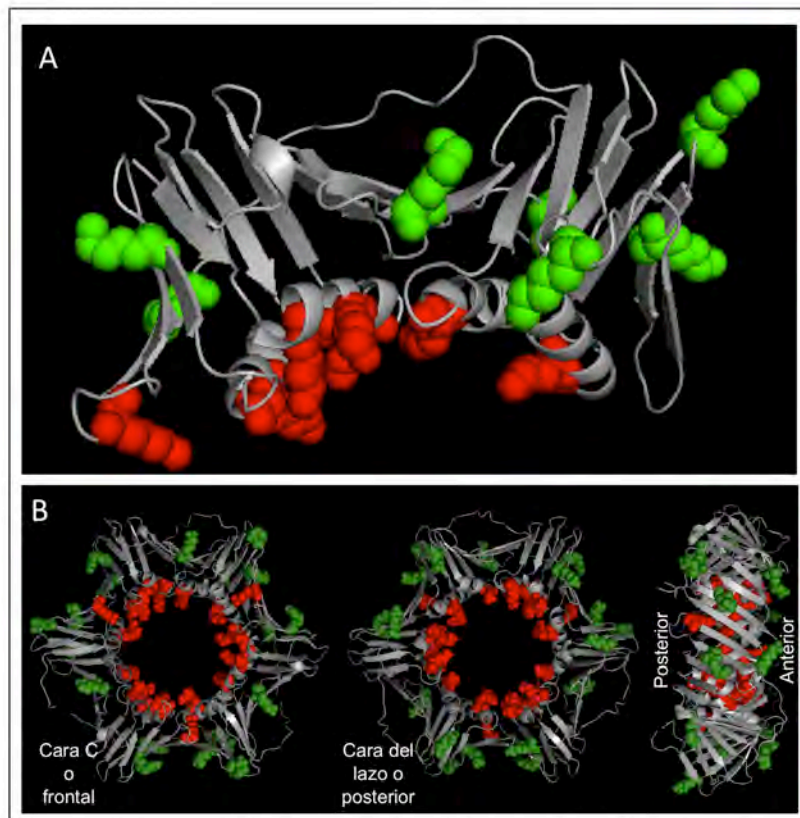


Figura 1.5: Representación de la estructura tridimensional de PCNA generada por MacPymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.) A) Predicción informática de la estructura tridimensional de un monómero de SIPCNA basada en la comparación de secuencia con el PCNA humano (Protein Data Bank 1AXC). Se han coloreado los residuos de lisina en el interior del anillo en rojo y los que están en el exterior en verde. B) Trímero de PCNA de *H. sapiens* en la que se han resaltado las lisinas situadas en el interior del anillo en rojo y las situadas en el exterior, en verde. De los 15 residuos coloreados, en humanos, 13 son lisinas y los otros dos (91 y 149) son argininas. En ninguno de los dos se muestra la lisina 263, ya que HsPCNA, mostrado en B y sobre el que se ha realizado la simulación de A, tiene tan sólo 261 aminoácidos.

Para identificar la posición que ocupan los residuos de lisina en la estructura tridimensional de PCNA de tomate, utilizamos un modelo 3D de un monómero de la proteína obtenido mediante modelización “*in silico*” a partir de la estructura del PCNA humano (db:1AXC). En la figura 1.4 A, sobre una imagen generada con MacPymol se muestran todas las lisinas de SIPCNA, indicando en verde aquellas que están situadas en el exterior del anillo y en rojo las que están en la zona interna por la que se enhebra el DNA o que quedan incluidas dentro de la estructura de la proteína. En la figura 1.5 B se muestra, sobre la estructura del trímero de PCNA de humanos (HsPCNA), la posición que ocupan 15 de las 16 lisinas de SIPCNA, ya que lisina 263 está localizada al final del extremo carboxilo en una zona que existe en el SIPCNA pero no en el HsPCNA.

En la tabla 1.7 se resumen las características de todas las lisinas de SIPCNA. Los resultados apuntan a las lisinas 164 y 254 como aquellos residuos con mayor probabilidad de ser sumoilados, ya que se ha descrito anteriormente su sumoilación en otros organismos, forman parte de dominios identificados como potenciales dianas de sumoilación, están localizados en el exterior del anillo aunque en caras opuestas (frontal y posterior) (Figura 1.5) y están conservadas en todos los PCNA analizados de eucariontes (ver anexo I) con la única excepción del PCNA de *Plasmodium falciparum* que no contiene un residuo de lisina en la posición 164. Adicionalmente a estas lisinas, se seleccionaron otras tres situadas en el exterior del anillo: (i) la lisina 168 por su localización cercana a la lisina 164 y por estar conservado en todos los PCNAs de plantas, mamíferos y en la mayoría de los animales; (ii) la lisina 190 situada en la cara del lazo de PCNA en una posición muy cercana a la lisina 164 y conservada en todas las secuencias de plantas y animales, excepto en *Anguilla japonica* y (iii) la lisina 91, que forma parte de una secuencia consenso de sumoilación en *C. elegans*, se localiza en la cara del lazo y esta conservada en la secuencia de todos los PCNA de plantas y en algunos animales y microorganismos eucarióticos. En la figura 1.6 se muestran la posición que ocupan las lisinas seleccionadas en la estructura tridimensional de PCNA.

Tabla 1.7. Lisinas de SIPCNA.

SIPCNA ¹	Sumoil. ²	Seq. consen. ³	Localización ⁴		Superficie ⁵	Grado de conservación ⁶	Selecc. ⁷
			Interior	Exterior			
K13	-	-	Sí	-	-	****	-
K14	-	-	Sí	-	-	***	-
K20	-	-	Sí	-	-	***	-
K77	-	-	Sí	-	-	***	-
K80	-	-	Sí	-	-	**	-
K91	-	-	-	Posterior	Sí	*	Sí
K110	-	-	Sí	-	-	**	-
K117	-	-	Sí	-	-	***	-
K149	-	-	Sí	-	-	*	-
K164	Sí	-	-	Posterior	Sí	****	Sí
K168	-	-	-	Posterior	Sí	**	Sí
K190	-	-	-	Posterior	Sí	**	Sí
K217	-	-	Sí	-	-	****	-
K240	-	-	-	Posterior	-	**	-
K254	-	Sí	-	Frontal	Sí	***	Sí
K263	-	-	-	Frontal	-	-	-

Resumen del proceso de selección de las lisinas de SIPCNA candidatas a ser mutadas. 1) Lisinas de PCNA de *S. lycopersicum*. 2) Lisinas sumoiladas en *S. cerevisiae*. 3) Lisinas que se encuentran en una secuencia diana consenso de sumoilación. 4) Identifica a las lisinas que se encuentran en la parte interna y las que se encuentran en la parte externa del anillo que forma PCNA. En estas últimas se diferencian las que están en la cara frontal o en la cara posterior del PCNA. 5) Define si las lisinas están en la parte superficial o en la parte interna de la estructura de PCNA. 6) Basado en el alineamiento del anexo 1. 4 estrellas para las conservadas en todas las especies comparadas, 3 para las conservadas entre los eucariotas, 2 para las conservadas entre los eucariotas superiores y 1 para las conservadas sólo entre plantas. 7) Lisinas seleccionadas para ser mutadas y analizadas.

Construcción de mutantes y ensayos de sumoilación.

Utilizando como molde el plásmido pET28b-SIPCNA (Sánchez-Durán *et al.*, 2011) se generaron mutantes puntuales en los residuos K164, K168 y K254, remplazando las lisinas por alaninas (plásmidos pETSIPCNAK164A, pETSIPCNAK168A y pETSIPCNAK254A). A continuación, se generaron los mutantes dobles K164A/K168A y K164A/K254A (plásmidos pETSIPCNAK164/168A y pETSIPCNAK164/254A) y el triple mutante K164A/K168A/K254A (plásmido pETSIPCNAK164/168/254A) utilizando como molde los plásmidos que contenían los mutantes dobles de SIPCNA.

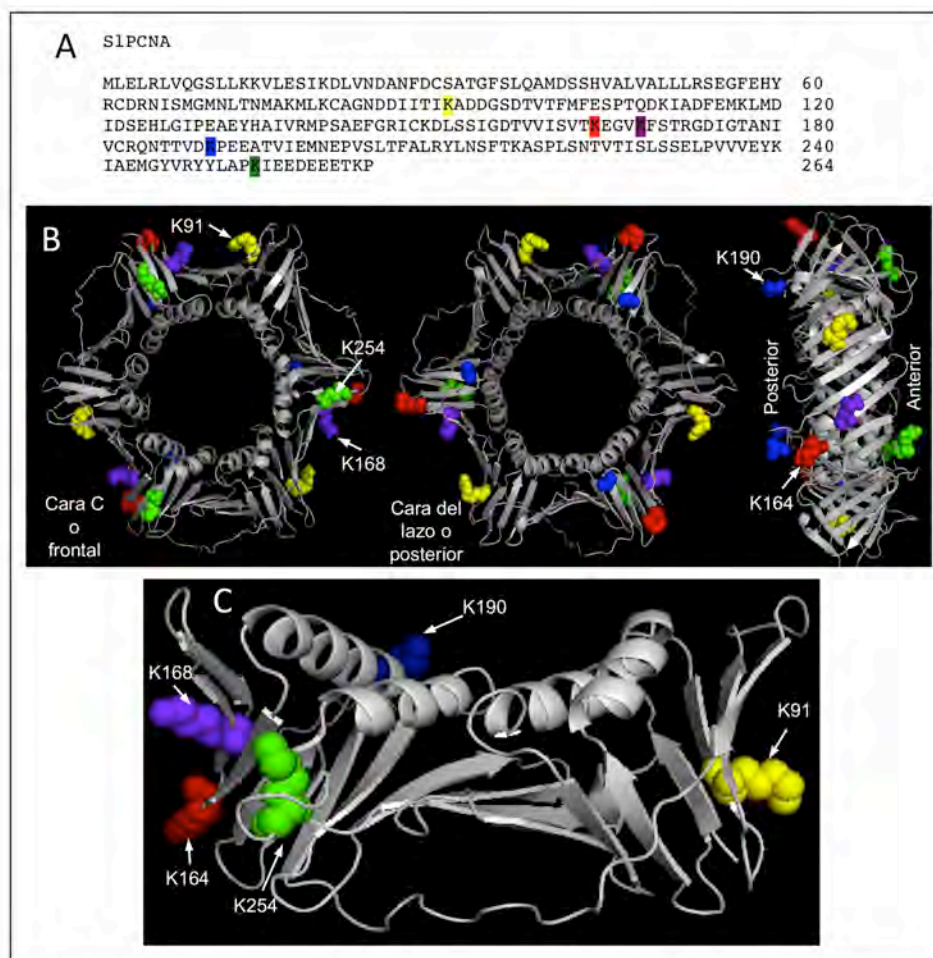


Figura 1.6: Lisinas seleccionadas. A) Secuencia aminoacídica del PCNA de *S. lycopersicum* en la que se han resaltado en amarillo las lisinas seleccionadas para ser mutadas. B) Representación de la estructura tridimensional de un trímero de PCNA de *H. sapiens* (Protein Data Bank 1AXC) en la que se han resaltado las lisinas mutadas en este trabajo: K91 en amarillo, K164 en rojo, K168 en morado, K190 en azul y K254 en verde. C) Predicción de la estructura tridimensional del monómero de S1PCNA a partir de los datos de secuencia y estructura de PCNA humano.

Los plásmidos que expresan la proteína silvestre o las versiones mutantes se utilizaron en un ensayo de sumoilación en *E. coli* con el sistema descrito en Mencía *et al.* 2004. Este sistema de sumoilación consiste en tres plásmidos (Figura 1.7 A) que se introducen en *E. coli*, para co-expresar:

- (i) SUMO1 de *H. sapiens*, desde pRHSUMO,
- (ii) las enzimas E1 de *H. sapiens* (SAE1 y SAE2) y E2 de *Mus musculus* (SCE1), desde pBADE12 y
- (iii) la proteína diana que se quiere sumoilar, desde pET28b.

Todos los genes se expresan desde promotores T7, inducibles por IPTG, lo que permite un control regulado y sincronizado del sistema de sumoilación y de la proteína diana.

En concordancia con los resultados descritos en la tesis doctoral de Sánchez-Durán (2011), el ensayo de sumoilación en *E. coli*, genera SIPCNA sumoilado en cantidades suficientes para ser detectado en un western-blot usando el anticuerpo anti-PCNA (Figura 1.7 B). En la hibridación, se detectó una doble banda de peso molecular aparente de 55KDa, que se identificó como SIPCNA mono-sumoilado por su tamaño relativo en comparación con el SIPCNA sin modificar y por su ausencia en el extracto en el que se expresaba SIPCNA sin el sistema de sumoilación. La diferencia en peso molecular aparente detectada entre las dos bandas podría deberse a la sumoilación de lisinas diferentes de SIPCNA, de forma similar a lo que ocurre con el PCNA de levaduras en el que se ha demostrado que la proteína sumoilada en la K127 o en la K164 muestran pesos moleculares aparentes diferentes cuando se separan mediante electroforesis SDS-PAGE (Hoege *et al.*, 2002; Pfander *et al.*, 2005). La formación de una doble banda en ensayos de sumoilación en bacterias se ha descrito también para PCNA de *A. thaliana*, aunque en este caso los autores no identificaron su naturaleza (Strzalka *et al.*, 2012). Adicionalmente, se detecta una banda de menor intensidad y un peso molecular aparente de 70KDa, que esta ausente en la calle en la que no se expresa el sistema de sumoilación y que podría corresponder a PCNA al que se han unido dos moléculas de SUMO.

Cuando se ensayó el mutante K164A de SIPCNA, se detectó la acumulación una única banda de 55KDa que se corresponde con la de menor peso molecular aparente que aparece al sumoilar el SIPCNA silvestre (Figura 1.7 B). La introducción de una mutación adicional en la lisina 168, no altera el patrón de sumoilación del mutante simple K164 (comparar el doble mutante K164A/K168A con el mutante simple K164A). Por el contrario, en el extracto obtenido al expresar el doble mutante K164A/K254A, en el que tampoco se detecta la banda superior, se aprecia una reducción de intensidad de la banda inferior comparada con la que se

produce con el mutante simple K164A (Figura 1.7B). Las bandas detectadas al expresar el mutante triple de PCNA K164A/K168A/K254A son las mismas que las observadas en la calle que contiene el extracto del doble mutante K164/K254 (Figura 1.6B).

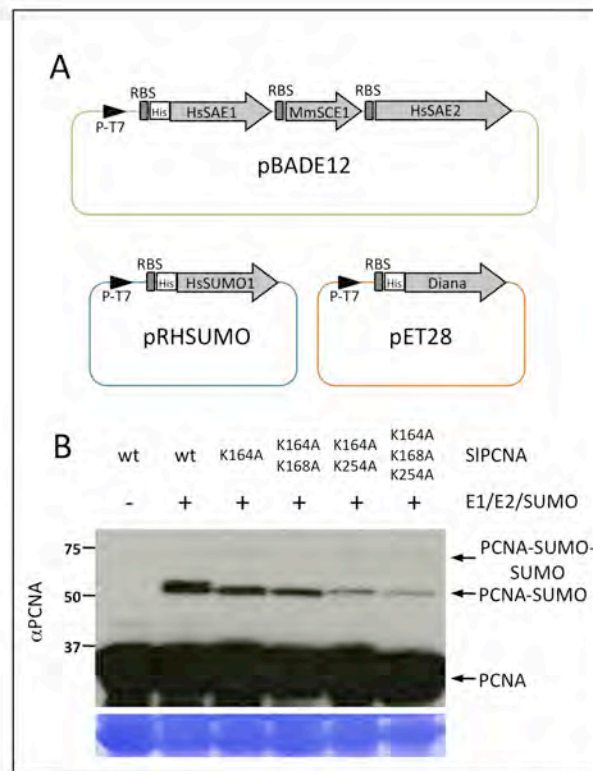


Figura 1.7: Ensayo de sumoilación de los mutantes de PCNA. (A) La proteína silvestre y los mutantes de SIPCNA se expresaron desde pET28b en una *E. coli* NCM631 transformada con los plásmidos pBADE12 y pRHSUMO que expresan las proteínas E1, E2 y SUMO (Mencía *et al.*, 2004). (B) Western blot de extractos celulares obtenidos de células transformadas con los tres plásmidos hibridados con un anticuerpo contra PCNA (α PCNA). Como control se incluye un extracto de células transformadas sólo con pET28SIPCNA que expresa SIPCNA silvestre, pero sin los plásmidos del sistema de sumoilación (primera calle a la izquierda). Se indican las bandas correspondientes a SIPCNA: 29,2KDa, SIPCNA-SUMO: 40,7KDa, SIPCNA-SUMO-SUMO 52,2KDa. Los números a la izquierda del western corresponden al tamaño (KDa) del marcador de peso molecular utilizado.

Estos resultados indican que la doble banda de 55KDa que se detecta al expresar SIPCNA silvestre podría ser el producto de la unión de una molécula de SUMO a diferentes lisinas de la proteína. De acuerdo con los resultados, la banda que muestra una masa aparente mayor podría ser el producto de la sumoilación de K164, mientras que la inferior correspondería,

al menos parcialmente, a la sumoilación de K254. Para confirmar este resultado, ensayamos la sumoilación del mutante simple de la lisina 254 de SIPCNA (Figura 1.8). Al igual que en el experimento previo, la banda de mayor peso molecular aparente acumulada al expresar SIPCNA silvestre, desaparece al ensayar el mutante simple K164A o el doble K164A/K168A. Por el contrario, cuando se expresa el mutante K254A se detecta una reducción con respecto a PCNA silvestre, de la señal correspondiente a la banda de menor peso molecular aparente, manteniéndose la de mayor peso. Cuando se expresa el doble mutante K164A/K254A se observa la desaparición completa de la banda superior y una disminución en la intensidad de la banda inferior similar a la detectada al expresar el mutante simple K254A. Estos resultados confirmaron que parte de la acumulación de la banda de menor peso molecular requiere la presencia de la lisina 254.

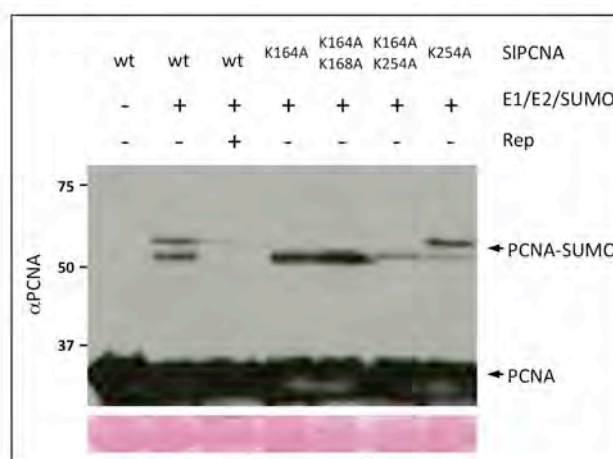


Figura 1.8: Ensayo de sumoilación de los mutantes de PCNA. Western blot de los extractos celulares obtenidos de células de *E. coli* NCM631 transformadas con los plásmidos que expresan SIPCNA, sus mutantes y el sistema de sumoilación, hibridados con un anticuerpo contra PCNA (α PCNA). Como control se incluye un extracto de células transformadas sólo con pET28SIPCNA que expresa SIPCNA silvestre, pero sin los plásmidos del sistema de sumoilación (primera calle a la izquierda). Se indican las bandas correspondientes a SIPCNA: 29,2KDa y SIPCNA-SUMO: 40,7KDa. Los números a la izquierda del western corresponden al tamaño (KDa) del marcador de peso molecular utilizado.

Para identificar qué otros residuos de lisina además de K254 son necesarios para la acumulación de la banda de menor peso molecular correspondiente a la sumoilación de SIPCNA, se decidió mutar otras dos

lisinas (K91 y K190) seleccionadas en el análisis previo como residuos susceptibles de ser sumoilados (Tabla 1.8). Cuando se realizó una hibridación western con el mutante K91A, no se encontró ninguna diferencia con respecto al extracto obtenido al expresar la proteína silvestre (Figura 1.9) lo que sugiere que esta lisina no es necesaria para la sumoilación de SIPCNA. Este resultado se confirmó al comprobar que las bandas de PCNA sumoilado del triple mutante K91A/K164A/K254A son las mismas que las obtenidas con el doble mutante K164A/K254A. Un resultado similar se obtuvo al analizar los ensayos de sumoilación sobre un mutante simple K190 y el triple mutante K164A/K190A/K254A, indicando que la lisina 190 tampoco es necesaria para la sumoilación de SIPCNA (Nota: la ligera disminución en la intensidad de la banda inferior observada en la calle correspondientes a la expresión del mutante simple K190A no se confirmó en otros ensayos de sumoilación realizados posteriormente).

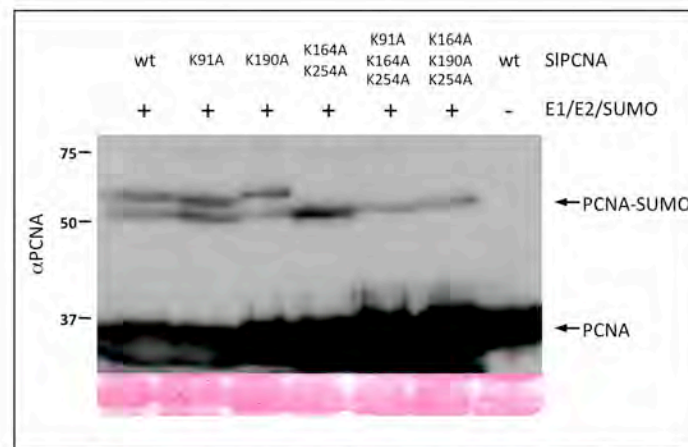


Figura 1.9: Ensayo de sumoilación de los mutantes de PCNA. Western blot de los extractos celulares obtenidos de células de *E. coli* NCM631 transformadas con los plásmidos que expresan SIPCNA, sus mutantes y el sistema de sumoilación, hibridados con un anticuerpo contra PCNA (α PCNA). Como control se incluye un extracto de células transformadas sólo con pET28SIPCNA que expresa SIPCNA silvestre, pero sin los plásmidos del sistema de sumoilación (primera calle a la izquierda). Se indican las bandas correspondientes a SIPCNA: 29,2KDa y SIPCNA-SUMO: 40,7KDa. Los números a la izquierda del western corresponden al tamaño (KDa) del marcador de peso molecular utilizado.

1.2.2. Determinación y caracterización de la interferencia de Rep en la sumoilación de SIPCNA.

Datos previos (Sánchez-Durán *et al.*, 2011) indicaban que PCNA podría ser una de las proteínas de la planta cuya sumoilación se vería alterada por la presencia de la proteína Rep de begomovirus. Para confirmar este resultado, obtenido sobreexpresando SIPCNA, Rep y el sistema de sumoilación en *E. coli*, realizamos un ensayo de sumoilación de SIPCNA en presencia y ausencia de la proteína viral. El resultado (Figura 1.8) muestra que la expresión de Rep conlleva la desaparición de la banda inferior y una fuerte disminución de la intensidad de la banda superior, lo que sugiere Rep está bloqueando la sumoilación, al menos, de las lisinas 164 y 254.

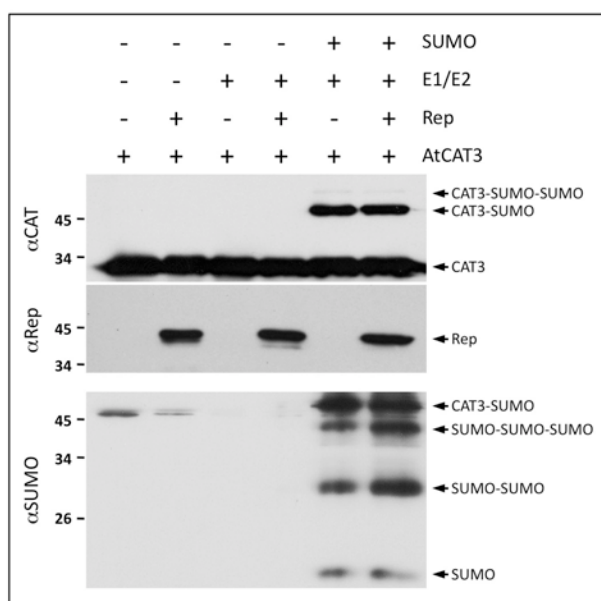


Figura 1.10: Interferencia de Rep con la sumoilación de la catalasa. Western blot de los extractos celulares obtenidos de células de *E. coli* NCM631 transformadas con los plásmidos que expresan un fragmento de la catalasa 3 de *A. thaliana*, en ausencia y presencia de Rep. Las membranas fueron hibridadas con anticuerpos contra la catalasa (α CAT) Rep (α Rep) y SUMO (α SUMO).

Considerando que la proteína Rep de los begomovirus interacciona tanto con SCE1 (Castillo *et al.*, 2004; Sánchez-Durán *et al.*, 2011) como con PCNA (Castillo *et al.*, 2003; Bagewadi *et al.*, 2004), la interferencia observada en la sumoilación de PCNA al expresar Rep podría deberse a la

inhibición de SCE1 o la interferencia estérica producido por la unión de Rep a PCNA.

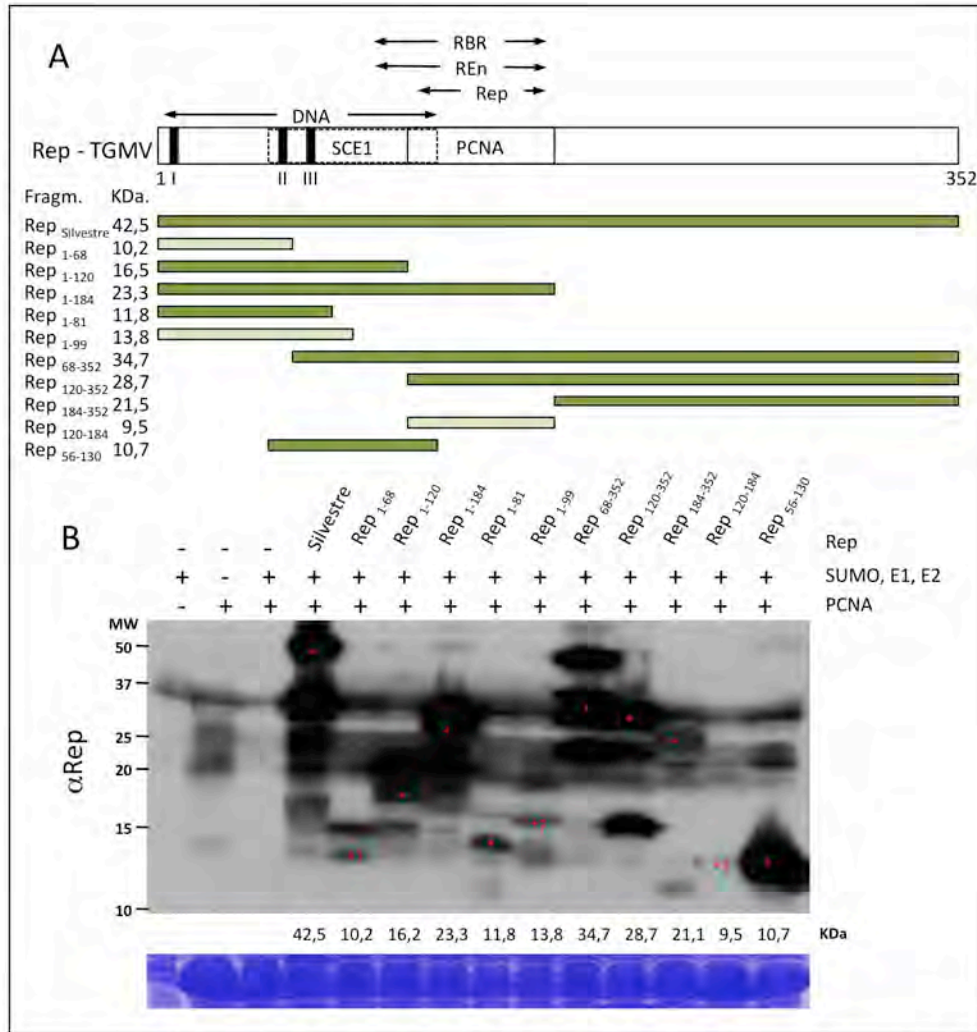


Figura 1.11: Deleciones de Rep. A) Esquema de Rep de TGMV en el que se representan los dominios de interacción con la Región Intergénica TGMV: DNA (residuos 1-130), consigo misma: AL1 (residuos 121-181), o con otras proteínas virales o de la planta: SCE1 (residuos 56-130) PCNA (120-184), RBR (residuos 101-180) y REn (residuos 101-180). Se representan también los tres dominios implicados en el inicio de la replicación del DNA de TGMV: I, II y III. Bajo dicho esquema se representan en verde las deleciones de Rep generadas en este trabajo, en un tono más claro las que presentaron una expresión más baja o no detectada. B) Western de la prueba de expresión de Rep y sus deleciones en *E. coli*, con PCNA y el sistema de sumoilación in vitro (Mencía *et al.*, 2004), (α Rep 1:10.000). Marcadas con un asterisco rojo las bandas que identificamos como resultado de la expresión de Rep y sus deleciones y con un asterisco rojo con interrogación las de una expresión más baja o no detectada. Bajo cada calle, la masa teórica en KDa de las proteínas expresadas. En el panel inferior tinción Coomassie de la banda correspondiente a PCNA.

Los resultados obtenidos por Sánchez-Durán al expresar mutantes puntuales de Rep que han perdido su capacidad de interactuar con SCE1 (ver Anexo II) (Sánchez-Durán *et al.*, 2011), sugieren que la interacción

entre estas dos proteínas no es responsable de la reducción en la sumoilación de PCNA.

Para confirmar dicha observación, llevamos a cabo un ensayo de sumoilación pero utilizando como diana de sumoilación la Catalasa 3 de *A. thaliana* (Castano-Miquel *et al.*, 2011) en lugar de PCNA. En el caso de que la reducción en la sumoilación de PCNA se debiera a la inactivación de SCE1, esperaríamos que la expresión de la proteína viral afectase también a la sumoilación de cualquier otra proteína. Por el contrario, si fuera la interacción Rep-PCNA la responsable de la interferencia, la expresión de Rep no debería alterar la sumoilación de proteínas con las que no interacciona. La figura 1.10 muestra los resultados obtenidos. La expresión de Rep no interfiere en la sumoilación de la Catalasa 3 de *A. thaliana*, lo que refuerza la hipótesis de una interferencia específica de Rep sobre la sumoilación de PCNA y apunta a la interacción Rep-PCNA como la causa en la reducción de la sumoilación de PCNA. La ausencia de un cambio general del patrón de sumoilación de la planta al expresar Rep (Figura 1.25A) confirma el efecto específico de la proteína viral sobre la sumoilación de PCNA.

1.2.3 Identificación de los dominios de Rep implicados en la interferencia.

Para identificar el/los dominios de Rep implicados en la interferencia con la sumoilación de PCNA, llevamos a cabo ensayos de sumoilación utilizando versiones truncadas de Rep. Se generaron diez construcciones en plásmidos pET28 que expresan, desde el mismo promotor, la proteína SIPCNA completa y cada una de las versiones truncadas de Rep. En la figura 1.11, se muestra un esquema de las proteínas truncadas en comparación con Rep completa, así como los pesos moleculares esperados para cada una de ellas. Antes de llevar a cabo los ensayos de interferencia de la sumoilación de PCNA, comprobamos la expresión de las proteínas truncadas en *E. coli*.

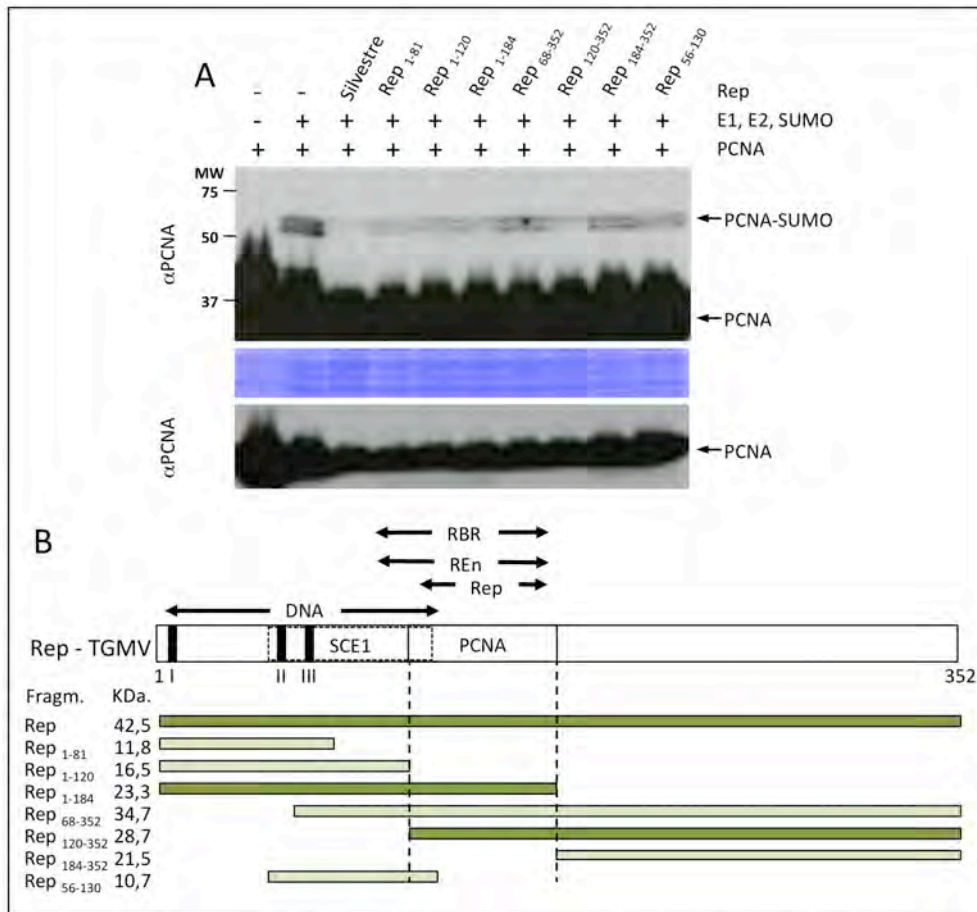


Figura 1.12: Ensayo de interferencia en la sumoilación de PCNA. A) Hibridación Western de las sobreexpresiones en *E. coli* de SIPCNA junto con el sistema de sumoilación y Rep o sus deleciones (α PCNA 1:2.000). En el panel intermedio, tinción Coomassie (control de carga). En el panel inferior exposición más corta de la banda correspondiente a PCNA sin sumoilar para poder comparar los niveles de expresión. SIPCNA: 29,2KDa; SIPCNA-HsSUMO: 40,7KDa. B) Esquema de Rep de TGMV en el que se representan los dominios de interacción descritos para RBR, REn, AL1, DNA, SCE1, Rep y PCNA. Bajo dicho esquema se representan las deleciones de Rep probadas en este ensayo. En verde oscuro los fragmentos que han disminuido la cantidad de PCNA sumoilado. En tono más claro los fragmentos que no han modificado la cantidad de PCNA sumoilado. En línea discontinua se acota el fragmento de Rep que interfiere con la sumoilación de PCNA.

La figura 1.11 B muestra un western blot obtenido al hibridar los extractos proteínicos con un anticuerpo policlonal anti-Rep. Se detectó expresión de las proteínas Rep truncadas en todos los casos, excepto en los extractos obtenidos de células transformadas con los plásmidos que expresan las proteínas REP₁₋₆₈, REP₁₋₉₉ y REP₁₂₀₋₁₈₄, por lo que se descartaron estas construcciones para los análisis de sumoilación posteriores.

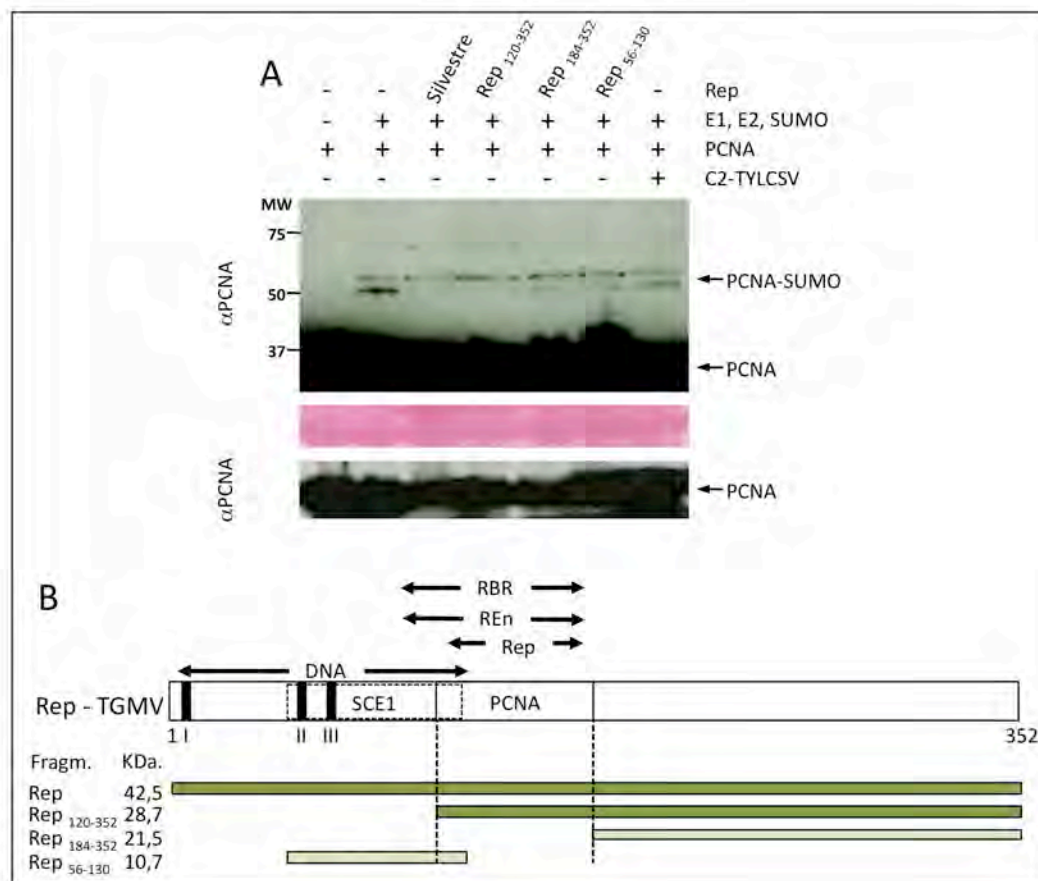


Figura 1.13: Ensayo de interferencia en la sumoilación de PCNA. A) Hibridación Western de las sobreexpresiones en *E. coli* de PCNA junto con el sistema de sumoilación y Rep, sus deleciones o C2 de TYLCSV. (α PCNA 1:2.000). SIPCNA: 29,2KDa; SIPCNA-HsSUMO: 40,7KDa. En el panel intermedio, tinción Poanceau de la membrana (control de carga). En el panel inferior exposición más corta de la banda correspondiente a PCNA sin sumoilar para poder comparar los niveles de expresión. B) Esquema de Rep de TGMV en el que se representan los dominios de interacción descritos para RBR, REn, Rep, DNA, SCE1 y PCNA. Bajo dicho esquema se representan las deleciones de Rep usadas en este ensayo. En línea discontinua se acota el fragmento de Rep que interfiere con la sumoilación de PCNA.

En la figura 1.12A se muestran los patrones de sumoilación de SIPCNA, en ausencia o en presencia de la proteína Rep completa o de las siete proteínas truncadas cuya expresión se había confirmado. Como en los casos anteriores, la expresión de Rep completa interfiere en la sumoilación de SIPCNA observándose una reducción severa de las dos bandas que se generan en los ensayos de sumoilación, con una mayor reducción en la banda correspondiente a la sumoilación de la lisina 254 (la de menor peso molecular aparente). La expresión de las proteínas truncadas produce, también en todos los casos, una disminución en la señal proveniente de las

dos bandas sumoiladas de SIPCNA comparada con las que se producen en ausencia de Rep.

Esta reducción es más patente en los extractos en los que se han expresado las Rep₁₋₁₈₄ y Rep₁₂₀₋₃₅₂, en los que se detecta, al igual que ocurría con la proteína completa, una reducción adicional en la acumulación de la banda correspondiente a la sumoilación de la lisina 254. Resultados similares se obtuvieron en otros dos experimentos independientes en los que se ensayaron las siete proteínas truncadas de Rep, lo que sugiere que el dominio que comprende los aminoácidos del 120 al 180 es el responsable de este efecto. Para confirmar este resultado, realizamos un ensayo de sumoilación con la versión truncada Rep que contienen el dominio mencionado (Rep₁₂₀₋₃₅₂) y dos que expresan las secuencias flanqueantes y cuyo nivel de acumulación es similar (Rep₁₈₄₋₃₅₂ y Rep₅₆₋₁₃₀; ver figura 1.11).

Como control adicional, para excluir la posibilidad que la reducción observada en la sumoilación de SIPCNA al expresar Rep se deba a un efecto inespecífico debido a la sobreexpresión de una proteína desde el mismo plásmido, incluimos un ensayo sobreexpresando la proteína C2 de TYLCSV. Los resultados que se muestran en la figura 1.13, indican que la expresión de C2 produce una reducción en la acumulación de SIPCNA sumoilado similar a la expresar Rep₁₈₄₋₃₅₂ y Rep₅₆₋₁₃₀. Por el contrario, la expresión de Rep₁₂₀₋₃₅₂ impide la acumulación del producto de sumoilación en la lisina 254 de SIPCNA, que sí se acumula en los otros extractos ensayados (se obtuvieron los mismo resultados en otros dos experimentos independientes).

1.2.4 Interferencia de la sumoilación de PCNA en planta.

Ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*.

Una vez confirmado que la expresión de Rep interfiere con la sumoilación de PCNA de tomate en *E. coli*, se procedió a confirmar la interferencia “*in planta*” sobreexpresando SIPCNA en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, se agroinfiltraron cultivos de *Agrobacterium*

tumefaciens que contenían plásmidos para la expresión de SIPCNA (pBIN-SIPCNA) y/o Rep (pBIN-Rep). Como control, se utilizaron cultivos transformados con el vector binario vacío (pBINX). La expresión de SIPCNA y Rep se determinó mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-PCNA o anti-Rep. La figura 1.14 muestra el resultado de una de las hibridaciones realizadas.

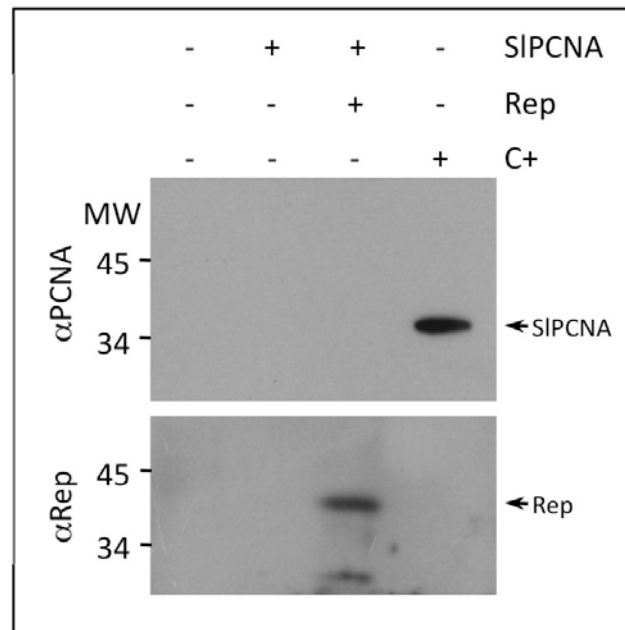


Figura 1.14: Expresión transitoria de SIPCNA en *N. benthamiana*. Western blot de los extractos de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con suspensiones de *Agrobacterium* transformadas con plásmidos binarios que expresan SIPCNA o Rep. Se usó como control negativo extracto de una hoja sin infiltrar y como control positivo una sobreexpresión de SIPCNA en *E. coli*. α PCNA: 1:2.000. α Rep: 1:1.000. Se indican las bandas correspondientes a Rep (40,3KDa) y SIPCNA (29,2 KDa).

En los extractos provenientes de tejidos agroinfiltrados con el vector vacío no se detectó hibridación, lo que podría deberse a la falta de expresión de PCNA de *N. benthamiana* (NbPCNA), a la menor afinidad del anticuerpo por el PCNA de esta especie o a una mezcla de ambos factores.

Un resultado similar se obtuvo al hibridar el extracto de tejidos agroinfiltrados con la construcción que expresa SIPCNA con el anticuerpo anti-PCNA (Figura 1.14). Que SIPCNA se detecte en extractos de *E. coli*, pero no en los de *N. benthamiana*, puede deberse a que en los ensayos de expresión transitoria en planta no se alcancen los niveles de acumulación

necesarios para la detección. Ninguno de los ensayos adicionales que se realizaron para incrementar la acumulación de SIPCNA permitió la detección de SIPCNA (utilización de supresores de silenciamiento -P19 de *Tomato bushy stunt virus*, (Voinnet *et al.*, 1998) - o de versiones truncadas de SIPCNA para evitar el efecto tóxico observado al expresar la proteína completa en levaduras -Araceli Castillo, comunicación personal.

Expresión de proteínas de fusión.

Como estrategia alternativa para detectar el SIPCNA en ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* se generaron construcciones para la producción de proteínas de fusión entre SIPCNA y GFP. Mediante clonación de la fase abierta de lectura completa de SIPCNA en los plásmidos pBINX'GFPStop y pBINX'GFP(ORF) (Natasa Hùlak, no publicados) se generaron plásmidos binarios para expresar GFP fusionada al extremo amino terminal (pBIN-GFP-PCNA) o al carboxilo terminal (pBIN-PCNA-GFP) de SIPCNA bajo el control del promotor 35S de CaMV (*Cauliflower mosaic virus*). La expresión de las proteínas se determinó mediante western blot y observación con el microscopio confocal de los tejidos agroinfiltrados. Como control se agroinfiltraron hojas con una construcción (pBINGFP) que expresa GFP desde el mismo promotor. A los cuatro días de la infiltración se detectó expresión de GFP principalmente en los núcleos de las células de los tejidos infiltrados con las proteínas fusionadas, mientras que en aquellos agroinfiltrados con pBINGFP se detectó fluorescencia verde tanto en el núcleo como en el citoplasma (figura 1.15A). La localización subcelular de GFP-PCNA y PCNA-GFP concuerdan con la descrita para PCNA de humanos (Russell y Pope, 1976). Al hibridar la membrana del western blot con el anticuerpo anti-PCNA se detectó una única banda con el peso molecular esperado en los tejidos agroinfiltrados con GFP-PCNA, pero no en los aquellos infiltrados con la construcción para expresar PCNA-GFP (Figura 1.15B). Al igual que en el experimento previo, no se detectó ninguna banda en los extractos vegetales, al hibridar la membrana con el anticuerpo anti-PCNA. La ausencia de bandas adicionales

en el extracto de GFP-PCNA, indica que no es posible detectar la sumoilación de la proteína fusionada en estos ensayos.

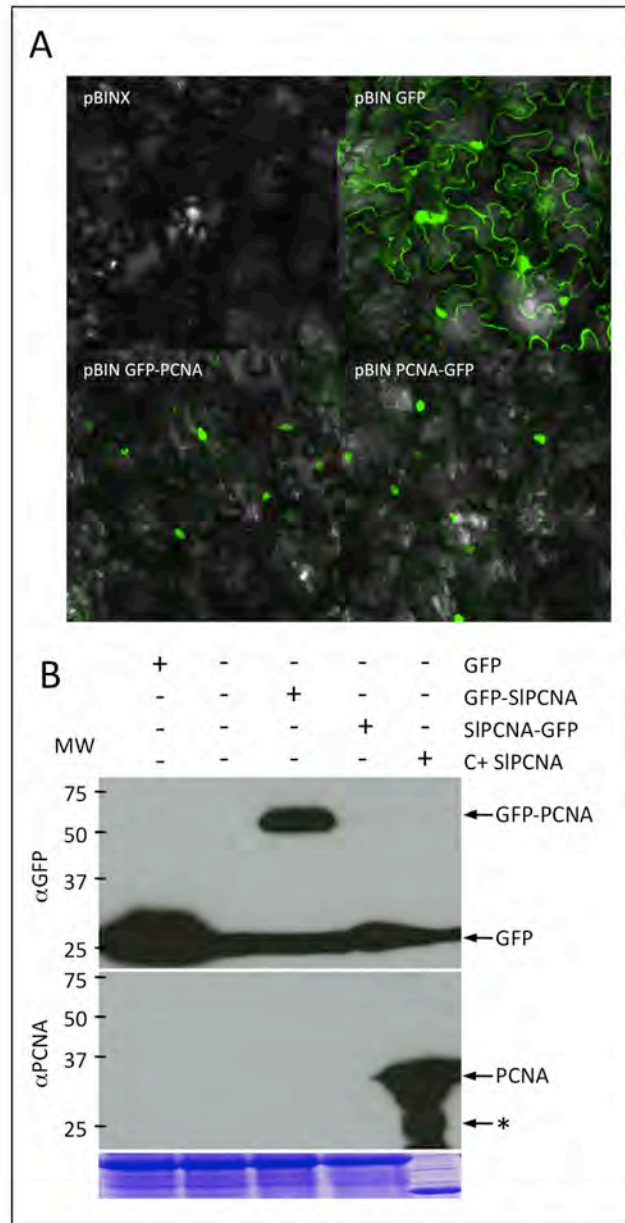


Figura 1.15: Fusiones de SIPCNA con GFP. A) Imágenes de microscopía confocal de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con pBINX (vector vacío) como control negativo, pBIN-GFP como control positivo, pBIN-GFP-PCNA, que expresa PCNA con la GFP fusionada en el extremo amino-terminal y pBIN-PCNA-GFP, que expresa PCNA con la GFP fusionada en el extremo carboxilo terminal. B) Hibridaciones western de extractos proteicos de las hojas infiltradas. En el panel superior hibridada con α GFP (1:5000), en el intermedio con α PCNA (1:2000) y en el inferior una tinción Coomassie como control de carga. GFP: 26,8KDa; GFP-PCNA: 56,0KDa. El control positivo es SIPCNA expresado en *E. coli*.

Para incrementar la eficiencia en la sumoilación, se llevaron a cabo nuevos experimentos co-agroinfiltrando pBIN-PCNA-GFP y plásmidos binarios para expresar NbSCE1 y NbSUMO1. En todos los ensayos se detecto una sola banda del tamaño esperado para GFP-PCNA, pero en ningún caso se detectó la presencia de bandas de mayor peso molecular que pudieran corresponder a PCNA sumoilado (Figura 1.16).

La cantidad de proteína sumoilada acumulada en un tejido puede ser uno de los factores limitantes para su detección, ya que el porcentaje de la proteína modificada no supera en muchas ocasiones el 1% de la proteína total. En el caso de PCNA-GFP, la sumoilación de PCNA debería detectarse por la aparición de una banda de 66,9 KDa. Ante la posibilidad de que la fusión de GFP pudiese interferir con la sumoilación de SIPCNA y de que, en las condiciones de separación utilizadas, la banda PCNA-GFP sumoilado podría quedar enmascarada por la señal proveniente de la proteína no sumoilada de 56 KDa, se generaron construcciones para expresar SIPCNA fusionado a otro epítipo más pequeño como FLAG. De esta forma se logra una mejor separación electroforética de las formas sumoiladas (42.9 KDa) y no sumoiladas (32 KDa) evitándose el potencial enmascaramiento de la señal de la primera por la proveniente de la segunda.

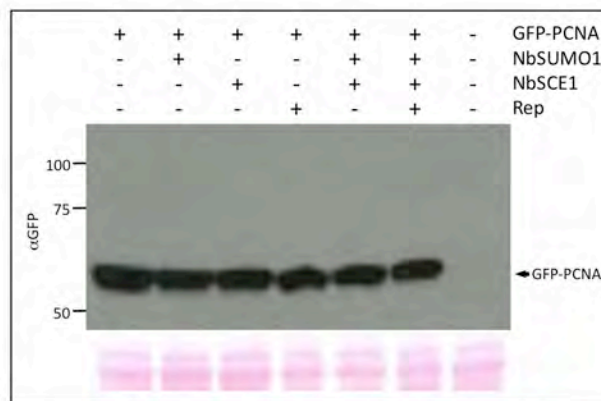


Figura 1.16: Coexpresión en hojas de *N. benthamiana* de GFP-PCNA con SCE1 y/o SUMO de *N. benthamiana* y/o Rep de TGMV. En el panel superior hibridación western de las hojas infiltradas (α GFP 1:5000), y en el inferior una tinción Ponceau como control de carga. En cada calle se indica si se utilizaron construcciones para la expresión de GFP-PCNA, NbSUMO, NbSCE1 o Rep. Los pesos moleculares esperados son: GFP-PCNA: 56,0KDa; SUMO-GFP-PCNA: 66,9KDa.

Para ello, se clonó SIPCNA en pJawohl para obtener el plásmido pJFLAG-PCNA que permite la expresión de la fusión FLAG-PCNA. Para determinar si se expresaba la proteína de fusión se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con pJFLAG-PCNA. Como control se agroinfiltraron hojas con el vector vacío (pBINX). Cuatro días después de la infiltración, se extrajeron las proteínas de las zonas agroinfiltradas y se determinó la expresión de FLAG-PCNA mediante un western blot utilizando anticuerpos anti-Flag. Como se aprecia en la figura 1.17, en los extractos provenientes de plantas agroinfiltradas con pJFLAG-PCNA se detectó una banda del peso molecular esperado para la proteína de fusión.

También se detectaron otras bandas de mayor peso molecular aparente que podrían corresponder a FLAG-PCNA sumoilado. Para comprobar la identidad de estas bandas se llevó a cabo la purificación de FLAG-PCNA mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina con anticuerpos anti-FLAG. En la figura 1.17 B se muestra el resultado obtenido al hibridar extracto crudo, una muestra del último lavado y la fracción eluida de la columna, con anticuerpos anti-FLAG y anti-SUMO. Al hibridar con un anticuerpo contra FLAG, se detectó en los eluidos provenientes de las muestras en las que se expresó FLAG-PCNA una banda muy intensa del tamaño esperado para la proteína no modificada, que no aparece en los extractos control. Adicionalmente se detectaron dos bandas de mayor tamaño, una de las cuales estaba presente también en los extractos control, mientras que la otra con un peso molecular elevado (de más de 75 KDa) sólo se detectó en las muestras provenientes de la expresión de FLAG-PCNA. Cuando se hibridó la membrana con anti-SUMO aparecieron tres bandas que no corresponden a sumoilación de PCNA-FLAG ya que están presentes en la muestra agroinfiltrada con el plásmido vacío.

En los ensayos que se muestran en las figuras 1.16 y 1.17 con GFP-PCNA y FLAG-PCNA, se incluyeron muestras en las que también se expresaba la proteína Rep de TGMV, con el fin de comprobar si *in planta* se detectaba interferencia en la sumoilación de PCNA. La no detección de

sumoilación de PCNA en los extractos en los que no se expresa Rep nos impidió determinar el efecto de la proteína viral.

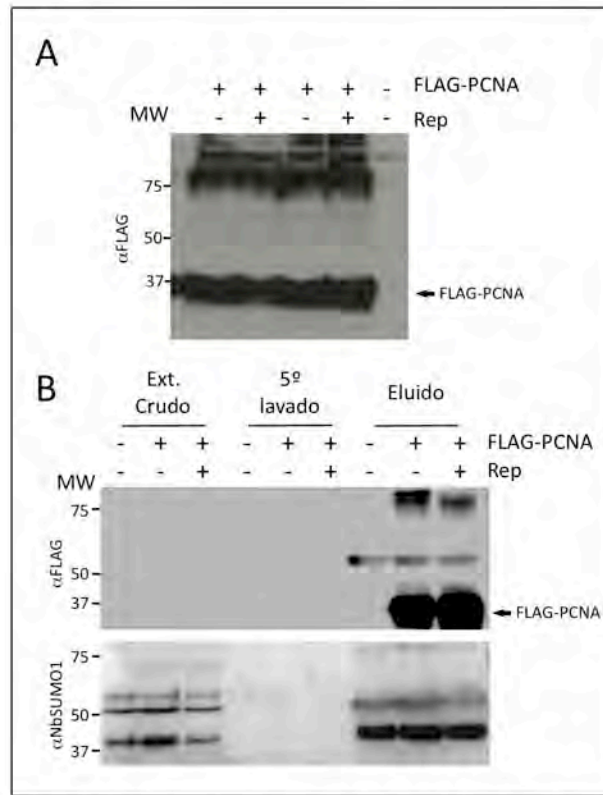


Figura 1.17: Purificación de Flag-PCNA. A) Tras agroinfiltrar las construcciones, las *N. benthamiana* se mantuvieron tres días en condiciones óptimas para la sobreexpresión (22°C, 16h de luz y 8h de oscuridad), se recortaron las zonas infiltradas y se maceraron para producir un extracto crudo que se analizó por Western blot para comprobar la expresión de las fusiones Flag-PCNA. B) De este extracto se purificó Flag-PCNA usando una resina unida a anticuerpos contra Flag. αFlag (1:100); αNbSUMO (1:1000). SUMO-Flag-PCNA: 42,9KDa; Flag-PCNA: 32,0KDa.

1.2.5 Sistema de *Arabidopsis in vitro*.

Ante la imposibilidad de detectar la sumoilación de PCNA en la planta, se decidió utilizar otra estrategia para confirmar que la expresión de Rep altera la sumoilación de PCNA de plantas, desarrollando un sistema de sumoilación en bacterias similar al descrito en el apartado 1.2.1 utilizando las enzimas E1 y E2 y el SUMO de *A. thaliana*.

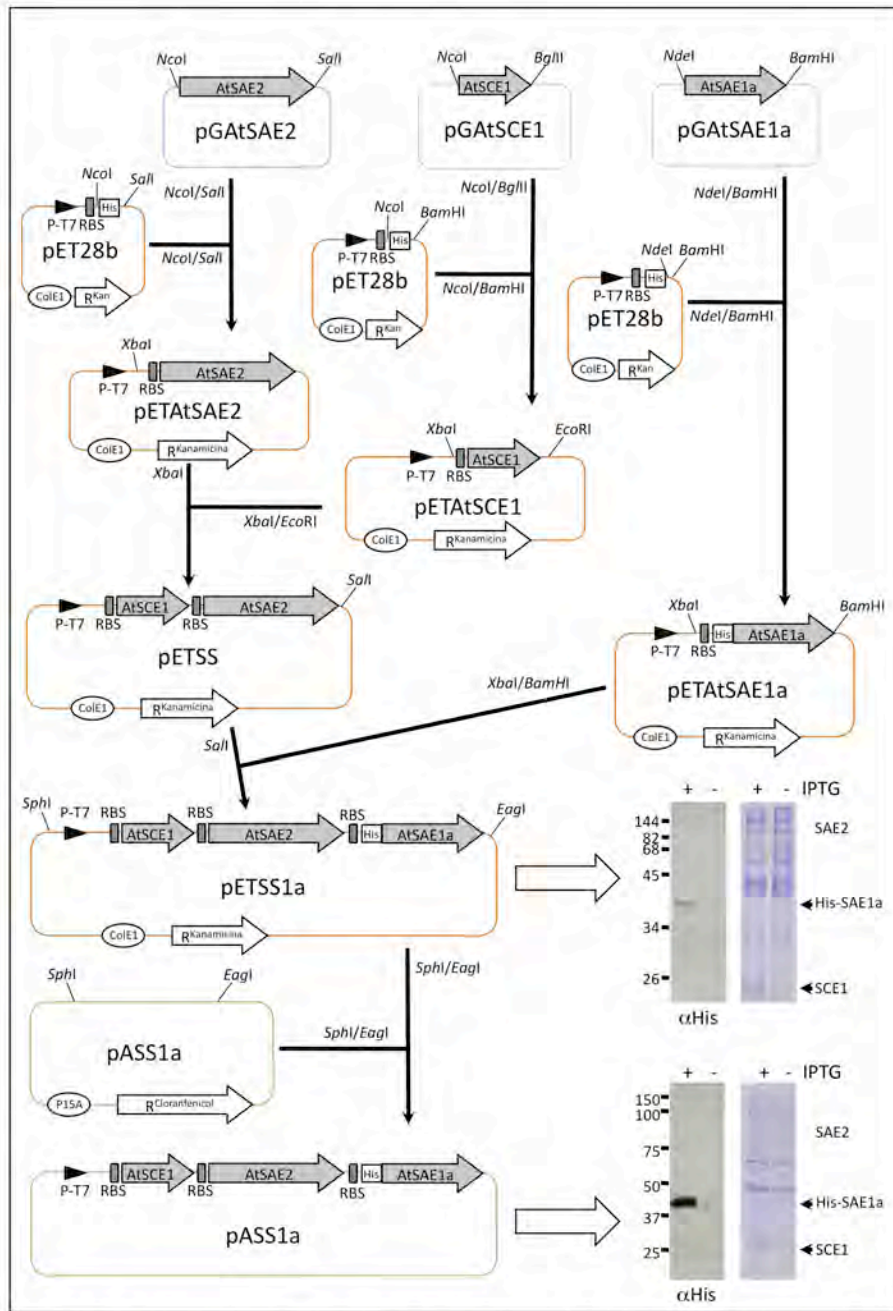


Figura 1.18: Construcción de pASS1a, plásmido de expresión en *E. coli* que codifica las enzimas de *A. thaliana* necesarias para catalizar una reacción de sumoilación *in vitro*. P-T7: Promotor T7, RBS: Sitio de unión a ribosoma, His: tag de histidina. Abajo a la derecha, ensayo de expresión de dichas enzimas desde pET28b y pACYC184. Las cabezas de flecha marcan las bandas que identificamos como las enzimas expresadas. α His (1:10.000). AtSCE1: 18KDa; HisAtSAE1a: 39,1KDa; AtSAE2: 69,7KDa.

La figura 1.18 muestra la estrategia utilizada para la clonación de AtSAE1a, AtSAE2 y AtSCE1 en pACYC184 (Mok *et al.*, 1991), un plásmido de expresión de *E. coli*, para obtener pASS1a. Esta construcción permite la expresión coordinada de los tres genes mediante la transcripción de un

mRNA policistrónico. Tras comprobar la expresión de las tres enzimas mediante análisis en geles SDS PAGE e hibridación con anti-His (Figura 1.18), llevamos a cabo un ensayo de sumoilación de SIPCNA utilizando en primer lugar SUMO1 de humanos (HsSUMO1). Al igual que en los ensayos con las E1 y E2 de mamíferos, al hibridar la membrana con un anticuerpo anti-PCNA se detectó en las tres calles una banda de aproximadamente 40 KDa correspondiente SIPCNA. Adicionalmente, en el extracto de las bacterias donde se había expresado el sistema completo de sumoilación junto a His-SIPCNA, se detecta una banda doble con el peso molecular esperado para esta proteína sumoilada. Esta banda no aparece en extractos procedentes de bacterias en las que no se expresa SUMO o las enzimas E1 y E2 (Figura 1.19).

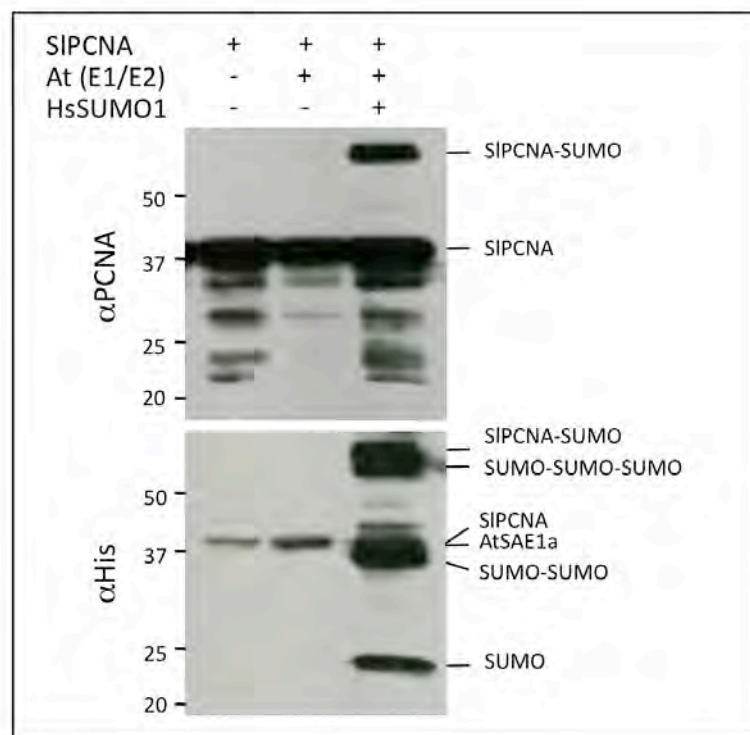


Figura 1.19: Ensayo de sumoilación *in vitro* de PCNA de *S. lycopersicum* usando el plásmido pASS1a, que contiene el sistema de sumoilación de *A. thaliana* y el plásmido pRHSUMO1 que contiene el gen SUMO1 de humano. Panel superior αPCNA (1:2.000). Panel inferior αHis (1:10.000). SIPCNA-SUMO: 45,1 KDa; SUMO-SUMO-SUMO: 41,1 KDa; His-AtSAE1a 38,3 KDa; His-SIPCNA: 31,4 KDa; SUMO-SUMO: 27,4 KDa; His-HsSUMO: 13,7.

Al hibridar la membrana con un anticuerpo anti-His se detectó una banda en las tres calles con el mismo peso molecular que la detectada con el anticuerpo anti-PCNA correspondiente a SIPCNA. En la calle central, dónde se expresan AtSAE1a se observa una banda a la altura de SIPCNA con mayor intensidad que corresponde a His-AtSAE1a. En la tercera calle además de las bandas ya descritas, aparecen las bandas correspondientes a SUMO libre, dímeros y trímeros de SUMO y una banda de aproximadamente 40kDa cuya naturaleza desconocemos. En esta misma calle, se detecta una banda que corresponde en altura con la banda que habíamos identificado como SIPCNA sumoilado en el western hibridado con el anticuerpo anti-PCNA.

Para determinar si este sistema de sumoilación es capaz de conjugar los SUMOs de *Arabidopsis* a SIPCNA, llevamos a cabo ensayos expresando los AtSUMO1, AtSUMO2 o AtSUMO3. Como control positivo se realizó un ensayo expresando HsSUMO. La figura 1.20 muestra los resultados obtenidos al hibridar la membrana con el anticuerpo anti-PCNA. En las calles que contienen los extractos donde se expresan AtSUMO1 y AtSUMO2 se detecta una banda que debe corresponder a SIPCNA sumoilado. Dicha banda se detecta también cuando se utiliza HsSUMO, pero no cuando en el ensayo se utilizó AtSUMO3.

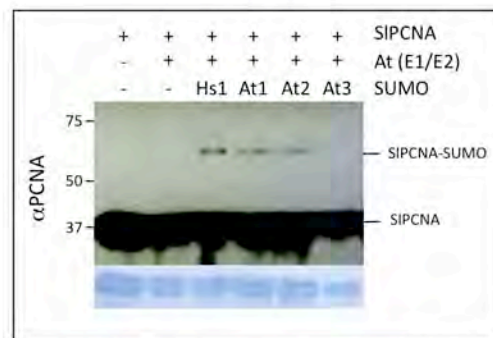


Figura 1.20: Ensayo de sumoilación *in vitro* de PCNA de *S. lycopersicum* usando el plásmido pASS1a y distintos SUMOs. Hs1: SUMO1 de humano (pRHSUMO1), At1, At2 y At3: respectivamente SUMOs 1, 2 y 3 de *A. thaliana* (pRHAtSUMO1, pRHAtSUMO2 y pRHAtSUMO3).

1.2.6 Interferencia de Rep en la sumoilación in vivo.

Como estrategia alternativa para analizar la interferencia de Rep sobre la sumoilación de PCNA en plantas, se generaron plantas transgénicas que expresaran la proteína viral. El desarrollo de estas plantas nos permitiría además, estudiar los cambios en los patrones de sumoilación producidos al expresar Rep e identificar las proteínas cuya sumoilación se ve alterada por la expresión de la proteína viral.

Detección de PCNA endógeno en *A. thaliana*.

Antes de iniciar el proceso de transformación, comprobamos que podríamos detectar la acumulación de PCNA en plantas mediante western blot. Teniendo en cuenta que las hojas que se utilizan para los ensayos en *N. benthamiana* son hojas maduras y que la expresión de PCNA se induce en la fase S, la falta de detección del PCNA endógeno de *N. benthamiana* observada en los ensayos de agroinfiltración, podría deberse a que la mayor parte de las células no están en esta fase del ciclo. Con el fin de aumentar la proporción de células en fase S en las muestras a analizar, decidimos utilizar extractos obtenidos de plántulas jóvenes (Gonzalez *et al.*, 2012). Para ello, se establecieron semillas de *N. benthamiana* y de *A. thaliana* en medio MS y se recogieron plántulas 20 días después, de las que se extrajeron proteínas para llevar a cabo un análisis por hibridación western. Para la extracción y posterior separación de las proteínas por electroforesis se utilizaron condiciones no desnaturalizantes con el fin comprobar la estructura cuaternaria del PCNA en las células. Como en los experimentos previos de expresión transitoria, no detectamos la presencia de PCNA de *N. benthamiana*. Por el contrario, en las calles en las que se cargaron los extractos provenientes de plántulas de *Arabidopsis*, se detectó una banda que, por su peso molecular, correspondería a trímeros de PCNA (figura 1.21).

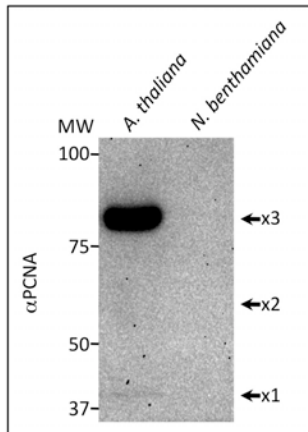


Figura 1.21: Gel en condiciones nativas de plántulas de *A. thaliana* Col0 y de *N. benthamiana*. Se dejaron germinar en placa 200 semillas de cada planta durante 20 días y se extrajeron proteínas. AtPCNA: 29,2KDa. Se marcan con flechas los tamaños esperados para los monómeros, los dímeros y los trímeros de PCNA.

Para confirmar el resultado, repetimos el ensayo recogiendo las plántulas a diferentes tiempos después de la germinación. Además comprobamos el efecto que sobre la expresión de PCNA tendría la incubación de las plántulas en medio líquido, donde es más eficiente aplicar tratamientos para la expresión de transgenes controlados por promotores inducibles. Tras geminar semillas de *A. thaliana*, las plantas se mantuvieron en MS sólido durante 11, 14 y 17 días antes de transferirlas a medio líquido, donde se mantuvieron en agitación durante tres días hasta extraer las proteínas. Como control se utilizaron plantas de *A. thaliana* crecidas durante 20 días sólo en medio sólido. Paralelamente, se realizó un ensayo con plántulas de *N. benthamiana* que se dejaron crecer 20 y 26 días tras la germinación en medio MS sólido, para determinar si un aumento en el tiempo de crecimiento mejoraba la detección de PCNA en esta especie.

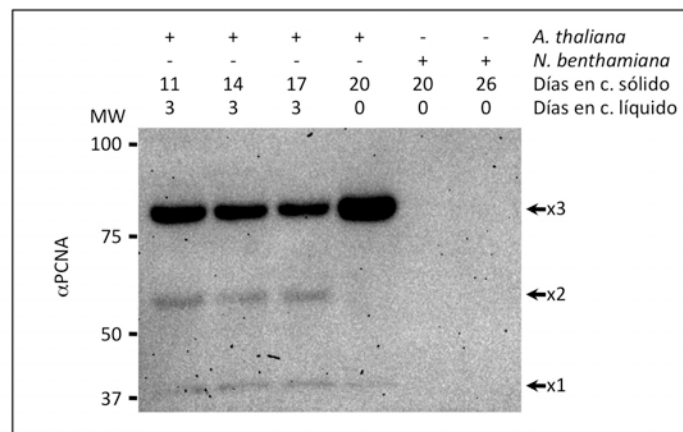


Figura 1.22: Gel en condiciones nativas de plántulas de *A. thaliana* y de *N. benthamiana*. Se dejaron germinar en placa semillas de ambas plantas (unas 200 para cada tratamiento) y se trasladaron a cultivo líquido a distintos tiempos para comprobar los posibles efectos sobre la expresión y polimerización de PCNA. AtPCNA: 29,2KDa. Se marcan con flechas los tamaños esperados para monómeros, dímeros y trímeros de PCNA.

La figura 1.22 muestra los resultados obtenidos al hibridar con un anticuerpo anti-PCNA. Como en el experimento previo, se detectó una banda muy intensa con un peso molecular aparente de alrededor de 85-90 KDa, que correspondería a un trímero de PCNA, en todos los extractos de plantas de *Arabidopsis*. Adicionalmente en las calles con los extractos provenientes de plantas que se habían transferido a medio líquido se detectaron dos bandas adicionales de menor intensidad, que, por sus pesos moleculares, podrían corresponder a dímeros y monómeros de PCNA. La mayor intensidad se detecta en la banda de peso molecular más alto, lo que sugiere que la mayor parte de las moléculas de PCNA están formando trímeros en la células. Como en el experimento previo, no se detectó ninguna banda en los extractos obtenidos de plántulas de *N. benthamiana*, lo que podría deberse a una menor afinidad del anticuerpo por NbPCNA que por AtPCNA, o a una menor cantidad de proteína acumulada en las plántulas de esta especie. Estos resultados indican que, en estas condiciones, no es posible detectar el PCNA de *N. benthamiana*, pero sí el de *A. thaliana*.

Generación de plantas transgénicas que expresen Rep de TGMV.

La construcción de plantas transgénicas para expresar Rep requiere la generación de construcciones con un promotor inducible ya que la expresión constitutiva de Rep es tóxica para la planta. Para ello, se clonó la fase abierta de lectura de Rep de TGMV en el plásmido pER8 bajo el control de un promotor inducible por estradiol (Zuo *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2006). El plásmido generado (pER8Rep) se utilizó posteriormente para transformar plantas Col0 de *A. thaliana*

El la tabla 1.8 se resume el proceso de obtención de plantas transgénicas pER8Rep. En dos transformaciones independientes se obtuvieron 18 plantas T1 resistentes a higromicina (3,4 mg/L). Mediante PCR, con los cebadores OM15 y OM16, se confirmó la presencia del casete de expresión de Rep en 12 de las 18 plantas. De ellas, sólo se obtuvieron semillas de cuatro líneas que se utilizaron para determinar el número de

loci en los que se había integrado el T-DNA. Tres de las líneas (pER8Rep1, pER8Rep2 y pER8Rep13, a las que, de aquí en adelante, nos referiremos solamente por su número) presentaron una segregación 3:1 confirmando la inserción de las construcciones en un único locus (Tabla 1.8 y Figura 1.23).

Tabla 1.8: Transformación de *A. thaliana* con la construcción pER8Rep.

Transformación	1ª	2ª
Resistentes a higromicina ⁽¹⁾	5	13
Plantas en sustrato ⁽²⁾	5	13
PCR ⁽³⁾	2	10
Semillas T2 ⁽⁴⁾	2	2
Segregación ⁽⁵⁾	1 locus	2
	2 loci	0

Se indican el número de:

- 1) Plántulas que crecieron en MS higromicina.
- 2) Plántulas que sobrevivieron al paso a sustrato.
- 3) Plántulas que dieron un resultado positivo en una PCR con oligos diseñados para amplificar la fase abierta de lectura de Rep.
- 4) Líneas de las que se obtuvieron semillas T2.
- 5) Líneas que contienen la construcción insertada en uno o dos loci. Datos obtenidos por la segregación de la resistencia a higromicina y evaluada mediante χ^2 sobre un mínimo de doscientas semillas germinadas en placas de MS suplementado con higromicina.

Las plantas T2 resistentes a higromicina de las líneas 2 y 7 mostraron un fenotipo similar a las plantas Col0, mientras que las de las líneas 1 y 13 presentaron alteraciones en su desarrollo: pérdida de la dominancia apical y curvatura de las hojas. Además, las plantas de la línea 13 presentaron floración temprana a día corto. Para confirmar la expresión inducible de Rep en las plantas transgénicas se llevó a cabo un ensayo de inducción en plantas T2 resistentes a higromicina y se evaluó la expresión de mRNA de Rep mediante RT-PCR. En ausencia de estradiol las plantas de las líneas 1 y la 13 mostraron una expresión basal de Rep, expresión que, no se detectó en las plantas de las líneas 2 y 7. La expresión de Rep se indujo en las plantas de las cuatro líneas en presencia de estradiol a estradiol 5 μ M (Figura 1.23). Para obtener semillas T3 e identificar plantas homocigóticas

se seleccionaron plantas T2 de las líneas pER8Rep-1 y 2 que presentaban una segregación 3:1 y que nos permitían analizar el comportamiento de plantas con y sin expresión basal de Rep. Para caracterizar la cinética de la inducción de Rep en respuesta a estradiol se llevo a cabo un ensayo de expresión transfiriendo plántulas homocigóticas T3 en estadio de 4 hojas a placas de MS sólido suplementado con estradiol 0,2 μ M.

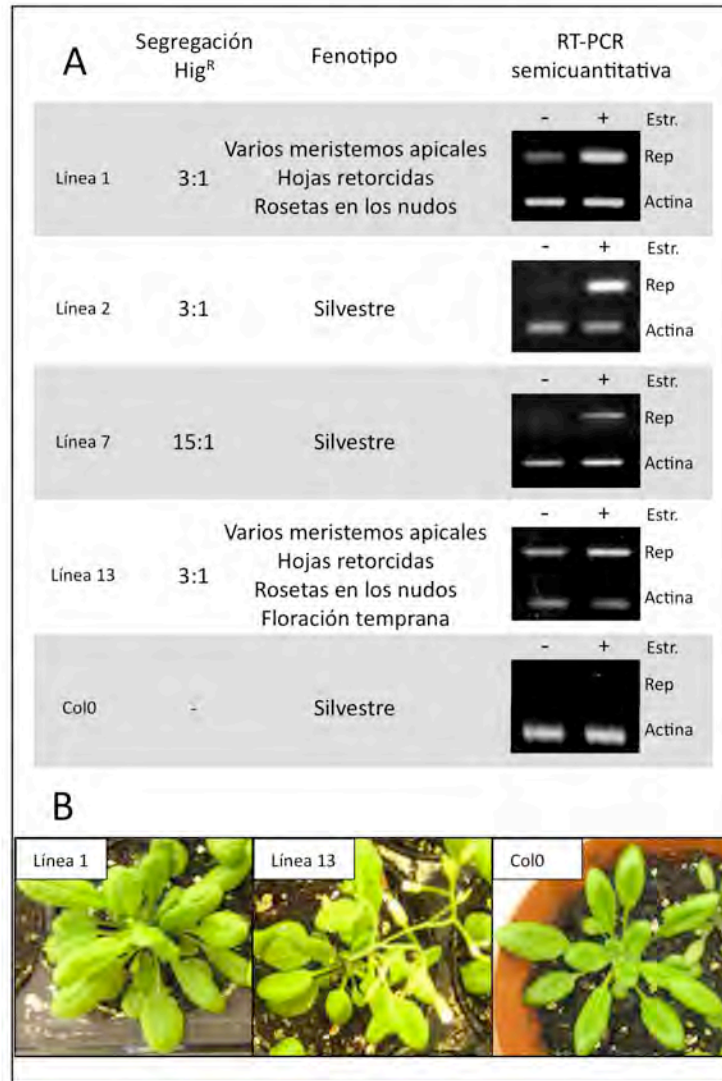


Figura 1.23: Caracterización de las líneas transgénicas pER8Rep. A) Tabla resumen de los fenotipos presentados por las cuatro líneas obtenidas. La resistencia a higromicina se determinó estableciendo 200 semillas T2 esterilizadas en placas de MS + higromicina 3,4 mg/L. Los ensayos de inducción para medir la expresión de AL1 se llevaron a cabo transplantando plántulas de 4 hojas a medio MS con estradiol 5 μ M o sin él, tomándose muestras a 12, 24 y 48 horas. Se presentan imágenes de las PCRs de una de las réplicas a 12h. B) Las líneas 1 y 13 presentaron diferencias morfológicas con respecto a las Columbia0 aun en ausencia de estradiol.

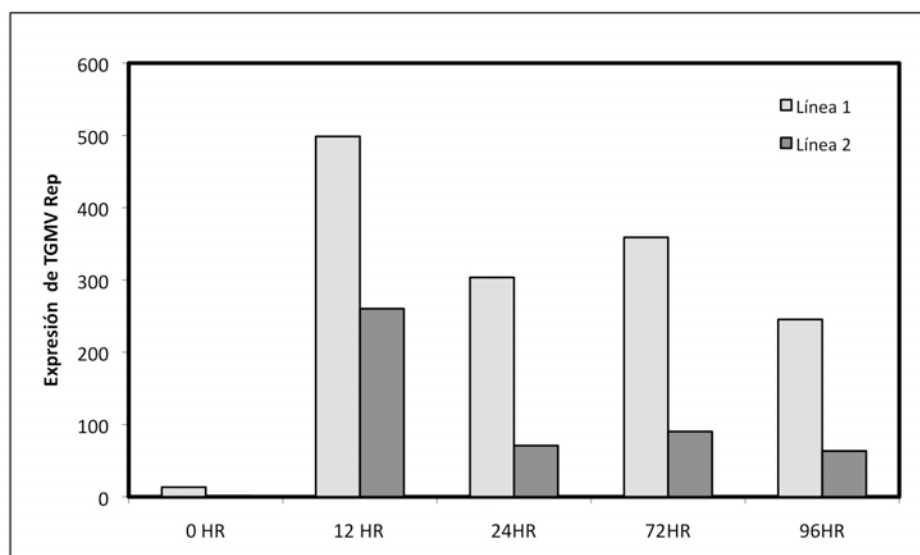


Figura 1.24: Caracterización de la expresión de Rep en las líneas pER8Rep. La inducción de la expresión de Rep se llevó a cabo sobre plántulas cultivadas en medio MS sólido hasta el estadio de 4 hojas. Las plántulas T3 fueron transferidas a medio MS sólido con estradiol $0,2\mu\text{M}$ durante los tiempos especificados. Se cuantificó la acumulación de mRNA de Rep mediante RT-qPCR en extractos provenientes de 200 plántulas. Se representan las medias de las dos réplicas biológicas realizadas. Para cada una se realizaron tres réplicas técnicas.

En la figura 1.24 se muestran los niveles de acumulación de mRNA Rep mediante RT-qPCR en ausencia o en presencia de estradiol durante 12, 24, 72 o 96 horas. Aunque las plantas de la línea 1 muestran niveles de acumulación mayores que las de la línea 2, las dos mostraron una dinámica similar. Los valores máximos de acumulación se producen, en ambas líneas, en plantas incubadas durante 12 horas en presencia de estradiol, para después disminuir y mantener la expresión hasta las 96 horas.

Detección de la sumoilación de PCNA en plantas pER8Rep.

Una vez confirmada la expresión inducible de Rep y la detección de PCNA de *Arabidopsis* se llevó a cabo un experimento para determinar si Rep interfiere “*in planta*” con la sumoilación de PCNA. Para ello germinamos en MS semillas de plantas T3 homocigóticas de las líneas pER8Rep1 y pER8Rep2. Como control se utilizaron plantas transgénicas homocigóticas transformadas con el vector vacío (línea pER8) (generadas por Edgar Rodríguez-Negrete). Once días después, las plántulas se transfirieron

a medio MS líquido sin o con 0,2µM de estradiol donde se mantuvieron tres días en incubación con agitación hasta extraer el RNA y las proteínas.

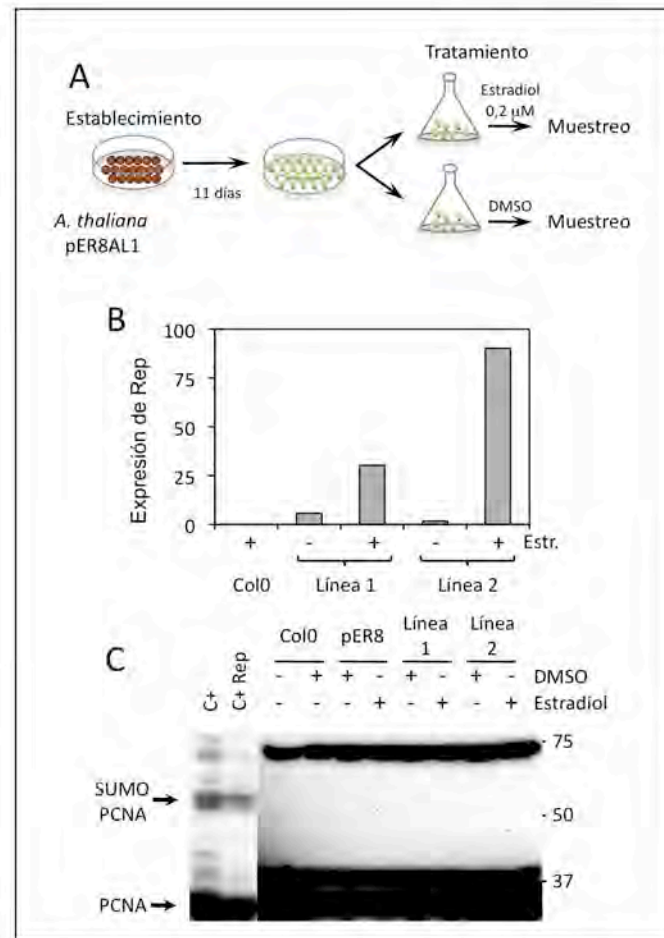


Figura 1.25: Inducción de AL1 en medio MS líquido. A) Se esterilizaron semillas de *A. thaliana* silvestres Col0 y transgénicas pER8 y pER8Rep (líneas 1 y 2). Se establecieron 200 semillas en medio MS sólido y, tras dejarlas germinar, se transfirieron a matraces con medio MS líquido a los que se añadió DMSO o estradiol disuelto en DMSO hasta una concentración final de estradiol de 0,2 µM a las 0 y 24 horas. Los matraces se mantuvieron en agitación durante un total de 72 horas y se recogieron las plántulas para su análisis. B) Se cuantificaron los niveles de mRNA de Rep mediante PCR en tiempo real. Se representan las medias de dos réplicas biológicas, para cada una de las cuales se realizaron tres réplicas técnicas. C) Hibridación western con αPCNA. C+: SIPCNA expresado en bacteria junto con SUMO y el sistema de sumoilación; C+ Rep: SIPCNA expresado en bacteria junto con Rep, SUMO y el sistema de sumoilación; Estradiol: se añadió estradiol 0,2mM; DMSO: control negativo, se añadió DMSO, el solvente en el que se disuelve el estradiol.

Antes de analizar la sumoilación de PCNA, comprobamos mediante RT-qPCR que la incubación con estradiol había inducido la expresión de Rep (figura 1.25B). Posteriormente analizamos la acumulación de PCNA mediante western blot con un anticuerpo anti-PCNA. En todos los extractos

analizados se detectó una banda cuyo tamaño corresponde al esperado para PCNA (Figura 1.25C). En ningún caso se detectó una banda cuyo tamaño pudiese corresponder al de PCNA sumoilado.

Cambios en el sumoiloma de *Arabidopsis* al inducir Rep.

Para determinar si la expresión de Rep producía cambios en el sumoiloma de las plantas, se realizó un ensayo de inducción de la expresión sobre plántulas de las líneas pER8Rep-1 y per8Rep-2 incubadas durante 12 o 24 horas en presencia de estradiol. Como control se emplearon plantas de la línea PER8. La figura 1.26 muestra los resultados del western blot obtenidos al hibridar una membrana con anticuerpos anti-SUMO1 y anti-SUMO3 de *A. thaliana*. Aunque la expresión de Rep no altera los patrones generales del sumoiloma de la planta, se detectan diferencias en la intensidad o tamaño de algunas bandas al comparar las muestras obtenidas antes del tratamiento con estradiol con las provenientes de plantas crecidas en presencia del compuesto. Estas diferencias son más evidentes en la hibridación con anti-SUMO1, que la realizada con anti-SUMO3 en la que el número de bandas detectadas por el anticuerpo es mucho menor. A pesar de que la comparación de las calles correspondiente a plantas Rep y plantas pER8 crecidas en presencia de estradiol indica que algunos de los cambios observados podrían deberse al tratamiento con estradiol y no a la expresión de Rep, se detectan cambios específicos de las plantas Rep (se obtuvieron resultados similares en otras dos hibridaciones independientes). Los resultados indican que es posible utilizar las plantas transgénicas generadas en esta Tesis para analizar los cambios en el sumoiloma producidos por la expresión de Rep.

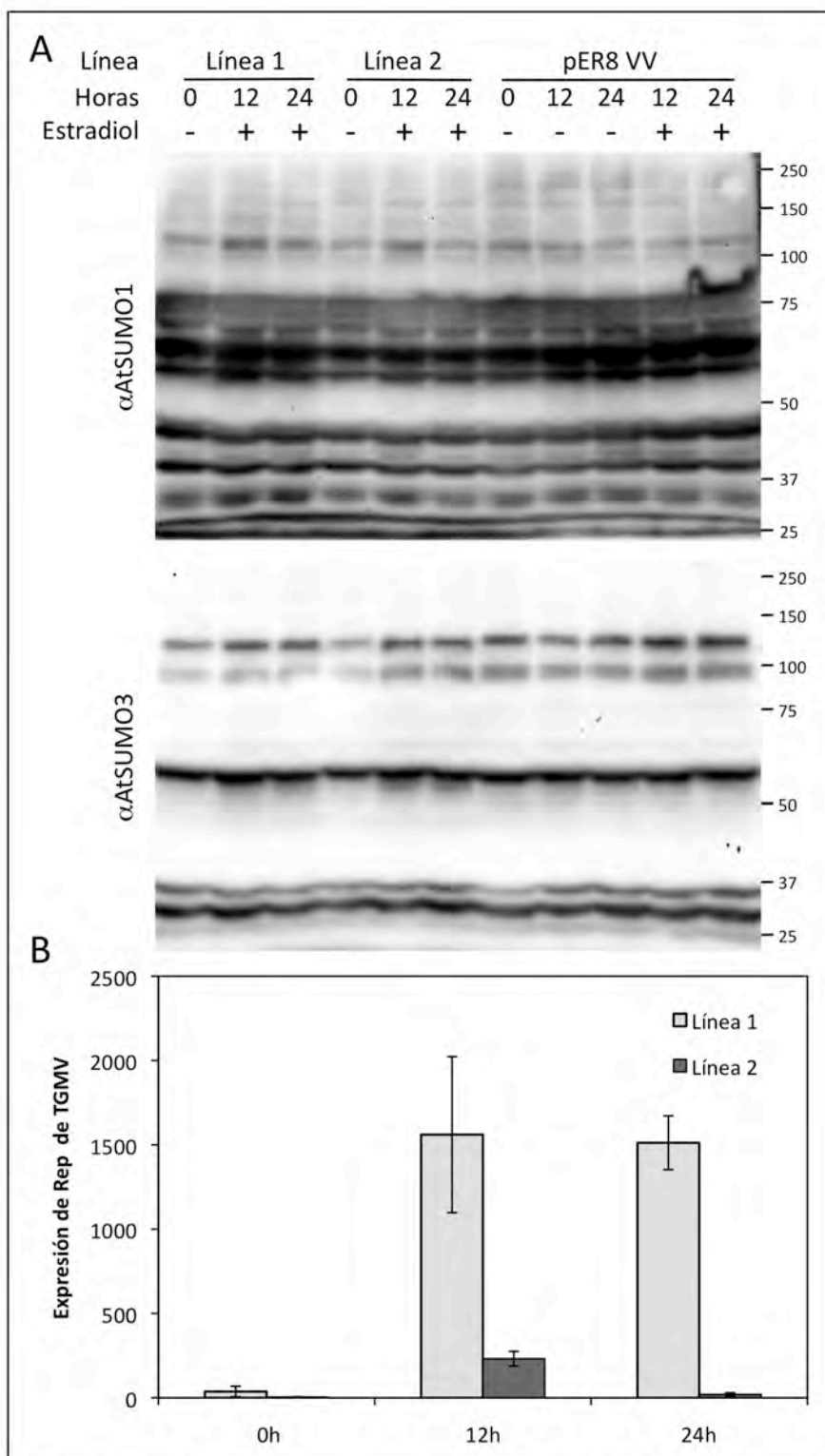


Figura 1.26: Inducción de la expresión de Rep en plántulas de *A. thaliana*. A) Westerns de plántulas transgénicas de *A. thaliana* pER8Rep y pER8 (vector vacío) tras 0, 12 o 24 horas de exposición a estradiol 0,2 μM en medio MS sólido. B) En estas mismas muestras se estimaron los niveles de transcrito de Rep por PCR a tiempo real. Se representan las medias de tres réplicas técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar.

Sería interesante detectar los aminoácidos de Rep responsables de la interacción con PCNA. Mutantes puntuales en estos aminoácidos que pierdan la capacidad de interactuar con PCNA deberían dejar de interferir en la sumoilación, si nuestra hipótesis es correcta.

No obstante, la confirmación e identificación de las proteínas afectadas requerirá de uso de técnicas de proteómica que permitan una mejor separación de las proteínas y su posterior identificación por espectrometría de masas.

1.3 DISCUSIÓN.

1.3.1 Identificación de las lisinas sumoilables de SIPCNA.

La información sobre la importancia que tienen las modificaciones post-traduccionales de PCNA en la modulación del metabolismo de DNA se ha generado principalmente a partir de estudios con levaduras y animales. Estos estudios indican que la ubiquitinación de PCNA conlleva la activación de sistemas de reparación de DNA, mientras que la sumoilación está asociada con la inhibición de la recombinación. La unión de SUMO a PCNA durante la replicación atrae a una helicasa que actúa como un factor antirrecombinogénico, Srs2, al impedir la formación de nucleofilamentos constituidos por la unión de la proteína Rad51 a moléculas de DNA de cadena sencilla. En levaduras, se ha identificado la sumoilación de la lisina 164 (conservada en todos los eucariotas) y de la lisina 127, presente sólo en la secuencia de PCNA de *S. cerevisiae*.

Los resultados obtenidos en dicho trabajo indican que se pueden sumoilar dos residuos en el PCNA de tomate, la ya mencionada lisina 164 y la lisina 254, cuya sumoilación había sido también descrita para PCNA de *A. thaliana* (Strzalka *et al.*, 2012). En este trabajo se describe la sumoilación de seis lisinas de AtPCNA1, de las que sólo la lisina 254 se localiza en la parte exterior del anillo de PCNA, lo que lleva a los autores a sugerir que esta es la única lisina sumoilable en el PCNA de Arabidopsis. Curiosamente no se detecta sumoilación de la lisina 164. Para llevar a cabo este estudio, los autores también emplearon el ensayo de sumoilación en bacterias, pero utilizando las enzimas E1 y E2 de Arabidopsis. Sin embargo, la estrategia experimental para identificar las lisinas sumoilables difiere de la utilizada en nuestro trabajo. Strzalka y colaboradores generaron en primer lugar versiones mutadas de AtPCNA1, en el que todas las lisinas menos una eran sustituidas por arginina. Seguidamente analizaron mediante el ensayo en bacterias la sumoilación de cada una de las proteínas mutantes. Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos en esta tesis utilizando

mutantes puntuales, podrían deberse a alteraciones en la estructura de PCNA producidas por la sustitución masiva de los residuos de lisina en cada mutante (15 de las 16 lisinas presentes en AtPCNA1). La detección de sumoilación de cinco lisinas situadas en lugares poco accesibles para la maquinaria de sumoilación, en el interior del anillo de PCNA y en una zona cercana al lazo que une las dos láminas plegadas, apoyaría esta posibilidad. Por otra parte, al trabajar con un sistema en bacterias, en el que todos los elementos de la maquinaria de sumoilación se sobreexpresan y hacerlo en presencia de una diana que mantiene un solo residuo de lisina podría resultar en la obtención de falsos positivos, al forzar las condiciones estequiométricas de la reacción a unas muy alejadas de las condiciones normales o fisiológicas. En el trabajo de Strzalka *et al.*, 2012 se indica que a pesar de que la lisina 164 sea un residuo identificado por los programas de predicción de dianas y se sumoile en levaduras, puede que se no observe sumoilación porque para ello es necesario la presencia de la ligasa SIZ1, que no está presente en el sistema de bacterias. Esta ligasa ha sido descrita como esencial para la modificación del residuo K164 de levaduras tanto *in vitro* como *in vivo* (Pfander *et al.*, 2005; Windecker y Ulrich, 2008). Aunque no podemos descartar completamente que el requerimiento de SIZ1 sea específico para el PCNA de *A. thaliana*, nuestros resultados contradicen esta hipótesis. Un cambio estructural producido al eliminar todas las lisinas excepto la K164 que impide el acceso de la maquinaria de sumoilación a este residuo o la existencia de otras lisinas en AtPCNA que son imprescindibles para que se sumoile la lisina K164, quizá estableciendo interacciones específicas con SUMO o SCE1, o manteniendo la estructura nativa de PCNA, podrían ser las causas más probables de la ausencia de sumoilación en los ensayos realizados por Strzalka y colaboradores.

Aunque nuestros resultados indican que las lisinas 164 y 245 son los residuos sumoilados en el PCNA de tomate, la presencia de una banda residual en las hibridaciones del mutante doble K164A / K254, (Figuras 1.5, 1.6 y 1.7) indica la existencia de otros residuos de lisina, que no son K91 ni

K190 que se pueden sumoilar aunque con menor frecuencia que las lisinas 164 y 254.

1.3.2 Ensayos en plantas.

Aunque la sumoilación de PCNA en la planta ha sido demostrada al identificar esta proteína como parte del sumoiloma de *Arabidopsis* (Elrouby y Coupland, 2010; Miller y Vierstra, 2011), en esta tesis no hemos sido capaces de detectar la sumoilación “en planta” de ninguno de los PCNA analizados (*S. lycopersicum*, *N. benthamiana* y *A. thaliana*). La principal causa de estos resultados negativos es, probablemente, que la sensibilidad de los métodos utilizados no permite detectar los niveles de PCNA sumoilado acumulados en los tejidos vegetales. La combinación entre el límite de sensibilidad del anticuerpo anti-PCNA empleado, un anticuerpo monoclonal generado contra un epítipo de PCNA de *S. cerevisiae* que no está muy conservado en los PCNAs de plantas, junto con el bajo porcentaje de PCNA que está en su forma sumoilada, han representando una limitación técnica que no hemos sido capaces de resolver.

Teniendo en cuenta que la sumoilación es un proceso reversible en el que las proteasas retiran los SUMOs de las proteínas modificadas, es muy posible que la proporción de PCNA sumoilado sea muy inferior a nivel de detección y que sea por tanto necesario utilizar alguna estrategia adicional para aumentar el porcentaje de proteína sumoilada. Así por ejemplo la primera vez que se detectó la sumoilación de PCNA *in vivo* en *S. cerevisiae*, (Hoege *et al.*, 2002) fue necesario utilizar un mutante de la proteasa de SUMO. De manera similar se podría aumentar el nivel de detección inhibiendo la actividad de las proteasas de SUMO en plantas de manera transitoria mediante VIGS (Virus induced gene silencing) o constitutiva (RNAi o mutantes). El principal problema con el que se encuentra esta aproximación es, que al contrario que en levaduras, en plantas existen varios genes que codifican proteasas y desconocemos cual o cuáles de ellos son responsables de la desumoilación de PCNA. Así, por ejemplo, en *Arabidopsis* se han identificado cinco genes que codifican para proteasas de

SUMO (ESD4, ULP1a, ULP1b, ULP1c y ULP1d) cuya actividad ha sido comprobada “in vitro” y dos más que contienen los dominios de estas enzimas (ULP2a y ULP2b) aunque aún no se ha confirmado su actividad (Castro *et al.*, 2012). La disponibilidad de mutantes simples de todas las proteasas, así como de algunos mutantes dobles y triples nos debería permitir la identificación del fondo genético que conlleve una mayor acumulación de PCNA sumoiledo. Adicionalmente, se ha descrito que algunos estreses abióticos, como por ejemplo el choque térmico, provocan en *A thaliana* un incremento en la acumulación de proteínas sumoiledas con SUMO1/SUMO2, pero no con SUMO3. Teniendo en cuenta que el PCNA de tomate parece sumoilarse con SUMO1 o SUMO2 pero no con SUMO3 (Figura 1.20) podríamos conseguir un incremento adicional en la cantidad de PCNA sumoiledo sometiendo las plantas a un choque térmico antes de extraer sus proteínas.

Por último, la utilización de PCNA etiquetado es otra de las estrategias que hemos utilizado para aumentar la sensibilidad de la detección de PCNA sumoiledo, ya que nos permite incrementar la concentración de las proteínas etiquetadas. No obstante hay que tener en cuenta, que los ensayos con PCNA etiquetado pueden tener ciertas limitaciones, ya que no sabemos si estas moléculas de PCNA pueden interaccionar para formar formán trímeros. Considerando que, tal y como indican los resultados obtenidos con geles no desnaturizantes (Figura 1.22), la mayor parte de las moléculas de PCNA en *Arabidopsis* se encuentran formando trímeros, y que los cambios post-traduccionales de PCNA como la ubiquitinación o la sumoilación tienen lugar en moléculas de PCNA que están formando trímeros, la incapacidad de los PCNA etiquetados para formar los trímeros no les permitiría ser modificados post-traduccionalmente. Antes de utilizar los PCNA etiquetados para determinar si se sumoilan sería necesario comprobar, mediante ensayos transitorios de expresión y geles no desnaturizantes, que los PCNA-etiquetados forman trímeros.

1.3.3 Sistema de *Arabidopsis in vitro*.

Los resultados obtenidos en el ensayo de sumoilación en bacterias utilizando las enzimas E1 y E2 de *Arabidopsis* mostraron que SIPCNA se sumoila con SUMO1 de humanos y con SUMO1 y 2 pero no con SUMO3 de *Arabidopsis* (Figuras 1.17 y 1.18). Es muy interesante que SUMO1 de humanos, en teoría el más parecido al de SUMO3 de plantas, sea capaz de sumoilar PCNA. En cualquier caso esta diferencia podría deberse a las diferencias en las secuencias responsables de las interacciones entre los SUMOs y SCE1, como se postula en Castaño-Miquel *et al.*, 2011. Aunque el sistema funciona, sería interesante incluir en el mismo la expresión de ligasas de SUMO. Para ello se podrían expresar dichas ligasas, concretamente AtSIZ1, bajo el mismo promotor T7 desde el que se expresan los SUMOs de *Arabidopsis* en los plásmidos pRHAtSUMO1, pRHAtSUMO2 y pRHAtSUMO3.

1.3.4 Rep reduce la sumoilación de PCNA.

Los resultados de los ensayos de co-expresión de Rep confirmaron los obtenidos por Sánchez Durán indicando que la presencia de esta proteína reduce la sumoilación de SIPCNA. La mayor resolución de nuestros ensayos nos ha permitido concluir que Rep afecta a la sumoilación de todos residuos de lisina sumoilables tanto los mayoritarios K164 y K254, como los correspondientes a la banda minoritaria detectada al hibridar extractos del doble mutante K164A/K254A.

Esta reducción en la sumoilación de PCNA podría explicarse como consecuencia de un efecto directo de Rep sobre la actividad de SCE1. Sin embargo, los resultados sugieren un mecanismo de interferencia específico contra la sumoilación de PCNA ya que: (i) Rep no afecta a la sumoilación de otra diana como la catalasa (Figura 1.7); (ii) al comparar los patrones de sumoilación de plantas que expresan Rep de TGMV y de plantas que no lo hacen, se observan cambios puntuales en el sumoiloma y no cambios generales como se esperaría si se afectara la actividad de SCE1 (Figura

1.23) y (iii) el mutante de Rep (K68A/K102A) que no interacciona con SCE1 no pierde la capacidad de interferir en la sumoilación de PCNA (Anexo 2, Sánchez Durán, 2011, Tesis Doctoral).

El hecho de que Rep interacciona con PCNA y que, de acuerdo con el mapeo realizado por Bagewadi *et al.*, 2004, Rep interacciona con residuos de PCNA situados a lo largo de toda su molécula, podría explicar la reducción de la sumoilación de PCNA como consecuencia de un impedimento estérico. Este escenario correspondería al modelo descrito por Mayanagi y colaboradores para explicar la plétora de interactores que tiene PCNA. Según este modelo la unión un interactor a PCNA bloquea el acceso de otros a dicha molécula (Mayanagi *et al.*, 2009; Mayanagi *et al.*, 2011), consiguiéndose de esta manera una regulación más fina para decidir en que momento se carga cada proteína sobre PCNA para tener acceso al DNA que con el modelo de “cinturón de herramientas” en el que una infinidad de factores “cuelgan” de PCNA y van actuando según van haciendo falta (Dovrat *et al.*, 2014).

La zona de interacción de Rep con PCNA ha sido caracterizada mediante ensayos de inmunoprecipitación con la Rep del begomovirus *Indian mung vean yellow mosaic virus* (IMVYMV) entre los residuos 135 y 183 (Bagewadi *et al.*, 2004). En este trabajo hemos comprobado que la secuencia de Rep de TGMV que provoca la reducción de la sumoilación de PCNA se localiza en la misma zona identificada como el dominio de unión a PCNA, lo que apoya la hipótesis de un efecto inhibitorio debido a la interacción de PCNA con Rep. Para confirmar definitivamente esta hipótesis, sería necesario identificar mutantes de Rep que no fueran capaces de interaccionar con PCNA, pero mantuvieran su interacción con SCE1.

No se tienen datos sobre las consecuencias de la sumoilación de PCNA en plantas, pero considerando que tanto el residuo modificado (K164) como mecanismos de reparación del DNA que se controlan por esta modificación están conservados en todos los eucariotas, es muy posible que la lisina 164 de PCNA sea modificada post-traduccionalmente en plantas. Aunque no sabemos si la sumoilación de PCNA provoca en otros organismos

el mismo efecto de inhibición de la recombinación homóloga descrita en levaduras, la sumoilación del PCNA de plantas y la existencia de un gen homólogo a SRS2 en *Arabidopsis*, (Blanck *et al.*, 2009) cuya expresión interfiere en la formación de intermediarios de recombinación, apoyaría la existencia de este mecanismo que reduciría la recombinación homóloga en la horquilla de replicación. De ser así, la reducción en la sumoilación de PCNA producida por Rep, provocaría un aumento en la recombinación homóloga entre las cadenas presentes en la horquilla de replicación al impedir la unión de SRS2 al replisoma, pudiéndose ser esta la causa de los elevados niveles de recombinación entre las moléculas de DNA del virus que se producen durante la infección.

La unión de Rep a PCNA también podría interferir con la ubiquitinación de la lisina K164. Si, como ocurre en otros organismos, la ubiquitinación de este residuo es clave para la puesta en marcha de sistemas de reparación del DNA, la consecuencia de la unión de Rep provocaría una mayor sensibilidad al daño en el DNA, tal y como ocurre con los mutantes en K164 en levaduras (Hoege *et al.*, 2002).

1.4 BIBLIOGRAFÍA.

- Almendares, J., M. Sierra, et al. (1993). "Critical regions, a profile of Honduras." *Lancet* **342**(8884): 1400-2.
- Alvisi, G. and G. Palu (2013). "Reprogramming the host: Modification of cell functions upon viral infection." *World J Virol* **2**(2): 16-7.
- Bagewadi, B., S. Chen, et al. (2004). "PCNA interacts with Indian mung bean yellow mosaic virus rep and downregulates Rep activity." *J Virol* **78**(21): 11890-903.
- Bentz, G. L., J. Shackelford, et al. (2012). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 regulates the function of interferon regulatory factor 7 by inducing its sumoylation." *J Virol* **86**(22): 12251-61.
- Berndt, A., H. Hofmann-Winkler, et al. (2009). "Importance of covalent and noncovalent SUMO interactions with the major human cytomegalovirus transactivator IE2p86 for viral infection." *J Virol* **83**(24): 12881-94.
- Blanck, S., D. Kobbe, et al. (2009). "A SRS2 homolog from Arabidopsis thaliana disrupts recombinogenic DNA intermediates and facilitates single strand annealing." *Nucleic Acids Res* **37**(21): 7163-76.
- Boggio, R., A. Passafaro, et al. (2007). "Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation." *J Biol Chem* **282**(21): 15376-82.
- Boutell, C. and R. D. Everett (2013). "Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins." *J Gen Virol* **94**(Pt 3): 465-81.
- Castillo, A. G., L. J. Kong, et al. (2004). "Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system." *J Virol* **78**(6): 2758-69.
- Catala, R., J. Ouyang, et al. (2007). "The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses." *Plant Cell* **19**(9): 2952-66.
- Chen, S. C., L. Y. Chang, et al. (2011). "Sumoylation-promoted enterovirus 71 3C degradation correlates with a reduction in viral replication and cell apoptosis." *J Biol Chem* **286**(36): 31373-84.
- Chiu, M. W., H. M. Shih, et al. (2007). "The type 2 dengue virus envelope protein interacts with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (Ubc9)." *J Biomed Sci* **14**(3): 429-44.
- Chosed, R., S. Mukherjee, et al. (2006). "Evolution of a signalling system that incorporates both redundancy and diversity: Arabidopsis SUMOylation." *Biochem J* **398**(3): 521-9.
- Colby, T., A. Matthai, et al. (2006). "SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from Arabidopsis." *Plant Physiol* **142**(1): 318-32.
- Dovrat, D., J. L. Stodola, et al. (2014). "Sequential switching of binding partners on PCNA during in vitro Okazaki fragment maturation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(39): 14118-23.
- Elrouby, N. and G. Coupland (2010). "Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify Arabidopsis proteins implicated in diverse biological processes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(40): 17415-20.
- Everett, R. D., C. Boutell, et al. (2013). "Interplay between viruses and host sumoylation pathways." *Nat Rev Microbiol* **11**(6): 400-11.
- Everett, R. D. and M. K. Chelbi-Alix (2007). "PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence." *Biochimie* **89**(6-7): 819-30.
- Fan, Z., Y. Zhuo, et al. (2006). "SARS-CoV nucleocapsid protein binds to hUbc9, a ubiquitin conjugating enzyme of the sumoylation system." *J Med Virol* **78**(11): 1365-73.
- Flemington, E. K. (2001). "Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments." *J Virol* **75**(10): 4475-81.
- Freudenthal, B. D., J. E. Brogie, et al. (2011). "Crystal structure of SUMO-modified proliferating cell nuclear antigen." *J Mol Biol* **406**(1): 9-17.
- Gali, H., S. Juhasz, et al. (2012). "Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork." *Nucleic Acids Res* **40**(13): 6049-59.
- Geoffroy, M. C. and R. T. Hay (2009). "An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(8): 564-8.
- Glotzer, J. B., M. Saltik, et al. (2000). "Activation of heat-shock response by an adenovirus is essential for virus replication." *Nature* **407**(6801): 207-11.

- Golebiowski, F., I. Matic, et al. (2009). "System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock." *Sci Signal* **2**(72): ra24.
- Gonzalez, N., H. Vanhaeren, et al. (2012). "Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion." *Trends Plant Sci* **17**(6): 332-40.
- Gulbis, J. M., Z. Kelman, et al. (1996). "Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA." *Cell* **87**(2): 297-306.
- Gurer, C., L. Berthoux, et al. (2005). "Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1." *J Virol* **79**(2): 910-7.
- Hagglund, R. and B. Roizman (2004). "Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1." *J Virol* **78**(5): 2169-78.
- Hanania, U., N. Furman-Matarasso, et al. (1999). "Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death." *Plant J* **19**(5): 533-41.
- Hickey, C. M., N. R. Wilson, et al. (2012). "Function and regulation of SUMO proteases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(12): 755-66.
- Ho, J. C. and F. Z. Watts (2003). "Characterization of SUMO-conjugating enzyme mutants in *Schizosaccharomyces pombe* identifies a dominant-negative allele that severely reduces SUMO conjugation." *Biochem J* **372**(Pt 1): 97-104.
- Hoegge, C., B. Pfander, et al. (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." *Nature* **419**(6903): 135-41.
- Hoogstraten, R. A., S. F. Hanson, et al. (1996). "Mutational analysis of the putative nicking motif in the replication-associated protein (AC1) of Bean Golden Mosaic Geminivirus." *Molecular plant-microbe interactions* **9** n7: 594-599.
- Hotson, A., R. Chosed, et al. (2003). "Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta." *Mol Microbiol* **50**(2): 377-89.
- Hotson, A. and M. B. Mudgett (2004). "Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity." *Curr Opin Plant Biol* **7**(4): 384-90.
- Huang, C., Y. Xie, et al. (2009). "Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component." *Plant Biotechnol J*.
- Ishida, T., M. Yoshimura, et al. (2012). "MMS21/HPY2 and SIZ1, two Arabidopsis SUMO E3 ligases, have distinct functions in development." *PLoS One* **7**(10): e46897.
- Johnson, E. S. (2004). "Protein modification by SUMO." *Annu Rev Biochem* **73**: 355-82.
- Johnson, E. S. and G. Blobel (1997). "Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p." *J Biol Chem* **272**(43): 26799-802.
- Kfoury, Y., R. Nasr, et al. (2012). "The multifaceted oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF-kappaB activation." *Adv Cancer Res* **113**: 85-120.
- Kim, E. T., Y. E. Kim, et al. (2010). "Role of noncovalent SUMO binding by the human cytomegalovirus IE2 transactivator in lytic growth." *J Virol* **84**(16): 8111-23.
- Kim, J. G., K. W. Taylor, et al. (2011). "Comparative analysis of the XopD type III secretion (T3S) effector family in plant pathogenic bacteria." *Mol Plant Pathol* **12**(8): 715-30.
- Kong, L. J., B. M. Orozco, et al. (2000). "A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants." *EMBO J* **19**(13): 3485-95.
- Krishna, T. S., X. P. Kong, et al. (1994). "Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA." *Cell* **79**(7): 1233-43.
- Laufs, J., I. Jupin, et al. (1995). "Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review." *Biochimie* **77**(10): 765-73.
- Leach, C. A. and W. M. Michael (2005). "Ubiquitin/SUMO modification of PCNA promotes replication fork progression in *Xenopus laevis* egg extracts." *J Cell Biol* **171**(6): 947-54.
- Li, F. Q., H. Xiao, et al. (2005). "Sumoylation of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus." *FEBS Lett* **579**(11): 2387-96.
- Li, R., L. Wang, et al. (2012). "SUMO binding by the Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 is crucial for BGLF4 function." *J Virol* **86**(10): 5412-21.
- Liang, Q., H. Deng, et al. "Tripartite motif-containing protein 28 is a small ubiquitin-related modifier E3 ligase and negative regulator of IFN regulatory factor 7." *J Immunol* **187**(9): 4754-63.
- Liu, Y., A. Shevchenko, et al. (2005). "Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex." *J Virol* **79**(22): 14004-16.
- Lois, L. M., C. D. Lima, et al. (2003). "Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis." *Plant Cell* **15**(6): 1347-59.

- Maga, G. and U. Hubscher (2003). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners." *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3051-60.
- Mailand, N., Gibbs-Seymour, I. and Bekker-Jensen, S. (2013) " Regulation of PCNA–protein interactions for genome stability " *Nat Rev Mol Cell Biol* doi:10.1038/nrm3562
- Matsumiya, S., Y. Ishino, et al. (2001). "Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen from *Pyrococcus furiosus*." *Protein Sci* **10**(1): 17-23.
- Mayanagi, K., S. Kiyonari, et al. (2011). "Architecture of the DNA polymerase B-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-DNA ternary complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 1845-9.
- Mayanagi, K., S. Kiyonari, et al. (2009). "Mechanism of replication machinery assembly as revealed by the DNA ligase-PCNA-DNA complex architecture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(12): 4647-52.
- Miller, M. J. and R. D. Vierstra (2011). "Mass spectrometric identification of SUMO substrates provides insights into heat stress-induced SUMOylation in plants." *Plant Signal Behav* **6**(1).
- Mok, Y. K., D. R. Clark, et al. (1991). "BsiY I, a novel thermophilic restriction endonuclease that recognizes 5' CCNNNNNNNGG 3' and the discovery of a wrongly sequenced site in pACYC177." *Nucleic Acids Res* **19**(9): 2321-3.
- Moldovan GL, P. B., Jentsch S. (2007). "PCNA, the maestro of the replication fork." *Cell* **129**(4): 665-679.
- Mukhopadhyay, D. and M. Dasso (2007). "Modification in reverse: the SUMO proteases." *Trends Biochem Sci* **32**(6): 286-95.
- Muller, S. and T. Dobner (2008). "The adenovirus E1B-55K oncoprotein induces SUMO modification of p53." *Cell Cycle* **7**(6): 754-8.
- Murtas, G., P. H. Reeves, et al. (2003). "A nuclear protease required for flowering-time regulation in *Arabidopsis* reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates." *Plant Cell* **15**(10): 2308-19.
- Novatchkova, M., R. Budhiraja, et al. (2004). "SUMO conjugation in plants." *Planta* **220**(1): 1-8.
- Novatchkova, M., K. Tomanov, et al. (2012). "Update on sumoylation: defining core components of the plant SUMO conjugation system by phylogenetic comparison." *New Phytol* **195**(1): 23-31.
- Orozco, B. and L. Hanley-Bowdoin (1998). "Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivir replication protein (Abstract)." *J Biol Chem* **273**(38): 24448-24456.
- Orozco, B. M., L. J. Kong, et al. (2000). "The multifunctional character of a geminivirus replication protein is reflected by its complex oligomerization properties." *J Biol Chem* **275**(9): 6114-22.
- Papouli, E., S. Chen, et al. (2005). "Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p." *Mol Cell* **19**(1): 123-33.
- Pfander, B., G. L. Moldovan, et al. (2005). "SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase." *Nature* **436**(7049): 428-33.
- Ren, J., X. Gao, et al. (2009). "Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0." *Proteomics* **9**(12): 3409-3412.
- Roden, J., L. Eardley, et al. (2004). "Characterization of the *Xanthomonas AvrXv4* effector, a SUMO protease translocated into plant cells." *Mol Plant Microbe Interact* **17**(6): 633-43.
- Russell, A. R. and J. H. Pope (1976). "Reactivity of antibody in acute myeloid leukaemia with proliferation-associated nuclear antigen(s)." *Clin Exp Immunol* **23**(1): 83-90.
- Saitoh, H. and J. Hinchev (2000). "Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3." *J Biol Chem* **275**(9): 6252-8.
- Sanchez-Duran, M. A., M. B. Dallas, et al. (2011). "Interaction between Geminivirus Replication Protein and the SUMO-Conjugating Enzyme Is Required for Viral Infection." *Journal of Virology* **85**(19): 9789-9800.
- Saracco, S. A., M. J. Miller, et al. (2007). "Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential." *Plant Physiol* **145**(1): 119-34.
- Settlage, S. B., R. G. See, et al. (2005). "Geminivirus C3 protein: replication enhancement and protein interactions." *J Virol* **79**(15): 9885-95.
- Stelter, P. and H. D. Ulrich (2003). "Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation." *Nature* **425**(6954): 188-91.
- Strzalka, W. and A. Ziemienowicz (2011). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation." *Ann Bot* **107**(7): 1127-40.

- Stukenberg, P. T., P. S. Studwell-Vaughan, et al. (1991). "Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme." *J Biol Chem* **266**(17): 11328-34.
- Ulrich (2009). "The SUMO system: an overview." *Methods Mol Biol* **497**: 3-16.
- Ulrich, H. D. (2007). "Conservation of DNA damage tolerance pathways from yeast to humans." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1334-7.
- Ulrich, H. D. and T. Takahashi (2013). "Readers of PCNA modifications." *Chromosoma* **122**(4): 259-74.
- van den Burg, H. A., R. K. Kini, et al. (2010). "Arabidopsis small ubiquitin-like modifier paralogs have distinct functions in development and defense." *Plant Cell* **22**(6): 1998-2016.
- van den Burg, H. A. and F. L. Takken (2010). "SUMO-, MAPK-, and resistance protein-signaling converge at transcription complexes that regulate plant innate immunity." *Plant Signal Behav* **5**(12): 1597-601.
- Voinnet, O., P. Vain, et al. (1998). "Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA." *Cell* **95**(2): 177-87.
- Wang, Y. E., O. Pernet, et al. (2012). "Regulation of the nucleocytoplasmic trafficking of viral and cellular proteins by ubiquitin and small ubiquitin-related modifiers." *Biol Cell* **104**(3): 121-38.
- Wimmer, P., S. Schreiner, et al. (2012). "Human pathogens and the host cell SUMOylation system." *J Virol* **86**(2): 642-54.
- Windecker, H. and H. D. Ulrich (2008). "Architecture and assembly of poly-SUMO chains on PCNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol* **376**(1): 221-31.
- Xiong, R. and A. Wang (2013). "SCE1, the SUMO-conjugating enzyme in plants that interacts with N1b, the RNA-dependent RNA polymerase of Turnip mosaic virus, is required for viral infection." *J Virol* **87**(8): 4704-15.
- Yasugi, T., M. Vidal, et al. (1997). "Two classes of Human Papillomavirus Type 16 E1 Mutants suggest pleiotropic conformational constraints affecting E1 multimerization, E2 interaction, and interaction with cellular proteins." *Journal of Virology* **71**(8): 5942-5951.
- Zuo, J., Q. W. Niu, et al. (2000). "Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants." *Plant J* **24**(2): 265-73.

CAPÍTULO 2

DESARROLLO DE NUEVAS HERRAMIENTAS PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DEL COMPLEJO TYLCD: PLANTAS 2IR

2.1 INTRODUCCIÓN.

El desarrollo de herramientas para la monitorización *in vivo* de las infecciones virales es esencial para la realización de estudios de interacción planta-virus. La estrategia más directa para generar estas herramientas consiste en la introducción de un gen chivato, clásicamente GFP (Green Fluorescent Protein), en el genoma del virus (Baulcombe *et al.*, 1995). En el caso de los geminivirus esta estrategia sólo se ha podido utilizar con begomovirus bipartitos en los que se ha remplazado el gen de la CP por el gen chivato. La fuerte presión de selección sobre el tamaño de su genoma, el solapamiento de las fases abiertas de lectura de varios de sus genes, y el papel esencial que juega la CP de begomovirus monopartitos para la infección (Kunik *et al.*, 1998; Kunik *et al.*, 1999), impiden que esta estrategia se pueda utilizar con otros geminivirus. Como alternativa, se ha desarrollado un sistema que permite monitorizar la replicación del virus mediante la introducción en el genoma de la planta de una construcción denominada 2IR-GFP (Morilla *et al.*, 2006). Esta construcción, que contiene un casete de expresión de GFP flanqueado por dos regiones intergénicas de *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), permite la detección de la replicación del virus *in vivo* mediante la monitorización de la fluorescencia verde.

El funcionamiento del sistema (Figura 2.1) está basado en el incremento de la expresión de GFP debido a la formación de moléculas extracromosómicas a partir de la construcción 2IR-GFP. En ausencia del virus las plantas transformadas con la construcción 2IR-GFP mantienen una expresión basal del gen chivato que les confiere una leve fluorescencia verde. Cuando un virus entra en una célula que contiene la construcción, su proteína Rep reconoce las IR del transgén induciendo la replicación de la secuencia situada entre las dos IR. Como resultado se generan copias circulares y extracromosómicas del transgén que contienen una única IR (moléculas extracromosómicas, ME). Una vez generadas, las ME pueden

replicarse tal y como lo hacen las moléculas circulares del virus ya que la IR contiene en cis todos los elementos necesarios para ello.

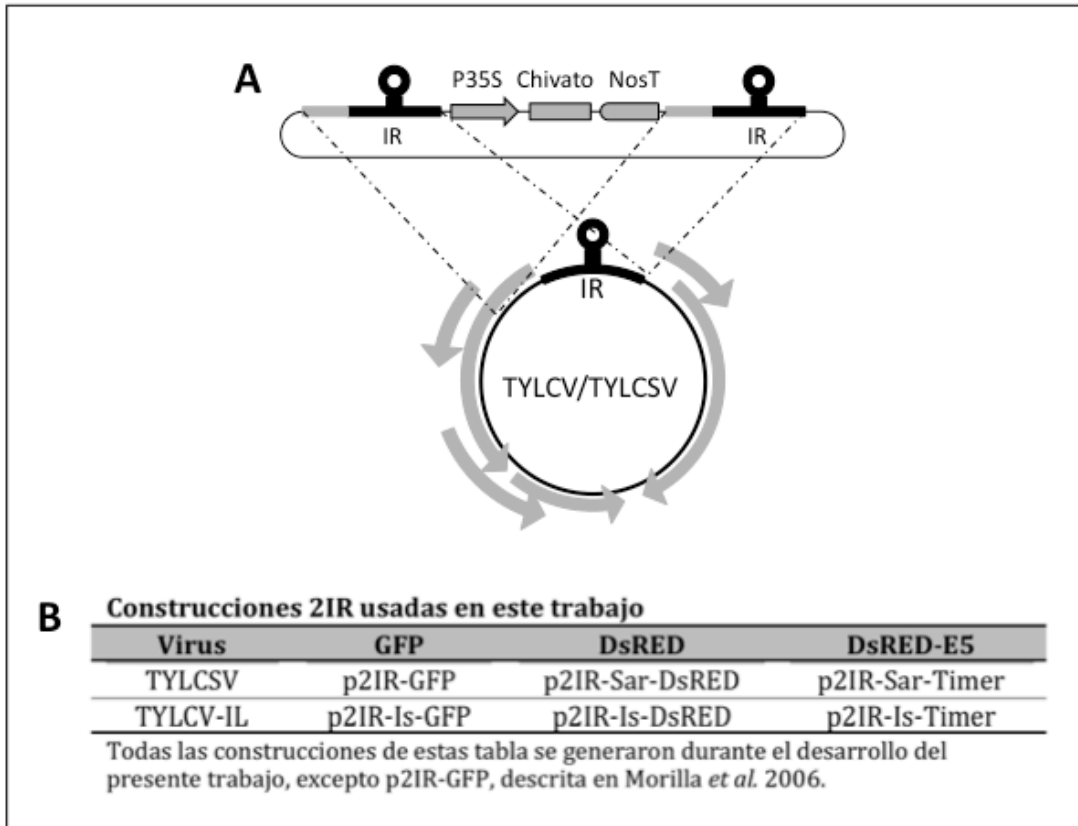


Figura 2.1: Construcciones 2IR. **A:** Las construcciones 2IR contienen un casete de expresión de un gen chivato (GFP, DsRED o DsRED-E5) flanqueado por dos repeticiones directas de la región intergénica (IR) de TYLCV-IL o TYLCSV. **B:** Construcciones 2IR empleadas en este trabajo, especificando las regiones intergénicas y genes chivatos que contienen.

Las plantas 2IR-GFP han sido utilizadas en estudios de genética reversa para identificar genes de la planta que afectan la infección del virus o de sinergismos con otros patógenos (Lozano-Durán *et al.*, 2011; Caracuel, *et al.*, 2012). Estas construcciones plantean, no obstante, algunas limitaciones que se derivan tanto de la naturaleza de las secuencias de la IR como del gen chivato que portan. La producción de ME a partir del transgén requiere del reconocimiento de las IR por la proteína Rep. Éste se produce mediante la unión de la proteína del virus a una secuencia repetida muy próxima a la estructura de tallo-lazo desde la que se inicia la replicación del virus. La secuencia reconocida por Rep es específica de cada especie de

virus, de forma que la proteína Rep de TYLCSV no reconoce la secuencia de la IR de otros virus del complejo TYLCD, como *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y viceversa. De esta forma, no se generan ME, ni se produce el aumento de fluorescencia verde asociada a floema en infecciones de TYLCV en plantas que contienen las IR de TYLCSV.

La otra limitación de las construcciones 2IR-GFP es la incapacidad de la GFP para generar fluorescencia verde en hojas de tomate, el principal cultivo afectado por estos virus. Los ensayos de expresión transitoria en hojas de tomate de construcciones para expresar GFP nos confirmaron (datos no mostrados), que no es posible visualizar la expresión de este gen chivato, ya que no se detecta fluorescencia a pesar de acumularse mRNA del gen. La búsqueda bibliográfica realizada confirma estos resultados, ya que no existe referencia alguna que muestre la expresión de GFP en hoja de tomate, aunque sí en su fruto (Quadrona *et al.*, 2011). Desconocemos cuál o cuáles son las causas por las que no es posible detectar la fluorescencia verde de la GFP en hojas de tomate, pero podría deberse a que la GFP emite fluorescencia tras formarse su centro activo al ciclarse sus aminoácidos Ser65, Tyr66 y Gly67. En este proceso, la tirosina se desprotona, adquiriendo la capacidad de emitir fluorescencia (Heim *et al.*, 1994). A pH por debajo de 4, la GFP pierde su capacidad de emitir fluorescencia (Patterson *et al.*, 1997; Kneen *et al.*, 1998), posiblemente por la protonación de la tirosina 66, que tiene un pK de 5,8 (Haupts *et al.*, 1998). Para abordar estas limitaciones, nos propusimos generar nuevas construcciones 2IR con el fin de: (i) detectar la replicación de la especie más extendida del complejo TYLCD, TYLCV, y (ii) visualizar la replicación de TYLCSV y TYLCV en tomate. Para esto hemos generado nuevas construcciones utilizando las IR de la estirpe TYLCV (AC: AJ489258, Morilla *et al.*, 2005) o TYLCSV (AC: L27708) que flanquean un casete de expresión de GFP para TYLCV o de otro gen chivato, DsRED (Campbell *et al.*, 2002) para TYLCV y TYLCSV, cuya expresión ya habíamos comprobado que se visualiza en hojas de tomate (datos no mostrados).

Adicionalmente, se diseñaron construcciones basadas en las IR de ambos virus para la expresión de una versión de DsRED (DsRED-E5) que contiene dos mutaciones puntuales: una mutación Val105Ala que duplica los niveles de emisión de fluorescencia y otra Ser197Thr que hace que la proteína recién sintetizada emita fluorescencia verde (con los máximos de absorción y emisión a 483 y 500 nm respectivamente). Tras un período de maduración, independiente de su concentración y dependiente de la temperatura y el pH, la fluorescencia torna al rojo (con máximos de absorción y emisión a 558 y 583nm) característico de la DsRED (Terskikh *et al.*, 2000). Estimamos mediante ensayos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, que el periodo de maduración de la DsRED-E5, en adelante Timer, es de aproximadamente seis horas (datos no mostrados). La expresión de este gen chivato nos proporcionará una mayor información sobre la dinámica de la replicación de los virus.

En este capítulo se presentan los resultados del proceso de obtención de nuevas plantas 2IR y de un primer análisis de su funcionamiento y fenotipo durante la infección por geminivirus.

2.2 RESULTADOS.

2.2.1 Construcciones 2IR.

La figura 2.1 B muestra las construcciones 2IR generadas, clasificadas de acuerdo con el origen de las secuencias IR y del gen chivato.

Construcciones de TYLCV.

Para producir las construcciones que permitieran la monitorización de la especie TYLCV, elegimos el aislado español de TYLCV-IL (AC: AJ489258).

Construcción 2IR-IL-GFP. En primer lugar, se amplificaron por PCR dos fragmentos de 491 pb que contienen la secuencia de la IR completa de TYLCV (nucleótidos 2460 a 169) utilizando como molde el plásmido pGTYZ-40 (Morilla *et al.*, 2005): el fragmento IR-*EcoRI* (cebadores OM1 y OM2) y el fragmento IR-*HindIII* (cebadores OM3 y OM4). Seguidamente se clonaron en el sitio *EcoRV* de pBSSKII+ generándose los plásmidos pBIRILEcoRI y pBIRILHindIII respectivamente. A continuación, se digirió con *EcoRI* el plásmido pBIRILEcoRI y el fragmento de 497pb resultante se clonó en el sitio *EcoRI* de pBINGFP, un plásmido que contiene la fase abierta de lectura completa de GFP bajo el control del promotor 35SCaMV (*Cauliflower mosaic virus*). Los plásmidos recombinantes con el fragmento en la orientación deseada (en los que el promotor del gen CP de TYLCV, está en la misma orientación que el promotor CaMV35S), se identificaron mediante PCR con un set de cebadores que amplifican un fragmento si el inserto está en el mismo sentido que el promotor de la CP (OM2/OM5) o en sentido contrario (OM1/OM5). A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó un plásmido, que denominamos pBIRGFP. Seguidamente, un fragmento de 497pb obtenido mediante digestión con *HindIII* de pBIRILHindIII se clonó en el sitio *HindIII* de pBIRGFP. Mediante PCR, con las parejas de cebadores OM3/OM6 y OM4/OM6 se identificó un plásmido

recombinante que contiene este segundo fragmento en la misma orientación que el anterior y al que se denominó p2IRILGFP.

Construcción 2IR-IL-DsRED. Para obtener una construcción 2IR de TYLCV-IL que expresara la proteína DsRED en lugar de GFP se digirió el plásmido p2IRILGFP con *XbaI* y *SacI* y se purificó el fragmento de 13.477 bp que corresponde al plásmido sin la fase abierta de lectura de la GFP. A continuación, se digirió el plásmido pCRDsRED (No publicado, cedido por el doctor Gabriel Morilla) con *XbaI* y *BamHI* para obtener un fragmento de 678 pb que contiene la fase abierta de lectura completa de la DsRED. Se generaron extremos romos y se ligaron los dos fragmentos. Mediante PCR con las parejas de cebadores OM5/OM8 y OM5/OM7 se identificó un plásmido recombinante que contiene la fase abierta de lectura de DsRED en la orientación apropiada y al que se denominó p2IRILDsRED.

Construcción 2IR-IL-Timer. Para generar la construcción 2IR de TYLCV-IL que expresa la proteína DsRED-E5, se construyó el plásmido p2IRILTimer, sustituyendo la fase abierta de lectura de la GFP del plásmido p2IRILGFP por la de la DsRED-E5. Para ello se purificó un fragmento de 681 pb que contiene la fase abierta de lectura de DsRED-E5 obtenido mediante digestión *KpnI-NotI* del plásmido pTimer (Clontech, (Terskikh *et al.*, 2000). Se eliminó la fase abierta de lectura de la GFP del vector p2IRILGFP digiriendo con *XbaI* y *SacI* y se purificó el fragmento de 13.477 pb. Tras generar extremos romos se ligaron los fragmentos y se seleccionó el plásmido recombinante que contiene la DsRED-E5 en la orientación apropiada mediante PCR con las parejas de cebadores OM5/OM8 y OM5/OM7 y al que se denominó p2IRILTimer.

Construcciones de TYLCSV.

Construcción 2IR-Sar-DsRED. Se purificó un fragmento de 678 pb conteniendo la fase abierta de lectura de la DsRED mediante digestión de

pCRDsRED con *XbaI-BamHI*. Una vez generados extremos romos, el fragmento se clonó en el sitio *HpaI* de pGTYOM para obtener p2IRSarDsRED. pGTYOM es un vector binario que contiene dos repeticiones directas de la región intergénica de TYLCSV flanqueando un promotor CaMV35S y un terminador NosT (Morilla *et al.*, 2006). La orientación del inserto se determinó por PCR usando las parejas de cebadores OM5/OM8 y OM5/OM7. El plásmido con la fase abierta de lectura de la DsRED en sentido con el promotor CaMV35S se denominó p2IRSarDsRED.

Construcción 2IR-Sar-Timer. La construcción DsRED-E5 se obtuvo clonando la fase abierta de lectura de DsRED-E5 en *HpaI* de pGTYOM. Para ello se digirió pTIMER con *KpnI-NotI* y se purificó el fragmento de 681 pb, en el que se generaron extremos romos. La orientación del inserto se determinó por PCR usando las parejas de cebadores OM5/OM8 y OM5/OM7. El plásmido con la fase abierta de lectura de la DsRED-E5 en sentido con el promotor CaMV35S se denominó p2IRSarTimer.

2.2.2 Análisis de las construcciones 2IR.

Antes de proceder a la transformación de plantas de *N. benthamiana* con las construcciones 2IR, se llevó a cabo un ensayo para confirmar la inducción de la expresión de los genes chivato en presencia del virus o de la proteína Rep correspondiente. Para ello, se coagroinfiltró cada construcción 2IR, con un clon infectivo del virus, un vector de expresión de la proteína Rep, o un vector vacío (Figura 2.2). Tres días después de la infiltración, se observaron las hojas bajo luz ultravioleta (Figura 2.2). Como control positivo se utilizó el plásmido p2IR-GFP, usado para generar las plantas transgénicas que sobreexpresan GFP en las células en las que se está replicando TYLCSV (Morilla *et al.*, 2006), que denominaremos 2IR-Sar-GFP.

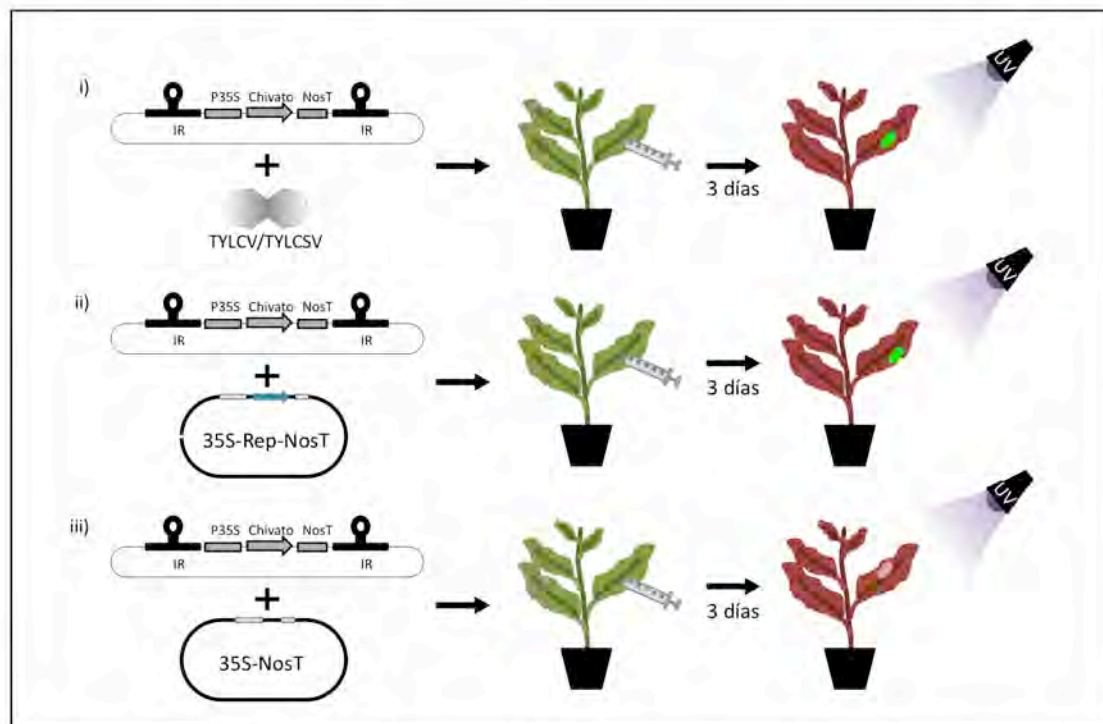


Figura 2.2: Ensayo de expresión transitoria de las construcciones 2IR. Las construcciones se agroinfiltraron junto con: un clon infectivo del virus (i), con un vector de expresión de Rep (ii) o con un vector binario con un casete de expresión vacío CaMV35S-NosT (pBINX1) como control negativo (iii). La expresión del gen chivato se analizó bajo luz ultravioleta a los tres días de la infiltración.

-Construcciones de TYLCSV: En el tejido agroinfiltrado con el vector vacío pBINX1 (Sánchez-Durán *et al.*, 2011) se detecta un bajo nivel de fluorescencia. La intensidad de la misma es mucho mayor en toda la zona infiltrada cuando se coinfiltraron las construcciones 2IR con el clon infectivo del virus pGTYA2 (Morilla *et al.*, 2004). Lo mismo ocurre al coinfiltrarlo con un vector que expresa Rep de TYLCSV (pACS1, Morilla *et al.*, 2006), observándose especialmente intensa en las zonas cercanas al tejido conductor. Resultados similares se obtuvieron al coinfiltrar los demás plásmidos que contienen las IR de TYLCSV flanqueando a los otros genes chivato (p2IRSarDsRED y p2IRSarTimer) (Figura 2.3).

-Construcciones de TYLCV: Los resultados obtenidos con las construcciones que contiene la IR de TYLCV-IL fueron similares a los de TYLCSV. En todos los casos, GFP, DsRED o Timer, se detectó una inducción en la expresión del gen chivato en los tejidos coinfiltrados con un clon

infectivo de TYLCV (pGTYCZ-40) o con un plásmido binario que expresa la proteína Rep de TYLCV a partir del promotor 35SCaMV (pBINX'C1Cz).

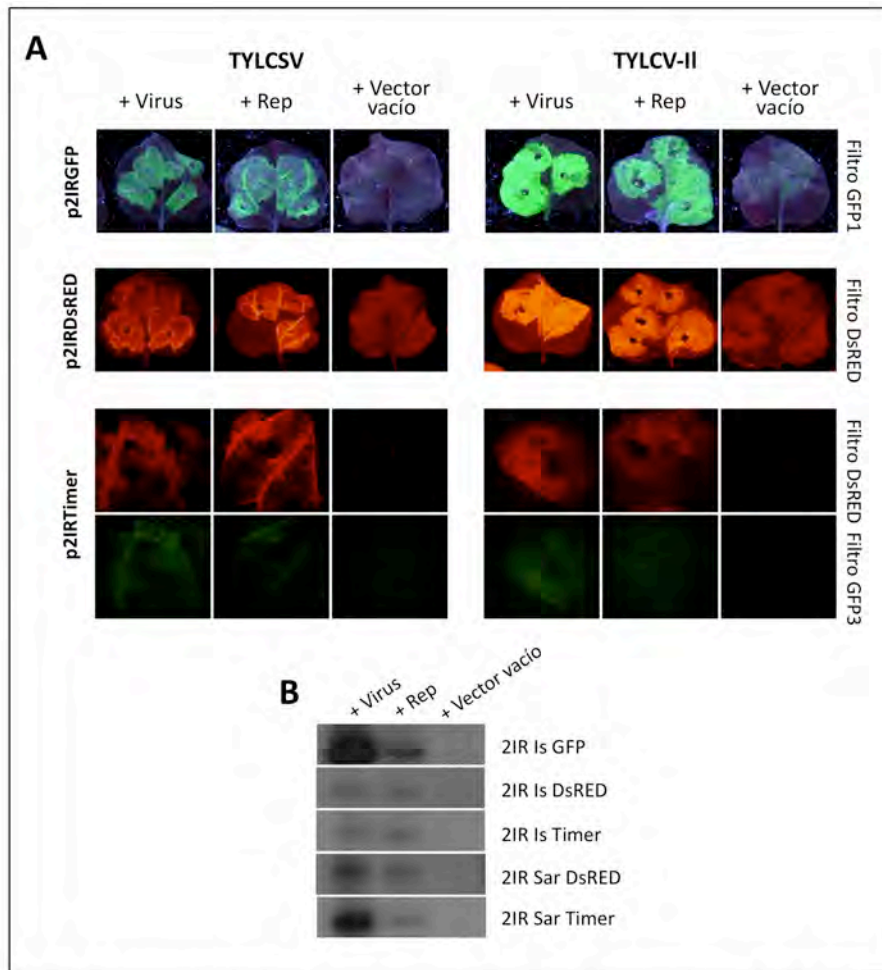


Figura 2.3: Resultados del ensayo de expresión transitoria de las construcciones 2IR. **(A)** A los tres días de la infiltración, las hojas infiltradas se fotografiaron bajo luz ultravioleta y **(B)** se analizó por hibridación Southern la presencia de moléculas extracromosómicas (8 ug de DNA de las hojas infiltradas, digeridos con *EcoRI* e hibridados con una sonda marcada con P³² por random priming preparada con la ORF del gen chivato correspondiente).

Para evaluar la formación y acumulación de moléculas extracromosómicas, se extrajo DNA de las hojas agroinfiltradas y se analizó por Southern blot. Se digirieron con *EcoRI* 8 mg de DNA total de cada muestra y se separaron en geles de agarosa al 8%. Se usaron como sondas las fases abiertas de lectura completas de los correspondientes genes chivato (obtenidas por digestión). Como era de esperar, en las calles que contienen DNA extraído de los tejidos coagroinfiltrados con el clon infectivo del virus o con el vector de expresión de Rep se detectó una banda de entre 2,1 y 2,2 Kb

que se corresponde con el tamaño esperado para una ME de DNA de doble cadena (Figura 2.3 B). Esta banda no aparece en las muestras de las hojas co-infiltradas con el vector vacío. Las diferencias de intensidad observadas entre las bandas pueden deberse a diferencias en los niveles de expresión de Rep o de replicación del virus que no se determinaron.

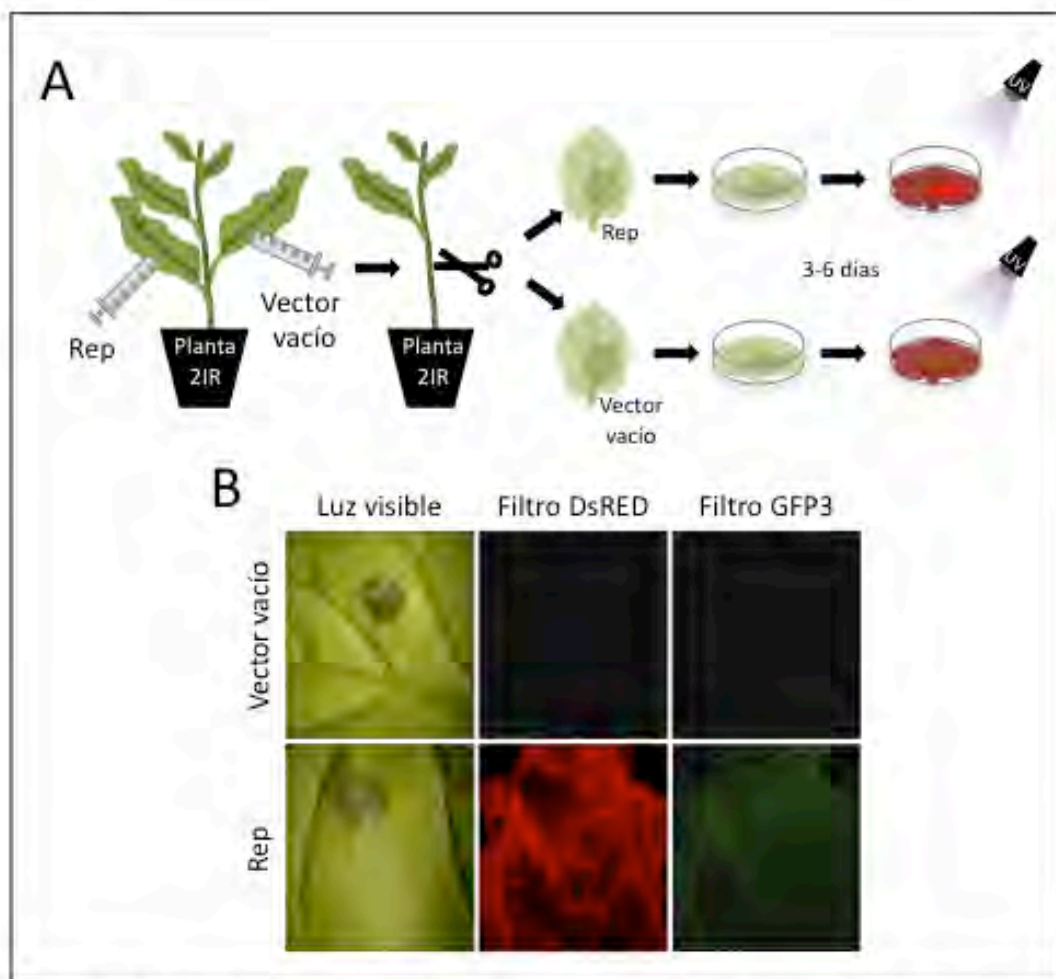


Figura 2.4: Ensayo de infiltración en hojas cortadas. **A:** Esquema del ensayo. Se infiltraron hojas con un casete de expresión de la proteína Rep o con un vector vacío (pBINX1) como control negativo. Se cortaron las hojas por la base del peciolo inmediatamente después de ser infiltradas y se incubaron en una atmósfera saturada de humedad durante 6 días (16h de luz / 8h de oscuridad). Se observaron para ser observadas bajo luz ultravioleta. **B:** Resultados del ensayo sobre una planta 2IR Sar Timer. Imágenes tomadas a los 4 días con una lupa de epifluorescencia bajo luz visible y bajo luz ultravioleta con filtro DsRED para detectar la proteína madura y filtro GFP3 para detectar la proteína que aún no ha terminado su proceso de plegamiento.

2.2.3 Obtención de plantas transgénicas de *N. benthamiana* con las construcciones 2IR.

Una vez comprobado el funcionamiento de las construcciones, se procedió a obtener plantas transgénicas de *N. benthamiana* con todas las construcciones generadas (p2IRILGFP, p2IRILDsRED, p2IRILTimer, p2IRSarDsRED y p2IRSarTimer). Para ello se transformaron discos de hoja con *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el protocolo descrito por Horsch *et al.*, 1985. Para cada construcción se obtuvieron de 20 a 40 callos resistentes kanamicina, a partir de los cuales se regeneraron de 8 a 12 plantas (Tabla 2.1).

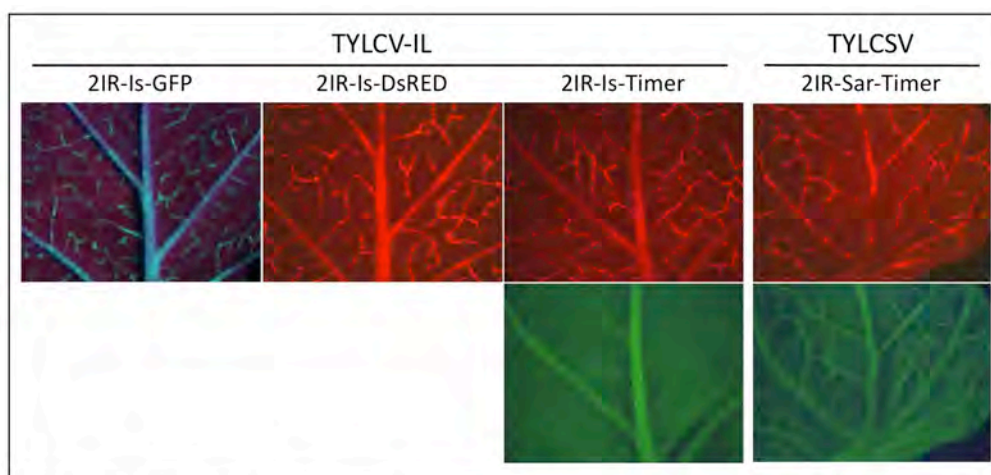


Figura 2.5: Tejidos en los que se replican TYLCV-II y TYLCSV. La fluorescencia, resultado de la expresión de los genes chivatos es similar a la descrita en Lozano *et al.*, 2011, que describe el desarrollo de la infección de TYLCSV en plantas 2IR-Sar-GFP. Las fotos se tomaron entre las 2 y 3 semanas posteriores a la inoculación. En el caso de las construcciones Timer, se muestran imágenes tomadas con el filtro DsRED, que muestra la proteína madura y con el filtro GFP3 que muestra la proteína recién sintetizada.

Para comprobar que plantas transformadas contenían las construcciones 2IR y que estas eran funcionales, se llevó a cabo un ensayo de inducción de la expresión de los genes chivatos en presencia de la proteína Rep correspondiente. Se agroinfiltraron dos hojas de cada planta T1, una con un plásmido de expresión de Rep y otra con el vector vacío pBINX1. A continuación, la hojas infiltradas se aislaron de la planta cortando sus peciolo y se depositaron en una placa de Petri sobre papel de

filtro humedecido con agua. Cuatro días después de la agroinfiltración se observaron las hojas bajo luz ultravioleta, comparando las diferencias en la expresión del gen chivato entre la hoja que infiltrada con el casete de expresión de Rep y la infiltrada con pBINX1 (Figura 2.4A). Como ejemplo de un resultado positivo, en la figura 2.4B se muestra el obtenido con una de las plantas T1 transformadas con p2IR-Sar-Timer.

Tabla 2.1: Transformación de *N. benthamiana* con las construcciones 2IR.

Construcción	2IR-IL-GFP	2IR-Sar-DsRED	2IR-IL-DsRED	2IR-Sar-Timer	2IR-IL-Timer	
Discos de hoja ⁽¹⁾	110	60	60	60	60	
Callos ⁽²⁾	31	21	21	37	22	
Plantas en sustrato ⁽³⁾	14	16	44	40	34	
Líneas transformantes ⁽⁴⁾	14	16	8	12	10	
Hoja cortada ⁽⁵⁾	13/13	12/16	4/8	12/12	10/10	
Semillas T1 ⁽⁶⁾	10/13	12/16	4/8	12/12	9/10	
Segreg. ⁽⁷⁾	1 locus	9	9	2	5	3
	2 loci	1	3	2	7	0
Fenotipo SAR ⁽⁸⁾	E3	K1	F1	C2	D2	
Semillas T2 ⁽⁹⁾	E3.1-E3.6	K1.1-K1.6	F1.1-F1.6	C2.1-C2.6	D2.1-D2.6	
T3 Homocig. ⁽¹⁰⁾	E3.3	ND	ND	ND	ND	

Se indican el número de:

- 1) Discos de hoja agroinoculados.
- 2) Callos independientes resistentes a kanamicina obtenidos a partir de los discos de hoja agroinoculados.
- 3) Plantas regeneradas a partir de los callos que sobrevivieron al proceso de enraizado y aclimatación a sustrato.
- 4) Líneas transformantes independientes obtenidas.
- 5) Líneas en las que se detectó un incremento de la expresión del gen chivato en experimentos de sobreexpresión transitoria de Rep en hojas cortadas.
- 6) Líneas de las que se obtuvieron semillas T2
- 7) Líneas que contienen la construcción insertada en uno o dos loci. Datos obtenidos por la segregación de la resistencia a kanamicina y evaluada mediante θ^2 .
- 8) Nombre de las líneas T1 con la construcción en un sólo locus con el fenotipo SAR más intenso.
- 9) Nombre de las líneas T2 de las que se recogieron semillas T3.
- 10) Nombre de las líneas T3 identificadas como homocigóticas mediante análisis de la segregación de la resistencia a kanamicina.

Todas las plantas transgénicas obtenidas con las construcciones p2IRILGFP, p2IRILTimer y p2IRSarTimer mostraron el incremento esperado de la expresión del gen chivato (Figura 2.5), sin embargo sólo el 50% y 75% de las plantas obtenidas con p2IRILDsRED y p2IRSarDsRED respectivamente, mostraron la inducción de la expresión del gen chivato al expresar las proteínas Rep correspondientes (Tabla 2.1).

Las plantas T1 en las que se detectó inducción del gen chivato dependiente de la expresión de Rep se seleccionaron para su caracterización posterior. En primer lugar se obtuvieron semillas T2 de las líneas, que se utilizaron para determinar el número de loci en los que se había integrado las construcciones mediante segregación de la resistencia a kanamicina (Tabla 2.1), detectándose líneas con segregación 3:1 para todas las construcciones.

2.2.4 Ensayos de infección.

A continuación, se realizó un ensayo para evaluar la inducción del gen chivato en infecciones sistémicas. Para ello se eligió una línea de cada construcción que presentara una segregación 3:1 e inducción de la expresión del gen chivato en el ensayo de hoja cortada (Tabla 2.1).

Se esterilizaron semillas T2 de cada una de las líneas seleccionadas y se germinaron en MS con kanamicina. A las 2 semanas, las plantas resistentes a kanamicina se transfirieron a sustrato y se dejaron crecer hasta tener de 4 a 5 hojas. Seguidamente, se agroinocularon de 10 a 25 plantas de cada línea con un clon infectivo de TYLCSV o TYLCV inyectando una suspensión de *A. tumefaciens* en el tallo, a través de la yema axilar de la tercera o cuarta hoja por encima de los cotiledones. Como control negativo se agroinocularon de 5 a 10 plantas con un cultivo que contiene el plásmido binario vacío pBINX1. La hoja situada en el punto de la agoinoculación se denomina hoja 0 y sirvió como referencia para posteriores observaciones. Cada semana se evaluó el desarrollo de síntomas y la inducción de la expresión del gen chivato de todas las hojas situadas por encima o al nivel del punto de inoculación en 2 o 5 plantas inoculadas con el virus y 1 o 2 con

el vector vacío. Así mismo, se extrajo DNA de las tres hojas más apicales de las plantas evaluadas para cuantificar la cantidad de virus y de moléculas extracromosómicas (ME) acumuladas. Las infecciones se repitieron dos veces para cada construcción excepto para la construcción 2IR-IL-DsRed con la que se realizó un único ensayo (Tabla 2.2).

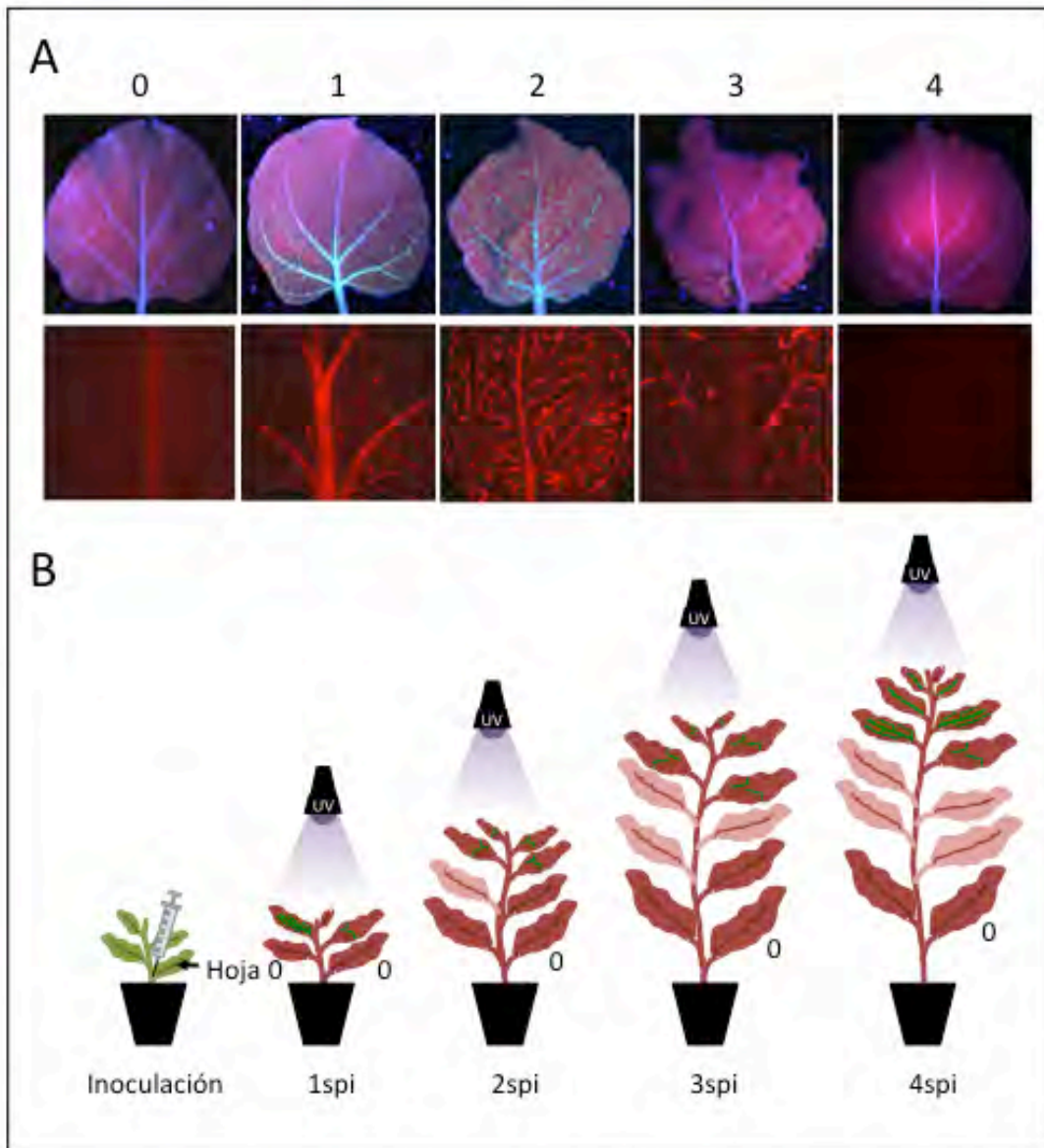


Figura 2.6: Ensayos de infección. A) Escala de expresión de GFP en una planta 2IRCzGFP (arriba) y de DsRED en una planta 2IRCzDsRED (abajo). B) Desarrollo de los ensayos de infección. Las plantas 2IR se inocularon cuando tenían de 4 a 5 hojas. Semanalmente, se monitorizaron los síntomas y la expresión del gen chivato en cada una de las hojas.

Para evaluar la inducción de la expresión del gen chivato utilizamos una escala (Figura 2.6) basada en los resultados obtenidos con la construcción 2IR-Sar-GFP (Lozano-Durán *et al.*, 2011) que describen cuatro niveles del fenotipo al que denominan SAR (Tabla 2.3). Para evaluar la severidad de los síntomas utilizamos un índice de 0 a 3 (Tabla 2.4).

Tabla 2.3: Índice de la expresión del fenotipo SAR.

Fenotipo	Descripción
SAR0	Expresión basal del gen chivato
SAR1	Inicio de la expresión en nervios principales, por lo general en la base de la hoja
SAR2	Expresión generalizada e intensa en todos los nervios en todo el limbo de la hoja
SAR3	Expresión débil, generalmente en nervios secundarios, con el nivel basal del fondo desapareciendo o ausente
SAR4	Ausencia de la expresión tanto basal como asociada a la replicación del gen chivato en toda la hoja

Tabla 2.4: Índice de la severidad de los síntomas producidos por TYLCSV o TYLCV.

Índice	Descripción
0	Ausencia de síntomas
1	Aparición de una curvatura leve en la hoja
2	Abarquillamiento y arrugamiento de la superficie foliar
3	Reducción del tamaño y amarilleamiento de la hoja

Todas las plantas 2IR infectadas desarrollaron síntomas y fenotipos SAR excepto las plantas 2IR-Sar-DsRED que, a pesar de presentar la sintomatología típica de la infección con TYLCSV, no desarrollaron cambios en la expresión del gen chivato (Tabla 2.2). Las figuras 2.7 A, 2.8 A, 2.9 A y 2.10 A muestran la evolución detallada de los síntomas y de la expresión de los genes chivatos analizados hoja a hoja en las plantas 2IR a las 1, 2, 3 y 4 semanas después de la infección (spi).

Plantas 2IR-IL-GFP. Los síntomas en estas plantas comienzan a ser visibles una semana después de la inoculación. A las dos semanas aparecen los síntomas más severos en las hojas apicales manteniéndose hasta cuarta semana. Esta cinética correlaciona con la de acumulación de virus, que presenta también su máximo a las 2 spi. El desarrollo de la expresión de GFP sigue un patrón similar al descrito por Lozano-Durán *et al.*, 2011, detectándose la inducción de GFP y la aparición del fenotipo SAR2 al mismo tiempo que la aparición de los síntomas.

La expresión de GFP se mantiene hasta la tercera semana después de la infección, aunque sólo mostrando el fenotipo SAR3 en el que la fluorescencia verde ha desaparecido de la lámina foliar y queda restringida a algunos haces vasculares. Una semana más tarde no se detecta expresión de GFP en ninguna de las hojas situadas por encima del punto de inoculación. El fenotipo SAR correlaciona con la acumulación de las MEs que es máxima a 1 spi y se reduce posteriormente.

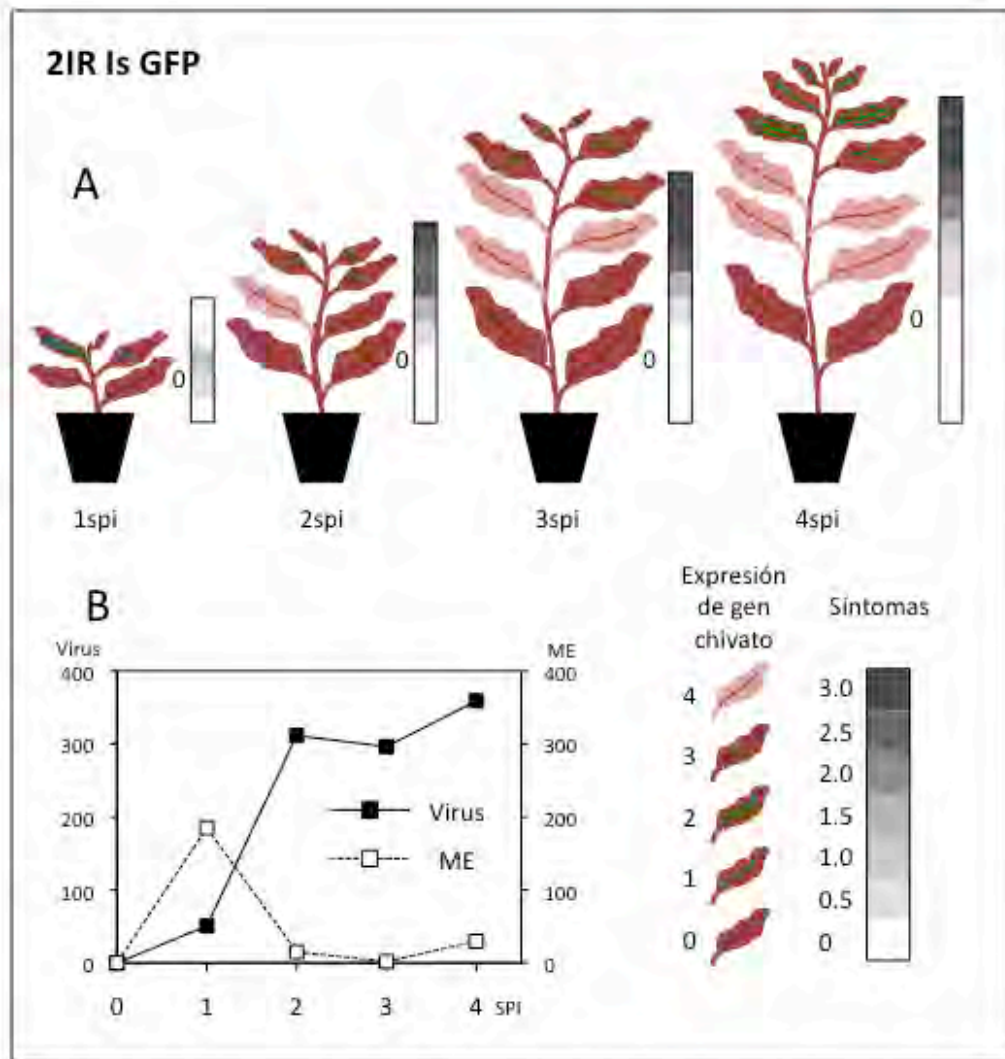


Figura 2.7: Resultados del ensayo de infección de las plantas 2IR Is GFP. A) Expresión del gen chivato y de los síntomas a lo largo del experimento. Los resultados a lo largo de toda la planta se han representado en un estándar con 5, 8, 10 y 13 hojas para la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª semanas respectivamente y son las medias de todas las hojas que ocupan la misma posición con respecto a la hoja 0. B) Niveles de virus y moléculas extracromosómicas detectados por Q-PCR. Los niveles de virus y los de las ME se expresan en millares de unidades arbitrarias relativizadas a los niveles de DNA genómico de la planta. Se realizaron dos réplicas independientes de este ensayo de infección. En cada una se agroinocularon 10 plantas con un clon infectivo de TYLCSV y 5 con un vector vacío por cada punto de muestreo.

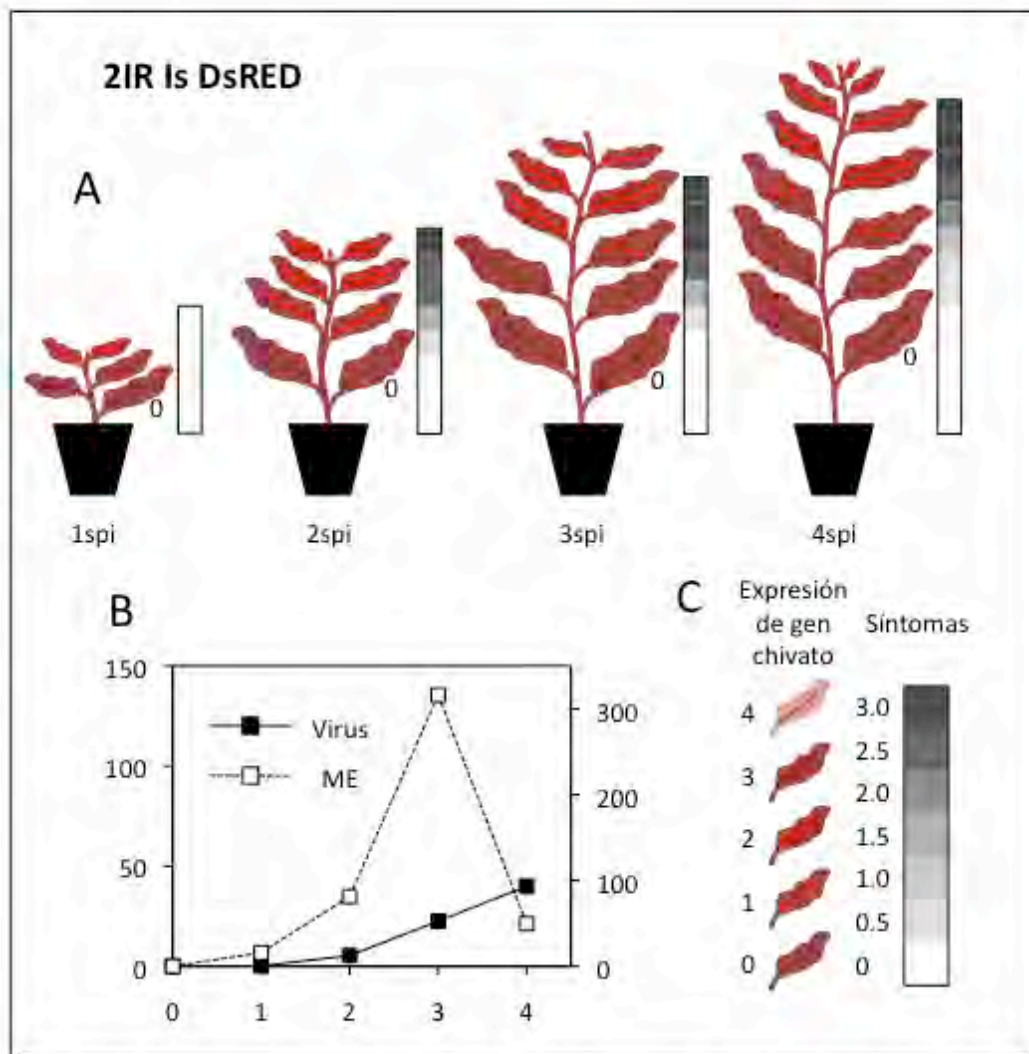


Figura 2.8: Resultados del ensayo de infección de las plantas 2IR Is DsRED. A) Expresión del gen chivato y de los síntomas a lo largo del experimento. Los resultados a lo largo de toda la planta se han representado en un estándar con 5, 8, 10 y 13 hojas para la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª semanas respectivamente y son las medias de todas las hojas que ocupan la misma posición con respecto a la hoja 0. B) Niveles de virus y moléculas extracromosómicas detectados por Q-PCR. Los niveles de virus se expresan en millares y los de las ME en unidades arbitrarias relativizadas a los niveles de DNA genómico de la planta. Se realizó tan sólo una réplica de este ensayo de infección. Se agroinocularon 5 plantas con un clon infeccioso de TYLCSV y 3 con un vector vacío por cada punto de muestreo.

Plantas 2IR-IL-DsRED. En las infecciones de estas plantas los síntomas no aparecen hasta la 2spi, alcanzando su máximo una semana después. Esta cinética en el desarrollo de los síntomas correlaciona con la acumulación de virus, observándose un incremento continuado desde la primera semana de la infección. La aparición de la expresión de DsRED en estas plantas se detecta a 1spi, a la que algunas hojas ya han desarrollado

fenotipos SAR1 y SAR2. A las 2spi, el número de hojas apicales que han desarrollado estos fenotipos es muy superior, apareciendo fenotipo SAR3 en las hojas más alejadas del ápice (+3 a +5). Esta situación se mantiene durante las 3 y 4 spi en las que todas las hojas nuevas tienen fenotipo SAR1 o SAR2, y las hojas ya existentes a las 2spi muestran fenotipos SAR2 o han visto reducida la fluorescencia roja a niveles de SAR3. Es llamativo que no se detecte silenciamiento en la expresión de DsRED en las plantas infectadas tal y como sucede en las plantas 2IR-IL-GFP. El aumento en la expresión de fluorescencia roja correlaciona con el de la acumulación de ME, que se incrementa desde la primera semana alcanzando su máximo a las 3 spi. De forma similar a lo que ocurre con las ME derivadas de las construcciones 2IR-IL-GFP, la acumulación de ME disminuye rápidamente una semana después de este pico.

Plantas 2IR-IL-Timer. El desarrollo de los síntomas, la expresión de la fluorescencia roja y la acumulación de virus y ME en las plantas infectadas son muy similares a los descritos para las plantas 2IR-IL-DsRED. Al igual que en las plantas que expresan DsRED, estas plantas mantienen la expresión del gen chivato en la mayor parte de las hojas situadas por encima de la hoja +5 sin que se detecte silenciamiento (fenotipo SAR4) del gen chivato, alcanzándose un máximo en la acumulación de la ME tres semanas después de la infección. El cambio del espectro de emisión que se produce durante la maduración de esta versión de la DsRED (de verde a rojo) presente en estas plantas nos permite realizar un seguimiento temporal más detallado de la expresión del gen chivato, ya que la presencia de fluorescencia verde en un tejido indica que la síntesis de la proteína se ha realizado recientemente (menos de 6 horas).

En este sentido, resulta interesante que los patrones temporales de emisión de fluorescencia verde y roja en las plantas 2IR-IL-DsRED son diferentes. Aunque ambas fluorescencias se detectan por primera vez a las 2 spi y se mantienen las plantas a las 3 y 4 spi, los patrones espaciales de expresión para las dos fluorescencias son parcialmente diferentes a las 3 y 4 spi. Así, no se observa inducción de la fluorescencia verde en las hojas más

apicales, ni es las situadas más cerca del punto de inoculación a las 3 y 4 spi, que sí muestran fenotipos SAR1 o SAR3 para la fluorescencia roja.

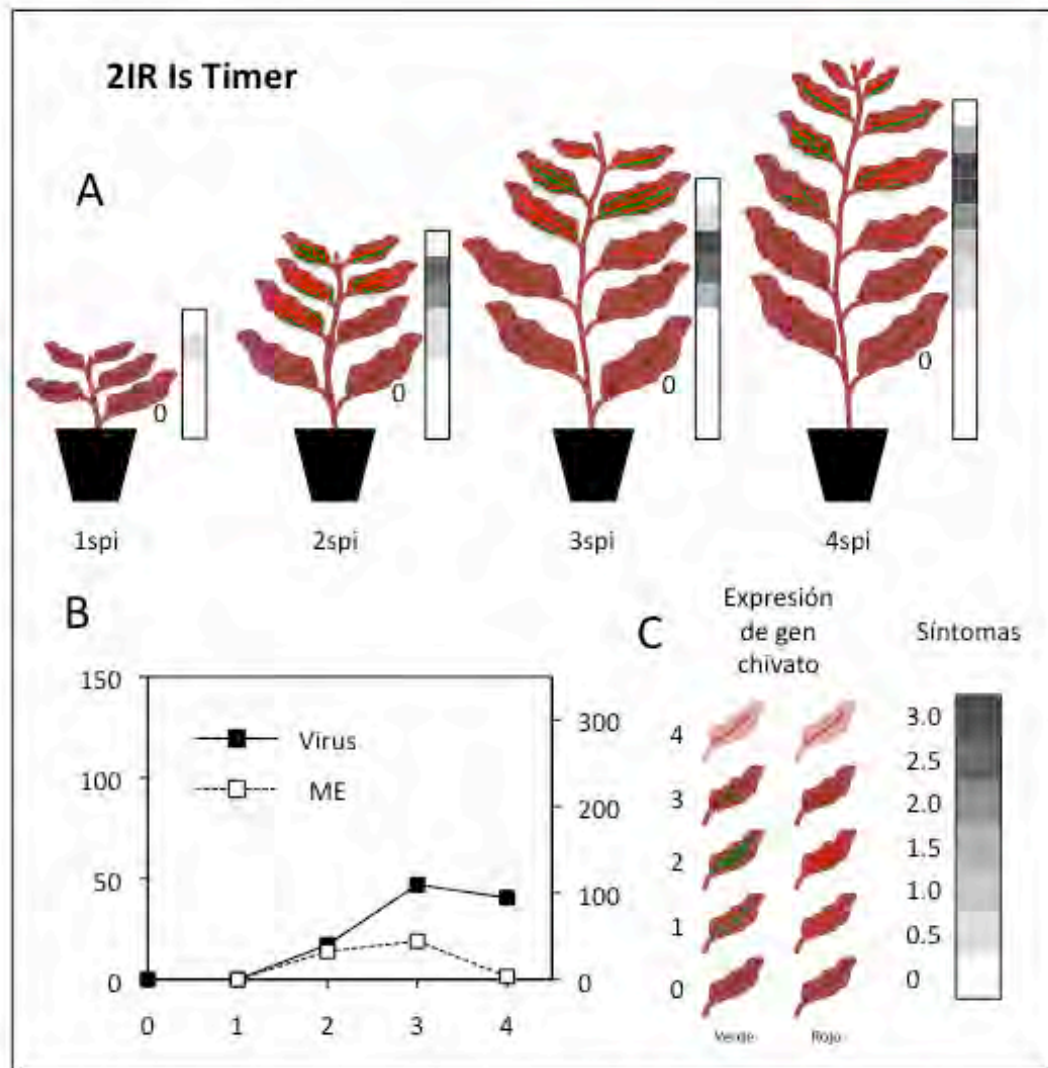


Figura 2.9: Resultados del ensayo de infección de las plantas 2IR Is Timer. A) Expresión del gen chivato y de los síntomas a lo largo del experimento. Los resultados a lo largo de toda la planta se han representado en un estándar con 5, 8, 10 y 13 hojas para la 1^a, 2^a, 3^a y 4^a semanas respectivamente y son las medias de todas las hojas que ocupan la misma posición con respecto a la hoja 0. B) Niveles de virus y moléculas extracromosómicas detectados por Q-PCR. Los niveles de virus se expresan en millares y los de las ME en unidades arbitrarias relativizadas a los niveles de DNA genómico de la planta. Se realizaron dos réplicas independientes de este ensayo de infección. En cada una se agroinocularon 5 plantas con un clon infectivo de TYLCSV y 3 con un vector vacío por cada punto de muestreo.

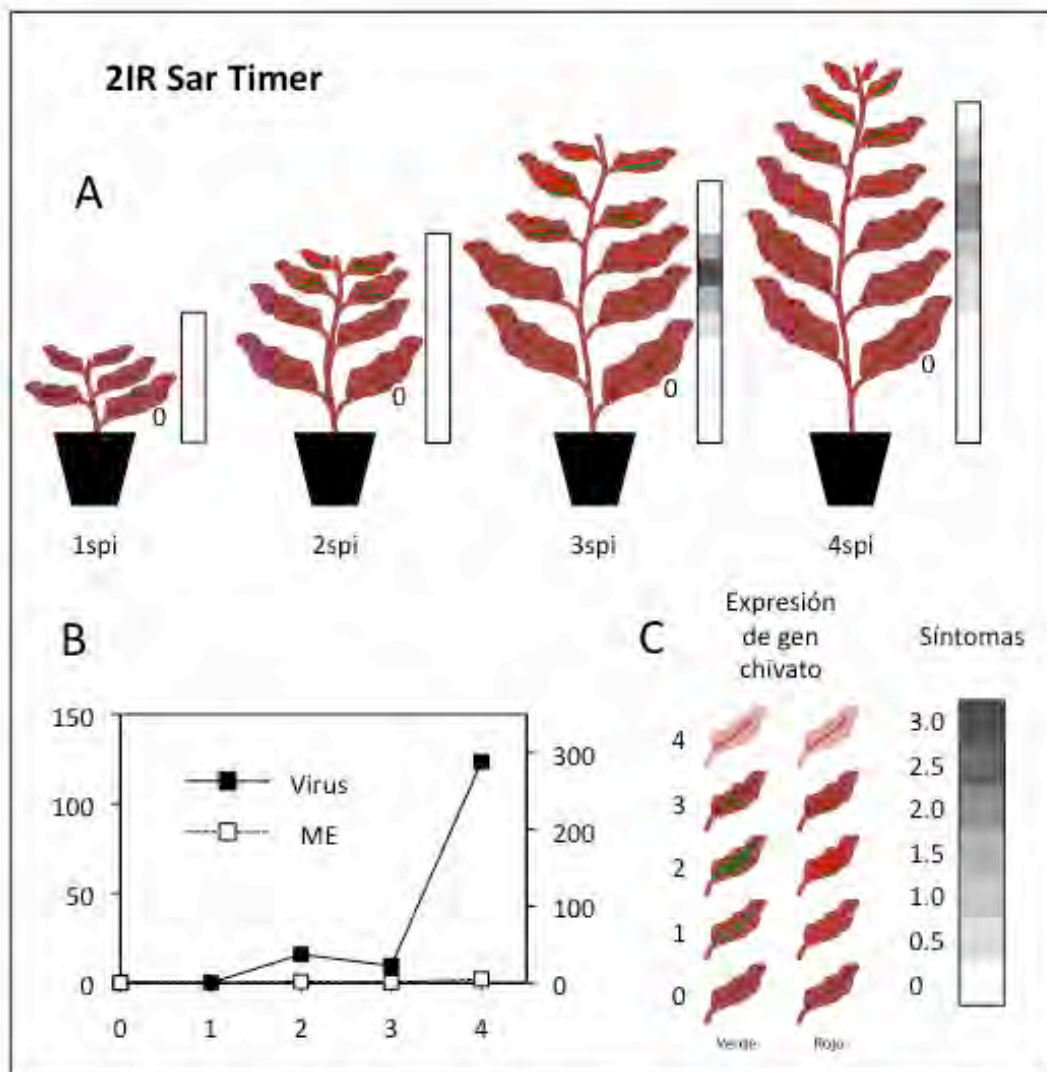


Figura 2.10: Resultados del ensayo de infección de las plantas 2IR Sar Timer. A) Expresión del gen chivato y de los síntomas a lo largo del experimento. Los resultados a lo largo de toda la planta se han representado en un estándar con 5, 8, 10 y 13 hojas para la 1^a, 2^a, 3^a y 4^a semanas respectivamente y son las medias de todas las hojas que ocupan la misma posición con respecto a la hoja 0. B) Niveles de virus y moléculas extracromosómicas detectados por Q-PCR. Los niveles de virus se expresan en millares y los de las ME en unidades arbitrarias relativizadas a los niveles de DNA genómico de la planta. Se realizaron dos réplicas independientes de este ensayo de infección. En cada una se agroinocularon 5 plantas con un clon infectivo de TYLCSV y 3 con un vector vacío por cada punto de muestreo.

Plantas 2IR-Sar-Timer. Al igual que en el caso anterior, las plantas 2IR-Sar-Timer infectadas con el virus, desarrollaron los fenotipos SAR correspondientes tanto a la fluorescencia roja como a la verde emitida por DsRED-E5, estando ausente esta última en las hojas más apicales y las situadas por encima de la hoja +7 a +9 a las 3 y 4 spi, hojas que aún presentaban fenotipo SAR para la fluorescencia roja. El desarrollo de

síntomas y la expresión del gen chivato en estas plantas está muy atenuado en intensidad con respecto al de las otras líneas transgénicas y al descrito para las 2IR-Sar-GFP (Lozano-Durán *et al.* 2011) sin que se llegue a alcanzar el nivel máximo de la expresión del gen chivato más que en una única hoja en la tercera semana de infección. El posterior análisis molecular mostró que la reducción en la expresión del gen chivato se corresponde con una reducida acumulación de moléculas extracromosómicas, que aun siendo detectables desde la 2ª spi, se acumulaban a un nivel muy bajo, incrementándose ligeramente a la 4ª spi. Algo parecido ocurre con la acumulación de virus, cuyo nivel se mantiene muy bajo hasta la cuarta spi.

2.3 DISCUSIÓN.

Tal y como se indicó en la introducción, las plantas 2IR-Sar-GFP (Morilla *et al.*, 2006) son una poderosa herramienta para investigar el desarrollo de la infección de TYLCSV (Morilla *et al.*, 2006), identificar genes del hospedador implicados en la replicación del virus (Lozano-Durán *et al.*, 2011), estudiar relaciones de sinergia entre distintos virus (Caracuel *et al.*, 2011), analizar los efectos de los estreses abióticos sobre la capacidad de replicarse del virus (esta tesis, capítulo 3), *etc...*

No obstante, estas construcciones tienen algunas limitaciones. Así, por ejemplo, la alta especificidad de Rep por la secuencia diana de la región intergénica hace que sólo TYLCSV, y no TYLCV-IL, sea capaz de movilizar moléculas extracromosómicas de una planta 2IR-Sar-GFP. Esto conlleva, que sea necesario generar construcciones específicas para cada virus. Así pues, para estudiar el desarrollo de las infecciones de TYLCV-IL, el virus más extendido del complejo TYLCD, generamos las plantas 2IR-IL-GFP.

En Morilla *et al.*, 2006, se describe que sólo TYLCSV es capaz de movilizar moléculas extracromosómicas desde la construcción 2IR-Sar-GFP. Del mismo modo, durante el desarrollo de los experimentos de infección sistémica en plantas, se llevó a cabo un ensayo en el que se inocularon plantas 2IR-IL-GFP con TYLCSV (datos no mostrados). Aunque todas las

plantas presentaron síntomas de la enfermedad, ninguna mostró un incremento en la expresión de GFP, confirmándose la especificidad de la capacidad de movilizar moléculas.

El hecho de que la GFP no emita fluorescencia en hojas de tomate, nos llevó a generar las construcciones 2IR-Sar-DsRED y 2IR-IL-DsRED. La obtención de plantas transgénicas con estas construcciones en *N. benthamiana* persigue dos objetivos: (i) comprobar que estas construcciones generen fenotipos similares a los producidos por las construcciones con GFP sin que alteren los patrones de replicación e infección del virus; (ii) generar plantas en las que se pueda monitorizar la infección con los dos virus (TYLCSV y TYLCV) mediante cruzamiento de las plantas transgénicas que contienen las construcciones 2IR-Sar y 2IR-IL con distintos fluoróforos.

Las plantas 2IR-IL han mostrado un patrón similar en el desarrollo de la enfermedad, la expresión del gen chivato y la acumulación de virus y de moléculas extracromosómicas, independientemente del gen chivato usado en la construcción. En todos los casos, el máximo en la acumulación de moléculas extracromosómicas coincide con o precede al momento en el que se alcanza el máximo de acumulación del virus, lo cual no es de extrañar, dado que para que se formen moléculas extracromosómicas es imprescindible la presencia y acción de la proteína vírica Rep, siendo ésta expresada en los estadios tempranos de la infección del virus.

También en todos los casos se observa una reducción en las moléculas extracromosómicas a la tercera o cuarta semana de la infección, que puede deberse a una disminución en la tasa de replicación del virus. Este patrón de expresión es muy similar a lo descrito para las plantas 2IR-Sar-GFP, aunque los tiempos en los que se produce la máxima acumulación de virus y moléculas extracromosómicas varían, dependiendo seguramente de las condiciones de la infección.

El hecho de que en las plantas que contienen las construcciones para expresar DsRED-E5 (Timer) la aparición de la fluorescencia verde siempre preceda a la fluorescencia roja y que en las hojas más apicales de estas plantas, cuando están infectadas, no se detecte nunca fluorescencia roja pero

sí fluorescencia verde, sugiere que la emisión de fluorescencia verde se debe a proteína sintetizada como consecuencia de la replicación de los virus en esos tejidos. No obstante, y teniendo en cuenta que las hojas en las que se detecta el fenotipo SAR son hojas sumidero, no podemos excluir completamente que parte de la fluorescencia correspondiente a la DsRED-E5 madura se deba a proteína sintetizada en otra parte de la planta.

En las plantas 2IR-Sar-Timer, contrariamente a lo esperable, ya que contienen las mismas regiones intergénicas que las plantas 2IR-Sar-GFP, no se aprecia una acumulación de moléculas extracromosómicas que alcance un máximo entre las 2 y las 3 spi, si no un leve incremento a las 4 spi. En estas plantas la baja intensidad de la expresión del gen chivato podría deberse al retraso observado en el desarrollo de la infección, que puede inferirse del retraso en la acumulación de virus y de la aparición tardía y disminución de la intensidad de los síntomas y que puede deberse a factores ambientales.

2.4 BIBLIOGRAFÍA.

Baulcombe, D. C., S. Chapman, et al. (1995). "Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections." Plant J 7(6): 1045-53.

Campbell, R. E., O. Tour, et al. (2002). "A monomeric red fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A 99(12): 7877-82.

Caracuel, Z., R. Lozano-Duran, et al. (2012). "C2 from Beet curly top virus promotes a cell environment suitable for efficient replication of geminiviruses, providing a novel mechanism of viral synergism." New Phytol 194(3): 846-58.

Haupts, U., S. Maiti, et al. (1998). "Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy." Proc Natl Acad Sci U S A 95(23): 13573-8.

Heim, R., D. C. Prasher, et al. (1994). "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A 91(26): 12501-4.

Horsch, R. B., S. G. Rogers, et al. (1985). "Transgenic plants." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 50: 433-7.

Kneen, M., J. Farinas, et al. (1998). "Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator." Biophys J 74(3): 1591-9.

Kunik, T., L. Mizrachi, et al. (1999). "Characterization of a tomato karyopherin alpha that interacts with the Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) capsid protein." Journal of Experimental Botany 50(334): 731-732.

Kunik, T., K. Palanichelvam, et al. (1998). "Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells." Plant J 13(3): 393-9.

Liang, Q., H. Deng, et al. "Tripartite motif-containing protein 28 is a small ubiquitin-related modifier E3 ligase and negative regulator of IFN regulatory factor 7." J Immunol 187(9): 4754-63.

Lozano-Duran, R., T. Rosas-Diaz, et al. (2011). "Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach." PLoS One 6(7): e22383.

Morilla, G., A. G. Castillo, et al. (2006). "A versatile transreplication-based system to identify cellular proteins involved in geminivirus replication." J Virol 80(7): 3624-33.

Morilla, G., D. Janssen, et al. (2005). "Pepper (*Capsicum annuum*) Is a Dead-End Host for Tomato yellow leaf curl virus." Phytopathology 95(9): 1089-97.

Morilla, G., B. Krenz, et al. (2004). "Tete a tete of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei." J Virol 78(19): 10715-23.

Patterson, G. H., S. M. Knobel, et al. (1997). "Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy." Biophys J 73(5): 2782-90.

Quadrana, L., M. C. Rodriguez, et al. (2011). "Coupling virus-induced gene silencing to exogenous green fluorescence protein expression provides a highly efficient system for functional genomics in Arabidopsis and across all stages of tomato fruit development." Plant Physiol 156(3): 1278-91.

Sanchez-Duran, M. A., M. B. Dallas, et al. (2011). "Interaction between Geminivirus Replication Protein and the SUMO-Conjugating Enzyme Is Required for Viral Infection." Journal of Virology 85(19): 9789-9800.

Stadler, R., Wright, K., et al. (2005). "Expression of GFP Fusions in Arabidopsis companion cells Reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots." The Plant Journal 41: 319-31

Terskikh, A., A. Fradkov, et al. (2000). "'Fluorescent timer': protein that changes color with time." Science 290(5496): 1585-8.

CAPÍTULO 3

EFECTOS DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN LA INFECCIÓN DE TYLCSV

3.1 INTRODUCCIÓN.

Uno de los principales retos a los que se enfrenta la agricultura en este siglo lo constituyen las variaciones en las condiciones ambientales que se están produciendo como consecuencia del cambio climático y la sobreexplotación de los recursos naturales. El aumento de temperatura, la salinización del suelo y las limitaciones de acceso al agua, son posiblemente los problemas más importantes a los que se tendrá que enfrentar la agricultura a lo largo del siglo XXI.

Estos cambios en las condiciones abióticas podrían afectar a la interacción de las plantas con sus patógenos, introduciendo un nuevo escenario en la interacción entre estreses bióticos y abióticos. Aunque existen muchos datos sobre las respuestas específicas de las plantas a estreses bióticos o abióticos, son muy escasos los existentes sobre el impacto que tienen cambios en la temperatura, salinidad o sequía sobre las infecciones. Los resultados publicados hasta la fecha muestran que cambios en las condiciones ambientales pueden alterar la susceptibilidad de la planta a un patógeno o a una plaga y viceversa y que los mecanismos de respuesta a estreses bióticos y abióticos comparten la expresión de genes comunes (Atkinson y Urwin, 2012; Cheong *et al.*, 2002; AbuQamar *et al.*, 2006; AbuQamar *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2013). Este “crosstalk” entre ambos tipos de estreses depende de una red de interacciones, en las que las hormonas, y en particular el ácido abscísico (ABA), juegan un papel central. Es bien conocido el papel que juega el ABA en la regulación de la respuesta de la planta a sequía, baja temperatura y estrés osmótico (Osakabe *et al.*, 2013), pero su relevancia en la respuesta a estreses bióticos ha sido mucho menos estudiada. Los escasos trabajos publicados hasta la fecha, indican que el ABA también funciona como regulador positivo o negativo de la respuesta a patógenos (Atkinson y Urwin 2012; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Tratamientos con la hormona o mutaciones en los genes de respuesta a ABA en *Solanum lycopersicum* o *Arabidopsis thaliana* producen cambios en la sensibilidad a hongos y bacterias (Audenaert *et al.*, 2002; Adie *et al.*,

2007; Hernandez-Blanco *et al.*, 2007; AbuQamar *et al.*, 2009; Ton y Mauch-Mani, 2004). Aunque se desconoce el mecanismo, el hecho de que algunas bacterias sean capaces de alterar la respuesta a ABA antagonizando con la defensa mediada por ácido salicílico (SA) (de Torres-Zabala *et al.*, 2007; de Torres Zabala *et al.*, 2009) o que la expresión de un gen de la biosíntesis de ABA provoque una disminución en el contenido de SA (Fan *et al.*, 2009), sugiere la existencia de un “crosstalk” en la respuesta a ambas hormonas y por tanto un efecto indirecto del ABA a través de la alteración de la respuesta a SA.

También es muy escasa la información sobre el efecto que tienen los estreses abióticos en las infecciones por virus. Aunque se han publicado trabajos sobre el impacto de la temperatura en la infección por virus, sugiriendo que el silenciamiento génico juega un papel relevante, se desconocen con exactitud los mecanismos implicados en dicho efecto. La información publicada sobre las consecuencias y desarrollo de infecciones víricas en condiciones de salinidad o sequía es aún más escasa. Los pocos trabajos publicados confirman la existencia de un “cross-talk” entre estos tipos de estreses demostrando que la infección por algunos virus de RNA produce tolerancia a la sequía (Xu *et al.*, 2008). En un trabajo reciente realizado con plantas de *A. thaliana* infectadas con el virus *Turnip mosaic virus* (TuMV) se concluyó que estreses abióticos como el calor y la sequía alteran significativamente la respuesta a la infección por el virus, desactivando la respuesta de defensa y aumentando la susceptibilidad a la infección (Maximilian y Sunnewald 2013; Prasch y Sunnewald, 2013)

Las plantas 2IR, descritas en el capítulo anterior de esta tesis, permiten monitorizar “*in vivo*” el progreso de las infecciones virales del complejo TYLCD sin que sea necesario realizar un análisis molecular. Por ello decidimos llevar a cabo un experimento para determinar el efecto de los tres tipos de estrés abiótico más relevantes para la agricultura: temperatura, salinidad y sequía, sobre la infección de una de las especies de virus del complejo TYLCD.

En este capítulo de la tesis se presentan los resultados que hemos obtenido al someter a condiciones de estrés abiótico a plantas de *N. benthamiana* 2IR-Sar-GFP infectadas con TYLCSV.

3.2 RESULTADOS.

3.2.1 Diseño experimental.

La figura 3.1 muestra el diseño experimental que hemos seguido, combinando el efecto de la temperatura con el de varios regímenes de riegos que producen estrés salino o sequía.

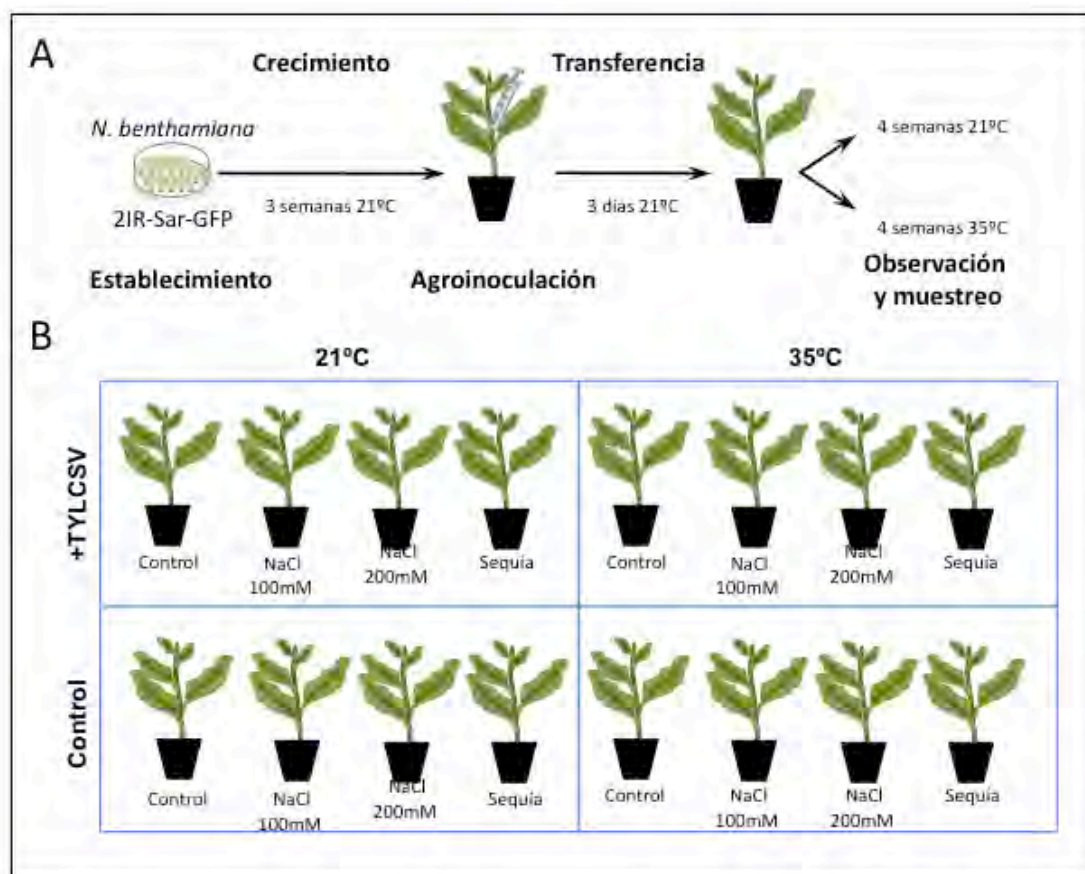


Figura 3.1: Diseño del experimento. **A)** Se establecieron semillas transgénicas 2IR Sar GFP de *N. benthamiana* en placas de MS a 21°C y 16h de luz/8h de oscuridad. A los 14 días se transfirieron a macetas con sustrato. Cuando las plantas tuvieron 4 hojas (3 semanas), se las agroiinoculó con un clon infectivo de TYLCSV. Se mantuvieron todas las plantas a 21°C durante tres días más para garantizar que la temperatura no interfiriera en el proceso de transferencia del t-DNA. Pasado este periodo, se cambió la temperatura para la mitad de las plantas a 35°C, a razón de 3°C diarios y se comenzaron los riegos con los distintos tratamientos. A los cinco días de la inoculación se comenzó la observación de síntomas y GFP. **B)** Distribución de las plantas en los grupos experimentales por tratamientos y temperaturas. Cada planta del esquema representa 5 plantas reales.

Se esterilizaron semillas de *N. benthamiana* 2IR-Sar-GFP (Morilla *et al.*, 2006), se establecieron en medio MS y se mantuvieron a 21°C con un

fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad. Tras dos semanas, se transplantaron ochenta plántulas a sustrato (Sustrato Universal, Compo) en macetas individuales de 7 cm de alto por 10 cm de diámetro y se mantuvieron en las mismas condiciones de luz y temperatura, regadas en días alternos con 25 mL de agua por planta, suplementados semanalmente con Hakaphos (Compo N:P:K 15:10:15) según las indicaciones del fabricante (1 g/L). Tres semanas después, cuando tenían 4 hojas desarrolladas, se agroinocularon la mitad de las plantas con un clon infectivo de TYLCSV y la otra mitad con un vector vacío, tras lo cual se mantuvieron las plantas a 21°C durante tres días más, para asegurar unas condiciones favorables para que *A. tumefaciens* transfiriera el T-DNA. A continuación, se iniciaron los tratamientos aumentando la temperatura de incubación de veinte plantas inoculadas con el clon infectivo y otras veinte con el vector vacío, a razón de 3°C diarios hasta alcanzar los 35°C, que se mantuvieron hasta el final del ensayo. El resto de las plantas se mantuvieron a 21°C. Las plantas infectadas y no infectadas se dividieron en cuatro grupos (cinco plantas por grupo y temperatura), aplicándoles cuatro regímenes distintos de riego. Un grupo, que denominaremos control de aquí en adelante, se siguió regando con 25mL de agua con la misma frecuencia que anteriormente. Otros dos grupos se regaron con 25mL de una solución 100mM o 200mM NaCl. El tratamiento de sequía consistió en mantener las plantas sin riego durante cinco días, hasta que se hizo patente una intensa epinastia. Luego se regaron con 12,5mL de agua con la misma frecuencia que los demás grupos. Las plantas incubadas a 21°C se regaron cada dos días mientras que las plantas crecidas a 35°C se regaron a diario.

3.2.2 Fenotipado de las plantas.

Las plantas se mantuvieron durante 28 días en observación analizándose el desarrollo de la planta, la aparición de síntomas, la expresión de GFP y la cantidad de DNA del virus y de las ME producidas a partir del transgén 2IR-Sar-GFP.

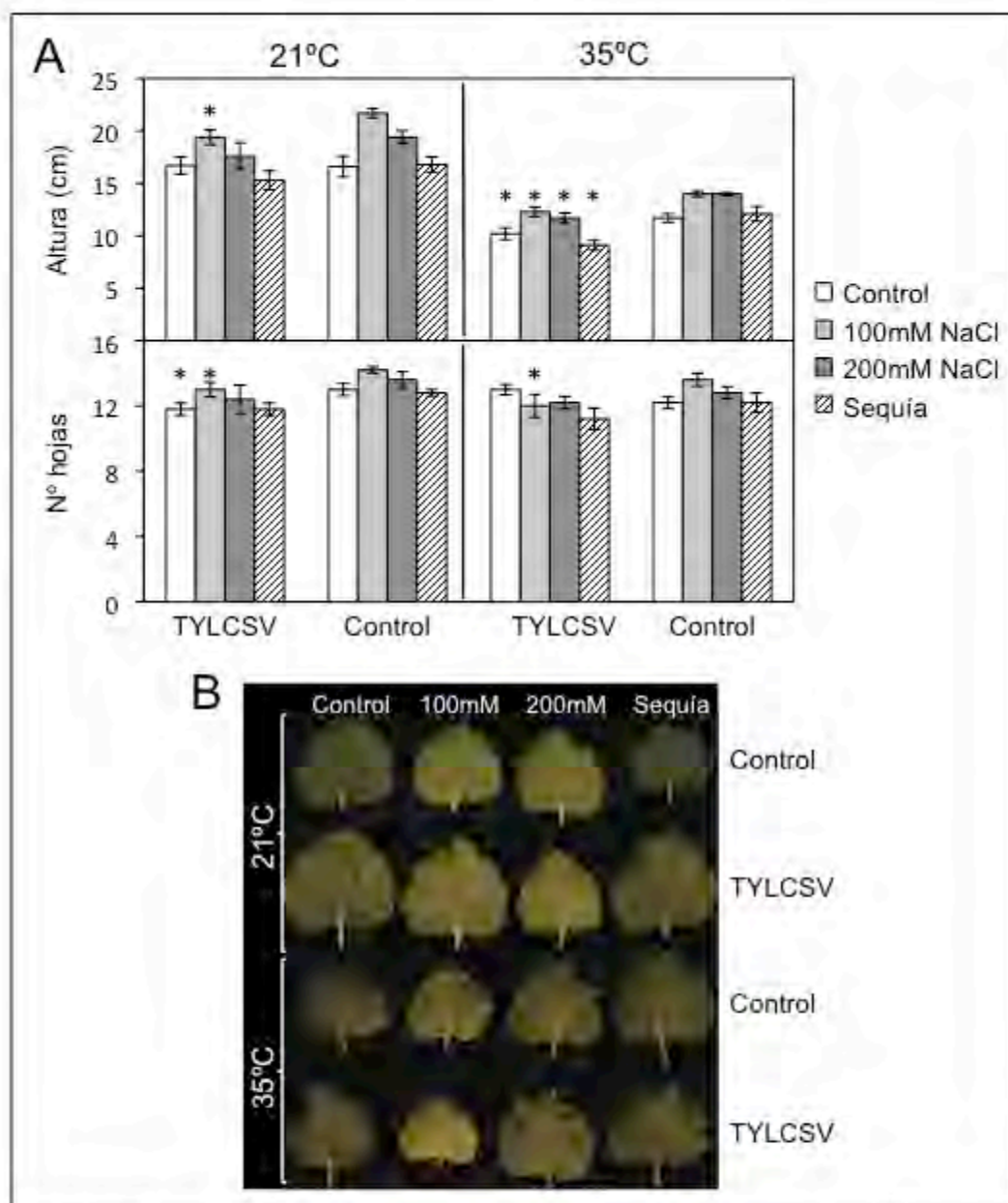


Figura 3.2: Fenotipado de la infección. A) Altura y número de hojas de las plantas estudiadas a los 28dpi. Se representan las medias de las cinco plantas de cada tratamiento. Se marcan con un asterisco los tratamientos en los que se observaron diferencias significativas al comparar las plantas inoculadas con el virus y las inoculadas con el vector vacío. Las barras de error representan la desviación estándar. B) Hojas representativas de plantas inoculadas y no inoculadas con TYLCSV en cada una de las condiciones experimentales.

Tamaño, número y color de las hojas.

A los 28 dpi (días post-infección) las plantas se separaron del sustrato y se determinó su altura desde el cuello de la raíz al ápice del tallo. Así mismo, se contaron el número de hojas en cada planta y se anotaron las

diferencias en color, textura o morfología detectadas en las mismas. En la figura 3.2 se resumen los datos obtenidos.

Todas las plantas incubadas a 35°C tenían un tamaño inferior a las incubadas a 21°C independientemente del tratamiento de riego o de si estaban infectadas o no (Figura 3.2 A). Esta observación se confirmó mediante análisis de la varianza (GraphPad Prism, ANOVA, análisis de Bonferroni). Para comparar el tamaño de las plantas inoculadas con las no inoculadas utilizamos el estadístico de la t de Student (Figura 3.2 A). A 21°C, sólo se observaron diferencias significativas en las plantas regadas con 100mM de NaCl. Sin embargo, a 35°C encontramos diferencias significativas entre las plantas inoculadas con TYLCSV y con el vector vacío en todos los tratamientos, apreciándose un mayor tamaño en las plantas no infectadas.

Al comparar estadísticamente el número de hojas de cada planta sólo se observan diferencias significativas (Figura 3.2 A) entre plantas inoculadas con TYLCSV o con el vector vacío en el caso de las plantas: (i) regadas con agua y cultivadas a 21°C, y (ii) las sometidas a estrés osmótico medio (100 mM NaCl) cultivadas a 21°C o 35°C.

Se observó también una diferencia en la intensidad del color de las hojas dependiendo del tratamiento recibido (Figura 3.2 B). En general, las plantas regadas con soluciones de NaCl presentaban una coloración más amarillenta y una textura más crujiente.

Síntomas y virus.

Se monitorizaron los síntomas y la expresión de GFP de todas las plantas del 4° al 28° dpi utilizando las mismas escalas que las empleadas en el capítulo 2 de esta tesis (Figura 2.6).

En la figura 3.3 A, (panel izquierdo), se compara el porcentaje de plantas que muestran síntomas en las infecciones a 21 y 35°C. Los primeros síntomas aparecieron en las plantas a 35°C a los 17 dpi, mientras que en las plantas cultivadas a 21°C no aparecieron hasta 4 días después, a los 21 dpi. A los 28 dpi todas las plantas regadas con agua (control) o con la solución de 100 mM de NaCl presentaban síntomas tanto a 21°C como a 35°C. En las

plantas regadas con la solución de 200 mM de NaCl e incubadas a 21°C se detectó una reducción en el desarrollo de los síntomas, ya que sólo tres de las cinco plantas los mostraban a los 28 dpi. A 35°C todas las plantas regadas con NaCl 200mM mostraban los síntomas de la enfermedad a los 28dpi, detectándose un retraso en la aparición de los mismos en comparación con las regadas con agua o con la solución de NaCl 100mM. El porcentaje de plantas con síntomas entre las sometidas a condiciones de sequía fue menor con respecto a los grupos control en ambas condiciones de temperatura, destacando la reducción observada a 35°C en la que sólo dos de las cinco plantas infectadas mostraban síntomas (Figura 3.2 A).

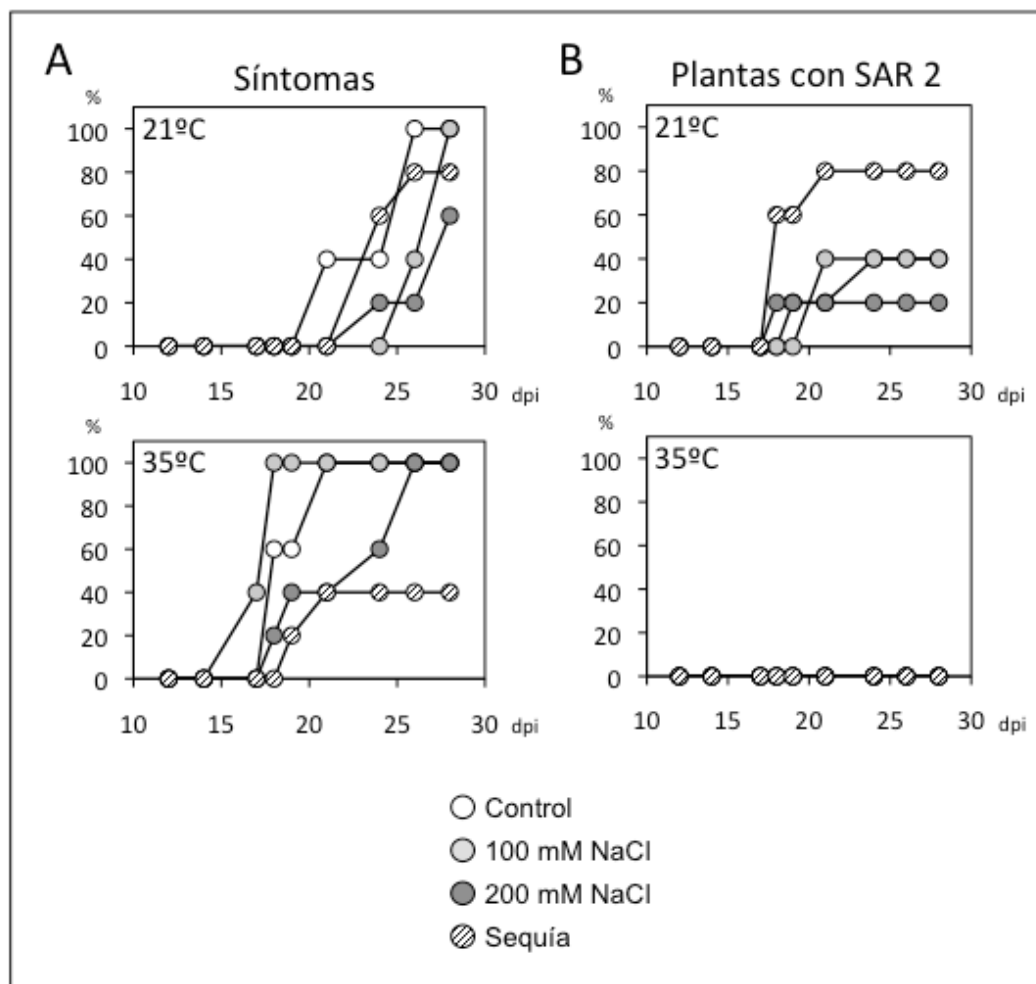


Figura 3.3: Observaciones del desarrollo de la infección. **A)** Porcentaje de plantas inoculadas con el virus que presentaron síntomas. **B)** Porcentaje de las plantas inoculadas con el virus que presentaron sobreexpresión de GFP en el nivel SAR2.

A los 28 días de la inoculación, se recolectaron las 3 o 4 hojas más apicales de cada planta. Se extrajo DNA total y se analizó el contenido en virus mediante q-PCR con los cebadores OM9 y OM10. En la tabla 3.1 se resume el número de plantas inoculadas con el clon infectivo en las que se detectó la presencia de virus. El número de plantas infectadas en todas las condiciones de riego fue siempre mayor a 21°C que a 35°C. Además, en comparación con las plantas control, se observa una reducción en el número de plantas que acumulan virus en las regadas con soluciones de 200mM NaCl o mantenidas en condiciones de sequía tanto a 21°C como a 35°C. Para determinar si también se producían cambios en la cantidad de virus acumulada, representamos la acumulación de virus a los 28dpi utilizando sólo los datos de las plantas infectadas (Figura 3.3). Al igual que en los síntomas, se aprecia una reducción en la cantidad de virus acumulada en las plantas cultivadas 35°C comparadas con las crecidas 21°C en todas las condiciones de riego, excepto en las plantas tratadas con 100 mM de NaCl en las que la diferencia no es significativa. Cuando se comparan las plantas cultivadas a 21°C no se aprecia diferencia entre las plantas control y las plantas sometidas a sequía. Por el contrario sí se aprecia una tendencia a la presencia de una menor carga viral en el caso de las plantas sometidas a estrés salino. Esta tendencia se mantiene también entre las plantas cultivadas a 35°C observándose una reducción significativa en las plantas sometidas a un mayor estrés salino (200 mM NaCl).

Tabla 3.1

Tratamiento	21°C	35°C
Agua	5/5	3/5
100mM	5/5	3/5
200mM	3/5	2/5
Sequía	4/5	1/5

Número de plantas en las que se detectó DNA de TYLCSV en las hojas apicales mediante q-PCR del total de plantas inoculadas con el virus.

3.2.4 GFP y moléculas extracromosómicas.

La observación de la expresión de GFP se llevó a cabo en paralelo a la observación de síntomas usando una lámpara de mano de luz ultravioleta. En la figura 3.3 B se muestra el porcentaje de plantas que muestran el fenotipo SAR2 (paneles de la derecha), fenotipo que corresponde al máximo de expresión de GFP en los tejidos conductores y que correlaciona con las mayores tasas de replicación del virus (Morilla *et al.*, 2006). En las plantas cultivadas a 21°C el fenotipo SAR2 aparece a los 18 dpi en plantas de todos los tratamientos menos en las regadas con la solución de 100 mM de NaCl en las que apareció dos días más tarde.

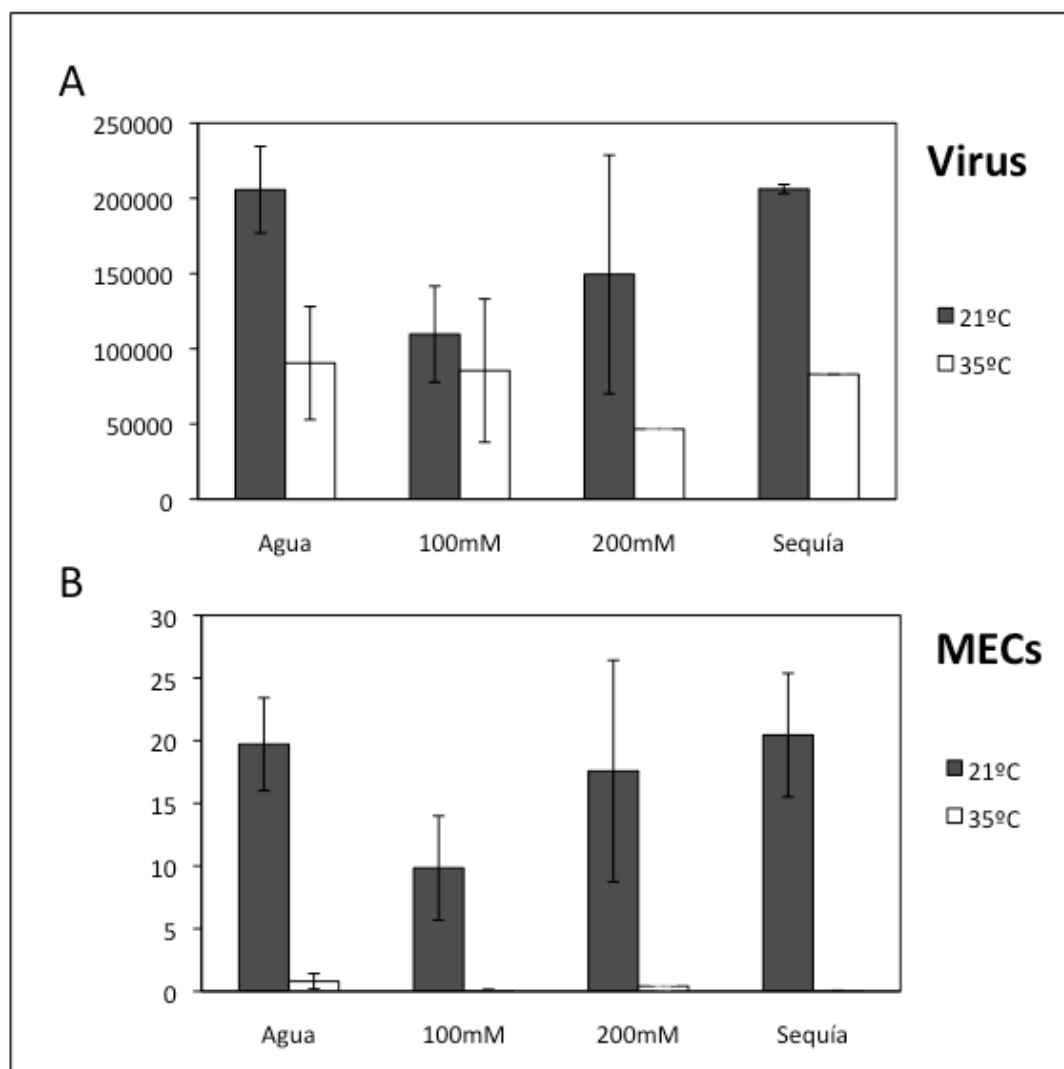


Figura 3.4: Estimación mediante q-PCR de los niveles de virus (A) y moléculas extracromosómicas (B). Se representan las medias de los valores obtenidos para las plantas que resultaron estar infectadas (indicadas en la tabla 3.1). Las barras de error representan la desviación estándar.

A los 28 dpi la mayor parte de las plantas sometidas a sequía mantenían el fenotipo. Por el contrario en los tratamientos con soluciones de 100 o 200 mM NaCl o en condiciones de riego control el porcentaje de plantas que expresan GFP en los tejidos conductores era significativamente menor. Sorprendentemente ninguna de las plantas mantenidas a 35°C desarrollaron el fenotipo SAR2 incluidas las plantas en las que se había detectado la acumulación de virus. En estas plantas no obstante, aunque no se detectó inducción de GFP en los tejidos vasculares, sí se observó el silenciamiento de la expresión basal de GFP en todos los tejidos, silenciamiento que no se produjo en ninguna de las plantas en las que no se detectaron virus, ni en ninguna de las inoculadas con el vector vacío.

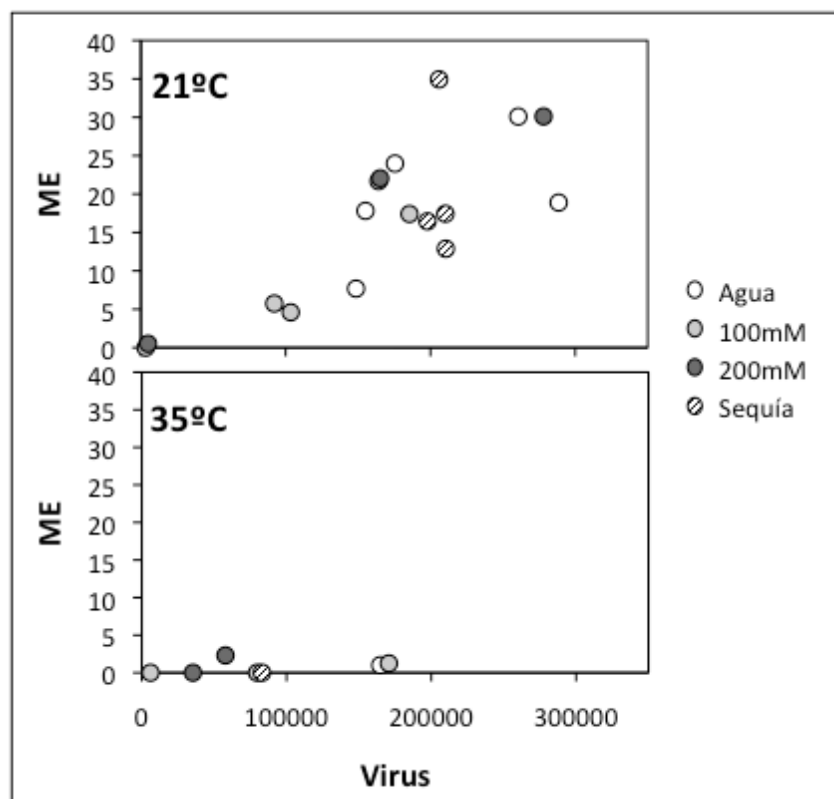


Figura 3.5: Dispersión de puntos resultante de enfrentar niveles moleculares extracromosómicos y virus para cada una de las plantas en las que se detectaron virus en el ensayo de Q-PCR.

Al analizar la acumulación de ME generadas en las plantas que contenían virus cultivadas a 21°C se observó una dinámica muy parecida a la obtenida con los niveles de acumulación de virus (Figura 3.4),

detectándose una reducción en las plantas regadas con la solución de 100 mM NaCl. Por el contrario, cuando se cuantificaron las ME de muestras correspondientes a plantas cultivadas a 35°C, no se detectaron cantidades significativas de moléculas extracromosómicas en ninguna de las muestras analizadas, incluso en aquellas en las que sí se habían detectado virus. Para determinar si la ausencia de ME en estas muestras se debía a una menor acumulación de virus, de los que depende su formación, representamos para cada planta en la que se detectaron virus la cantidad de ME frente a la de moléculas del virus (Figura 3.5). A 21°C se observa una correlación directa entre los dos valores, mientras que a 35°C, esta correlación no existe, observándose muestras que con una carga viral similar son capaces de acumular ME a 21°C, pero no lo hacen a 35°C. En ninguno de los casos, los puntos parecen estar agrupados por tratamientos.

3.3 DISCUSIÓN.

A pesar de que el número de plantas utilizado en cada una de las condiciones es limitado y de que los datos provienen de un solo experimento, los resultados presentados en este capítulo confirman la existencia una interferencia negativa sobre la replicación de TYLCSV de los estreses abióticos analizados . El efecto negativo es muy claro en el caso del estrés térmico, en el que se observa una reducción tanto del número de plantas que se infectan como en la cantidad de virus que se acumula en las plantas en las que sí se establece la infección

Aunque desde hace casi un siglo se sabe que la temperatura influye en las infecciones virales de plantas, el número de trabajos realizados es limitado. En general, las temperaturas altas se asocian con una reducción de los síntomas “heat masking” y con una reducción en la cantidad de virus (Johnson, 1922). Por el contrario las temperaturas bajas se asocian con la propagación rápida de las enfermedades virales y el desarrollo de síntomas severos (Hine *et al.*, 1970; Gerik *et al.*, 1990). Estas observaciones han llevado al uso de la “termoterapia” como método para la selección de

material libre de virus en los casos de materiales vegetales que se transmiten vegetativamente (Manganaris *et al.*, 2003).

Aunque existen algunas excepciones a esta correlación general entre la temperatura y la infección, como la publicada recientemente demostrando que el virus *Turnip crinkle virus* (TCV) en *A. thaliana* se replica mejor a altas temperaturas (Zhang *et al.*, 2012; Prasch y Sonnewald, 2013), el efecto negativo del aumento de temperatura sobre la infección se ha demostrado para tanto para virus de RNA (Siddiqui *et al.*, 2008; Shams-Bakhsh *et al.*, 2007, Szittyá *et al.*, 2003) como para virus de DNA (Chellappan *et al.*, 2005; Tuttle *et al.*, 2008). El resultado obtenido en este trabajo con TYLCSV confirma el comportamiento termosensible de las infecciones por geminivirus, en lo que se refiere a la cantidad de virus que se acumula. Sin embargo, los resultados en el desarrollo de los síntomas son contradictorios. La disminución en la cantidad de DNA viral detectada a 35°C no correlaciona con el aumento de los síntomas que apreciamos durante la infección en las plantas crecidas a esa temperatura, lo que indica que los síntomas detectados no son provocados por el virus, si no por otros cambios fisiológicos producidos por el estrés térmico. La ausencia de esta sintomatología en experimentos previos con *N. benthamiana* (Chellappan *et al.*, 2005) puede deberse a la diferencia en la temperatura utilizada en este trabajo, ya que en el caso citado las plantas se incubaron a 30°C.

En 1956 el Dr. Harrison (Harrison, 1956) propuso que la cantidad de virus acumulada durante una infección representaba un equilibrio entre la replicación y la degradación de los virus. Medio siglo después, en el trabajo realizado para identificar el mecanismo molecular responsable del efecto de la temperatura en el desarrollo de los síntomas producido por *Cymbidium Ring Spot Virus* (CymRSV), se demostró que dicho efecto estaba asociado con ese equilibrio y más concretamente con el aumento de la actividad de degradación de los virus mediante silenciamiento génico. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, a temperaturas elevadas se produce un aumento en la acumulación de siRNA derivados de la secuencia del virus, que correlaciona con la disminución de los síntomas y una reducción en la

cantidad de virus acumulada (Szittyta *et al.*, 2003). Los datos publicados posteriormente por otros laboratorios confirmaron que el silenciamiento génico se inhibe a temperaturas bajas en *A. thaliana*, *N. benthamiana*, *N. Tabacum*, *Solanum tuberosum* y *Glycine max* (Szittyta *et al.*, 2003; Kasai *et al.*, 2009), confirmando la termosensibilidad de este mecanismo de defensa antiviral. No obstante, la termosensibilidad del silenciamiento en plantas no parece ser universal ya que resultados publicados recientemente demuestran que en vid no se produce dicha inhibición del silenciamiento a temperaturas bajas (Romon *et al.*, 2013).

Experimentos realizados con el geminivirus *Cassava latent virus* (CLV) indican que, el silenciamiento podrá ser el responsable de la termosensibilidad detectada al infectar plantas de mandioca con este virus, al detectarse un aumento en la acumulación de siRNA derivados del virus que correlaciona con la disminución en la acumulación de DNA viral al elevar la temperatura de 25°C a 30°C (Chellappan *et al.*, 2005). Este resultado se confirmó con los estudios obtenidos al comprobar la termosensibilidad en el funcionamiento de un vector de silenciamiento génico basado en el geminivirus *Cotton leaf crumple virus* (CLCrV) en plantas de algodón (*Gossypium hirsutum*) (Tuttle *et al.*, 2008).

Aunque no se ha demostrado cual o cuales son las causas últimas por las que el silenciamiento incrementa su actividad a temperaturas altas, se ha sugerido que correlaciona, al menos en *N. benthamiana*, con un incremento en la actividad del gen *RDR6* (Qu *et al.*, 2005), una RNA polimerasa dependiente de RNA que juega un papel central en la generación de siRNA secundarios durante el proceso de infección viral. Esta podría ser una de las causas del efecto que hemos observado en nuestro experimento, ya que la actividad de este gen es necesaria para el establecimiento y propagación del silenciamiento a partir de vectores de VIGS basados en el geminivirus *Cabagge Leaf Curl Virus* (CaLCuV) (Blevins *et al.*, 2006).

Además del aumento de actividad de RDR6 existen otros posibles mecanismos que podrían ser también responsables de los cambios en la susceptibilidad a TYLCSV con la temperatura, como la termosensibilidad de

los supresores de silenciamiento génico de los virus o de alguna de las proteínas del virus o de las proteínas de la planta esenciales para la replicación o el movimiento, o cambios en la expresión génica de la planta producidos como consecuencia del aumento de temperatura que conlleven la inducción o represión de proteínas que interfieran directa o indirectamente con la infección del virus.

La interferencia con la infección de TYLCSV, aunque menor, es también evidente en las plantas sometidas a estrés salino, mientras que las condiciones de sequía no parecen alterar la capacidad del virus para infectar las plantas. Tanto en las plantas cultivadas a 21 °C como a 35°C, se detecta una reducción en la cantidad de virus en las plantas regadas con 100 mM de NaCl. Esta reducción es también observable en las plantas tratadas con 200 mM de NaCl, en las que el porcentaje de plantas infectadas es menor que en las plantas control y en las que también se aprecia una tendencia a una reducción en la cantidad de virus acumulada en las plantas infectadas. En el caso del estrés hídrico, aunque se aprecia una reducción en el número de plantas infectadas a las dos temperaturas, no se detecta una disminución drástica en la cantidad de virus en aquellas plantas en las que se ha establecido la infección si se las compara con las plantas control de cada experimento. Sería necesario analizar un mayor número de plantas para determinar si las diferencias son significativas.

Los efectos negativos del estrés salino y térmico parecen ser parcialmente aditivos, ya que tanto el número de plantas infectadas como la cantidad de virus acumulada es menor en las plantas sometidas a ambos estreses (regadas con soluciones de NaCl y crecidas a 35°C) que en las plantas sometidas a un sólo tipo de estrés (a 35°C y regadas con agua o a 21°C y regadas con soluciones salinas). Este dato sugiere que los mecanismos por los que estos estreses interfieren con la infección son, al menos, parcialmente independientes.

3.4 BIBLIOGRAFÍA.

- AbuQamar, S., X. Chen, et al. (2006). "Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to Botrytis infection." *Plant J* **48**(1): 28-44.
- AbuQamar, S., H. Luo, et al. (2009). "Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor." *Plant J* **58**(2): 347-60.
- Adie, B. A., J. Perez-Perez, et al. (2007). "ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis." *Plant Cell* **19**(5): 1665-81.
- Atkinson, N. J. and P. E. Urwin (2012). "The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field." *J Exp Bot* **63**(10): 3523-43.
- Audenaert, K., G. B. De Meyer, et al. (2002). "Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to Botrytis cinerea and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms." *Plant Physiol* **128**(2): 491-501.
- Blevins, T., R. Rajeswaran, et al. (2006). "Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing." *Nucleic Acids Res.*
- Chellappan, P., R. Vanitharani, et al. (2005). "Effect of Temperature on Geminivirus-Induced RNA Silencing in Plants." *Plant Physiol.*
- Cheong, Y. H., H. S. Chang, et al. (2002). "Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis." *Plant Physiol* **129**(2): 661-77.
- de Torres Zabala, M., M. H. Bennett, et al. (2009). "Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses." *Plant J* **59**(3): 375-86.
- de Torres-Zabala, M., W. Truman, et al. (2007). "Pseudomonas syringae pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease." *EMBO J* **26**(5): 1434-43.
- Fan, J., L. Hill, et al. (2009). "Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions." *Plant Physiol* **150**(4): 1750-61.
- Gerik, J. S., J. E. Duffus, et al. (1990). "Etiology of tomato plant decline in the California desert." *Phytopathology* **80**: 1352-1356.
- Harrison, B. D. (1956). "The infectivity of extracts made from leaves at intervals after inoculation with viruses." *J Gen Microbiol* **15**(1): 210-20.
- Hernandez-Blanco, C., D. X. Feng, et al. (2007). "Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance." *Plant Cell* **19**(3): 890-903.
- Hine, R. B., W. E. Osborne, et al. (1970). "Elevation and temperatura effects on severity of maize virus in sorghum in Arizona." *Plant Dis Rep* **54**: 1064-1068.
- Johnson, J. (1922). "The relation of air temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants." *Phytopathology* **12**: 438-440.
- Kasai, A., S. Ohnishi, et al. (2009). "Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean." *Plant Cell Physiol* **50**(6): 1090-8.
- Manganaris, G. A., A. S. Economou, et al. (2003). "Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine." *Plant Cell Rep* **22**(3): 195-200.
- Morilla, G., A. G. Castillo, et al. (2006). "A versatile transreplication-based system to identify cellular proteins involved in geminivirus replication." *J Virol* **80**(7): 3624-33.
- Osakabe, Y., K. Yamaguchi-Shinozaki, et al. (2013). "Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress." *J Exp Bot* **64**(2): 445-58.
- Prasch, C. M., & Sonnewald, U. (2013). Simultaneous Application of Heat, Drought, and Virus to Arabidopsis Plants Reveals Significant Shifts in Signaling Networks. *Plant Physiology*, *162*(4), 1849-1866. doi:10.1104/pp.113.221044)

- Qu, F., X. Ye, et al. (2005). "RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*." J Virol **79**(24): 15209-17.
- Robert-Seilanianz, A., M. Grant, et al. (2011). "Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism." Annu Rev Phytopathol **49**: 317-43.
- Romon, M., I. Soustre-Gacougnolle, et al. (2013). "RNA silencing is resistant to low-temperature in grapevine." PLoS One **8**(12): e82652.
- Shams-Bakhsh, M., T. Canto, et al. (2007). "Enhanced resistance and neutralization of defense responses by suppressors of RNA silencing." Virus Res **130**(1-2): 103-9.
- Siddiqui, S. A., C. Sarmiento, et al. (2008). "Effects of viral silencing suppressors on tobacco ringspot virus infection in two *Nicotiana* species." J Gen Virol **89**(Pt 6): 1502-8.
- Szittyá, G., D. Silhavy, et al. (2003). "Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation." EMBO J **22**(3): 633-40.
- Suzuki, N., Rivero, RM, et al. (2014) "Abiotic and biotic stress combinations." New Phytol. 2014 Jul;203(1):32-43.
- Ton, J. and B. Mauch-Mani (2004). "Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose." Plant J **38**(1): 119-30.
- Tuttle, J. R., A. M. Idris, et al. (2008). "Geminivirus-mediated gene silencing from Cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton." Plant Physiol **148**(1): 41-50.
- Xu, P., F. Chen, et al. (2008). "Virus infection improves drought tolerance." New Phytol **180**(4): 911-21.
- Zhang, X., J. Singh, et al. (2012). "Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected arabidopsis plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1." J Virol **86**(12): 6847-54.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos y medios de cultivo.

4.1.1 Cepas bacterianas.

La manipulación de estirpes bacterianas se llevó a cabo aplicando la metodología general descrita anteriormente (Sambrook y Russell, 2001). La incubación de los cultivos de *E. coli* y de *A. tumefaciens* se realizó en medio rico de Luria y Bertani (LB) (Bertani, 1951), a una temperatura de 37°C o 28°C, respectivamente, con los antibióticos o suplementos correspondientes (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Suplementos para bacterias.

Suplemento	Concentración
Ampicilina	100 µg/mL
Kanamicina	50 µg/mL
Tetraciclina	10 µg/mL
Cloranfenicol	30 µg/mL
Rifampicina	50 µg/mL
X-Gal	80 µg/mL
IPTG	1 mM

Concentración de antibióticos y de otros suplementos usados en el cultivo bacteriano en medio LB.

La cepa de *E. coli* DH5 α se utilizó para la construcción, mantenimiento y amplificación de plásmidos, mientras que la cepa NCM631 (Govantes *et al.*, 1996) se utilizó en los experimentos de expresión *in vitro* de proteínas.

- *E. coli* DH5 α : F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlac Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K- m_K+), λ - .

- *E. coli* NCM631: hsdS gal λ DE3 LacI, LacUV5::T7 Pol.

Las estirpes de *A. tumefaciens* LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1983), GV3101 (Holsters *et al.*, 1980) y C58C1 (Deblaere *et al.*, 1985) se utilizaron para la transformación, inoculación de virus o expresión transitoria de proteínas *in planta*.

4.2 Material vegetal.

4.2.1 *Nicotiana benthamiana*.

Los experimentos realizados con *N. benthamiana* Domin se llevaron a cabo en plantas cultivadas en condiciones controladas de luz (día largo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) y temperatura (22-24°C) en sustrato comercial con fertilizante.

La germinación de semillas y cultivo de plántulas *in vitro* de *N. benthamiana* se realizó en medio Murashige y Skoog (MS, Sigma®; Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa (30g/L) y en caso necesario con kanamicina (50 mg/L) en cámaras de cultivo a 21°C con 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

4.2.2 *Arabidopsis thaliana*.

Todos los experimentos se realizaron utilizando el ecotipo Columbia-0. Las plantas se cultivaron en condiciones controladas de luz: durante la fase de crecimiento a día corto, 8 horas de luz y 16 de oscuridad y durante el desarrollo de los experimentos o durante la fase de floración si debían obtenerse semillas, a día largo, 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La temperatura se controló para mantenerse a 18°C durante la fase oscura y a 20°C durante la fase luminosa.

El cultivo *in vitro* de *A. thaliana* se realizó en medio Murashige y Skoog (MS, Sigma®) suplementado con sacarosa (15g/L) y MES (0,5g/L) en cámaras de cultivo a 21°C con 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Cuando fue necesario se suplementó el medio MS con higromicina a 3,4 mg/L.

4.3 Plásmidos.

4.3.1 Plásmidos de expresión en *E. coli*.

Ensayos de sumoilación de PCNA.

Para expresar SIPCNA en *E. coli* se utilizó el plásmido pETSIPCNA, (Sánchez-Durán *et al.*, 2011). Sobre este plásmido y usando el kit Lightning change direct mutagenesis de Agilent con los oligonucleótidos OM17 y

OM18 se generó el plásmido pETSIPCNAK254A, que expresa el mutante puntual a alanina en la lisina 254. Usando este y el plásmido pETSIPCNAK164A (Sánchez Durán, no publicado, mutante puntual a alanina en la lisina 164), como molde, y los oligonucleótidos OM17, OM18, OM19 y OM20, se generaron los plásmidos pETSIPCNAK164/168A y pETSIPCNAK164/254A, que expresan los mutantes dobles K164A/K168A y K164A/K254A respectivamente. El plásmido pETSIPCNAK164/168/254A, que codifica el triple mutante K164A/K168A/K254A se generó utilizando como molde el plásmido que contenía el mutante doble K164A/K168A y los oligonucleótidos OM17 y OM18. Este mismo método se usó sobre pETSIPCNA con los oligos OM21, OM22, OM23 y OM24 para generar los plásmidos pETSIPCNAK91 y pETSIPCNAK190 y sobre pETSIPCNAK164/254A para obtener los mutantes triples correspondientes en los plásmidos pETSIPCNAK91/164/254A y pETSIPCNAK164/190/254A.

Expresión de Rep en bacterias.

Para ensayar la interferencia de Rep con la sumoilación de PCNA se usó el plásmido pETSIPCNA-AL1, (Sánchez Durán, tesis doctoral 2011), en el que la fase abierta de lectura de Rep está clonada junto con un sitio de unión a ribosoma tras la fase abierta de lectura de SIPCNA, de modo que ambos genes pueden ser traducidos desde un mRNA policistrónico expresado desde el mismo promotor T7. Para expresar las delecciones de Rep se siguió esta misma táctica. En la tabla 4.3 se resumen los oligos usados y los plásmidos producidos en este proceso.

Usando como molde pET28AL1 (Sánchez Durán, tesis doctoral, 2011) en el que Rep de TGMV se encuentra bajo el control del promotor T7 de pET28b, se amplificaron por PCR las versiones truncadas de Rep que contienen el extremo amino de dicha proteína (Rep₁₋₆₈, Rep₁₋₁₂₀, Rep₁₋₁₈₄, Rep₁₋₈₁ y Rep₁₋₉₉). El cebador OM25 hibrida con el sitio de unión a ribosoma de pET28, así los fragmentos amplificados con este cebador contienen dicha región reguladora, por lo que se clonaron en los sitios *SacI-HindIII* de pETSIPCNA, a continuación de la fase abierta de lectura de PCNA,

obteniendo los plásmidos pETSIPCNA-A1, pETSIPCNA-A2, pETSIPCNA-A3, pETSIPCNA-A4 y pETSIPCNA-A5.

Para obtener las versiones truncadas de Rep que no contienen el extremo amino se siguió un proceso en dos pasos. Primero se amplificaron los fragmentos Rep₆₈₋₃₅₂, Rep₁₂₀₋₃₅₂, Rep₁₈₄₋₃₅₂, Rep₁₂₀₋₁₈₄ y Rep₅₆₋₁₃₀ usando los cebadores especificados en la tabla 4.3 sobre el plásmido pET28-AL1 y se clonaron en los sitios *Dei-Bam*HI de pET28b obteniendo los plásmidos pET28-B1, pET28-B2, pET28-B3, pET28-C1 y pET28-C2. Así, las versiones truncadas de Rep quedaron corriente debajo de un sitio de unión a ribosoma. El siguiente paso consistió en usar estos plásmidos como molde para amplificar de nuevo estas versiones truncadas de Rep. En esta segunda amplificación se usó el cebador OM25 en todas las reacciones en lugar del cebador Fw correspondiente. De este modo, se amplificaron los fragmentos de Rep precedidos por un sitio de unión a ribosoma. A continuación se clonaron en los sitios *SacI-Bam*HI de pETSIPCNA, obteniendo los plásmidos pETSIPCNA-B1, pETSIPCNA-B2, pETSIPCNA-B3, pETSIPCNA-C1 y pETSIPCNA-C2.

De esta forma, tanto las versiones truncadas de Rep que contienen su extremo amino como las que no, quedan corriente abajo de un sitio de unión a ribosoma bajo el control del mismo promotor T7 que SIPCNA, transcribiéndose ambos en un mismo policistrón.

Expresión de enzimas de sumoilación de A. thaliana.

El plásmido pBADE, descrito en (Mencia y de Lorenzo, 2004), permite la expresión de las encimas E1 y E2 que catalizan la sumoilación de proteínas diana en ensayos en *E. coli*. Para generar un plásmido similar, que expresase el sistema de sumoilación de *A. thaliana* en *E. coli*, comenzamos amplificando por PCR los genes AtSCE1, AtSAE1a y AtSAE2 y clonándolos en pGEM-T easy para obtener los plásmidos pGAtSCE1, pGAtSAE1a y pGAtSAE2. Para ello se usaron los cebadores OM44, OM45, OM46, OM47, OM48 y OM49 y como moldes de las PCR los plásmidos pBAtSCE1, pBAtSAE1a y pBSAE2 (María Moriel, no publicados). Estos

plásmidos se habían obtenido amplificando las fases abiertas de lectura del sistema de sumoilación usando como molde cDNA de *A. thaliana* y clonándolas en EcoRV de pBSSK.

Tabla 4.2. Oligonucleótidos para amplificar los fragmentos de Rep.

Fragmento	Cebador Fw	Cebador Rv	Plásmido generado
Rep ₁₋₆₈	OM25	OM31	pETSIPCNA-A1
Rep ₁₋₁₂₀	OM25	OM32	pETSIPCNA-A2
Rep ₁₋₁₈₄	OM25	OM33	pETSIPCNA-A3
Rep ₁₋₈₁	OM25	OM34	pETSIPCNA-A4
Rep ₁₋₉₉	OM25	OM35	pETSIPCNA-A5
Rep ₆₈₋₃₅₂	OM27	OM26	pET28B1
Rep ₁₂₀₋₃₅₂	OM28	OM26	pET28B2
Rep ₁₈₄₋₃₅₂	OM29	OM26	pET28B3
Rep ₁₂₀₋₁₈₄	OM28	OM33	pET28C1
Rep ₅₆₋₁₃₀	OM30	OM36	pET28C2
Rep ₆₈₋₃₅₂	OM25	OM26	pETSIPCNA-B1
Rep ₁₂₀₋₃₅₂	OM25	OM26	pETSIPCNA-B2
Rep ₁₈₄₋₃₅₂	OM25	OM26	pETSIPCNA-B3
Rep ₁₂₀₋₁₈₄	OM25	OM33	pETSIPCNA-C1
Rep ₅₆₋₁₃₀	OM25	OM36	pETSIPCNA-C2

Resumen de los oligonucleótidos usados en la construcción de los plásmidos generados para analizar la interferencia de Rep en la sumoilación de PCNA.

Luego, las fases abiertas de lectura de los tres genes, se transfirieron a pET28b para que cada una de ellas tuviese situado corriente arriba un sitio de unión a ribosoma. El plásmido pGAtSAE2 se digirió usando las enzimas *NcoI* y *SalI*. El fragmento de 1884pb obtenido se clonó en *NcoI* y *SalI* de pET28b para obtener pETAtSAE2. El plásmido pGAtSCE1 se digirió con *NcoI* y *BglIII* y el fragmento de 421pb clonado en los sitios *NcoI* y *BamHI* de pET28b para generar pETAtSCE1. Al mismo tiempo, pGSAE1a se digirió con las enzimas *NdeI* y *BamHI*. El fragmento resultante de 975pb se clonó en los sitios *NdeI* y *BamHI* de pET28b obteniendo pETAtSAE2.

El siguiente paso consistió en agrupar las tres fases abiertas de lectura en el mismo plásmido, para ello, se digirió el plásmido pETAtSCE1

con *Xba*I y *Eco*RI. El fragmento resultante de 530pb se trató para generar extremos romos y se clonó en el sitio *Xba*I de pETAtSAE2 para generar pETSS. A continuación, pGSAE1a se digirió con *Xba*I y *Bam*HI. El fragmento de 1069pb obtenido se trató para generar extremos romos y fue clonado en el sitio *Sal*I de pETSS para obtener pETSS1a.

Ya que las dianas de sumoilación iban a ser expresadas desde un pET28b (origen ColE1 y resistencia a kanamicina) y AtSUMO desde un pJB866 (RK2 y ampicilina, plásmidos pRHAtSUMO1, pRHAtSUMO2 y pRHAtSUMO3, María Moriel, no publicados), se transfirió el casete de expresión policistrónico completo a otro plásmido con origen de replicación (P15A) y resistencia a antibiótico (cloranfenicol) compatibles con estos plásmidos, como es pACYC184. Para ello, se digirió pETSS1a con *Sph*I y *Eag*I. El fragmento resultante de 3785pb se trató para obtener extremos romos y se clonó en el sitio *Eco*RV de pACYC184 para generar pASS1a.

4.3.3 Plásmidos de expresión en plantas.

Expresión de PCNA y Rep.

Para los ensayos de expresión transitoria de SIPCNA y Rep de TGMV se usaron los plásmidos pBINX'SIPCNA (M. A. Sánchez Durán, no publicado) y pBINX'Rep (Sánchez-Durán *et al.*, 2011). Ambos plásmidos contienen las fases abiertas de lectura de los dos genes bajo el control de un promotor 35SCaMV. Para evitar los efectos de los sistemas de silenciamiento de la planta, se sobreexpresó P19 desde pBIN61, (Voinnet *et al.*, 2003).

Para expresar Rep en *A. thaliana* desde un promotor inducible se generó el plásmido pER8Rep. Para ello se amplificó Rep con los oligonucleótidos OM15 y OM16 usando como molde el plásmido pBINX'-Rep (Sánchez-Durán *et al.*, 2011) y se clonó en pGemT-easy. Tras secuenciar el inserto, se digirió con *Xho*I y *Spe*I y se clonó en los sitios *Xho*I-*Spe*I del plásmido pER8.

PCNA con tags.

pBIN-GFP-SIPCNA: Se amplificó por PCR la fase abierta de lectura de SIPCNA por PCR usando los cebadores OM37 y OM38 y se clonó en los sitios *Bam*HI y *Kpn*I de pBINX'GFPStop (Natasa Hulak, no publicado).

pBIN-PCNA-GFP: Se amplificó la fase abierta de lectura de SIPCNA con los cebadores OM37 y OM39 y se clonó en los sitios *Bam*HI y *Kpn*I de pBINX'GFP(ORF) (Natasa Hulak, no publicado).

pJFLAG-PCNA: se amplificó la fase abierta de lectura de SIPCNA con los cebadores OM40 y OM41 y se clonó en los sitios *Eco*RI y *Pst*I de pJawohl2B-3xFlag (amablemente cedido por el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Botella).

Rep de TYLCV-IL para comprobar las construcciones 2IR en N. benthamiana.

Para obtener un vector binario que expresase la proteína Rep de TYLCV-IL, en primer lugar, se amplificó la ORF de la misma usando los cebadores OM42 y OM43 sobre el plásmido pGTYCZ-40. El fragmento de 1086 pb fue clonado en *Xba*I-*Bam*HI en pBINX1 para obtener pBINX'C1Cz.

Expresión de enzimas de sumoilación de N. benthamiana.

Las SCE1 y SUMO1 de *N. benthamiana* se sobreexpresaron desde los plásmidos pBINXNbUbc9 y pBINXNbSUMO respectivamente (Sánchez Durán, no publicados).

4.4 Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.

La manipulación de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante los métodos estándar (Sambrook y Russell, 2001; Ausubel *et al.*, 1999).

El análisis mediante hibridación Southern se llevó a cabo según lo descrito en Castillo *et al.*, 2004. Se analizaron 8 µg de DNA de las hojas infiltradas, digeridos con *Eco*RI e hibridados con una sonda marcada con P³²

por random priming preparada sobre la ORF del gen chivato correspondiente (GFP, DsRED o DsRED-E5).

4.5 Análisis de proteínas de plantas.

El material vegetal se congeló en nitrógeno líquido inmediatamente tras su recolección. Se trituró en mortero con nitrógeno líquido hasta pulverizarlo y se almacenó a -80°C (no más de 24-48h) hasta su análisis. Una parte de este material (150-300 mg) se mezcló con un volumen (1 µL por cada mg de material) de tampón de extracción (Tris 50mM, NaCl 150mM, Triton X-100 0,2% y Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free de Roche, un comprimido en 10mL, según las indicaciones del fabricante). Se dejó descongelar a 4°C durante 30 minutos. Se centrifugaron las muestras a 4°C y 19.000 rpm durante 15 minutos dos veces, para eliminar los restos celulares. El contenido en proteínas se estimó mediante Bradford y se resolvieron 50-70mg de proteína total en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) entre el 8 y el 12% dependiendo de los tamaños de las proteínas a detectar.

4.6 Ensayos de sumoilación en *E. coli*.

La diana del sistema de sumoilación, PCNA de *Solanum lycopersicum*, en solitario o con la fase abierta de lectura de AL1 de TGMV o sus distintas delecciones, con sendos sitios de unión al ribosoma para la formación de mRNAs policistrónicos, fueron clonadas en pET28b (Novagen®) tal y como se describe más arriba. En todos los ensayos se utilizó *E. coli* NCM631 y los ensayos fueron realizados según está descrito en Mencía *et al.*, 2004.

4.7 Transformación de plantas.

Las plantas de *N. benthamiana* se transformaron siguiendo el protocolo descrito en Morilla *et al.*, 2004.

La transformación de *A. thaliana* se llevó a cabo mediante el procedimiento de inmersión floral (Clough y Bent, 1998) usando *A.*

tumefaciens GV3101 portando el plásmido pER8AL1. La selección de los transformantes se llevó a cabo en medio MS sólido (agar para plantas Sigma 8g/L) suplementado con higromicina (3,4 mg/L).

4.8 Microscopía y fotografía.

Para el seguimiento de la expresión de GFP en los capítulos 2 y 3, se usó una lámpara BLAK-RAY B100AP que emite a luz a 365nm. Para el seguimiento de la expresión de DsRED en los ensayos de expresión transitoria se usó una lámpara de luz azul Dark Reader Hand Lamp HL32T de Mobitec, que tiene un espectro de excitación de entre 420 y 500 nm.

El seguimiento y fotografía de la expresión de GFP, DsRED y DsRED-E5 de las plantas transgénicas en el capítulo 1 se llevó a cabo usando una lupa estereoscópica Leica MZ FL III equipada con una cámara Leica DFC420C con el programa de captura de imagen Leica FireCam V3.4. Para la GFP se usó el filtro GFP1, para la DsRED y la emisión roja de la DsRED-E5 el filtro DsRED y para la emisión verde de la DsRED-E5, se usó el filtro GFP3.

4.9 Ensayos de infecciones virales.

Los *A. tumefaciens* transformados con los clones infectivos de TYLCV o TYLCSV fueron inoculados en 5mL de LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se dejaron incubar 24h a 28°C en agitación. Luego se diluyeron los cultivos 1/50 en LB fresco con los mismos antibióticos y se incubaron a 28°C en agitación durante 16h. Transcurrido este tiempo se centrifugaron los cultivos 15 minutos a 4500 rpm y se resuspendieron los precipitados en LB fresco sin antibióticos a una O.D. final de entre 6 y 8. Para inocular las plantas de *N. benthamiana* se inyectó 0,1mL de esta suspensión en el tallo de las mismas usando una jeringuilla provista de una aguja de 0,5mm de calibre, a través de una yema axilar.

4.10 Ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*.

El procedimiento de cultivo de los *A. tumefaciens* para estos ensayos es idéntico al descrito en el apartado anterior. Para preparar las suspensiones de bacterias se centrifugaron los cultivos durante 15 minutos a 4500 rpm pero se resuspendieron los precipitados en tampón de infiltración (Cl_2Ca 100mM; MES 100mM; acetosiringona 100 μM), con una O.D. final de 1. En caso de coinfiltrar varios cultivos en una misma hoja, la O.D. de cada uno de ellos se ajustó independientemente a 1. Las suspensiones se dejaron incubar durante 4 horas en oscuridad antes de infiltrarse en el envés de las hojas usando una jeringuilla de 2mL desprovista de aguja.

Los ensayos se llevaron a cabo en un mínimo de dos réplicas independientes. Cada suspensión de *Agrobacterium* se infiltró en tres hojas de tres plantas. Dichas hojas se recogieron tres días después de la infiltración y se procesaron como un pull para su análisis por Southern o western blot.

Tabla 4.3. Oligonucleótidos

Código	Nombre	Secuencia	Descripción
OM1	ILIRupEcoRI	CACATgaattcGTGGTTCCCCCATTTCTCGTGG	Con OM2 para amplificar la IR de TYLCV-II. con extremos EcoRI.
OM2	ILIRloEcoRI	AATTGaatteAAGTGGGTCCACATATTTGC	Con OM1 para amplificar la IR de TYLCV-II. con extremos EcoRI.
OM3	ILIRupHindIII	CACATgaagcttGTGGTTCCCCCATTTCTCGTGG	Con OM4 para amplificar la IR de TYLCV-II. con extremos HindIII.
OM4	ILIRloHindIII	AATTGagcttAAGTGGGTCCACATATTTGC	Con OM3 para amplificar la IR de TYLCV-II. con extremos HindIII.
OM5	pBINX1	TCATTTTGAGAGAGAACACGGG	Secuenciar desde 35S.
OM6	pBINX2	CAAATGTTTGAACGATCGG	Secuenciar desde NosT.
OM7	DsREDupp	ATGGCCTCCTCCGAGAACGG	Amplifica la ORF de DsRED y DsRED-E5.
OM8	DsREDDow	CTACAGGAACAGGTGGTGG	Amplifica la ORF de DsRED y DsRED-E5.
OM9	25Sr RNAupp	ATAACCCGCATCAGGTTCTCCA	Control endógeno de RT-PCR en <i>N. benthamiana</i> ..
OM10	25Sr RNALow	CCGAAAGTTAACGGATCCATTTT	Control endógeno de RT-PCR en <i>N. benthamiana</i> ..
OM11	RTCPTYLCD-F	GAAAGGCTGAACTTCGACACAGC	Quantificar por RT-PCR la cantidad de DNA de TYLCV y TYLCV.
OM12	RTCPTYLCD-R	GGACTTTTACATGGGCGCTTCAC	Quantificar por RT-PCR la cantidad de DNA de TYLCV y TYLCV.
OM13	UpRTGFP5	GAGGATACGTCGACGAGAAG	Quantificar por RT-PCR la cantidad de MECs que contienen GFP.
OM14	LowRTGFP5	GATCCTGTTGACGAGGGTGT	Quantificar por RT-PCR la cantidad de MECs que contienen GFP.
OM15	ALITGupp-XhoI	AACTCGAGATGCCATTCGCATCC	Amplificar la secuencia de Rep de TGMV.
OM16	ALITGlow-SpeI	AAACTAGTTTLAGCTGCTCTGTG	Amplificar la secuencia de Rep de TGMV.

Tabla 4.3. Oligonucleótidos (continuación)

Código	Nombre	Secuencia	Descripción
OM17	SIPCNAK254AFw	TATTACCTGGGACCTAAGATAGAGAGGATGAA	Generar la mutación K254A en SIPCNA.
OM18	SIPCNAK254ARv	TTTCATCCTCTTCTATATCTTAGGTGCGAGGTAATA	Generar la mutación K254A en SIPCNA.
OM19	SIPCNAKI64/168AFw	ACTGCCGGAAGGTGTGGCATTCTCAACCAGAGGT	Generar la mutación K168A en el mutante SIPCNA K164A.
OM20	SIPCNAKI64/168ARv	ACCTCTGGTTGAGAATGCCACACACCTTCCCGCAGT	Generar la mutación K168A en el mutante SIPCNA K164A.
OM21	mutK91AFw	CATCATCAGCATCCGGGCTGACCGATGGCAG	Generar la mutación K91A en SIPCNA.
OM22	mutK91ARv	CTGCCATCGTCAGCCCGGATGGTGATGATG	Generar la mutación K91A en SIPCNA.
OM23	mutKI90AFw	CAACTGTTGAGCGGCCCTGAAGAAGCC	Generar la mutación K190A en SIPCNA.
OM24	mutKI90ARv	GGCTTCTTCAGGGCGGCTCAACAGTTTG	Generar la mutación K190A en SIPCNA.
OM25	pET28RBSFwSacI	AAGAGCTCAGAAGGAGATATACC	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM26	AL1F2	AACATATGAAATACTGCTGCC	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM27	AL1F3	AACATATGGACGGTCCGAAGTGC	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM28	AL1F4	AACATATGCCCGTTCCACCGTCTC	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM29	AL1F5	AACATATGCAACCTCACCTCC	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM30	AL1R1	AAGGATCCTTAATTTTCCCTCGAACTG	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM31	AL1R2	AAGGATCCTTAGTCGACCTGGAATTC	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM32	AL1R3	AAGGATCCTTACGGAGGAAAGCCATGG	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.

Tabla 4.3. Oligonucleótidos (continuación)

Código	Nombre	Secuencia	Descripción
OM33	AL1R4	AAGGATPCCTTAGGATAACGAGTCCG	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM34	AL1R5	AAGGATPCCTTAGGAAGACGATTTAGC	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM35	AL1R6	AAGGATCCCTTAGCTGCTCTGTG	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM36	AL1R7	AAGGATCCCTTATGTTTGGCAACCTCC	Amplificar fragmento de Rep de TGMV.
OM37	PCNAFwBamHI	AAGGATCCATGTTGGAACTACGTC	Clonar SIPCNA con un tag de GFP.
OM38	PCNARv+stopKpnI	AAGGTACCTCAAGGCTTGGTTTCC	Clonar SIPCNA con un tag de GFP.
OM39	PCNARv-stopKpnI	AAGGTACCAAGGCTTGGTTTCC	Clonar SIPCNA con un tag de GFP.
OM40	PCNAFwEcoRI	AAGAATTCATGTTGGAACTACGTC	Clonar SIPCNA con un tag de 3xFlag.
OM41	PCNARv+stopPstI	AACTGCAGTCAAGGCTTGGTTTCC	Clonar SIPCNA con un tag de 3xFlag.
OM42	oC1TYCzlow	TCTAGAGCTCGCAGCCTTAAGGCC	Clonar Rep de TYLCV-IL.
OM43	oC1TYCzupp	CGATGGATCCCAACATGCCCTCG	Clonar Rep de TYLCV-IL.
OM44	AtSCE1FwNcoI	CCATGGCTTAGTGGAAATGCCCTCG	Clonar AtSCE1 en pET28b.
OM45	AtSCE1RvBgIII	AGATCTTTAGACAAGAAGCAGGATACTGCC	Clonar AtSCE1 en pET28b.
OM46	AtSAE1aFwNdeI	CATATGGAGCGGAGAGAAGGCTTACC	Clonar AtSAE1a en pET28b.
OM47	AtSAE1aRvBamHI	GGATCCCTTAAGAGGTA AAAAGAGTCCG	Clonar AtSAE1a en pET28b.
OM48	AtSAE2FwNcoI	CCATGGCTTAAGCAACAACAAGC	Clonar AtSAE2 en pET28b.
OM49	AtSAE2RvSall	GTCGACCTATTTCAACTCTTATCTTC	Clonar AtSAE2 en pET28b.

4.12 Anticuerpos usados en este trabajo.

Tabla 4.4 Anticuerpos.

Anticuerpo	Mono o policlonal	Organismo	Origen	Dilución de uso	Referencia
α ScPCNA	Monoclonal	Ratón	GeneTex GTX20029	Bacterias 1/2500 Plantas 1/100	(Krasna <i>et al.</i> , 2002)
α NbSUMO1	Policlonal	Conejo	UMA	Bacterias 1/5000 Plantas 1/200	(Sánchez-Durán <i>et al.</i> , 2011)
α Mouse IgG-HRP	policlonal	Cabra	GE Healthcare NXXA931	1/10000	http://www.sigmaldrich.com
α Rabbit IgG-HRP	policlonal	Cabra	Sigma A6154	1/5.000	(Oidak <i>et al.</i> , 2011)
α FLAG	Monoclonal	Ratón	Sigma F1804	1/1.000	(Rudinsky <i>et al.</i> , 2009)
α AL1	Policlonal	Conejo	NCSSU	1/3.000	(Sánchez-Durán <i>et al.</i> , 2011)
α AtSUMO-1	Policlonal	Conejo	Abcam Ab5316	1/1.000	(Conti <i>et al.</i> , 2008)
α AtSUMO-3	Policlonal	Conejo	Abcam Ab5317	1/1.000	(Budhiraja <i>et al.</i> , 2009)
α GFP	Monoclonal	Ratón	Cloneteck 632375	1/20.000	(van den Akker <i>et al.</i> , 2012)
α HIS-Tag	Monoclonal	Ratón	Biomedical AB-3237	1/3.000	http://lifescience.biomedical.com

4.14 Bibliografía.

- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (1999). Short Protocols in Molecular Biology : A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **62**(3): 293-300.
- Budhiraja, R., R. Hermkes, et al. (2009). "Substrates related to chromatin and to RNA-dependent processes are modified by Arabidopsis SUMO isoforms that differ in a conserved residue with influence on desumoylation." Plant Physiol **149**(3): 1529-40.
- Clough, S. J. and A. F. Bent (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." The Plant Journal **16**(6): 735-743.
- Conti, L., G. Price, et al. (2008). "Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis*." Plant Cell **20**(10): 2894-908.
- Deblaere, R., B. Bytebier, et al. (1985). "Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants." Nucleic Acids Res **13**(13): 4777-88.
- Govantes, F., J. A. Molina-Lopez, et al. (1996). "Mechanism of coordinated synthesis of the antagonistic regulatory proteins NifL and NifA of *Klebsiella pneumoniae*." J Bacteriol **178**(23): 6817-23.
- Hoekema, H. P.R., et al. (1983). "A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid." Nature **303**: 179-180.
- Holsters, M., B. Silva, et al. (1980). "The functional organization of the nopaline A. *tumefaciens* plasmid pTiC58." Plasmid **3**(2): 212-30.
- James, P., J. Halladay, et al. (1996). "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." Genetics **144**(4): 1425-36.
- Krasna, L., D. Dudorkinova, et al. (2002). "Large expansion of morphologically heterogeneous mammary epithelial cells, including the luminal phenotype, from human breast tumours." Breast Cancer Res Treat **71**(3): 219-35.
- Mencia, M. and V. de Lorenzo (2004). "Functional transplantation of the sumoylation machinery into *Escherichia coli*." Protein Expr Purif **37**(2): 409-18.
- Murashige T. and S. F. ((1962)). "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. ." Physiol Plant **15**((3)): 473-497.
- Oldak, M., L. Tolzmann, et al. (2011). "Differential regulation of human papillomavirus type 8 by interferon regulatory factors 3 and 7." J Virol **85**(1): 178-88.
- Rudinskiy, N., Y. Grishchuk, et al. (2009). "Calpain hydrolysis of alpha- and beta2-adaptins decreases clathrin-dependent endocytosis and may promote neurodegeneration." J Biol Chem **284**(18): 12447-58.
- Sambrook, J. R. D. (2001). Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Duran, M. A., M. B. Dallas, et al. (2011). "Interaction between Geminivirus Replication Protein and the SUMO-Conjugating Enzyme Is Required for Viral Infection." Journal of Virology **85**(19): 9789-9800.
- van den Akker, J., A. van Weert, et al. (2012). "Transglutaminase 2 is secreted from smooth muscle cells by transamidation-dependent microparticle formation." Amino Acids **42**(2-3): 961-73.
- Voinnet, O., S. Rivas, et al. (2003). "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus." Plant J **33**(5): 949-56.

CONCLUSIONES

1.- SIPCNA se sumoila en ensayos *in vitro* y sin la mediación de SIZ1 en las lisinas 164 y 254, utilizando tanto las E1 y E2 de mamíferos como las de *A. thaliana*.

2.- SIPCNA puede sumoilarse con HsSUMO1, AtSUMO1 y AtSUMO2, pero no con AtSUMO3.

3.- La expresión de Rep reduce la sumoilación de las lisinas 164 y 254 de PCNA.

4.- La interferencia de Rep es específica, ya que la expresión de la proteína viral no afecta la sumoilación *in vitro* de la catalasa 3 (AtCAT3) de *A. thaliana*, ni a los patrones de sumoilación en planta.

5.- El dominio de Rep que reduce la sumoilación de SIPCNA se localiza en el fragmento comprendido entre los aminoácidos 120 y 184, el mismo descrito para su interacción con PCNA.

6.- En experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana*, las construcciones 2IR-Sar-DsRED, 2IR-Sar-Timer, 2IR-IL-GFP, 2IR-IL-DsRED y 2IR-Cz-Timer generan moléculas extracromosómicas y llevan a un incremento en la expresión de los fluoróforos GFP, DsRED o DsRED-E5 cuando son coinfiltrados con los virus TYLCSV o TYLCV-IL o sus respectivas proteínas Rep.

7.- Las plantas *N. benthamiana* transgénicas de las líneas 2IR-Sar-Timer, 2IR-IL-GFP, 2IR-IL-DsRED y 2IR-IL-Timer presentan incrementos en la expresión de los fluoróforos GFP, DsRED o DsRED-E5 al ser infectadas por TYLCSV o TYLCV que correlacionan con los niveles de moléculas extracromosómicas y de DNA viral.

8.- El desarrollo de síntomas y la acumulación de TYLCSV en plantas 2IRSarGFP se altera cuando las plantas se exponen a condiciones de estrés salino, sequía o temperatura alta.

CONCLUSIONS

1.- SIPCNA is SUMOylated *in vitro* without de mediation of SIZ1. The modification occurs in the 164 and 254 lysines catalyzed by the E1 and E2 both from mammals and *A. thaliana*.

2.- SIPCNA can be SUMOylated by HsSUMO1, AtSUMO1 and AtSUMO2, but not by AtSUMO3.

3.- Rep expression reduces SUMOylation in SIPCNA lysines 164 and 254.

4. Rep interference is specific, since its expression does not affect the *in vitro* SUMOylation of catalase 3 (AtCAT3) of *A. thaliana*, nor the plant SUMOylation patterns.

5.- The domain of Rep that reduces the SUMOylation of SIPCNA is located in the fragment between aminoacids 120 and 184, same that has been described for its interaction with PCNA.

6.- In transitory expression assays in *N. benthamiana*, the constructs 2IRSarDsRED, 2IRSarTimer, 2IRILGFP, 2IRILDsRED and 2IRCzTimer generate extrachromosomal molecules that lead to an increment in the expression of the fluorofores GFP, DsRED or DsRED-E5 when they are coinfiltrated with viruses TYLCSV or TYLCV-IL or their respectives Rep proteins.

6.- The transgenic *N. benthamiana* plants of the lines 2IRSarTimer, 2IRILGFP, 2IRILDsRED y 2IRILTimer present increments in the expression of fluorofores GFP, DsRED or DsRED-E5 that correlate with the levels of extrachromosomal molecules and viral DNA, when infected with TYLCSV or TYLCV.

7.- The development of symptoms and the acumulation of TYLCSV in 2IR-Sar-GFP plants are altered when plants are exposed to saline, drought or high temperature stress.

ANEXO I

ALINEAMIENTO
MÚLTIPLE DE
SECUENCIAS DE
PCNA

Anexo I

Anexo 1 Alineamiento de secuencias de PCNA de varias especies

	1314	20		
1	MLELRLVQGSLLKKVLESIK	DLVNDANFDCSATGFSLQAMDS	SSHVALVALLRSEGF	EHY 60 PCNA1_SOLLC
1	MLELRLVQGSLLKKVMSIK	DLVNDANFDCSATGFSLQAMDS	SSHVALVAVLLRSEGF	EHY 60 PCNA1_DAUCA
1	MLELRLVQGSLLKKVLESIK	DLVNDANFDCSSTGFSLQAMDS	SSHVALVSLLLRSEGF	EHY 60 PCNA1_ARATH
1	MLELRLVQGSLLKKVLEAVK	DLVNDANFDCSTTGFSLQAMDS	SSHVALVSLLLRSEGF	EHY 60 PCNA2_ARATH
1	MLELRLVQGSLLKKVLESIK	DLVNDANFDCSTTGFSLQAMDS	SSHVALVSLLLRSEGF	EHY 60 PCNA_BRANA
1	MLELRLVQGSLLKKVLESIK	DLVTDANFDCSASGFSLQAMDS	SSHVALVALLRSEGF	EHY 60 PCNA_CATRO
1	MLELRLVQGSLLKKVLEAIREL	VNDANFDCSGTGFSLQAMDS	SSHVALVALLRAEGF	EHY 60 PCNA_MAIZE
1	MLELRLVQGSLLKKVLESIK	DLVNDANFDFSSSGFSLQSMDS	SSHVALVALLKSEGF	EHY 60 PCNA_POPNI
1	MLELRLVQGSLLKKVLESIK	ELVNDANFDCSSTGFSLQAMDS	SSHVALVALLRSEGF	EHY 60 PCNA_PEA
1	MLELRLVQGSLLKKVLEAIREL	VTDANFDCSGTGFSLQAMDS	SSHVALVALLRSEGF	EHY 60 PCNA_ORYSJ
1	-----	SSTGFSLQAMDS	SSHVALVALLRSEGF	EHY 30 PCNA_SOYBN
1	MLELRLVQGSLLKKVLESIK	DLVNDANFDCSATGFSLQAMDS	SSHVALVALLRSEGF	EHY 60 PCNA_TOBAC
1	MFEARLVQGSILKKVLEALK	DLINEACWDISSGVNLQSMDS	SHVSLVQLTLRSEGF	DTY 60 PCNA_BOVIN
1	MFEARLVQGSILKKVLEALK	DLINEACWDISSGVNLQSMDS	SHVSLVQLTLRSEGF	DTY 60 PCNA_CRIGR
1	MFEARLVQGSILKKVLEALK	DLINEACWDISSGVNLQSMDS	SHVSLVQLTLRSEGF	DTY 60 PCNA_HUMAN
1	MFEARLIQGSILKKVLEALK	DLINEACWDVSSGVNLQSMDS	SHVSLVQLTLRSEGF	DTY 60 PCNA_MOUSE
1	MFEARLIQGSILKKVLEALK	DLINEACWDISSGVNLQSMDS	SHVSLVQLTLRSEGF	DTY 60 PCNA_RAT
1	MFEARLVQGSVLRKRVLEALK	DLITEACWDLGSGGISLQSMDS	SHVSLVQLTLRSEGF	DTY 60 PCNA_COTJA
1	MFEARLVQGSVLRKRVLEALK	DLITEACWDLGSGGISLQSMDS	SHVSLVQLTLRSEGF	DTY 60 PCNA_CHICK
1	MFEARLVQGSILKKVLEALK	DLITEACWDVSSSGISLQSMDS	SHVSLVQLTLRSDGF	DSY 60 PCNA_ANGJA
1	MFEARLVQGSILKKVLEALK	DLITEACWDVSSSGISLQSMDS	SHVSLVQLTLRSDGF	DSY 60 PCNA_DANRE
1	MFEARLIQGSNLKVVQEAL	DIVTEASWDCTSSGISLQAMDS	SHVSLVQLTLRADGF	ENF 60 PCNA_STYCL
1	MFEARLVQGSILKKVLEALK	DLIDEACWDITSSGISLQSMDS	SHVSLVQLTLRSDGF	DTY 60 PCNA_XENLA
1	MFEARLLRSSILKKVLEAIK	DLTQATFDCDDNGIQLQAMDN	SHVSLVSLTLRADGF	DKY 60 PCNA_BOMMO
1	MFEARLQATILKKIILDAIK	DLLNEATFDCSDSGIQLQAMDN	SHVSLVSLTLRSDGF	DKF 60 PCNA_DROME
1	MFEARLINATILKKIILDAIK	ELLHEATFECSSEGIQLQAMDN	SHVSLVSLTLRSDGF	DKF 60 PCNA_SARCR
1	MFEAKLANAGLLKKIVESIK	DLVTDAPFDCSETAMSLQAMDS	SHVALVSLKLEVGLF	DTY 60 PCNA_CAEEL
1	MFEARLLQASLLKKIILESIK	DLVESANFDCSPEGISLQAMDG	THVTLINLVLNRNEGF	FETY 60 PCNA_DICDI
1	MLEAKLNNASILKKLFECIK	DLVNDANVDAESGLKQALDGNH	VSLVSLHLLDSGF	SHY 60 PCNA_PLAF7
1	MLEARFQQAALLKKLLDAIK	ELVTDANFDCNDNGISLQAMDS	SHVALVSMLIKSDGF	FEPY 60 PCNA_SCHPO
1	MLEAKFEEASLFRKRIIDGFK	DCVQLVNFQCKEDGIIAQAVD	DSRVLLVLSLEIGVEAF	QEQY 60 PCNA_YEAST
1	-MIDVIMTGELLKTVTRAI	VALVSEARIHFLKGLHSRAVD	PANVAMVIVDIPKDSF	EVY 59 PCNA_ARCFU

77 80 91 110 117

61	RCDRNISMGMNLTNMAKMLK	CAGNDDIITIK	ADDG-SDTVTFMFESPTQDK	IADFEMKLM	119	PCNA1_SOLLC
61	RCDRNISMGMNLGNMAKMLK	CAGNDDIITIK	ADDG-SDTVTFMFESPTQDK	IADFEMKLM	119	PCNA1_DAUCA
61	RCDRNLSMGMNLGNMSKMLK	CAGNDDIITIK	ADDG-GDTVTFMFESPTQDK	IADFEMKLM	119	PCNA1_ARATH
61	RCDRNLSMGMNLGNMSKMLK	CAGNDDIITIK	ADDG-SDTVTFMFESPTQDK	IADFEMKLM	119	PCNA2_ARATH
61	RCDRNLSMGMNLGNMSKMLK	CAGNDDIITIK	ADDG-GDTVTFMFESPKQDK	IADFEMKLM	119	PCNA_BRANA
61	RCDRNPSMGMNLNNMAKMLK	CAGNDDIITLK	ADDG-SDTVTFMFESPTQDK	ISDFEMKLM	119	PCNA_CATRO
61	RCDRNLSMGMNLNNMAKMLR	CAGNDDIITIK	ADDG-SDTVTFMFESPKQDK	IADFEMKLM	119	PCNA_MAIZE
61	RCDRNLSMGMNLGNMSKMLK	CAGNDDIITIK	GDDG-SDTVTFMFESPTQDK	IADFEMKLM	119	PCNA_POPNI
61	RCDRNLSMGMNLNNMAKMLK	CAGNDDIITIK	ADDG-SDTVTFMFESPTQDK	ISDFEMKLM	119	PCNA_PEA
61	RCDRNLSMGMNLNNMAKMLR	CAGNDDIITIK	ADDG-SDTVTFMFESPNQDK	IADFEMKLM	119	PCNA_ORYSJ
31	RCDRNISMGMNLNNMAKMLK	CAGNDDIITIK	ADDG-SDTVTFMFESPTQDK	ISDFEMKLM	89	PCNA_SOYBN
61	RCDRNISMGMNLNMAKMLK	CAGNDDIITLK	ADDG-SDTVTFMFESPTQDK	IADFEMKLM	119	PCNA_TOBAC
61	RCDRNLAGVNLTSMSKILK	CAGNEDIITLRAEDN	-ADTLALVFEAPNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_BOVIN
61	RCDRNLAGVNLTSMSKILK	CAGNEDIITLRAEDN	-ADTLALVFEAPNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_CRIGR
61	RCDRNLAGVNLTSMSKILK	CAGNEDIITLRAEDN	-ADTLALVFEAPNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_HUMAN
61	RCDRNLAGVNLTSMSKILK	CAGNEDIITLRAEDN	-ADTLALVFEAPNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_MOUSE
61	RCDRNLAGVNLTSMSKILK	CAGNEDIITLRAEDN	-ADTLALVFEAPNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_RAT
61	RCDRNLAGVNLNSMSKILK	CAGNEDIITLRAEDN	-ADTLALVFETPNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_COTJA
61	RCDRNLAGVNLNSMSKILK	CAGNEDIITLRAEDN	-ADTLALVFEAPNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_CHICK
61	RCDRNLAGVNLNSMSKMLK	CAGNEDIITLRAEDN	-ADTLALVFETLNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_ANGJA
61	RCDRNLAGVNLSSMSKILK	CAGNEDIITLRAEDN	-ADALALVFETLNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_DANRE
61	RCDRNLAGINMTSMAIM	CAGNDDIITLRAEDN	-ADMLELIFESSKGD	YSQYEMKLM	119	PCNA_STYCL
61	RCDRNQSIGVKMSSMSKILK	CAASDDIITLRAEDN	-ADTVTMVFESPNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_XENLA
61	RCDRNISMGMNLGSMKILK	FAGDKDTATIK	AQDN-ADNVTFVFESPNQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_BOMMO
61	RCDRNLSMGMNLGSMKILK	CANNEDNVTK	AQDN-ADTVTIFVESANQE	KVSDYEMKLM	119	PCNA_DROME
61	RCDRNISMGMNLGSMKILK	CANNDDTVTVK	AQDN-ADTVTFMFESPNHEK	KVSDYEMKLM	119	PCNA_SARCR
61	RCDRTINLGLSLANMSKALK	CANNDDTCMLK	YEENEGDSIIFTFADPKRDK	TQDVTVKMM	120	PCNA_CAEEL
61	NCDRSLSLGLSLVLSKILK	CAGNDDTLTIRARDNES	SDTVTFVFESPKNDRVSDFEIK	LI	120	PCNA_DICDI
61	RCDREVLGVNIASLNKVF	KLCGANESVVISSKDD	-EDNLFVFNENKED	KVTNFSKLM	119	PCNA_PLAF7
61	RCDRNIALGINLNAKSK	VLRCAQNE	DLVTLKAEEDT-PEVLNLFVFESEKNDR	ISDYDVKLM	119	PCNA_SCHPO
61	RCDHPVTLGMDLTSLSKILK	RCGNNTDTLTLIADNT	-PDSIILLFEDTKKDR	IAEYSLKLM	119	PCNA_YEAST
60	NIDEEKTIGVMDRIFDISK	SISTKDLVELIVEDES	--TLKVKFGS-----VEYKVALI		111	PCNA_ARCFU

149

164 168

120	DID--SEHLGIPEA--EYHAIVRMPSAEFGRICKDLSSIGDTVVISVTKEGVK	175	PCNA1_SOLLC
120	DID--SEHLGIPEA--EYHAIVRMPSAEFARICKDLSSIGDTVVISVTKEGVK	175	PCNA1_DAUCA
120	DID--SEHLGIPDA--EYHSIVRMPSNEFSRICKDLSSIGDTVVISVTKEGVK	175	PCNA1_ARATH
120	DID--SEHLGIPDA--EYHSIVRMPSGEFSRICKDLSSIGDTVVISVTKEGVK	175	PCNA2_ARATH
120	DID--SEHLGIPDA--EYHSIVRMPSNEFSRICKDLSTIGDTVVISVTKEGVK	175	PCNA_BRANA
120	DID--SEHLGIPEA--EYHAIVRMPSAEFARICKDLSSIGDTVVISVTKEGVK	175	PCNA_CATRO
120	DID--SEHLGIPDS--EYQAVRMPSSEFMRICKDLSSIGDTVVISVTKEGVK	175	PCNA_MAIZE
120	DID--SEHLGIPDS--EYQAVRMPSSEFSRICKDLSSIGDTVIISVTKEGVK	175	PCNA_ORYSJ
120	DID--SEHLGIPEA--EYHAIVRMPSAEFARICKDLSSIGDTVVIASKEGVK	175	PCNA_PEA
120	DID--SEHLGIPEA--EYHAIVKMPSAEFARICKDLASIGDTVVISVTKEGVK	175	PCNA_POPNI
90	DID--SEHLGIPEA--EYHAIVKMPSSAEFARICKDLSSIGDTVVISVTKEGVK	145	PCNA_SOYBN
120	DID--SEHLGIPEA--EYHAIVRMPSAEFSRICKDLSSIGDTVVISVTKEGVK	175	PCNA_TOBAC
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVVKMPSGEFARICRDLSHIGDAVVISCAKDGVK	175	PCNA_BOVIN
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVVKMPSGEFARICRDLSHIGDAVVISCAKDGVK	175	PCNA_CRIGR
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVVKMPSGEFARICRDLSHIGDAVVISCAKDGVK	175	PCNA_HUMAN
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVIKMPSGEFARICRDLSHIGDAVVISCAKNGVK	175	PCNA_MOUSE
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVVKMPSGEFARICRDLSHIGDAVVISCAKDGVK	175	PCNA_RAT
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVVKMPSAEFARICRDLSHIGDAVVISCAKDGVK	175	PCNA_COTJA
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVVKMPSAEFARICRDLSHIGDAVVISCAKDGVK	175	PCNA_CHICK
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVVKMPSGEFARICRDLSQLIGDAVMISCAKDGVM	175	PCNA_ANGJA
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVVKMPSGEFARICRDLSQLIGDAVMISCAKDGVM	175	PCNA_DANRE
120	DLD--CEQLGIPEQ--DYSCCVTLPSQEFGRICRDLSQLIGECVVITCTDGV	175	PCNA_STYCL
120	DLD--VEQLGIPEQ--EYSCVIKMPSGEFARICRDLSQLIGDAVVISCAKDGVK	175	PCNA_XENLA
120	NLD--LEHLGIPET--EYSCVVKMPSSAEFARICRDLSQLIGESMVISCTKEGVK	175	PCNA_BOMMO
120	NLD--QEHLGIPET--DFSCVVRMPAMEFARICRDLAQFSESVVICCTKEGVK	175	PCNA_DROME
120	NLD--QEHLGIPET--DYSCVVRMPMEFARICRDLAQFSEMLICCTKEGVK	175	PCNA_SARCR
121	DID--SEHLGIPDQ--DYAVVCEMPAGEFQKTKDLSTFSDSLNITATKAGIVFTGKGI	176	PCNA_CABEL
121	DIK--NEQYSIRKS--DYSAVIKMPSAELQRICRDLSEIIVTISANKEGVK	176	PCNA_DICDI
120	SIE--LDSLNIIPDCEEGFDAEVELSSKELTNIFRNLSSEFSDTVFIEIDSNCIK	177	PCNA_PLAF7
120	DID--QEHLGIPDI--EYDATITMPAAEFQRITRDLLTSLSDSVTINASK	175	PCNA_SCHPO
120	DID--ADFLKIEEL--QYDSTLSLPSSEFSKIVRDLSQLSDSINIMITKETIK	175	PCNA_YEAST
112	DPSAIRKEPRIPEL--ELPAKIVMDAGEFKKAIAAADKISDQVIFRSDKEGFRIEAKGDV	169	PCNA_ARCFU

190

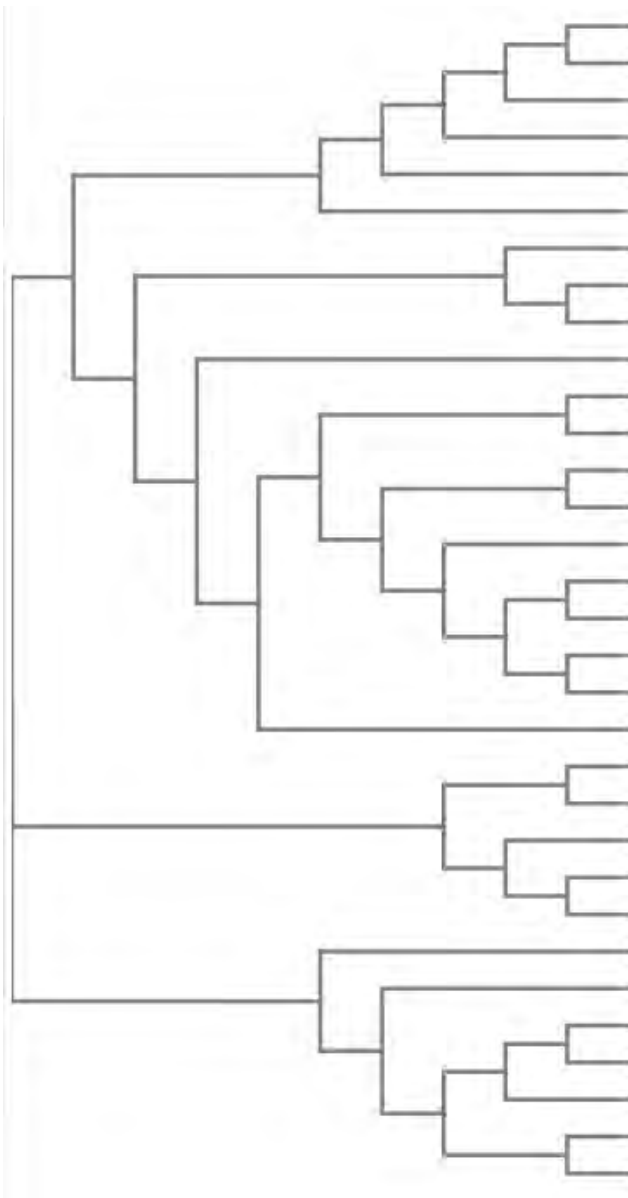
217

176	GTANIVCRQNTTVD-KPEEATVIEMNEPVSLTFALRYLNSFTKASPLSNTVTISLSSELP	234	PCNA1_SOLLC
176	GTANIVCRQNTTVD-KPEEATVIEMNEPVSLTFALRYMNSFTKASPLSSTVTISLSSELP	234	PCNA1_DAUCA
176	GTANIVLRQNTTVD-KPEDAIVIEKPEVSLSFALRYMNSFTKATPLSDTVTISLSSELP	234	PCNA1_ARATH
176	GTANIVLRQNTTVD-KPEDAIVIEKPEVSLSFALRYMNSFTKATPLSETVTISLSSELP	234	PCNA2_ARATH
176	GTANIVLRQNTTVD-KPEDAIVIEKPEVSLSFALRYMNSFTKATPLSDTVTISLSSELP	234	PCNA_BRANA
176	GTANIVCRQNTTVD-KPDEATIIEMNEPVSLTFALRYLNSFTKATPLSNNVTISLSSELP	234	PCNA_CATRO
176	GSANIVCRQNQTID-KPEEATIIEMQEPVSLTFALRYMNSFTKASSLSEQVTISLSSELP	234	PCNA_MAIZE
176	GTANIVCRQNKTVD-KPEDATIIEMQEPVSLTFALRYMNSFTKASPLSEQVTISLSSELP	234	PCNA_ORYSJ
176	GSANIVCRQNTTVD-KPEEATVIEMNEPVSLTFALRYMNSFTKATPLSSSVTISLSNELP	234	PCNA_PEA
176	GTANIVLRQNTTVD-KPEDATVIEMNEPVSMTFALRYMNSFTKATPLSNTVTISMSDLP	234	PCNA_POPNI
146	GTANIVCRQNTSVD-KPEEATVIEMNEPVSLTFALRYMNSFTKATPLSNTVTISLSNELP	204	PCNA_SOYBN
176	GTANIVCRQNTTVD-KPEEATVIEMNEPVSLTFALRYLNSFTKATPLSNTVTISLSSELP	234	PCNA_TOBAC
176	GNGNIKLSQTSNVD-KEEEAVAIEMNEPVQLTFALRYLNFFTKATPLSPTVTLMSADVP	234	PCNA_BOVIN
176	GNGNIKLSQTSNVD-KEEEAVTIEMNEPVQLTFALRYLNFFTKATPLSPTVTLMSSTDVP	234	PCNA_CRIGR
176	GNGNIKLSQTSNVD-KEEEAVTIEMNEPVQLTFALRYLNFFTKATPLSSTVTLMSADVP	234	PCNA_HUMAN
176	GNGNIKLSQTSNVD-KEEEAVTIEMNEPVHLTFALRYLNFFTKATPLSPTVTLMSADVP	234	PCNA_MOUSE
176	GNGNIKLSQTSNVD-KEEEAVSIEMNEPVQLTFALRYLNFFTKATPLSPTVTLMSADVP	234	PCNA_RAT
176	GNGNIKLSQTSNVD-KEEEAVTIEMNEPVQLTFALRYLNFFTKATPLSPTVTLMSADVP	234	PCNA_COTJA
176	GNGNIKLSQTSNVD-KEEEAVTIEMNEPVQLTFALRYLNFFTKATPLSPTVTLMSADVP	234	PCNA_CHICK
176	GTGNVKSQTSNVD-KEDDAVTIEMNEPVQLIFALNYLNFFTKATPLSKTVTLMSADIP	234	PCNA_ANGJA
176	GTGNVKSQTSNVD-KEDEAVTIEMNEPVQLIFALNYLNFFTKATPLSKTVTLMSADIP	234	PCNA_DANRE
176	GAGKIKLKQNTGSDI-KEEEQVTVEISEPVQLTFAIKYLNLFAASPLSPSVCLSMSNNVP	235	PCNA_STYCL
176	GTGNVKSQTSNVD-KEEEAVTIEMNEPVQLTFALRYLNFFTKATPLSPTVTLMSADIP	234	PCNA_XENLA
176	GSANVKLAQTASID-KEEEAVVIEMEEPVTTLFACQYLNFFTKATSLSPQVQLSMSADVP	234	PCNA_BOMMO
176	GTANIKLAQTGSVD-KEEEAVIEMQEPVTLTFACRYLNAFTKATPLSTQVQLSMCADVP	234	PCNA_DROME
176	GSANVKLAQTSSVD-KEEEAVIEMQEPVTLTFACRYLNAFTKATPLSAQVQLSMCADVP	234	PCNA_SARCR
177	GSSVVTYSPSSNTD-DETEAVTLEVKDPVNVNFSIKYMNQFTKATALSDRVRLSLCNDVP	235	PCNA_CABEL
177	GSGNITIKPTSDSDVPAEQATVIESKEPVVNLNFKLFLSNFTKATPLSPMVTLSMSEGIP	236	PCNA_DICDI
178	GDAEVALKPRDSTS-EDDIGVTIKSKKKIKQSFAIKYLNLFSKSNILADVVLGLSDSRP	236	PCNA_PLAF7
176	GNGSTTLKQHTDLS-DQDQSIIEISLTQAVTLTFLSLKYLQFTKATPLATRVTLMSNDVP	234	PCNA_SCHPO
176	GSGSVI IKPFVDME-HPETS IKLEMDQPVDLTFGAKYLLDIKGSLSDRVGIRLSSEAP	234	PCNA_YEAST
170	DSIVFHMTETELIEFN-----GGEARSMFSVDYLKEFCXVAGSGDLLTIHLGTNYP	220	PCNA_ARCFU

240	254	263		
235 VVVEYKIAE-----MGYVRYLAPKIEEDEEETKP----			264	PCNA1_SOLLC
235 VVVEYKIAE-----MGYIRFYLAPKIEEEEDSKP----			264	PCNA1_DAUCA
235 VVVEYKVAE-----MGYIRYYLAPKIEEEEDTNP----			263	PCNA1_ARATH
235 VVVEYKVAE-----MGYIRYYLAPKIEEEEDTKPE----			264	PCNA2_ARATH
235 VVVEYKVAE-----MGYIRYYLAPKIEEDEEDKA----			263	PCNA_BRANA
235 VVVEYKIAE-----MGYIRFYLAPKIEDEDEMMP----			263	PCNA_MAIZE
235 VVVEYKIAE-----MGYIRFYLAPKIEEDDEEQSLEYQA			268	PCNA_CATRO
235 VVVEYKIAE-----MGYIRFYLAPKIEDEDEMKS----			263	PCNA_ORYSJ
235 VVVEYKIAE-----MGYVRFYLPKMEEDEPEPGA----			264	PCNA_POPNI
235 VVVEYKIAE-----MGYVRFYLPKIEEDEEETKPQA--			266	PCNA_PEA
205 VVVEYKIAE-----MGYVRFYLPKIEEDEEDTKPQV--			236	PCNA_SOYBN
235 VVVEYKIAE-----MGYIRFYLAPKIEEDEEETKP----			264	PCNA_TOBAC
235 LVVEYKIAD-----MGHLKYLLAPKIEDEEESG-----			261	PCNA_BOVIN
235 LVVEYKISD-----MGHLKYLLAPKIEDEEESG-----			261	PCNA_CRIGR
235 LVVEYKIAD-----MGHLKYLLAPKIEDEEESG-----			261	PCNA_HUMAN
235 LVVEYKIAD-----MGHLKYLLAPKIEDEEESG-----			261	PCNA_MOUSE
235 LVVEYKIAD-----MGHLKYLLAPKIEDEEESG-----			261	PCNA_RAT
235 LVVEYKIAD-----MGHXKYLLAPKIEDQQEGS-----			262	PCNA_COTJA
235 LVVEYKIAD-----MGHLKYLLAPKIEDQQEGS-----			262	PCNA_CHICK
235 LVVEYKIAD-----MGHVKYLLAPKIDEEESG-----			260	PCNA_ANGJA
235 LVVEYKIAD-----MGHVKYLLAPKIDEEESG-----			260	PCNA_DANRE
236 LVVEYKIVAD-----MGHIKYFLAPKIEDEEEQDS----			264	PCNA_STYCL
235 LVVEYKIAD-----MEHVKYLLAPKIDEEESG-----			261	PCNA_XENLA
235 LVVEYRIPD-----IGHIRYYLAPKIEEEDS-----			260	PCNA_BOMMO
235 LVVEYAIKD-----LGHIRYYLAPKIEDNET-----			260	PCNA_DROME
235 LVVEYAIKE-----LGHIRYYLAPKIEDES-----			260	PCNA_SARCR
236 VVVEYPIEE-----NGYLRFYLPKIDDDENMD-----			263	PCNA_CAEEEL
237 VVVEYKIDD-----LGFLGFFLAPKIE-----			258	PCNA_DICDI
237 IEFKYEIKDTSPPSDTLKIGFVKFFLAPKMDDMDNKD----			274	PCNA_PLAF7
235 LLVEYKIM-E-----SGFLRFYLPKIGEEDEE-----			260	PCNA_SCHPO
235 ALFQFDL-K-----SGFLQFFLAPKFNDEE-----			258	PCNA_YEAST
221 VRLVFELVGG-----RAKVEYILAPRIESE-----			245	PCNA_ARCFU

Anexo I: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de varios PCNA. Se han coloreado en verde las secuencias que pertenecen a plantas, en azul las de mamíferos, en rojo las de pájaros, en morado la de un tunicado, en marrón la de un anfibio, en azul oscuro las de insectos, en celeste las de otros eucariotas y en negro la secuencia de PCNA de una arquea, añadido como grupo externo. Se han sombreado en gris las lisinas de SIPCNA conservadas en los demás organismos. A continuación se detallan las especies a las que pertenecen las secuencias y los números de acceso de cada secuencia.

PCNA_SOLLC *Solanum lycopersicum* Q8H0Q1
PCNA1_DAUCA *Daucus carota* Q00268
PCNA1_ARATH *Arabidopsis thaliana* Q9M7Q7
PCNA2_ARATH *Arabidopsis thaliana* Q9ZW35
PCNA_BRANA *Brassica napus* Q43124
PCNA_MAIZE *Zea mays* Q43266
PCNA_CATRO *Catharanthus roseus* P24314
PCNA_ORYSJ *Oryza sativa* subsp. *japonica* P17070
PCNA_POPNI *Populus nigra* Q9MAY3
PCNA_PEA *Pisum sativum* O82134
PCNA_SOYBN (Fragment) *Glycine max* P22177
PCNA_TOBAC *Nicotiana tabacum* O82797
PCNA_BOVIN *Bos taurus* Q3ZBW4
PCNA_CRIGR *Cricetulus griseus* P57761
PCNA_HUMAN *Homo sapiens* P12004
PCNA_MOUSE *Mus musculus* P17918
PCNA_RAT *Rattus norvegicus* P04961
PCNA_COTJA *Coturnix coturnix japonica* Q9DDF1
PCNA_CHICK *Gallus gallus* Q9DEA3
PCNA_ANGJA *Anguilla japonica* Q9W644
PCNA_DANRE *Danio rerio* Q9PTP1
PCNA_STYCL *Styela clava* P53358
PCNA_XENLA *Xenopus laevis* P18248
PCNA_BOMMO *Bombyx mori* O01377
PCNA_DROME *Drosophila melanogaster* P17917
PCNA_SARCR *Sarcophaga crassipalpis* O16852
PCNA_CAELC *Caenorhabditis elegans* O02115
PCNA_DICDI *Dictyostelium discoideum* Q54K47
PCNA_PLAF7 *Plasmodium falciparum* (isolate 3D7) P61074
PCNA_SCHPO *Schizosaccharomyces pombe* (strain 972 / ATCC 24843) Q03392
PCNA_YEAST *Saccharomyces cerevisiae* (strain ATCC 204508 / S288c) P15873
PCNA_ARCFU *Archaeoglobus fulgidus* Q29912



sp|O29912|PCNA_ARCFU 0.45122
 sp|P15873|PCNA_YEAST 0.31866
 sp|P61074|PCNA_PLAF7 0.33613
 sp|O02115|PCNA_CAEEL 0.24823
 sp|Q03392|PCNA_SCHPO 0.23037
 sp|Q54K47|PCNA_DICDI 0.21328
 sp|O01377|PCNA_BOMMO 0.10366
 sp|P17917|PCNA_DROME 0.0429
 sp|O16852|PCNA_SARCR 0.05326
 sp|P53358|PCNA_STYCL 0.16967
 sp|Q9W644|PCNA_ANGJA 0.02556
 sp|Q9PTP1|PCNA_DANRE 0.0129
 sp|Q9DDF1|PCNA_COTJA 0.00472
 sp|Q9DEA3|PCNA_CHICK 0.00291
 sp|P17918|PCNA_MOUSE 0.0163
 sp|P57761|PCNA_CRIGR 0.00809
 sp|P04961|PCNA_RAT 0.00723
 sp|Q3ZBW4|PCNA_BOVIN 0.00394
 sp|P12004|PCNA_HUMAN 0.00372
 sp|P18248|PCNA_XENLA 0.063
 sp|Q43266|PCNA_MAIZE 0.03429
 sp|P17070|PCNA_ORYSJ 0.01894
 sp|Q43124|PCNA_BRANA 0.01811
 sp|Q9M7Q7|PCNA1_ARATH 0.01411
 sp|Q9ZW35|PCNA2_ARATH 0.01631
 sp|Q9MAY3|PCNA_POPNI 0.06719
 sp|P24314|PCNA_CATRO 0.04501
 sp|Q8H0Q1|PCNA_SOLLC 0.01306
 sp|O82797|PCNA_TOBAC 0.00966
 sp|Q00268|PCNA1_DAUCA 0.02829
 sp|O82134|PCNA_PEA 0.03151
 sp|P22177|PCNA_SOYBN 0.02357

ANEXO II

EXTRACTO DE LA TESIS
DOCTORAL “INTERACCIÓN
ENTRE LOS GEMINIVIRUS Y EL
SISTEMA DE SUMOILACIÓN DE
PLANTAS.” SÁNCHEZ-DURÁN
(2011)

Anexo II

Extracto de la tesis doctoral “Interacción entre los Geminivirus y el Sistema de Sumoilación de Plantas” de Miguel Ángel Sánchez Durán.

Nota: en este anexo, el gen Rep es denominado AL1 o AL1/Rep.

2.4.2 Cambios en la sumoilación de proteínas celulares mediados por la interacción AL1-SCE1.

La interacción de AL1/Rep con la enzima que conjuga SUMO (SCE1) podría afectar a la sumoilación de proteínas celulares modulando su actividad, localización, interacción con otras proteínas, etc. Esta modulación podría ser específica, alterando la sumoilación de determinadas proteínas, o general, afectando a los niveles de sumoilación de todas las proteínas celulares. En el primer escenario, la especificidad podría estar determinada por la interacción de AL1/Rep con las proteínas celulares que se sumoílan. La interacción de AL1/Rep con SCE1 y con la proteína celular podría incrementar la sumoilación de la proteína (AL1/Rep actuaría como una ligasa de SUMO) o reducirla, interfiriendo en la sumoilación de la proteína. En el segundo escenario (modulación global de la sumoilación) la interacción de AL1/Rep con SCE1 podría inducir una reducción de los niveles de sumoilación, al inhibir a la enzima que conjuga SUMO, o bien incrementarla, si activara la actividad del enzima E2.

Con los experimentos que se describen a continuación se ha querido determinar si la interacción de AL1/Rep con SCE1 produce modulación específica o general de la sumoilación de proteínas de la planta.

Modulación de la sumoilación de proteínas que interaccionan con AL1/Rep.

La interacción de la proteína de los geminivirus AL1/Rep con RBR (retinoblastoma) y PCNA juega un papel muy importante durante la infección. En mamíferos y/o levaduras se ha descrito que los homólogos funcionales de dos proteínas se sumoílan modulando su actividad (Ledl *et al.*, 2005; Hoege *et al.*, 2002; Ulrich, 2009). Se desconocía si PCNA y RBR de plantas se sumoílaba, pero por analogía funcional y por la conservación de los residuos de lisina sumoílables, sugerían que estas proteínas vegetales podrían también estar sometidas a un sistema de regulación por SUMO.

Modulación de la sumoilación de RBR.

Como ya se mencionó en la introducción, Ledl *et al.*, (2005) determinaron que pRB humano se sumoíla en su lisina 720 y que la sumoilación de la proteína afecta a su actividad, ya que un mutante en este residuo K720R incrementa levemente la represión de promotores dependientes de E2F. Además, en el mismo trabajo, se muestra que los niveles de sumoilación de pRB se modifican por la interacción con las proteínas E1A de adenovirus y E7 de papilovirus. Hasta el momento no se había demostrado que la proteína RBR de plantas se sumoílara, ni que pudiera interactuar con SCE1, como ocurre con muchas de las proteínas sumoílables. Análisis realizados con el software SUMOsp: Sumoylation Sites Prediction 2.0 ® muestran que las proteínas de plantas AtRBR y ZmRBR presentan sitios putativos de sumoilación, en ambos casos uno de ellos con alta probabilidad teórica de ser modificados por SUMO (K1007 en AtRBR y K194 en ZmRBR).

ZmRBR interacciona con SCE1.

Para determinar si RBR de maíz, que interacciona con AL1, se unía también a NbSCE1, utilizamos el sistema de doble híbrido de levaduras. Cultivos de *S. cerevisiae* se cotransformaron con un plásmido (pAS2-1-ZmRBR; Arguello-Astorga *et al.*, 2004) que expresa un fragmento de 614 aminoácidos de la proteína del retinoblastoma de maíz (ZmRBR₂₅₃₋₈₆₇) fusionada al dominio GAL 4 BD (BD-ZmRBR), y con el plásmido que

expresa AD-NbSCE1 (pACT2- NbSCE1). Al sembrar los cotransformantes en medio selectivo para seleccionar la activación de los genes marcadores se comprobó que ZmRBR interacciona con NbSCE1 (Figura 33), y que tal interacción es específica, ya que ZmRBR no interacciona con la proteína MP (motor protein) de *B. tabaci* fusionada al dominio AD de GAL4, una proteína seleccionada como control negativo para determinar si ZmRBR interacciona con cualquier proteína.

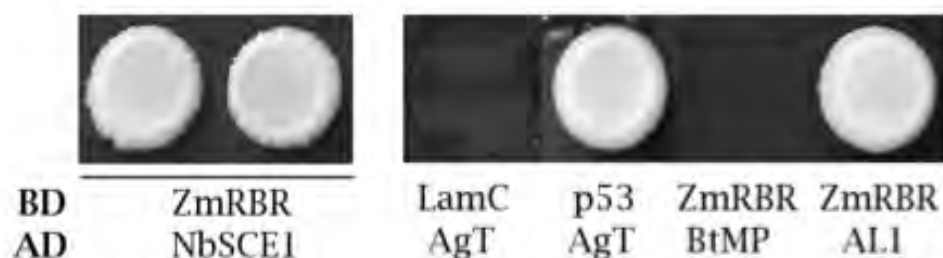


Figura 33. Interacción entre ZmRBR y NbSCE1. Crecimiento de las levaduras cotransformadas con BD-ZmRBR y AD-NbSCE1 (panel izquierdo). Se muestra la imagen de dos cotransformantes independientes. En el panel de la derecha se muestran los controles de interacción, LamC + AgT: control negativo, p53 + AgT: control positivo, ZmRbr + BtMP: control negativo de interacción con retinoblastoma, ZmRbr + AL1: control positivo de interacción con retinoblastoma.

ZmRBR se sumoila.

Para determinar si se producía sumoilación de ZmRBR se utilizó el mismo sistema de sumoilación en *E. coli* detallado en el apartado 2.4.1 de Resultados (Mencía *et al.*, 2004). Se clonó el fragmento de ZmRBR utilizado en el experimento de interacción con NbSCE1 en un plásmido para expresar ZmRBR fusionado a un epítipo de histidinas (pET28b-ZmRBR). Seguidamente se transformaron células de *E. coli* BL21 con: (a) pET28b-ZmRBR (expresa His- ZmRBR), (b) pET28b-ZmRBR y pBADE12 (que expresa His-SAE1, SAE2 y SCE1) y (c) pET28b-ZmRBR, pBADE12 y pRHSUMO (que expresa His-SUMO), y se analizó la acumulación de ZmRBR utilizando un anticuerpo anti-HIS.

En el extractos de células que expresan ZmRBR y las enzimas E1 y E2 de sumoilación (SAE/SCE1) se detectaron dos bandas de 65 y 80 kDa que no aparecen en el extracto de células que sólo expresa las enzimas E1 y E2.

La banda de 80 kDa corresponde al tamaño esperado para la expresión del fragmento de ZmRBR. La banda de 65 kDa podría corresponder a una versión truncada de la misma proteína. Cuando se expresa SUMO junto con ZmRBR, y las enzimas E1 y E2, se detectan las mismas bandas correspondientes a ZmRBR, pero además aparecen varias bandas de mayor tamaño que podrían corresponder a versiones mono o multisumoiladas de las proteínas ZmRBR de 65 y 80 kDa. (Figura 34).

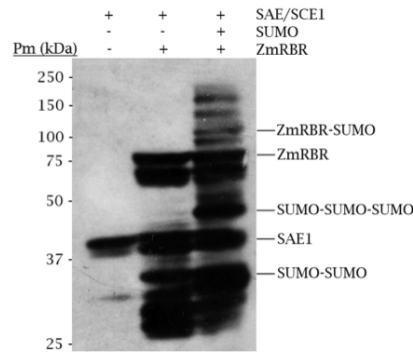


Figura 34. Ensayo de sumoilación de ZmRBR. *Western-blot* de los extractos de *E. coli* expresando SAE1, SAE2 y SCE1 (SAE/SCE1), SUMO o ZmRBR. La membrana se hibridó con un anticuerpo anti-His. Los distintos componentes esenciales de la maquinaria de sumoilación presentes (+) o ausentes (-) en cada calle se indican en la parte superior. Las bandas de interés se destacan a la derecha del panel.

La expresión de genes dependientes de E2F no depende de la interacción AL1/SCE1.

Durante la infección con TGMV, la proteína AL1 induce la acumulación de PCNA en hojas maduras (Egelkroust *et al.*, 2001) mediante la liberación de factores E2F que produce al interaccionar la proteína del virus con RBR.

Para determinar si la liberación de los factores E2F unidos a RBR que se produce en presencia de AL1 está relacionada con la interacción entre AL1/SCE1 y RBR, se analizó la expresión de un promotor dependiente de factores E2F en presencia de AL1 silvestre y de los mutantes afectados en la interacción con SCE1. Para ello utilizamos plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan el gen de la proteína luciferasa bajo por el control del promotor de PCNA (Egelkroust *et al.*, 2002).

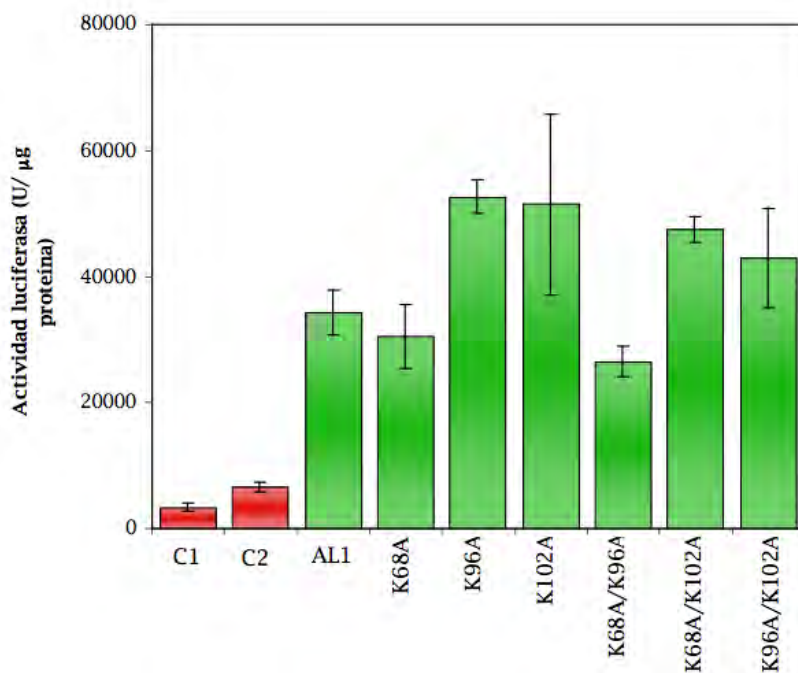


Figura 35. Histograma en el que se muestra la inducción de la expresión del promotor de PCNA en ausencia o presencia de AL1 silvestre o mutantes puntuales. Las barras en rojo corresponden a controles: (C1) hojas no infiltrada, (C2) hojas infiltradas con el plásmido pBINX'. Las barras en verde corresponden a las hojas infiltradas con AL1 silvestre (AL1) o con los distintos mutantes puntuales. Los valores de actividad luciferasa corresponden a la media de 3 experimentos independientes. Las barras de error representan los valores de error típico calculado.

Se agroinfiltraron hojas de plantas transgénicas con un plásmido binario que expresa AL1 silvestre (pBINX'-AL1) o sus mutantes simples o dobles (pBINX'-AL1 K68A, pBINX'-AL1 K96A, pBINX'-AL1 K102A, pBINX'-AL1 K68A/K96A, pBINX'-AL1 K68A/K102A y pBINX'-AL1 K96A/K102A). Tres días tras la infiltración se recogió el material vegetal, se obtuvieron los extractos de proteína total y se cuantificaron. A continuación, se midió la actividad luciferasa en un detector de luminiscencia y se expresó ésta como unidades de actividad luciferasa por cantidad de proteína total (U Activ Luc/µg proteína).

Los resultados (Figura 35) confirmaron que la expresión de AL1 induce la expresión de luciferasa. Los niveles de actividad luciferasa generados en las hojas infiltradas con los mutantes simples y dobles de AL1 no fueron significativamente diferentes a los obtenidos con AL1 silvestre. Las agroinfiltraciones se realizaron también coinfiltrando un plásmido

pBIN61 que expresaría P19 como supresor del silenciamiento, pero los resultados obtenidos fueron similares a los ya descritos sin P19.

Modulación de la sumoilación de PCNA.

PCNA de tomate se sumoila.

Se ha descrito la sumoilación de la lisina 164 (K164) de PCNA de *S. cerevisiae*, mamíferos y *Xenopus laevis* (Hoegel *et al.*, 2002; Ulrich, 2009) la cual está conservada en los PCNA de plantas. Además, en PCNA de levaduras se sumoila un segundo residuo de lisina (K127; Hoegel *et al.*, 2002). Como primer paso para determinar si la interacción AL1-SCE1 afectaba a la sumoilación de PCNA de plantas, se utilizó el sistema de sumoilación en *E. coli* utilizado en los experimentos del apartado 2.4.1 (Mencía *et al.*, 2004) para determinar si PCNA de tomate (SIPCNA) se sumoila. Se clonó el marco abierto de lectura completo de SIPCNA en un plásmido para expresar SIPCNA fusionado al epítipo de histidinas (pET28b-SIPCNA). Se transformaron células de *E. coli* BL21 con: (a) pET28b-SIPCNA, (b) pET28b-SIPCNA y pBADE12 y (c) pET28b-SIPCNA, pBADE12 y pRHSUMO y se analizó la acumulación de SIPCNA utilizando un anticuerpo anti-His (SAE1, SUMO y SIPCNA quedan fusionadas a un epítipo de histidinas). En todos los extractos se detectó una banda de aproximadamente 31 kDa que corresponde al tamaño esperado para SIPCNA. En el extracto de células que expresan el sistema de sumoilación al completo y SIPCNA, se detectó otra banda de aproximadamente 55 kDa que correlaciona con el tamaño esperado para SIPCNA monosumoilado (SIPCNA-SUMO en Figura 36). En este extracto aparecieron además otras bandas de mayor peso molecular que podrían corresponder a SIPCNA unido a varios SUMO o bien a oligómeros de SUMO (dímeros, trímeros, etc.) similares a los descritos por Mencía *et al.*, 2004.

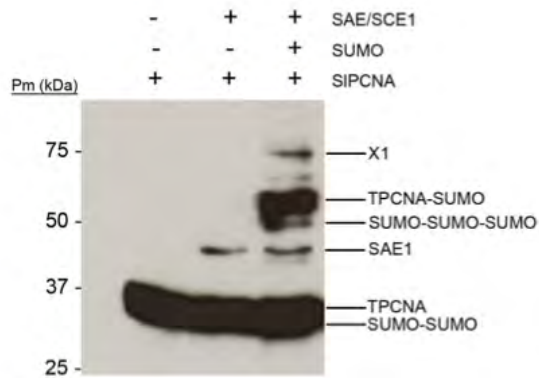


Figura 36. Ensayo de sumoilación de SIPCNA. *Western-blot* de los extractos de *E. coli* expresando His-SAE1, SAE2 y SCE1 (SAE/SCE1), His-SUMO o His-SIPCNA. La membrana se hibridó con un anticuerpo anti-His. Los distintos componentes esenciales de la maquinaria de sumoilación presentes (+) o ausentes (-) en cada calle se indican en la parte superior. Las bandas de interés se destacan a la derecha del panel. X1: por tamaño, podría corresponder a un multímero formado por cuatro SUMO o bien a SIPCNA unido a 2 SUMO.

La expresión de AL1 modifica la sumoilación de PCNA.

Para estudiar si la expresión de AL1 afecta a la sumoilación de SIPCNA se realizaron ensayos de sumoilación en presencia o ausencia de AL1 de TGMV. Para ello, en el plásmido pET28b-SIPCNA se subclonó el marco abierto de lectura de AL1 junto con la secuencia rbs (ribosomal binding site) tras el marco abierto de lectura de SIPCNA, generándose el plásmido, pET28b-SIPCNA-AL1, que produce un ARNm policistrónico con la fase abierta de lectura para ambas proteínas. Se transformaron células de *E. coli* BL21 con distintas combinaciones de los plásmidos que expresan His-SIPCNA e His-AL1 (pET28b-SIPCNA-AL1), las enzimas His-SAE1, SAE2 y SCE1 (pBADE12) y/o His-SUMO1 (pRHSUMO).

Tras inducir la expresión de las proteínas se analizó la acumulación de AL1 y SIPCNA utilizando anticuerpos anti-His, anti-PCNA, anti-AL1 (anticuerpo monoclonal) y anti-SUMO1 (Figura 37).

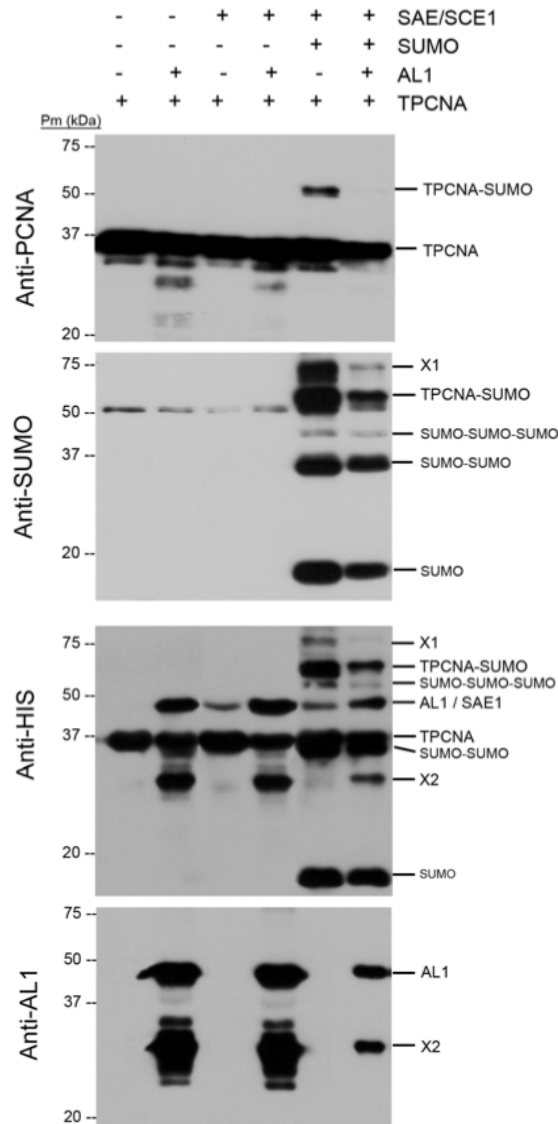


Figura 37. Sumoilación de SIPCNA en presencia o ausencia de AL1. *Western-blot* de los extractos de *E. coli* expresando His-SAE1, SAE2 y SCE1 (SAE/SCE1), His-SUMO, His-SIPCNA o His-AL1. Los distintos componentes esenciales de la maquinaria de sumoilación presentes (+) o ausentes (-) en cada calle se indican en la parte superior. La membrana se hibridó con un anticuerpo anti-PCNA, anti-SUMO, anti-His o anti-AL1. Las bandas de interés se destacan a la derecha del panel. La banda X1 podría corresponder tanto a un multímero formado por cuatro SUMOs o bien a un complejo SIPCNA-SUMO-SUMO. La banda X2 corresponde a AL1 truncado. El experimento se repitió dos veces más, en las mismas condiciones, obteniéndose los mismos resultados.

En todas las calles de la membrana hibridada con el anticuerpo anti-PCNA se observa una banda correspondiente a SIPCNA. Adicionalmente, en el extracto en el que se expresa SIPCNA y la maquinaria completa de

sumoilación aparece una banda adicional de aproximadamente 55 kDa que corresponde al tamaño esperado de SIPCNA sumoilado (Figura 37). Una banda de tamaño idéntico se detecta también en el mismo extracto cuando la membrana se hibrida con anti-SUMO (Figura 37), lo que confirma que debe corresponder al SIPCNA unido covalentemente a una molécula de SUMO. Cuando además de SIPCNA y la maquinaria de sumoilación se expresa AL1 (última calle de la derecha), la intensidad de la banda de 37kDa que corresponde a SIPCNA no sumoilado no varía si se compara con la calle en la que no hay expresión de AL1. Sin embargo, la de la banda correspondiente a SIPCNA sumoilado disminuye cuando se expresa AL1 (la banda no es detectable en la membrana hibridada con anti-PCNA y su intensidad se reduce muy apreciablemente en la hibridada con anti-SUMO) (Figura 37). En esta membrana se observa también una reducción en la banda marcada como X1 y que muy posiblemente corresponda a SIPCNA unido a dos moléculas de SUMO. Esta banda no aparece al hibridar las membranas con el anticuerpo anti-PCNA, probablemente por una menor sensibilidad del mismo (es un anticuerpo producido contra PCNA de *S. cerevisiae*). En la membrana hibridada con anti-SUMO se detecta además una banda correspondiente a SUMO libre y otras correspondientes a oligómeros formados por la sumoilación de SUMO. La membrana hibridada con anti-His confirmó los resultados obtenidos con anti-PCNA y anti-SUMO, así como la expresión de AL1 y SAE1, que contienen epítopos de histidina (Figura 37). La expresión de AL1 en los extractos se confirmó también en la membrana hibridada con anti-AL1, que confirma el resultado obtenido en la sección 2.4.1 al no detectarse sumoilación de AL1 (Figura 37).

Estos resultados indican que SIPCNA es sumoilado, y que la presencia de AL1 de TGMV reduce la cantidad de proteína modificada por SUMO. Para determinar si el efecto de AL1 sobre la sumoilación de SIPCNA era específico o era un artefacto debido a la expresión de una proteína adicional a partir del ARNm policistrónico del que se traduce SIPCNA, se construyó un plásmido para expresar, bajo el control del mismo promotor T7, un ARNm policistrónico expresando SIPCNA y la proteína C2/Trap de

TYLCSV (pET28b-SIPCNA-C2). Previamente habíamos comprobado que la proteína C2/Trap no interacciona con NbSCE1. Con este plásmido se repitió el experimento de sumoilación de SIPCNA en *E. coli*, comprobándose que la expresión de C2/Trap no afecta a la sumoilación de SIPCNA, ya que la intensidad de la banda correspondiente a SIPCNA sumoilado no se modifica significativamente en presencia o ausencia de Trap/C2 (Figura 38). El resultado indica por tanto que la disminución de los niveles de sumoilación de SIPCNA en presencia de AL1 ocurre de manera específica.

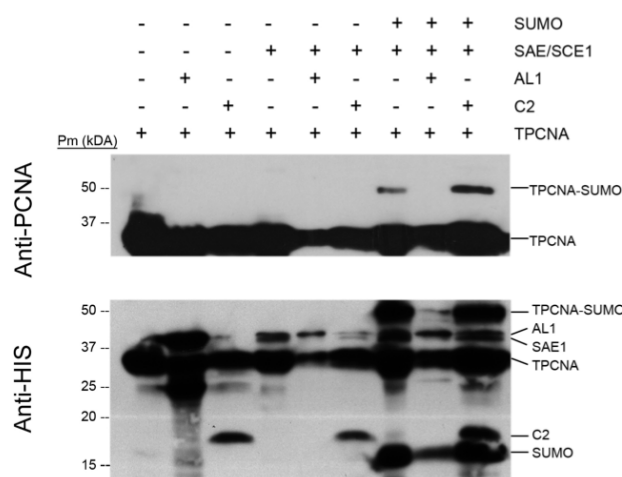


Figura 38. Sumoilación de SIPCNA en presencia o ausencia de C2/Trap de TYLCSV. *Western-blot* de los extractos de *E. coli* expresando His-SAE1, SAE2 y SCE1 (SAE/SCE1), His-SUMO, His-SIPCNA o His-C2/Trap de TYLCSV. Los distintos componentes esenciales de la maquinaria de sumoilación presentes (+) o ausentes (-) en cada calle se indican en la parte superior. La membrana se hibridó con un anticuerpo anti-PCNA (panel superior) o anti-SUMO (panel inferior). Las bandas de interés se destacan a la derecha de cada imagen.

La interacción AL1-SCE1 en la modulación de la sumoilación de SIPCNA.

Para determinar si la inhibición en la sumoilación de SIPCNA observada en los ensayos en *E. coli* depende de la interacción entre AL1 y SCE1, se llevó a cabo un ensayo de sumoilación de SIPCNA en *E. coli* para comparar los niveles de inhibición de su sumoilación, en presencia de AL1 silvestre o de los mutantes puntuales de AL1 que impiden la interacción con NbSCE1. Para llevar a cabo el experimento seleccionamos el doble mutante K68A/K102A de AL1, ya que en ninguno de los ensayos de interacción

realizados se detectó interacción de la proteína AL1 mutante con NbSCE1. Para realizar el experimento se construyó el plásmido pET28b-SIPCNA-AL1 K68A/K102A, que expresa un ARNm policistrónico para expresar His-SIPCNA e His-AL1 K68A/K102A. Utilizando este plásmido se repitió el ensayo de sumoilación de SIPCNA hibridándose la membrana con un anticuerpo anti-PCNA (Figura 39).

Al igual que en experimentos previos, la expresión de AL1 inhibió la sumoilación de SIPCNA cuando se comparan los niveles de SIPCNA-SUMO en presencia o ausencia de AL1 silvestre (Figura 39). Al expresarse el mutante AL1 K68A/K102A se observó una reducción similar a la obtenida en los extractos que expresan AL1 silvestre (Figura 39). Este resultado sugiere que la reducción en los niveles de sumoilación de SIPCNA no depende de la interacción AL1-NbSCE1.

En un ensayo adicional de sumoilación de SIPCNA utilizando los mutantes simples AL1 K96A y AL1 K102A, se obtuvieron los mismos resultados (datos no mostrados), no observándose diferencias significativas en la reducción en la acumulación de conjugados SIPCNA-SUMO entre AL1 silvestre y las versiones mutantes de la proteína.

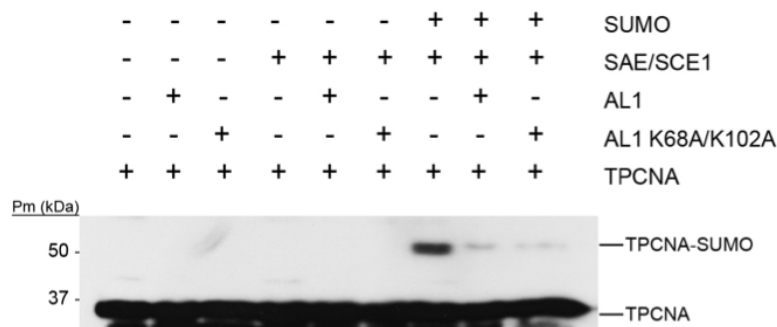


Figura 39. Sumoilación de SIPCNA en presencia del mutante AL1 K68A/K102A, que no interacciona con NbSCE1. *Western-blot* de los extractos de *E. coli* expresando His-SAE1, SAE2 y SCE1 (SAE/SCE1), His-SUMO, His-SIPCNA o His-AL1 silvestre (AL1) o el mutante His-AL1 K68A/K102A (AL1 K68A/K102A). Los distintos componentes esenciales de la maquinaria de sumoilación presentes (+) o ausentes (-) en cada calle se indican en la parte superior. La membrana se hibridó con un anticuerpo anti-PCNA. Las bandas de interés se destacan a la derecha del panel.

ANEXO III

RESUMEN

INTRODUCTION

Geminiviruses.

Geminiviruses are a group of plant viruses (family *Geminiviridae*) transmitted by insects that cause certain diseases with greater economic impact worldwide (Mansoor, Briddon et al. 2003); (Rojas, Hagen et al. 2005); (Navas-Castillo, Fiallo-Olive et al. 2011)). Geminiviruses share several common features: (i) their genomes are composed of one or two circular molecules ssDNA 2,5 to 3 Kb; (ii) their virions show cuasiicosaedric twin structure; (iii) their genomes containing 6 to 8 open reading frames which partially or completely overlap; (iv) encoding a single viral protein necessary for replication (Rep) and (v) Rep-assisted replication starts at an hairpin-shaped structure located in a sequence called IR (intergenic region) (Rojas, Hagen et al. 2005); (Jeske 2009).

The genus *Begomovirus*.

Begomovirus genus contains most of geminivirus species. Members of this genus are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* and infect a variety of dicotyledonous both from Old and New World. However begomovirus species usually has a narrow host range.

Begomoviruses genome consists of one (monopartite) or two DNA molecules (bipartite), called DNA A and DNA B, each of between 2,5 and 3 Kb, which share no sequence similarity except a highly conserved common region (CR) of about 200 nucleotides. This region is located in the intergenic region, equivalent to the IR monopartite begomoviruses, where the loop structure is located in, housing promoters for expression of the ORFs that encode proteins required for the replication (Rep and C3), transcription (C2) and encapsidation (CP). DNA-B contains two open reading frames, encoding proteins involved in viral movement and symptom development-related (BL1 and BR1 or NS). The DNA-A and DNA-B are individually encapsidated and both are essential to complete the infection (Rojas, Hagen et al. 2005).

The genome of monopartite begomoviruses is homologous to DNA-A bipartite. There are two ORFs encoded in the sense strand of the virion, V2 (also known as pre-coat protein), and capsid protein (also CP, coat protein or V1). Chain complementary to virion sense contains four ORFs: Rep (replication-associated protein, also C1, AL1, L1 or AC1), C2 (also AL2, AC2, L2 or TrAP-for transcription activating protein-), C3 (also AL3, AC3, L3 or REn-for replication enhancer-) and C4 (also AC4 or L4).

Rep is a multifunctional protein that initiates and terminates replication. Rep binds to a specific sequence in the IR and introduces a cut in a nearby sequence. It has been assigned a helicase activity (Clerot and Bernardi 2006); (Choudhury, Malik et al. 2006). It has been proposed to mediate Rep replication not only joining the viral DNA, but also by inducing a favorable cellular environment for this process, mainly by interacting with cellular factors in addition to interacting with C3. Rep interacts with a plethora of host proteins, including PCNA, (Bagewadi, Chen et al. 2004); (Castillo, Collinet et al. 2003), the plant retinoblastoma homolog (Xie, Suarez-Lopez et al. 1995); (Kong, Orozco et al. 2000); (Desvoyes, Ramirez-Parra et al. 2006), the C factor replication (Luque, Sanz-Burgos et al. 2002), histone 3, a mitotic kinase (Kong and Hanley-Bowdoin 2002), the kinase Grik (Selth, Dogra et al. 2005), and SUMO conjugating enzyme (SCE1) a regulator of cell homeostasis (Castillo, Kong et al. 2004).

CHAPTER 1

Routes of ubiquitination and similar to ubiquitination.

Protein modification by covalent attachment of small peptides as ubiquitin (Ub) or similar to it as SUMO (small ubiquitin-like modifier) are post-translational events that modulate the function of proteins that regulate many processes of the plant, including development, cell cycle and responses to biotic and abiotic stresses (Marino, Peeters et al. 2012); (Castro, Tavares et al. 2012). These peptides are covalently attached to a lysine residue on the target protein through an enzymatic cascade comprising an activating enzyme E1, E2 conjugating enzyme one and E3 ligase which binds to and confers substrate specificity. Polyubiquitination mark proteins for degradation in the proteasome, while the sumoylation monoubiquitination or may alter protein activity, location and / or their interactors. These routes of post-translational regulation play a very important role in the response to both biotic and abiotic so they are targeting one of the priority targets of many pathogens including viruses (Alcaide-Loridan and Jupin 2012).

Geminiviruses ubiquitination machinery used and sumoylation to perform infection. Thus, reduction in the expression of UBA1 (ubiquitin-like activating enzyme modifier-1) or component regulators ubiquitin ligases as RHF2A, SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2) or COP9 signalosome 3 (CSN3) or SUMO-conjugating enzyme E2 (SCE1, SUMO conjugating enzyme) adversely affects the infection (Lozano-Duran, Rosas-Diaz et al. 2011); (Castillo, Kong et al. 2004). It have been described interactions for geminivirus proteins and components of these pathways. The β C1 protein binds to the ubiquitin conjugating enzyme E2 3 (UBC3) of *Solanum lycopersicum*, reducing the overall accumulation of polyubiquitinated proteins and causing strong symptoms (Eini, Dogra et al. 2009);. (Bachmair, Becker et al. 1990). C2 protein interacts and interferes with the CSN complex, a complex that controls the operation of the E3 ligases containing

Culinas (SCF) (Lozano-Duran, Rosas-Diaz et al. 2011). SCF Because these ligases are key regulators in many cellular processes, the ability of the geminiviruses to sequester these complexes represents a powerful strategy to modulate the functions of the host. Accordingly, C2 overexpression altered hormonal responses regulated by several ligases (Lozano-Duran, Rosas-Diaz et al. 2011).

It has been proposed that the C4 protein some curtovirus and begomoviruses could induce cell proliferation in the plant by activating the expression of a RKP (RING finger protein) host protein marking inhibitors kinases for degradation in proteasome (Lai, Chen et al. 2009).

Rep SCE1 interacts with the conjugating enzyme E2 SUMO *N. benthamiana* (Castillo, Kong et al. 2004). SCE1 silencing or alteration of the Rep-SCE1 interaction reduces the accumulation of viral DNA, suggesting that this interaction is essential for viral replication (Sanchez-Duran, Dallas et al. 2011); (Castillo, Kong et al. 2004). Transient expression of Rep sumoylation modify the state of certain proteins may be involved in viral replication (Sanchez-Duran, Dallas et al. 2011).

Sumoylation and plant viruses.

So far only been identified the interaction of two proteins of plant viruses with sumoylation system: the NIb protein potyvirus *Turnip mosaic virus* (TuMV) and Rep protein of begomovirus. For NIb, an RNA-dependent RNA polymerase, is described that its interaction with AtSCE1 causes its sumoylation and that the establishment of infection in the plant requires both the interaction and modification of the viral protein (Xiong and Wang 2012). It also described that interaction of the begomovirus Rep protein with SCE1 of *Nicotiana benthamiana* is necessary for virus replication (Castillo, Kong et al. 2004); (Sanchez-Duran, Dallas et al. 2011).

Consequences of interaction with SCE1 Rep.

Transient expression assays in *N. benthamiana* Rep suggest that Rep produce specific changes in sumoylation of some plant proteins, and no

generalized sumoilome changes as described for CELO Gam protein (Sanchez-Duran, Dallas et al. 2011); (Boggio, Colombo et al. 2004); (Boggio, Passafaro et al. 2007). Rep is a multifunctional protein essential for replication of geminivirus. Rep is capable of interacting with a plethora of plant proteins. Between interacting proteins Rep has been demonstrated to interact in several eukaryotic species, including *A. thaliana* (Miller and Vierstra 2011); (Elrouby and Coupland 2010) with Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Castillo, Collinet et al. 2003); (Bagewadi, Chen et al. 2004). PCNA is a protein present in all eukaryotes and archaea and whose peptide sequence is highly conserved. Functionally, PCNA serves as a scaffold for the enzymes that modify and replicate the DNA, such as DNA polymerases, chromatin modifying enzymes or enzymes involved in DNA repair systems. Despite the biological significance of its interaction with Rep remains unknown, the fact that Rep is involved in recognition of the origin of replication of the virus, has helicase activity and cuts in a nucleotide sequence of the virus that serves as a signal to the initiation of replication, suggest that their interaction with PCNA should play a key role for generating new copies of the virus genome.

In yeast, during the S phase of the cell cycle, PCNA trimers threaded by DNA may be further SUMOylated but, unlike ubiquitination, occurring primarily in response to blockage of replication, sumoylation occurs under conditions governing the operation of the replication fork is not altered (Hoege, Pfander et al. 2002); (Stelter and Ulrich 2003); Parker (Parker, Bucceri et al. 2008). Sumoylation of yeast PCNA is catalyzed by ligase Siz1 and preferably occurs in less frequently Lys164 and Lys127 in (Hoege, Pfander et al. 2002), thereby preventing TLS polymerases are loaded by preventing the ubiquitination of this residue. In *S. cerevisiae*, SUMOylated PCNA binds Srs2 antirecombinogenic protein suppressing recombination during DNA replication by interfering with Rad51 binding to DNA single strands formed in the replication fork (Pfander, Moldovan et al. 2005); (Veaute, Jeusset et al. 2003); (Papouli, Chen et al. 2005). The apparent lack of sumoylation of PCNA from another yeast, *S. pombe*, and the absence in

some vertebrates of an homolog of Srs2 raised questions about the importance of this change (Hoegel, Pfander et al. 2002); (Arakawa, Moldovan et al. 2006); (Leach and Michael 2005). However, the demonstration that mammalian PCNA is SUMOylated (Ulrich 2009), (Ulrich and Takahashi 2013); (Gali, Juhasz et al. 2012); (Moldovan, Dejsuphong et al. 2012) and identification of Srs2 homologues in these organisms (Moldovan, Dejsuphong et al. 2012); (Blanck, Kobbe et al. 2009) suggest that sumoylation of PCNA in these cases may have a similar role to the described in *S. cerevisiae*. Data on post-translational modifications of PCNA plants are scarce. In two analysis of *A. thaliana* sumoillome PCNA was identified as a SUMOylated protein (Miller and Vierstra 2011); (Elrouby and Coupland 2010). This result has been confirmed by tests in *E. coli* for the SUMOylation of PCNA of tomato and *Arabidopsis* (Sanchez-Duran, Dallas et al. 2011); (Strzalka, Labecki et al. 2012).

Previous work of our group (Sanchez-Duran, Dallas et al. 2011) showed that expression in *E. coli* of the begomovirus TGMV Rep protein (*Tomato golden mosaic virus*) reduces sumoylation of PCNA plant and that interference does not depend on the interaction of viral protein with SCE1 (a summary of these results is shown in Annex II of this thesis).

Identifying SIPCNA SUMOylated lysines.

The results obtained in this work indicate that two residues in the tomato PCNA can be SUMOylated, the aforementioned lysine 164 and lysine 254, which was also described to be SUMOylated in *A. thaliana* PCNA (Strzalka, Labecki et al. 2012). In this paper AtPCNA1 is described to be SUMOylated in six lysines, of which only lysine 254 is located on the outside of the PCNA ring, leading the authors to suggest that this is the only SUMOylated lysine in *Arabidopsis* PCNA. Interestingly, SUMOylation in lysine 164 is not detected. To carry out this study, the authors also used the sumoylation test in bacteria, using E1 and E2 enzymes from *Arabidopsis*. However, the experimental strategy to identify sumoillables lysines differs from that used in our work. They generated first AtPCNA1

mutated versions, in which all the lysines except one were replaced by arginines. Then analyzed each of the mutant proteins by the bacteria SUMOylation test. The differences between these results and those obtained in this thesis using single amino acid mutants could be due to alterations in the structure of PCNA produced by massive replacement of lysine residues in each mutant (15 of the 16 lysines present in AtPCNA1). They detect the SUMOylation of five lysines located in inaccessible places for sumoylation machinery, within the PCNA ring and a near tie between the two folded sheets area support this possibility. Moreover, when working with a system in bacteria, in which all elements of the machinery of SUMOylation are overexpressed in the presence of a target that maintains a single lysine residue, may result in false positive, forcing stoichiometric conditions to reaction conditions very remote from physiological. Strzałka et al., 2012 shows that although the K164 lysine residue is identified by target prediction programs and is SUMOylated in yeast, they cannot observe its SUMOylation because the absence of ligase SIZ1, which is not present in the bacterial system. This ligase has been described as essential for the modification of yeast residue K164 in vitro and in vivo (Pfander, Moldovan et al. 2005); (Windecker and Ulrich 2008). Although we can not completely rule out that SIZ1 requirement is specific for PCNA *A. thaliana*, our results contradict this hypothesis. A structural change caused by removing all lysines K164 except that prevents access sumoylation machinery this residue or the existence of other lysines in AtPCNA that are essential for the lysine K164 sumoile, perhaps by establishing specific interactions with SUMO or SCE1, or maintaining the native structure of PCNA could be the most likely causes of the lack of sumoylation in trials conducted by Strzałka et al.

Although our results indicate that the lysines 164 and 245 are SUMOylated residues in tomato PCNA, the presence of a residual band hybridizations double mutant K164A / K254 indicates the existence of other waste lysine, which are not K91 and K190 that can be SUMOylated although less frequently than lysines 164 and 254.

Plant studies.

Although sumoylation of PCNA in the plant has been demonstrated to identify this protein as part of SUMOylome of *Arabidopsis* (Miller and Vierstra 2011); (Elrouby and Coupland 2010), in this thesis we have not been able to detect SUMOylated PCNA in any of the analyzed plants (*S. lycopersicum*, *A. thaliana* and *N. benthamiana*). The main cause of these negative results is probably that the sensitivity of the methods used to detect SUMOylated PCNA is too low. The combination of the detection limit of the monoclonal anti-PCNA antibody used a antibody produced against an epitope of *S. cerevisiae* PCNA that is not highly conserved in plant PCNAs, along with the low percentage of SUMOylated PCNA have represented a technical limitation that we have not been able to solve.

It has been described in *A thaliana* that some abiotic stresses, such as heat shock, cause an increase in the accumulation of proteins SUMOylated with SUMO1 / SUMO2 but not SUMO3. Considering that it seems that tomato PCNA is SUMOylated with SUMO1 or SUMO2 but not SUMO3, we could achieve a further increase in the amount of SUMOylated PCNA giving the plants a heat shock before extracting proteins.

Arabidopsis in vitro system.

The results obtained in testing in bacteria using sumoylation E1 and E2 enzymes from *Arabidopsis* showed that SIPCNA is SUMOylated with human SUMO1 and SUMO1 and 2 but not SUMO3 from *Arabidopsis*. Interestingly human SUMO1 is, in theory, the more similar to plant SUMO3, that is not able to SUMOylate SIPCNA. In any case this difference could be due to differences in the sequences responsible for the interactions between SUMO and SCE1, as postulated in (Castano-Miquel, Segui et al. 2011). Although the system works, it would be interesting to include the expression of SUMO ligases in it. We could express these ligases, specifically AtSIZ1, under the same T7 promoter from which are expressed

the Arabidopsis SUMOs in the plasmids pRHAtSUMO1, pRHAtSUMO2 and pRHAtSUMO3.

Rep reduced SUMOylation of PCNA.

The results of co-expression of Rep and PCNA confirmed those obtained by Sanchez Duran indicating that the presence of Rep reduce SIPCNA sumoylation. The higher resolution of our tests has allowed us to conclude that Rep affects sumoylation of all SUMOylated residues, K164 and K254, as well as the residue corresponding to the minority band detected in the hybridizations from the double mutant K164A / K254A extracts.

This reduction in sumoylation of PCNA could be explained as a result of a direct effect of Rep on SCE1 activity. However, the results suggest a specific mechanism of interference against PCNA sumoylation because: (i) Rep does not affect sumoylation of another targets (i. e. catalase); (ii) when compared patterns of sumoylation of plants expressing Rep TGMV and plants that do not, specific changes are observed in the SUMOylome and no overall changes as would be expected if the activity of SCE1 were affected and (iii) Rep mutant (K68A / K102A) which does not interact with SCE1 does not lose the ability to interfere with SUMOylation of PCNA (Annex II, Sanchez Duran, 2011, Doctoral Thesis).

Rep interacts with PCNA and, according to the mapping performed by Bagewadi et al., 2004, Rep does it with residues located along its entire molecule. That might explain the reduction of PCNA SUMOylation due to steric hindrance. This scenario corresponds to the model described by Mayanagi and collaborators to explain the plethora of interactors having PCNA. According to this model an interactor binding to PCNA blocks the access of others to that molecule (Mayanagi, Kiyonari et al. 2009); (Mayanagi, Kiyonari et al. 2011), thus achieving a finer regulation to decide at what point loads each protein on PCNA to access the DNA more than a "tool belt" model in which there are multitude of factors "hanging" of PCNA (Dovrat, Stodola et al. 2014).

The area of Rep that interact with PCNA has been characterized by immunoprecipitation assays with Rep protein from begomovirus *Indian mung vein yellow mosaic virus* (IMVYMV) between residues 135 and 183 (Bagewadi, Chen et al. 2004). In this study we have found that the sequence of TGMV Rep causing reduced sumoylation of PCNA is located in the same area identified as the binding domain to PCNA, which supports the hypothesis of an inhibitory effect due to the interaction of Rep with PCNA. To definitively confirm this hypothesis, it would be necessary to identify Rep mutants that were unable interact with PCNA, but maintain their interaction with SCE1.

CHAPTER 2

The development of tools for monitoring viral infections *in vivo* is essential for studies of plant-virus. The most direct strategy for generating these tools is the introduction of a reporter gene, classically GFP (Green Fluorescent Protein), in the virus genome (Baulcombe, Chapman et al. 1995). In the case of geminivirus this strategy has only been used with bipartite begomovirus in which the CP gene has been replaced by the reporter gene. The strong selection pressure on the size of its genome, overlapping open reading frames of several genes, and the essential role of the CP of monopartite begomovirus for infection (Kunik, Palanichelvam et al. 1998); (Kunik, Mizrachy et al. 1999), prevent this strategy can be used with monopartite geminivirus. Alternatively, a system has been developed that can monitor viral replication by introducing into the plant genome a construct called 2IR-GFP (Morilla, Castillo et al. 2006). This construct, containing a GFP expression cassette flanked by two intergenic regions of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), allows the detection of virus replication *in vivo* by monitoring green fluorescence.

System operation is based on the increased expression of GFP due to the formation of extrachromosomal molecules (EM) from 2IR-GFP construct. In the absence of virus, plants transformed with the 2IR-GFP construct maintain a basal reporter gene expression, that gives them a slight green fluorescence. When a virus enters a cell containing the construct, the protein Rep recognizes IRs, inducing replication of transgene sequence located between the two IRs. As a result circular extrachromosomal copies of the transgene containing a single IR are generated. The EMs can replicate as circular molecules since the virus provides *in trans* the Rep and the EMs contains *in cis* all the elements necessary for this.

However, these constructions have some limitations. For example, high specificity for the target sequence of Rep, the intergenic region, makes TYLCSV only, and not TYLCV-IL, able to mobilize 2IR-Sar-GFP extrachromosomal molecules. Thus, to study the development of TYLCV-IL

infection, the most widespread virus TYLCD complex, we generated the 2IR-IL-GFP plants.

In Morilla et al., 2006, is described how just TYLCSV is able to mobilize extrachromosomal molecules from 2IR-Sar-GFP construct. Similarly, during the development of systemic infection experiments in 2IR-IL-GFP plants, we carried out a test in which they were inoculated with TYLCSV (data not shown). Although all plants showed symptoms of the disease, showed no increase in GFP expression, confirming the specificity of the molecules ability to mobilize.

The fact that GFP does not fluoresce in tomato leaves but DsRED does, led us to generate 2IR-Sar-DsRED and 2IR-IL-DsRED constructs. The production of transgenic plants with these constructs in *N. benthamiana* has two objectives: (i) verify that these constructs generate similar phenotypes to those produced by the constructs with GFP without altering patterns of virus replication and infection; (ii) generate plants where mixed infections of the two virus (TYLCSV and TYLCV) can be motitorized by crossing the transgenic plants containing constructs 2IR-Sar and 2IR-IL with different fluorophores.

Infection assays.

The 2IR-IL plants have shown a similar pattern in the disease development, reporter gene expression and virus accumulation and extrachromosomal molecules, regardless reproter gene used in the construct. In all cases, the maximum in the accumulation of extrachromosomal molecules coincides with or precedes the time at which the maximum accumulation of the virus is achieved, which is not surprising, given that for extrachromosomal molecules to form require the presence and action of viral Rep protein, expressed in the early stages of virus infection.

In all cases a reduction in extrachromosomal molecules to the third or fourth week of infection, which may be due to a decrease in virus replication rate or a decrease in the accumulation of extrachromosomal molecules is observed. This expression pattern is similar to that described for plants 2IR-

Sar-GFP, although the times when the maximum of virus and extrachromosomal molecules occur vary depending on the conditions of infection.

The index of SAR phenotype of green fluorescence were equal to or greater than that of the red fluorescence. This would suggest that green precedes red, as described in transient expression assays in protoplasts of *N. tabacum* (Terskikh, Fradkov et al. 2000). In the very small apical leaves of infected plants no red fluorescence was ever detected but sometimes a little green fluorescence. This seems to support our theory that, in fact, what comes to the apical leaves are viruses, not protein. Once the virus begins to replicate, extrachromosomal molecules begin to accumulate and begins DsRED-E5 expression, which then fluoresces green. After a number of hours, this DsRED-E5 matures and begin to fluoresce red.

In 2IR-Sar-Timer plants, contrary to what is expected, since they contain the same intergenic regions that plants 2IR-Sar-GFP, is not appreciated a peak in the accumulation of extrachromosomal molecules between 2 and 3 spi, but a slight increase at 4 spi. In these plants the low intensity of gene expression may be due to the delay observed in the development of infection which can be inferred from the delay in the accumulation of virus and the onset and reduced severity of symptoms that may be due to environmental factors.

CHAPTER 3

One of the main challenges facing agriculture in this century will be the variations in environmental conditions that are occurring as a result of climate change and overexploitation of natural resources. The increase in temperature, soil salinization and limitations of access to water, are possibly the most important problems that agriculture will face along the XXI century.

These changes in abiotic conditions could affect the interaction of plants with pathogens entering a new stage in the interaction between biotic and abiotic stresses. Although many data on specific plant responses to biotic or abiotic stresses, very few existing on the impact of changes in temperature, salinity or drought on infections. The results published to date show that changes in environmental conditions can alter the susceptibility of the plant to a pathogen or pest and vice versa and response mechanisms to biotic and abiotic share common gene expression (Atkinson and Urwin 2012); (Cheong, Chang et al. 2002); (AbuQamar, Chen et al. 2006); (AbuQamar, Luo et al. 2009);. Suzuki et al, 2013). This "crosstalk" between the two types of stresses depends on a network of interactions, in which hormones, particularly the abscisic acid (ABA), play a central role. It is well known the role of ABA in the regulation of plant response to drought, low temperature and osmotic stress (Osakabe, Yamaguchi-Shinozaki et al. 2013), but their relevance in the response to biotic stress has been much less studied. The few published to date, studies indicate that ABA also functions as positive or negative regulator of the response to pathogens (Atkinson and Urwin 2012); (Robert-Seilaniantz, Grant et al. 2011). Hormone treatments or mutations in the genes responsive to ABA in *Arabidopsis thaliana* or *Solanum lycopersicum* produce changes in sensitivity to fungi and bacteria (Audenaert, De Meyer et al. 2002); (Adie, Perez-Perez et al. 2007); (Hernandez-Blanco, Feng et al. 2007); (AbuQamar, Luo et al. 2009);. (Ton and Mauch-Mani 2004). Although the fact that some bacteria are able to alter the response to ABA antagonizing defense mediated by salicylic acid

(SA) mechanism is unknown (de Torres-Zabala, Truman et al. 2007); (de Torres Zabala, Bennett et al. 2009), or the expression of a gene of ABA biosynthesis cause a reduction in the contents of SA (Fan, Hill et al. 2009), suggests the existence of a "crosstalk" in response to both hormones and an indirect effect of ABA through the altered response to SA.

It is also very little information on the effect of abiotic stresses on virus infections. Although there are several studies on the impact of temperature on virus infection that suggest gene silencing plays a role, it is not sure which is the mechanisms involved in this effect. The information published on the impact and development of viral infections in conditions of salinity or drought is even scarcer. The few published studies confirm the existence of a "cross-talk" between these types of stresses demonstrating that infection with RNA viruses produce some drought tolerance (Xu, Liu et al. 2008). In recent works performed with *A. thaliana* plants infected with the virus *Turnip mosaic virus* (TuMV), it was concluded that abiotic stresses such as heat and drought significantly alter the response to infection by the virus, disabling the answer and defense increasing susceptibility to infection (Maximilian and Sunnewald 2013; Prash and Sunnewald, 2013)

The 2IR plants described in the previous chapter of this thesis, allow monitoring "*in vivo*" progress of viral infections TYLCD complex without having to perform a molecular analysis. Therefore we decided to conduct an experiment to determine the effect of the three most important abiotic stress for agriculture: temperature, salinity and drought, infection of a species complex of TYLCD virus.

This chapter of the thesis the results we have obtained by subjecting abiotic stress *N. benthamiana* plants 2IR-Sar-GFP infected with TYLCSV are presented.

Infection assays

Although the number of plants used in each of the conditions is limited and that the data are from a single experiment, the results presented in this chapter confirm the existence negative interference on the

replication of abiotic stresses TYLCSV analyzed . The negative effect is very clear in the case of heat stress, in which a reduction in both the number of plants infected and the quantity of virus that accumulates in plants were observed.

Although it is known nearly a century ago that temperature influences viral infections of plants, the number of work performed is limited. Generally, high temperatures are associated with a reduction of symptoms "heat masking" and a reduction in the amount of virus (Johnson 1922). Rather low temperatures associated with the rapid spread of viral diseases and the development of severe symptoms (Hine, Osborne et al. 1970) (Gerik, Duffus et al. 1990). These observations have led to the use of "thermotherapy" as a method for selecting virus-free material in cases of plant materials transferred vegetatively (Manganaris, Economou et al. 2003).

Although there are some exceptions to this general correlation between temperature and infection, as published recently showing that the virus *Turnip crinkle virus* (TCV) in *A. thaliana* is best replica at high temperaruras (Zhang, Singh et al. 2012);. Prasch and Sonnewald , 2013), the negative effect of increased temperature on infection has been shown to both RNA viruses (Siddiqui, Sarmiento et al. 2008); (Shams-Bakhsh, Canto et al. 2007), (Szittyá, Silhavy et al. 2003) and for virus DNA (Chellappan, Vanitharani et al. 2005); (Tuttle, Idris et al. 2008). The result obtained in this work confirms the thermosensitive behavior of TYLCSV infections, in relation to the amount of virus that accumulates. However, the results in the development of symptoms are contradictory. The decrease in the amount of viral DNA detected at 35 does not correlate with increased symptoms appreciate during infection in plants grown at that temperature, indicating that the symptoms detected are not virus induced but for other physiological changes induced by thermal stress. The absence of these symptoms in previous experiments with *N. benthamiana* (Chellappan, Vanitharani et al. 2005) may be due to the difference in temperature used in this work, since in that case the plants were incubated at 30 ° C.

In 1956 Dr. Harrison (Harrison 1956), proposed that the accumulated amount of virus during infection representing a balance between virus replication and degradation. Half a century later, in the work done to identify the molecular mechanism responsible for the effect of temperature on the development of symptoms produced by *Cymbidium Ring Spot Virus* (CymRSV), it was shown that this effect was associated with that balance and more specifically with the Increased activity of virus by degradation of gene silencing. According to the results obtained in this work, elevated temperatures increased the accumulation of siRNA sequence derived from the virus, which correlates with the decrease in symptoms and a reduction in the amount of accumulated virus (Szittyá, Silhavy et al. 2003). The data subsequently published by other laboratories confirmed that gene silencing is inhibited at low temperatures in *A. thaliana*, *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *Solanum tuberosum* and *Glycine max* (Szittyá, Silhavy et al. 2003); (Kasai, Ohnishi et al. 2009) confirming the temperature sensitivity of this antiviral defense mechanism. However, the thermosensitivity of silencing in plants does not appear to be universal since recently published results show that silencing such inhibition does not occur at low temperatures in vine plants (Romon, Soustre-Gacougnolle et al. 2013).

Experiments with the geminivirus *Cassava latent virus* (CLV) indicate that the silencing may be responsible for the detected thermosensitivity of cassava plants infected with this virus, upon detecting an increase in the accumulation of virus siRNA derivatives that correlates with decreased in the accumulation of viral DNA by raising the remperature of 25°C to 30°C (Chellappan, Vanitharani et al. 2005). This result was confirmed with studies obtained when testing the temperature sensitivity in the operation of a vector-based gene silencing geminivirus *Cotton leaf crumple virus* (CLCrV) in cotton plants (*Gossypium hirsutum*) (Tuttle, Idris et al. 2008).

Although without evidence about the root causes of why silencing increases its activity at high temperatures, it has been suggested that correlates, at least in *N. benthamiana*, with an increase in the activity of

RDR6 gene (Qu, Ye et al. 2005), an RNA dependent RNA polymerase that plays a central role in the generation of secondary siRNA during viral infection. This could be one of the causes of the effect we have observed in our experiment, since the activity of this gene is necessary for the establishment and spread of silencing from VIGS vectors based in *Cabagge leaf curl virus* geminivirus (CaLCuV) (Blevins, Rajeswaran et al. 2006).

In addition to increased activity of RDR6 there could be other possible mechanisms that could also be responsible for temperature mediated changes in susceptibility to TYLCSV with, as the thermosensitivity of viral suppressors of gene silencing or any other viral or plant protein essential for replication or movement or changes in plant gene expression occurring as a result of temperature rise involving the induction or repression of proteins that directly or indirectly interfere with virus infection.

Interference with TYLCSV infection, although smaller, is also evident in plants subjected to salt stress, while drought conditions do not appear to alter the ability of the virus to infect plants. Both crop plants at 21 as at 35° C, a reduction is detected in the amount of virus in plants irrigated with 100 mM NaCl. This reduction is also observed in treated plants 200 mM NaCl, in which the percentage of infected plants is lower than in the control plants and in which also a trend towards a reduction is seen in the amount of the accumulated virus infected plants. In the case of water stress, but a reduction was seen in the number of infected plants at the two temperatures, not a drastic decrease in the amount of virus in those plants in which infection is established if they are compared with is detected each experiment the control plants. It would be necessary to analyze a larger number of plants to determine whether the differences are significant.

The negative effects of salt and heat stress appear to be partially additive, as both the number of infected plants as the amount of accumulated virus is lower in plants under both stresses (irrigated with solutions of NaCl and grown at 35°C) than in plants subjected to a single type of stress (at 35 and irrigated with water or 21 and irrigated with

saline). This suggests that the mechanisms by which these stresses interfere with the infection are at least partially independent.

References.

- AbuQamar, S., X. Chen, et al. (2006). "Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to Botrytis infection." *Plant J* **48**(1): 28-44.
- AbuQamar, S., H. Luo, et al. (2009). "Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor." *Plant J* **58**(2): 347-60.
- Adie, B. A., J. Perez-Perez, et al. (2007). "ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis." *Plant Cell* **19**(5): 1665-81.
- Alcaide-Loridan, C. and I. Jupin (2012). "Ubiquitin and plant viruses, let's play together!" *Plant Physiol* **160**(1): 72-82.
- Arakawa, H., G. L. Moldovan, et al. (2006). "A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation." *PLoS Biol* **4**(11): e366.
- Atkinson, N. J. and P. E. Urwin (2012). "The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field." *J Exp Bot* **63**(10): 3523-43.
- Audenaert, K., G. B. De Meyer, et al. (2002). "Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to Botrytis cinerea and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms." *Plant Physiol* **128**(2): 491-501.
- Bachmair, A., F. Becker, et al. (1990). "Perturbation of the ubiquitin system causes leaf curling, vascular tissue alterations and necrotic lesions in a higher plant." *The Embo Journal* **9**: 4543-.
- Bagewadi, B., S. Chen, et al. (2004). "PCNA interacts with Indian mung bean yellow mosaic virus rep and downregulates Rep activity." *J Virol* **78**(21): 11890-903.
- Baulcombe, D. C., S. Chapman, et al. (1995). "Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections." *Plant J* **7**(6): 1045-53.
- Blanck, S., D. Kobbe, et al. (2009). "A SRS2 homolog from Arabidopsis thaliana disrupts recombinogenic DNA intermediates and facilitates single strand annealing." *Nucleic Acids Res* **37**(21): 7163-76.
- Blevins, T., R. Rajeswaran, et al. (2006). "Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing." *Nucleic Acids Res*.
- Boggio, R., R. Colombo, et al. (2004). "A mechanism for inhibiting the SUMO pathway." *Mol Cell* **16**(4): 549-61.
- Boggio, R., A. Passafaro, et al. (2007). "Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation." *J Biol Chem* **282**(21): 15376-82.
- Castano-Miquel, L., J. Seguí, et al. (2011). "Diversification of SUMO-activating enzyme in Arabidopsis: implications in SUMO conjugation." *Mol Plant* **6**(5): 1646-60.
- Castillo, A. G., D. Collinet, et al. (2003). "Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Rep) and viral replication protein (Rep)." *Virology* **312**(2): 381-94.
- Castillo, A. G., L. J. Kong, et al. (2004). "Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system." *J Virol* **78**(6): 2758-69.
- Castro, P. H., R. M. Tavares, et al. (2012). "SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses." *Cell Mol Life Sci* **69**(19): 3269-83.
- Chellappan, P., R. Vanitharani, et al. (2005). "MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(29): 10381-6.
- Cheong, Y. H., H. S. Chang, et al. (2002). "Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis." *Plant Physiol* **129**(2): 661-77.
- Choudhury, N. R., P. S. Malik, et al. (2006). "The oligomeric Rep protein of Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) is a likely replicative helicase." *Nucleic Acids Res* **34**(21): 6362-77.
- Clerot, D. and F. Bernardi (2006). "DNA helicase activity is associated with the replication initiator protein rep of tomato yellow leaf curl geminivirus." *J Virol* **80**(22): 11322-30.

- de Torres Zabala, M., M. H. Bennett, et al. (2009). "Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses." *Plant J* **59**(3): 375-86.
- de Torres-Zabala, M., W. Truman, et al. (2007). "Pseudomonas syringae pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease." *EMBO J* **26**(5): 1434-43.
- Desvoyes, B., E. Ramirez-Parra, et al. (2006). "Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf development." *Plant Physiol* **140**(1): 67-80.
- Dovrat, D., J. L. Stodola, et al. (2014). "Sequential switching of binding partners on PCNA during in vitro Okazaki fragment maturation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(39): 14118-23.
- Eini, O., S. Dogra, et al. (2009). "Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA beta satellite." *Mol Plant Microbe Interact* **22**(6): 737-46.
- Elrouby, N. and G. Coupland (2010). "Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify Arabidopsis proteins implicated in diverse biological processes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(40): 17415-20.
- Fan, J., L. Hill, et al. (2009). "Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions." *Plant Physiol* **150**(4): 1750-61.
- Gali, H., S. Juhasz, et al. (2012). "Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork." *Nucleic Acids Res* **40**(13): 6049-59.
- Gerik, J. S., J. E. Duffus, et al. (1990). "Etiology of tomato plant decline in the California desert." *Phytopathology* **80**: 1352-1356.
- Harrison, B. D. (1956). "The infectivity of extracts made from leaves at intervals after inoculation with viruses." *J Gen Microbiol* **15**(1): 210-20.
- Hernandez-Blanco, C., D. X. Feng, et al. (2007). "Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance." *Plant Cell* **19**(3): 890-903.
- Hine, R. B., W. E. Osborne, et al. (1970). "Elevation and temperatura effects on severity of maize virus in sorghum in Arizona." *Plant Dis Rep* **54**: 1064-1068.
- Hoegge, C., B. Pfander, et al. (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." *Nature* **419**(6903): 135-41.
- Jeske, H. (2009). "Geminiviruses." *Curr Top Microbiol Immunol* **331**: 185-226.
- Johnson, J. (1922). "The relation of air temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants." *Phytopathology* **12**: 438-440.
- Kasai, A., S. Ohnishi, et al. (2009). "Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean." *Plant Cell Physiol* **50**(6): 1090-8.
- Kong, L. J. and L. Hanley-Bowdoin (2002). "A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection." *Plant Cell* **14**(8): 1817-32.
- Kong, L. J., B. M. Orozco, et al. (2000). "A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants." *EMBO J* **19**(13): 3485-95.
- Kunik, T., L. Mizrachy, et al. (1999). "Characterization of a tomato karyopherin alpha that interacts with the Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) capsid protein." *Journal of Experimental Botany* **50**(334): 731-732.
- Kunik, T., K. Palanichelvam, et al. (1998). "Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells." *Plant J* **13**(3): 393-9.
- Lai, J., H. Chen, et al. (2009). "RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle." *Plant J* **57**(5): 905-17.
- Leach, C. A. and W. M. Michael (2005). "Ubiquitin/SUMO modification of PCNA promotes replication fork progression in Xenopus laevis egg extracts." *J Cell Biol* **171**(6): 947-54.
- Lozano-Duran, R., T. Rosas-Diaz, et al. (2011). "Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in Arabidopsis thaliana." *Plant Cell* **23**(3): 1014-32.

- Luque, A., A. Sanz-Burgos, et al. (2002). "Interaction of Geminivirus Rep protein factor C and its potencial role during geminivirus DNA replication." *Virology* **302**: 83-94.
- Manganaris, G. A., A. S. Economou, et al. (2003). "Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine." *Plant Cell Rep* **22**(3): 195-200.
- Mansoor, S., R. W. Briddon, et al. (2003). "Geminivirus disease complexes: an emerging threat." *Trends Plant Sci* **8**(3): 128-34.
- Marino, D., N. Peeters, et al. (2012). "Ubiquitination during plant immune signaling." *Plant Physiol* **160**(1): 15-27.
- Mayanagi, K., S. Kiyonari, et al. (2011). "Architecture of the DNA polymerase B-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-DNA ternary complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 1845-9.
- Mayanagi, K., S. Kiyonari, et al. (2009). "Mechanism of replication machinery assembly as revealed by the DNA ligase-PCNA-DNA complex architecture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(12): 4647-52.
- Miller, M. J. and R. D. Vierstra (2011). "Mass spectrometric identification of SUMO substrates provides insights into heat stress-induced SUMOylation in plants." *Plant Signal Behav* **6**(1).
- Moldovan, G. L., D. Dejsuphong, et al. (2012). "Inhibition of homologous recombination by the PCNA-interacting protein PARI." *Mol Cell* **45**(1): 75-86.
- Morilla, G., A. G. Castillo, et al. (2006). "A versatile transreplication-based system to identify cellular proteins involved in geminivirus replication." *J Virol* **80**(7): 3624-33.
- Navas-Castillo, J., E. Fiallo-Olive, et al. (2011). "Emerging virus diseases transmitted by whiteflies." *Annu Rev Phytopathol* **49**: 219-48.
- Osakabe, Y., K. Yamaguchi-Shinozaki, et al. (2013). "Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress." *J Exp Bot* **64**(2): 445-58.
- Papouli, E., S. Chen, et al. (2005). "Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p." *Mol Cell* **19**(1): 123-33.
- Parker, J. L., A. Bucceri, et al. (2008). "SUMO modification of PCNA is controlled by DNA." *EMBO J* **27**(18): 2422-31.
- Pfander, B., G. L. Moldovan, et al. (2005). "SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase." *Nature* **436**(7049): 428-33.
- Qu, F., X. Ye, et al. (2005). "RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*." *J Virol* **79**(24): 15209-17.
- Robert-Seilaniantz, A., M. Grant, et al. (2011). "Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism." *Annu Rev Phytopathol* **49**: 317-43.
- Rojas, M. R., C. Hagen, et al. (2005). "Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses." *Annu Rev Phytopathol* **43**: 361-94.
- Romon, M., I. Soustre-Gacougnolle, et al. (2013). "RNA silencing is resistant to low-temperature in grapevine." *PLoS One* **8**(12): e82652.
- Sanchez-Duran, M. A., M. B. Dallas, et al. (2011). "Interaction between Geminivirus Replication Protein and the SUMO-Conjugating Enzyme Is Required for Viral Infection." *Journal of Virology* **85**(19): 9789-9800.
- Selth, L. A., S. C. Dogra, et al. (2005). "A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication." *Plant Cell* **17**(1): 311-25.
- Shams-Bakhsh, M., T. Canto, et al. (2007). "Enhanced resistance and neutralization of defense responses by suppressors of RNA silencing." *Virus Res* **130**(1-2): 103-9.
- Siddiqui, S. A., C. Sarmiento, et al. (2008). "Effects of viral silencing suppressors on tobacco ringspot virus infection in two *Nicotiana* species." *J Gen Virol* **89**(Pt 6): 1502-8.
- Stelter, P. and H. D. Ulrich (2003). "Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation." *Nature* **425**(6954): 188-91.
- Strzalka, W., P. Labecki, et al. (2012). "Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen has several potential sumoylation sites." *J Exp Bot* **63**(8): 2971-83.

- Szittyá, G., D. Silhavy, et al. (2003). "Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation." *EMBO J* **22**(3): 633-40.
- Terskikh, A., A. Fradkov, et al. (2000). "'Fluorescent timer': protein that changes color with time." *Science* **290**(5496): 1585-8.
- Ton, J. and B. Mauch-Mani (2004). "Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose." *Plant J* **38**(1): 119-30.
- Tuttle, J. R., A. M. Idris, et al. (2008). "Geminivirus-mediated gene silencing from Cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton." *Plant Physiol* **148**(1): 41-50.
- Ulrich (2009). "The SUMO system: an overview." *Methods Mol Biol* **497**: 3-16.
- Ulrich, H. D. and T. Takahashi (2013). "Readers of PCNA modifications." *Chromosoma* **122**(4): 259-74.
- Veaute, X., J. Jeusset, et al. (2003). "The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments." *Nature* **423**(6937): 309-12.
- Windecker, H. and H. D. Ulrich (2008). "Architecture and assembly of poly-SUMO chains on PCNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Biol* **376**(1): 221-31.
- Xie, Q., P. Suarez-Lopez, et al. (1995). "Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication." *Embo J* **14**(16): 4073-82.
- Xiong, R. and A. Wang (2012). "SCE1, the SUMO-conjugating enzyme in plants that interacts with NIB, the RNA-dependent RNA polymerase of Turnip mosaic virus, is required for viral infection." *J Virol* **87**(8): 4704-15.
- Xu, X. Z., Q. P. Liu, et al. (2008). "Analysis of synonymous codon usage and evolution of begomoviruses." *J Zhejiang Univ Sci B* **9**(9): 667-74.
- Zhang, X., J. Singh, et al. (2012). "Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected arabidopsis plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1." *J Virol* **86**(12): 6847-54.

ANEXO IV

ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

Interaction between Geminivirus Replication Protein and the SUMO-Conjugating Enzyme Is Required for Viral Infection^{∇†}

Miguel A. Sánchez-Durán,¹ Mary B. Dallas,² José T. Ascencio-Ibañez,² Maria Ines Reyes,² Manuel Arroyo-Mateos,¹ Javier Ruiz-Albert,¹ Linda Hanley-Bowdoin,² and Eduardo R. Bejarano^{1*}

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, Campus Teatinos, 29071 Málaga, Spain,¹ and Department of Molecular and Structural Biochemistry, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27695-7622²

Received 10 December 2010/Accepted 8 July 2011

Geminiviruses are small DNA viruses that replicate in nuclei of infected plant cells by using plant DNA polymerases. These viruses encode a protein designated AL1, Rep, or AC1 that is essential for viral replication. AL1 is an oligomeric protein that binds to double-stranded DNA, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded DNA, and induces the accumulation of host replication machinery. It also interacts with several host proteins, including the cell cycle regulator retinoblastoma-related protein (RBR), the DNA replication protein PCNA (proliferating cellular nuclear antigen), and the sumoylation enzyme that conjugates SUMO to target proteins (SUMO-conjugating enzyme [SCE1]). The SCE1-binding motif was mapped by deletion to a region encompassing AL1 amino acids 85 to 114. Alanine mutagenesis of lysine residues in the binding region either reduced or eliminated the interaction with SCE1, but no defects were observed for other AL1 functions, such as oligomerization, DNA binding, DNA cleavage, and interaction with AL3 or RBR. The lysine mutations reduced or abolished virus infectivity in plants and viral DNA accumulation in transient-replication assays, suggesting that the AL1-SCE1 interaction is required for viral DNA replication. Ectopic AL1 expression did not result in broad changes in the sumoylation pattern of plant cells, but specific changes were detected, indicating that AL1 modifies the sumoylation state of selected host proteins. These results established the importance of AL1-SCE1 interactions during geminivirus infection of plants and suggested that AL1 alters the sumoylation of selected host factors to create an environment suitable for viral infection.

Geminiviruses constitute a large family of plant viruses with circular, single-stranded DNA (ssDNA) genomes packaged within geminate particles (77, 82). They infect a broad range of plants and cause devastating crop diseases (57, 63). The family *Geminiviridae* is classified into four genera, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, and *Mastrevirus*, based on their genome organizations, host ranges, and insect vectors (25, 26). The largest genus corresponds to the begomoviruses, which can have bipartite genomes (A and B components), like *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), or monopartite genomes, like *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV).

Geminiviruses replicate through double-stranded DNA (dsDNA) intermediates (34). Begomoviruses encode two proteins involved in viral replication. AL1 (also called AC1, C1, and Rep) is essential for replication (23), while AL3 (also called AC3, C3, and REn) enhances viral DNA accumulation (86). AL1 is a multifunctional protein that mediates the virus-specific recognition of its cognate origin (28), is required for the initiation and termination of viral DNA synthesis (28, 49, 70), and acts as a DNA helicase (18, 19). A variety of protein

interactions have been demonstrated for TGMV AL1 and other geminivirus replication proteins, including the formation of homomultimers (72) and interactions with AL3/REn (83, 84) and coat protein (CP) (56).

Geminiviruses do not encode their own DNA polymerases and rely on host nuclear DNA replication machinery, like many mammalian DNA tumor viruses. However, they are able to replicate in nuclei of mature plant cells that are inactive for DNA replication. Accumulating evidence strongly supports the notion that geminivirus proteins have a significant impact on a variety of host pathways (reviewed in references 31 and 35), including differentiation, cell cycle control, DNA replication, plasmodesma function, and RNA silencing. The AL1 protein binds to several host factors (1, 4, 5, 13–15, 46) and reprograms mature plant cells to create a permissive environment for viral replication. These factors include interactions with essential components of the DNA replisome, like proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (62) and the host retinoblastoma-related protein (RBR), which regulates cell division and differentiation in plants (22).

Posttranslational modifications of proteins play critical roles in many cellular processes because they cause rapid changes in the function of preexisting proteins, multiprotein complexes, and subcellular structures. Their versatility in regulating protein function and cell behavior makes them particularly attractive targets for viruses. Sumoylation is a posttranslational process that involves the covalent attachment of a 10-kDa ubiquitin-like polypeptide (Ubl) called SUMO (also known as sentrin, Smt3 UPL, and PIC1) to a target protein (reviewed in

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Dept. Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, Campus Teatinos, 29071 Málaga, Spain. Phone: 34 952131677. Fax: 34 952132000. E-mail: Edu_rodri@uma.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 20 July 2011.

references 2, 29, 36, and 87). Posttranslational modification by SUMO employs ATP-dependent reaction cascades that are mechanistically similar to ubiquitination, involving sequential activation and conjugation. SUMO activation is driven by an E1 enzyme (SUMO-activating enzyme SAE1/SAE2 heterodimer). SUMO conjugation is mediated by a single E2 enzyme (SUMO-conjugating enzyme [SCE1], also known as Ubc9) that is essential for cell viability and sumoylation in yeast, animals, and plants (37, 81, 85). The final transfer of SUMO from SCE1 to the substrate can occur directly or can be enhanced by SUMO ligases, such as the PIAS family proteins. Lysine-conjugated SUMO can be specifically cleaved by SUMO proteases (SENPs), making this a dynamic process (reviewed in references 10 and 65).

The addition of SUMO occurs exclusively at lysine residues, most commonly in the acceptor motif Ψ Kx(E/D), where Ψ is a large hydrophobic amino acid, K is the target lysine, x is any amino acid, and E/D is glutamic or aspartic acid. Two different extensions of the simple SUMO acceptor consensus site were identified recently. The phosphorylation-dependent sumoylation motif (PDSM) consists of a conventional sumoylation motif followed by a phosphorylated Ser and a Pro residue (Ψ KxexppSP) (39). The second acceptor consensus includes the negatively charged amino acid-dependent sumoylation motif (NDSM) (90).

Sumoylation is associated with diverse outcomes, ranging from changes in localization to altered activity and, in some cases, the stabilization of the modified protein. All of these effects might be the result of changes in the molecular interactions of sumoylated proteins (29). Sumoylation can mask a binding site in its target, inhibiting interactions with other proteins; increase the number of binding sites on its target, facilitating the binding of other molecules, such as proteins or DNA; or produce a conformational change that modulates activity.

The core components for sumoylation have been identified in *Arabidopsis thaliana* (48, 69, 81). The *Arabidopsis* genome encodes eight full-length SUMO genes (*AtSUMO* genes), a single gene for a SUMO-conjugating enzyme homolog of SCE1/Ubc9 (*AtSCE1a*), and a large number of SUMO proteases (20). Only three SUMO E3 ligases (*SIZ1*, *HPY2*, and *MMS21*) have been identified in *Arabidopsis* (41, 42, 61). SUMO influences a variety of plant responses to the environment (24, 60). It is involved in tolerance to cold, heat, drought, and salt stress (16, 21, 48, 59, 61, 92); modulates abscisic acid and cytokinin responses (41, 54); and has an important role in phosphate homeostasis (61). The loss of the SUMO, E1, or E2 enzyme leads to embryonic lethality (81), indicating that sumoylation is essential for normal plant development. Sumoylation controls the time of flower initiation (43, 67) and meristem and root development via cell cycle regulation (41, 42). Recent studies have identified SUMO target host proteins involved in DNA-related or RNA-dependent processes, such as the regulation of chromatin structure, splicing, and translation (11, 24, 58).

Several observations, including the pathogen manipulation of SUMO conjugation (40, 45, 76), the modification of SUMO levels altering pathogen infection in plants (15, 32), and sumoylation influencing innate immunity (52), indicate that SUMO also plays an important role in the plant defense re-

sponse. In animal systems, an increasing number of proteins from both RNA and DNA viruses have been shown to modify the sumoylation status of host proteins either by preventing *de novo* sumoylation or by enhancing desumoylation. Many of these viral proteins are also targets of sumoylation (9, 78). In sharp contrast, only the interaction between AL1 and the sumoylation machinery has been described for plants (15). Here we map the SCE1 interaction motif in AL1 and present evidence that the interaction is required for viral infection and replication. We show that the AL1-SCE1 interaction does not alter the general sumoylation pattern in plant cells but may specifically influence the SUMO conjugation of selected host proteins.

MATERIALS AND METHODS

General methods. Manipulations of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* strains and nucleic acids were performed according to standard methods (79). Plant DNA gel blots were performed as described previously (15). *E. coli* strain DH5 α was used for subcloning. All PCR-amplified fragments cloned in this work were fully sequenced. *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 was used for the agroinfiltration assays.

Plasmids and cloning. Cloning details are provided in the supplemental material. Table S1 in the supplemental material summarizes the engineering of the plasmids used in this work. Table S2 in the supplemental material contains all the oligonucleotides used in this study.

Yeast two-hybrid GAL4 system. Yeast two-hybrid assays were performed as described previously (15). Yeast strain PJ696, which contains the three reporter genes *lacZ*, *HIS3*, and *ADE2*, was used in the two-hybrid screens (27). Yeast cells were cotransformed with bait and prey plasmids as described previously by Gietz (30). The transformation mixture was plated onto the yeast selective dropout (SD) selection medium lacking Trp and Leu (SD/-Trp-Leu) (19a). Transformants were recovered during a period of 3 to 5 days and checked for growth on three selection media: SD/-Trp-Leu-Ade, SD/-Trp-Leu-His, or SD/-Trp-Leu-His-Ade. Quantitative β -galactosidase assays were performed in liquid cultures as described previously (14). Immunoblotting of the AL1 proteins expressed in yeasts was monitored with the ECL enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Pharmacia Biotech AB). The primary antibody was a polyclonal anti-TGMV AL1 antibody (33). All constructs were tested in at least three independent experiments, with each experiment including four independent transformants per construct.

Infection and replication assays. *Nicotiana benthamiana* plants were infected by bombardment or agroinoculation. For bombardment, the wild type or the mutant replicon (10 μ g) for TGMV DNA-A was precipitated onto 1-mm gold microprojectiles in the presence or absence of the corresponding wild-type DNA-B replicon. The wild-type TGMV A and B plasmids were pMON1564 (modified as described in the supplemental material) and pTG1.4B (28), respectively. Agroinoculation was performed by using wild-type or mutant constructs for TGMV A and pGB2 and a TGMV B dimer cloned into pGA482 (7). Total DNA was extracted from young leaf tissue from individual plants. The DNA (2.5 μ g/lane) was digested with XhoI, resolved on 1% agarose gels, transferred onto a nylon membrane, and hybridized with an α -³²P-radiolabeled probe specific for DNA-A isolated as an EcoRI fragment (2,588 bp) from pMON1565 (70). The *AL1* coding region recovered from total DNA extracted from infected plants was amplified by using primers AL1For and AL1Rev and sequenced.

Transient-replication assays were performed as described previously (28). Total DNA was extracted 72 h after transfection, digested with DpnI/XhoI, and examined for double- and single-stranded viral DNA accumulation by agarose gel blot analysis using α -³²P-radiolabeled virus-specific probes against TGMV A. Each replication assay was performed in at least three independent experiments.

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays. The reconstitution of yellow fluorescent protein (YFP) fluorescence was determined by the transient coexpression of selected protein pairs. *N. benthamiana* leaves were infiltrated with *A. tumefaciens* LBA4404 cells carrying the corresponding binary plasmids according to a previously described protocol (64). The reconstitution of YFP fluorescence was analyzed as described previously (3). Confocal laser scanning microscopy was performed as described previously (91), using a TCS SP5 2 (Leica) microscope. Fluorescence was quantified from four independent experiments by using ImageJ software (1997 to 2009; W. S. Rasband, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD [http://rsb.info.nih.gov/ij/]).

Recombinant protein purification and AL1 DNA-binding and DNA cleavage assays. The glutathione *S*-transferase (GST) and GST-AL1 (wild-type and mutant versions) expression cassettes from pNSB547 and pNSB314 were integrated into the parent bacmid vector bMON14272 in *E. coli* (55). Recombinant bacmid DNA was purified from *E. coli* and transfected into Sf9 cells (Bac-to-Bac baculovirus expression system; Invitrogen). The baculovirus-mediated expression of GST and the GST-AL1 protein was confirmed by immunoblot analysis with anti-GST (Sigma-Aldrich) and anti-AL1 (33) polyclonal antibodies. High-titer lysates were prepared and used for subsequent infections and protein production as described previously (70).

DNA electrophoretic mobility shift assays were performed as described previously (73), using the wild-type and mutant versions of the GST-AL1 protein produced in Sf9 cells. Wild-type and mutant versions of the His₁₀-tagged AL1₁₋₁₈₀ protein were expressed in *E. coli*, purified by Ni affinity chromatography, and used for DNA cleavage assays as described previously by Nash et al. (68).

RESULTS

Mapping of the SCE1-interacting domain of AL1. Previous work from our laboratory showed that TGMV AL1 interacts with *Nicotiana benthamiana* SCE1 (NbSCE1) through its N-terminal half (15). To map this interaction further, we examined the abilities of a series of truncated AL1 proteins to bind to SCE1. The TGMV AL1 truncations were expressed as fusions with the GAL4 DNA-binding domain (DBD), and the interaction with an activation domain (AD)-NbSCE1 fusion was analyzed by using yeast two-hybrid growth assays (Fig. 1A). When the first 130 residues of AL1 (AL1₁₃₀₋₃₅₂) were removed, the interaction with NbSCE1 was abolished. However, when residues 1 to 56 (AL1₅₆₋₃₅₂) were deleted, no reduction in yeast growth was detected. Furthermore, AL1 fragments comprising amino acids 56 to 130 (AL1₅₆₋₁₃₀) or amino acids 56 to 114 (AL1₅₆₋₁₁₄) were able to induce yeast growth with an efficiency similar to that of full-length AL1. To further characterize the SCE1-binding motif, we analyzed the interaction of AL1 fragments comprising residues 56 to 85 (AL1₅₆₋₈₅), residues 86 to 130 (AL1₈₆₋₁₃₀), and residues 115 to 130 (AL1₁₁₅₋₁₃₀). An interaction was detected only with AL1₅₆₋₈₅, although its strength was significantly reduced relative to that of the full-length protein. The interaction differences between the various baits were not due to variations in expression or stability, because immunoblot analysis using an anti-GAL4 DBD antibody showed that all of the truncated AL1-DBD fusions accumulated to similar levels in yeast (data not shown).

Together, these results showed that the SCE1-binding domain in AL1 is located between amino acids 56 and 114. Amino acids 56 to 85 are likely to form the core SCE1-binding domain, while sequences located between residues 86 and 114 may stabilize or enhance the interaction. We constructed a three-dimensional (3D) model for the amino-terminal region (amino acids 7 to 122) of AL1, using the ProMod method from Swiss-Model and homology with TYLCSV AL1/Rep (79.3% identity within this region) (12). As shown in Fig. 1B, the core SCE1-interacting region of AL1 (residues 56 to 85) corresponds to a conserved structural motif with three beta-sheets (β_4 , β_5 , and β_6), while residues 86 to 114 correspond to three beta-sheets and one alpha-helix (β_7 , β_8 , α_3 , and β_9). The complete sequence contains two of the three conserved motifs (RCR-II and RCR-III) characteristic of enzymes mediating rolling-circle replication (RCR) and the intervening geminivirus Rep sequence (GRS) element found in all geminivirus AL1/Rep proteins (47, 68).

Previous results located the SCE1-binding domain of AL1 between amino acids 130 and 180, as a truncated AL1 protein corresponding to residues 1 to 180 supported yeast growth, while the fragment encompassing amino acids 1 to 130 (AL1₁₋₁₃₀) did not (15) (Fig. 1). Since both truncated proteins accumulate at similar levels, the lack of an interaction between SCE1 and AL1₁₋₁₃₀ must be due to alterations in protein structure, possibly because of incorrect protein folding in yeast.

Mutation of lysine residues of the AL1-SCE1-interacting domain alter binding to SCE1. Previous results suggested that sumoylation substrates interact with SCE1 primarily through the sumoylation motif Y-K-xD/E (8, 53), while other studies with mammalian SCE1/UBC9-binding proteins indicated that SCE1 binds preferentially to hydrophobic regions containing LK and/or KL dipeptides (75). TGMV AL1 contains three putative sumoylation sites (positions 23 to 28, 141 to 147, and 297 to 301) identified by prediction programs (SUMOsp 2.0 [http://sumosp.biocuckoo.org/] and SUMOplot [Abgent]). It also has two conserved LK pairs (positions 270 to 271 and 327 to 328). However, all of these motifs are located outside the AL1-SCE1-binding region identified in Fig. 1A. Specific lysine residues also play crucial roles in most SCE1 interactions. The AL1-SCE1-binding domain (residues 56 to 114) contains four lysine residues (K68, K98, K102, and K107) that are conserved in most AL1/Rep homologs from begomoviruses, curtoviruses, and topocoviruses (Fig. 1B). Although previous results showed that K107 is required for DNA binding and cleavage (46, 71), no functions have been assigned to K68, K96, or K102. We generated alanine substitution mutations at the four lysine residues and determined the abilities of the corresponding AL1 mutant proteins to interact with SCE1. We produced single-site mutants (K68A, K98A, K102A, and K107A) and all combinations of double-site mutants (K68/96A, K68/102A, K68/107A, K96/102A, K96/107, and K102/107A) in TGMV AL1. The mutant AL1 open reading frames (ORFs) fused to the GAL4 DBD were expressed in yeast and analyzed for binding to AD-SCE1 in the two-hybrid system (Fig. 2A).

No obvious differences in growth were detected in yeast cells cotransformed with any of the single mutants. However, the strength of the interaction with SCE1 relative to that of wild-type AL1 was reduced for all the mutants, ranging from an 82% reduction for the K107A mutant to 32% for the K68A mutant, suggesting that the lysine residues are required for full binding activity. Double mutants containing the K68A substitution and one of the other lysine residues (K68A/K96A, K68A/K102A, or K68A/K107A) lost the ability to bind SCE1 almost completely. A minor, but noticeable, reduction was also detected for the K96A/K102A double mutant. However, the binding activities of double mutants containing any combination of K107A (K96A/K107A and K102A/K107A) were reduced significantly compared to those of the corresponding single mutants. All mutant proteins accumulated to levels comparable to those of a DBD-wild-type AL1 fusion (Fig. 2B), showing that the variations in the interaction efficiency were not due to differences in expression levels. Together, these results suggested that K68 plays a major role in SCE1 binding and that K96, K102, and K107 have redundant roles in the interaction.

AL1-SCE1 interactions were confirmed *in planta* by using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) with a split

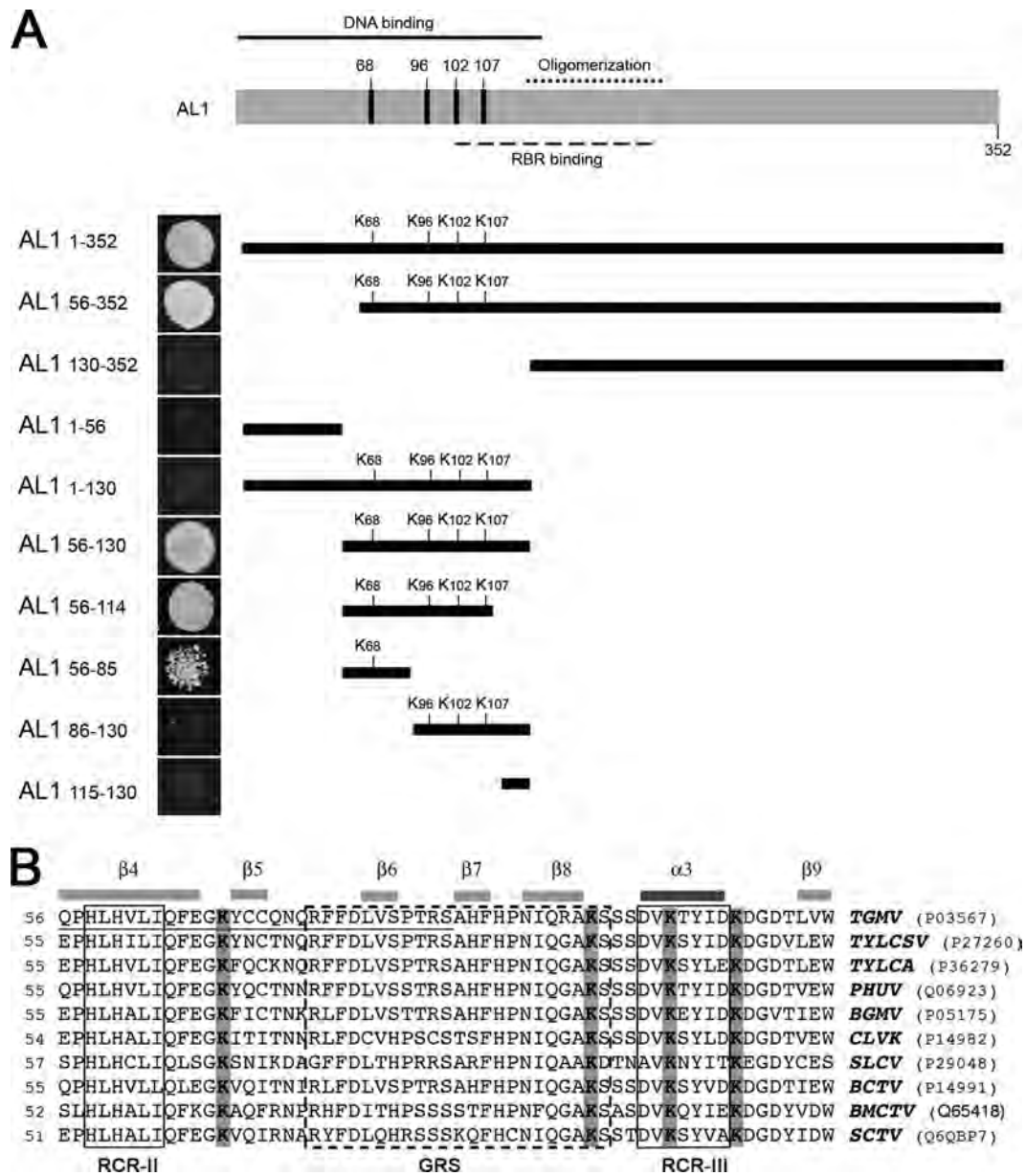


FIG. 1. (A) Interaction between TGMV AL1 deletions and NbSCE1. Diagram of AL1 showing the position of the DNA-binding (71), oligomerization (72), and RBR-binding (46) domains. Boxes below the diagram indicate the sizes of truncated AL1 proteins designated by their N- and C-terminal amino acids. Lysine residues located in the SCE1-binding domain of AL1 are marked. Shown are data for the growth of yeast cells cotransformed with NbSCE1 and one of the AL1 fusion proteins (partial or complete AL1 clones) in media lacking histidine and containing 2 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT). Yeast growth images are on the left of each bar, representing the different AL1 protein deletions. (B) Comparison of the amino acid sequences of AL1₅₆₋₁₁₄ fragments from TGMV with the equivalent regions of AL1/Rep homologs from other geminiviruses (TYLCA, *Tomato yellow leaf curl Australia virus*; PHYVV, *Pepper huasteco yellow vein virus*; BGMV, *Bean golden mosaic virus*; CLVK, *Cassava latent virus Kenya*; SLCV, *Squash leaf curl virus*; BCTV, *Beet curly top virus*; BMCTV, *Beet mild curly top virus*; STCV, *Spinach curly top virus*). GenBank accession numbers corresponding to the Rep/AL1 protein sequences are indicated in parentheses. Lysine residues are highlight in gray. Predicted beta-sheets and alpha-helix structures are indicated. GRS (dotted box), RCR-II, and RCR-III (box) domains are also marked.

yellow fluorescent protein (YFP) reporter (44). To validate this experimental approach for the analysis of AL1 interactions, we first confirmed the ability of the BiFC assay to detect AL1 oligomerization *in vivo*. When N-terminal fusions of wild-type AL1 to both the N terminus of YFP (NYFP) and the C terminus of YFP (CYFP) were transiently coexpressed in *N. benthamiana*, YFP fluorescence was observed mainly in nuclei

of the infiltrated leaf, which is indicative of AL1-AL1 interactions (Fig. 3A). We also observed YFP fluorescence mostly in nuclei of cells coinfiltrated with constructs corresponding to NYFP-AL1 and CYFP-NbSCE1 (Fig. 3A). In contrast, the expression of NYFP-AL1 or CYFP-NbSCE1 alone (data not shown) or the coexpression of NYFP-AL1 or CYFP-NbSCE1 with the coat protein of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRV)

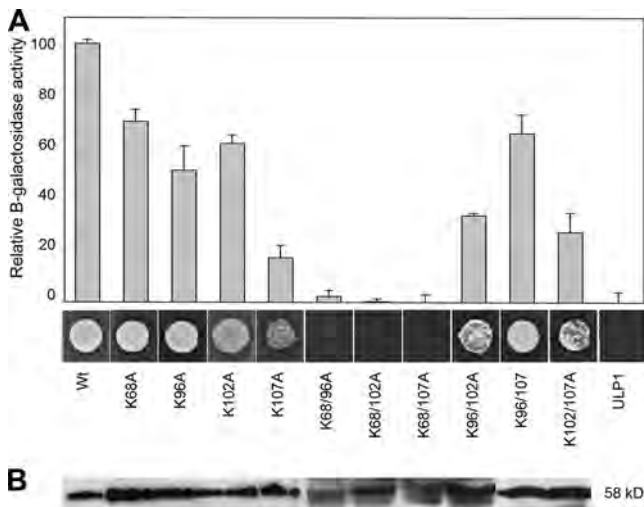


FIG. 2. (A) Single and double TGMV AL1 mutant interactions with NbSCE1. Interactions were assayed by measuring the β -galactosidase activity in total protein extracts and are expressed as a percentage of the interaction between the wild-type (Wt) AL1 protein and NbSCE1. The negative control corresponds to yeast coexpressing *S. cerevisiae* ULP1 (ubiquitin-like protein) and NbSCE1. The bars correspond to data from an average of three independent experiments, each assayed for four independent transformants. The error bars correspond to two standard errors. (B) Immunoblot analysis of protein extracts from yeast cells coexpressing NbSCE1 and AL1 using an anti-AL1 polyclonal antibody. The molecular mass for the observed band is 58 kDa.

fused to NYFP or CYFP, respectively, did not generate fluorescence (Fig. 3A). Taken together, these results demonstrated that AL1 and SCE1 can associate in plant cells.

Since the K107A mutation affects other AL1 functions in addition to SCE1 binding (46, 71), we did not analyze this mutant further. To evaluate the role played by the K68, K96, and K102 residues in the AL1-SCE1 interaction *in planta*, we performed BiFC assays by coexpressing CYFP-NbSCE1 and NYFP fused to single and double mutant AL1 proteins. In these assays, the AL1 K102A mutant showed no significant difference in fluorescence compared to that of wild-type AL1. However, the substitution of either K68A or K96A reduced fluorescence in the infiltrated tissue 74% and 58%, respectively, relative to that of wild-type AL1. Furthermore, when a second AL1 mutation was introduced (K68A/K96A, K68A/K102A, or K96A/K102A), no fluorescence was detected (Fig. 3B). These results indicated that the K68 and K96 residues may be involved in SCE1 binding *in planta*, as observed for the two-hybrid assays. However, the K102A mutation alone did not alter the strength of the interaction. Immunoblot analysis using an anti-AL1 polyclonal antibody to probe total protein extracts from infiltrated leaves indicated that the mutant AL1 proteins accumulated to similar or higher levels than those of the wild-type protein, indicating that variations in interactions were not due to poor expression (Fig. 3C).

The K68A mutation reduces viral DNA accumulation and symptom severity in plants. To determine whether the K68A, K96A, or K102A mutation affects viral infection or symptom development, we generated viral replicons containing these AL1 mutations and used them in plant infection and transient-

replication assays. Plant infections were carried out on *N. benthamiana* plants by the cobombardment of TGMV B and either wild-type or mutant TGMV A replicons, with the latter carrying single or double AL1 point mutations. Plants inoculated with wild-type virus developed symptoms by 6 to 7 days postinoculation, exhibiting leaf curling, general chlorosis, and stunted growth (Fig. 4A). The K102A mutant virus caused symptoms that were indistinguishable from those caused by the wild-type virus, indicating that this mutation does not visibly alter the infection process. In contrast, plants inoculated with the K68A mutant virus developed only mild stunting and leaf curling and never displayed chlorosis. The K96A single mutant and all the double mutants (K68A/K96A, K68A/K102A, and K96A/K102A) did not produce detectable symptoms at 6 weeks postinoculation (Fig. 4A).

We examined TGMV DNA levels in *N. benthamiana* plants inoculated with either wild-type or mutant viral constructs. Samples from infected leaves at 14 days postinoculation were analyzed by the hybridization of a TGMV A-specific probe to leaf tissue prints (see Fig. S4 in the supplemental material). Viral DNA accumulation correlated with the intensity of the symptoms. All plants infected with wild-type and K102A mutant viruses showed equivalent amounts of viral DNA accumulation. A reduction in viral DNA levels was observed for plants infected with the K68A mutant, suggesting that lower levels of viral DNA are associated with mild symptoms. No viral DNA was detected in any of the plants infected with the K96A mutant or any of the three double mutants. Viral ssDNA and dsDNA accumulation patterns were examined on DNA gel blots of total DNA from systemically infected leaves hybridized with a TGMV A-specific probe. Plants infected with the K102A mutant contained essentially wild-type levels of viral ssDNA and dsDNA (Fig. 4B). In contrast, levels of both DNA forms were reduced in K68A mutant-inoculated plants relative to wild-type-inoculated plants. The decrease was more apparent for ssDNA than for dsDNA.

To confirm that the viral DNA in plants infected with the K68A or K102A mutant did not result from the replication of revertants, we extracted DNA from symptomatic young leaves collected at 19 days postinfection from plants inoculated with the corresponding mutant viruses (three plants per infection). A 471-bp fragment encoding AL1 amino acids 42 to 199 was amplified with primers AL1For and AL1Rev and fully sequenced. All analyzed fragments contained the mutations, confirming that the alanine replacement of K68 and K102 is stable in infected plants.

To determine whether the reduced viral DNA levels in plants infected with the mutants was due to a defect in replication and/or dissemination through the plant, we monitored viral DNA accumulation in *Nicotiana tabacum* BY-2 protoplasts transfected with the TGMV A replicons. In these assays, only the K102A mutant supported viral replication (Fig. 4C). No nascent viral DNA corresponding to the K96A mutant and the double mutants was detected in the replication assays, indicating that their inability to infect plants is due to a replication defect. The replication of the K68 mutant was also not observed in transient assays, even though it causes attenuated symptoms and accumulates to low levels in plants. This discrepancy most likely reflects the ability of the K68 mutant to move into adjacent cells and replicate in infected plants but not

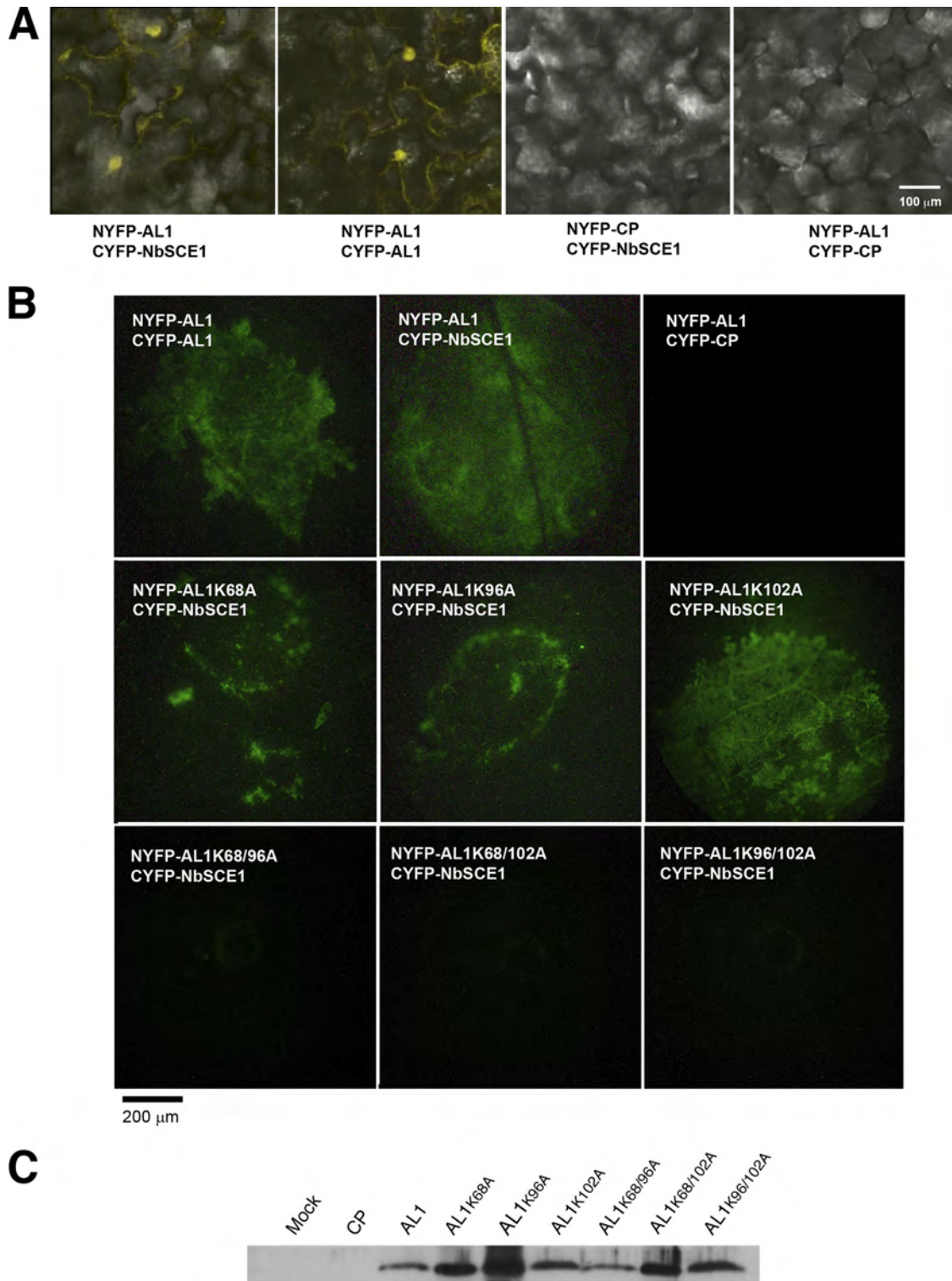


FIG. 3. BiFC analyses showing *in vivo* oligomerization of AL1 and interaction with NbSCE1. *N. benthamiana* leaves were coagroinfiltrated with constructs fused to the C terminus (CYFP) or N terminus (NYFP) of YFP. Reconstituted YFP fluorescence was monitored 3 days after infiltration with a confocal microscope (A) or an epifluorescence binocular microscope with a Leica 10446364 filter for YFP emission (B). (A) Interaction of AL1 (wild type, AL1), NbSCE1, and CP from PNRV. (B) BiFC of AL1 (wild type and mutants) with NbSCE1. (C) Immunoblot analysis of protein extracts from leaves coagroinfiltrated with CYFP-NbSCE1 and wild-type or mutant AL1 or PNRV CP. Mock samples correspond to extracts from leaves agroinfiltrated with constructs expressing CYFP or NYFP. Fusion AL1 proteins were detected by using a polyclonal antibody against AL1. The molecular mass for the observed band is 58 kDa.

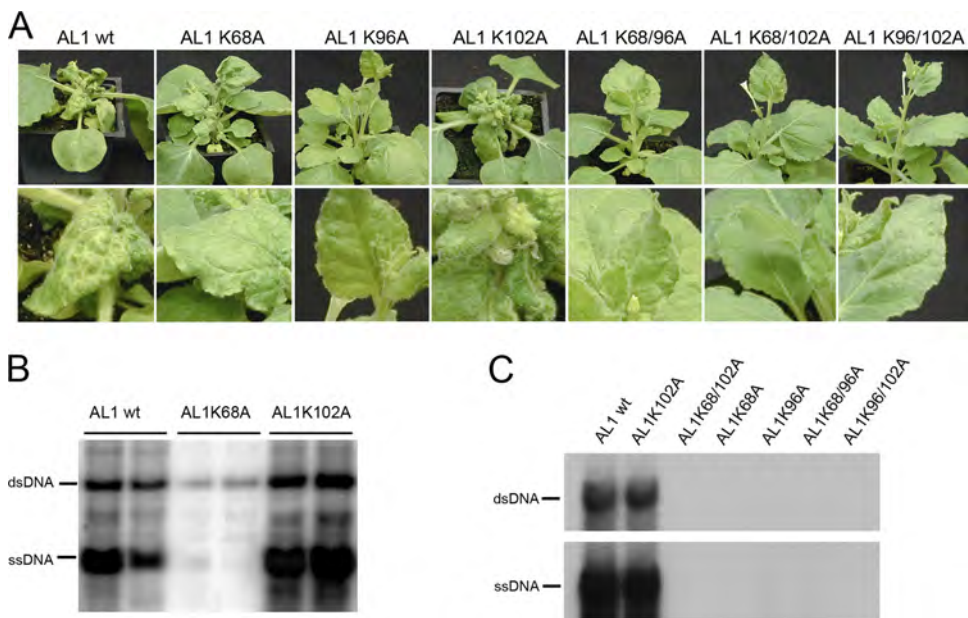


FIG. 4. (A) Symptoms of *N. benthamiana* cobombarded with TGMV B and wild-type (wt) or mutant AL1 TGMV A replicons. Leaf details for each plant are shown in the bottom panels. (B) Total DNA (2.5 mg/lane) was isolated from systemically infected leaves from two plants (wild type and the K68A and K102A mutants) at 19 days postinfection and analyzed on DNA gel blots. TGMV DNA was detected by using a radiolabeled probe specific for the A component. The two intense bands for each line represent double- and single-stranded forms of TGMV A. (C) Tobacco protoplasts were transfected with TGMV A and B replicons with either wild-type or mutant AL1 ORFs. Total DNA was isolated from cells at 72 h posttransfection and analyzed on DNA gel blots by using a radiolabeled probe specific for the A component.

in protoplasts, thereby facilitating the detection of very low levels of viral replication *in planta*.

Tissue sections from infected *N. benthamiana* plants showed that even though the intensity of the signal per cell was lower for the K68A AL1 mutant than for the wild-type virus, there was no difference in the numbers of infected nuclei (Fig. 5B1 and B2), indicating that variations in viral DNA accumulation

are consistent with a decrease in viral production rather than a reduction in the number of infected cells in the plant (Fig. 5).

Mutations in K68 and K102 do not alter other AL1 functions. To rule out a potential role of the mutated lysine residues in other protein interactions, we first asked if the AL1 mutants can form oligomers in two-hybrid assays. Oligomerization was assayed by the cotransformation of yeast cells with

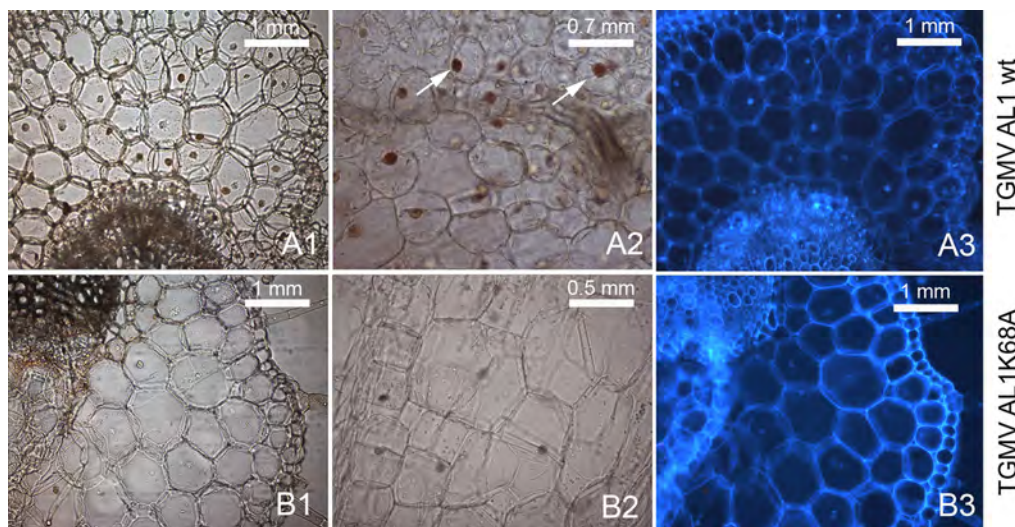


FIG. 5. Immunolocalization of TGMV in infected *N. benthamiana* plants. Panels A1, A2, and A3 correspond to wild-type TGMV A- and B-inoculated plants, while panels B1, B2, and B3 correspond to plants infected with TGMV B and the TGMV A K68A mutant. Panels A3 and B3 are the same sections as those in panels A1 and B1, respectively, but with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained nuclei. Sectioning was performed 19 days after plant infection, and a polyclonal AL1 primary antibody was used. Arrows indicate examples of infected nuclei.

constructs expressing the mutant version of the protein fused to the Gal4 DBD and AD. No significant differences were observed for any of the mutant fusions and the wild-type AL1 fusions in reporter gene assays (see Fig. S1A in the supplemental material).

We then examined the abilities of the AL1 mutants to interact with AL3 and RBR because their binding regions (amino acids 101 to 180) overlap with the SCE1-binding region in AL1 (1, 46, 83). We coexpressed TGMV AL1 and AL3 as GAL4 DBD and AD fusions, respectively. The K68A and K102A single mutants and the K68A/K102A double mutant showed AL3-binding activities similar to those of wild-type AL1 (see Fig. S1C in the supplemental material). In contrast, the AL1 K96A mutant displayed reduced AL3-binding activity. Although TGMV AL1 interacts with RBR proteins from both maize and *Arabidopsis* in the yeast two-hybrid assays, binding to maize RBR is stronger and easier to detect (1, 46). Thus, we assayed AL1 binding to a fusion to the GAL4 DBD of a truncated version (Zm214C) of maize RBR1, comprising the pocket-C-terminal region of the protein (amino acids 214 to 866) (1, 46). Neither the single nor the double mutations altered AL1-RBR binding significantly (Fig. S1B).

AL1 also specifically binds to DNA direct repeats in the 5'-intergenic region of the TGMV genome (28) through a domain located in the first 130 amino acids of the protein (73) (Fig. 1A). To determine whether the lysine substitutions that affect the AL1-SCE1 interaction also alter the AL1 DNA-binding activity, we used GST fusions of wild-type and mutated AL1. GST-AL1 fusion proteins were expressed in insect cells and partially purified by binding to glutathione resin. The DNA-binding activities of the fusion proteins were tested in electrophoretic mobility shift assays by titration with a radiolabeled dsDNA fragment (comprising TGMV A nucleotides 62 to 92) that includes the AL1-binding site. Shifted complexes were observed with wild-type AL1 and all the mutant proteins. No significant differences were detected in either the intensity or the number of the retarded complexes between wild-type AL1 and the mutant versions (see Fig. S2 in the supplemental material).

It was shown recently that an AL1 mutant encompassing the K96A mutation is not competent for DNA cleavage (68), which could account for the failure of this mutant to infect plants and support viral replication. In contrast, recombinant His₁₀-tagged proteins corresponding to wild-type AL1₁₋₁₈₀ and the K68A or K68A/K102A mutant displayed similar cleavage activities in assays using a fluorescently labeled ssDNA containing the origin cleavage site (see Fig. S3 in the supplemental material). Based on these results and those described above, we concluded that the K68A and K68A/K102A mutations do not significantly alter activities known to be mediated by regions that overlap or contain the SCE1-binding region in AL1.

The AL1-SCE1 interaction does not depend on K68 or K102 sumoylation. It was shown previously that SCE1-binding motifs often include lysine residues that are sumoylated (80). To determine if the role of K68 and K102 in the AL1-SCE1 interaction depends on their sumoylation, we generated single and double mutants of K68 and K102 by replacing the lysine residue with arginine, which maintains the positive charge but eliminates any chance of conjugation to SUMO or ubiquitin. Yeast two-hybrid assays showed that single K68R and double

K68/102R mutants were altered in NbSCE1 binding (see Fig. S5 in the supplemental material), indicating that the AL1-SCE1 interaction does not depend on the sumoylation of K68 or K102.

Recombinant viruses, including single K68R or K102R or double K68/102R mutations, produced symptoms in *N. benthamiana* plants that were indistinguishable from those caused by the wild-type virus (see Fig. S5A in the supplemental material). Furthermore, all plants infected with wild-type and mutant viruses showed equivalent amounts of viral DNA accumulation (Fig. S5B). The stability of the K68R and K102R mutations during infection was confirmed as described above for the corresponding alanine mutations. Consistent with this result, all attempts using *in vitro* and *in vivo* assays failed to detect AL1 sumoylation (data not shown).

AL1 modulates sumoylation of host targets. There is evidence that animal viruses can alter the sumoylation status of host proteins (9). To gain insight into whether AL1-SCE1 interactions affect host cell sumoylation, we expressed AL1 in plants and analyzed changes in the overall host sumoylation pattern. Leaves from young *N. benthamiana* plants were infiltrated with *A. tumefaciens* cultures containing a binary plasmid that expresses TGMV AL1 from a 35S Cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter (pBINX'-AL1). Total protein extracts from agroinfiltrated leaves were analyzed by immunoblotting using an anti-SUMO1 antibody (Fig. 6A). The numbers and the intensities of cross-reacting bands in AL1-expressing and control leaf samples were similar, indicating that AL1 does not alter the general sumoylation pattern of plant proteins. However, the intensities of two bands migrating at 50 and 82 kDa were enhanced in the AL1-expressing samples. Although the size of the 50-kDa band matches that expected for AL1-SUMO (51 kDa), it does not correspond to the viral protein, because immunoblots of the same extracts using an anti-AL1 polyclonal antibody did not cross-react with the 50-kDa band (Fig. 6B). It is unlikely that the sumoylation of AL1 would preclude its detection when a polyclonal antibody is used. Taken together, these results indicated that AL1 expression does not have a global effect on the host sumoylation system. Nevertheless, the two changes observed for AL1-expressing *N. benthamiana* leaves suggested that the viral protein might modulate the sumoylation state of the specific host target(s). However, since AL1 is sufficient to induce host transcription (35), we cannot rule out that the changes correspond to sumoylated proteins that are strongly induced in response to AL1 and are not detected in the control plants due to low expression levels.

DISCUSSION

Given the small size of geminivirus DNA genomes, their replication and movement are dependent largely on host factors. Small DNA viruses typically encode a few multifunctional proteins that mediate replication, regulate the expression of their own genes, and manipulate the cell machinery to create an appropriate cell environment for viral reproduction. Protein interactions between viral and host proteins play key roles in all these processes. Geminivirus AL1/Rep is a multifunctional protein that interacts with many cellular factors, including SCE1, the conjugating enzyme (E2) of the sumoylation system (15). In the last few years, this posttranslational modification

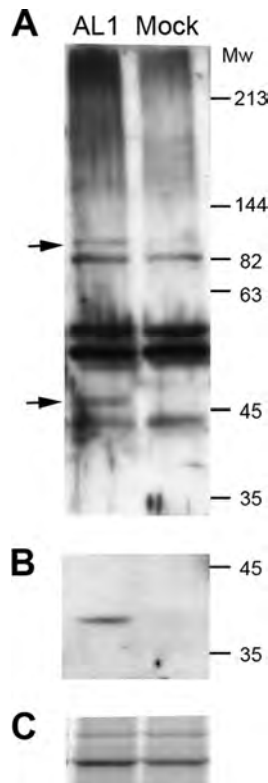


FIG. 6. Accumulation of SUMO protein conjugates in *N. benthamiana* leaves ectopically expressing AL1. Protein extracts from agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves expressing AL1 were analyzed by protein gel blots using an anti-NbSUMO1 polyclonal antibody (*N. benthamiana*) (A) or an anti-AL1 polyclonal antibody (B). Each lane contained 35 mg (*N. benthamiana*) of total protein extract. Similar results were obtained in three independent experiments. Arrows indicate bands that accumulated differentially when AL1 was expressed. (C) Loading controls. Mw, molecular weight (in thousands).

system has emerged as a central theme in the regulation of protein function. Consequently, it is no surprise that viral proteins were among the first described to exploit the host SUMO system. To better understand the biological role of the interaction between AL1/Rep and SCE1, we mapped the SCE1-binding domain of AL1, constructed viral mutants affected in the interaction, and analyzed the effect of these mutations on viral infection and replication.

Two-hybrid assays of truncated AL1 proteins located the SCE1-binding site in the N terminus of the viral protein to a region that spans residues 56 to 114. The lower level of SCE1-binding activity of AL1_{56–85} than that of AL1_{56–114} and the inability of AL1_{86–130} to bind to SCE1 suggest that the region consists of a core region encompassing residues 56 to 85 that is essential for the SCE1-AL1-binding interaction and a supporting region including residues 86 to 114 that enhances or stabilizes the interaction. This model is also supported by the observation that the combination of an AL1 K68A mutation with a K96A, K102A, or K107A mutation abolishes SCE1 binding in yeast. The SCE1-interacting region is located within the DNA-binding and cleavage/ligation domains of AL1 (71, 73) and overlaps with the AL3- and RBR-binding regions (46, 83) but is outside the oligomerization core. In a three-dimen-

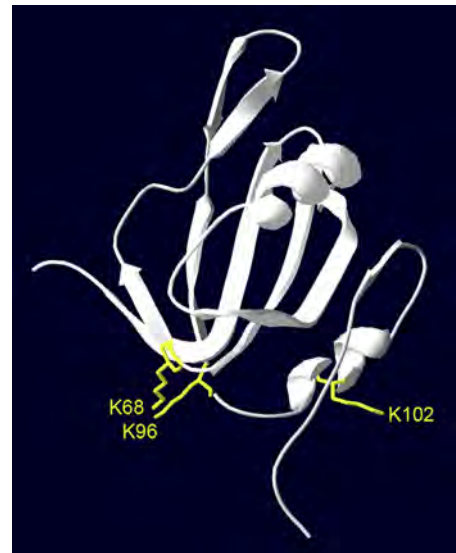


FIG. 7. Three-dimensional model of the AL1 N terminus (residues 4 to 122). Lysine residues analyzed in this work are highlighted in yellow. The model is based on the previously reported structure of the homolog TYLCSV AL1/Rep (12).

sional model of AL1 based on the previously reported structure of the homolog TYLCSV Rep (12), the lysines analyzed in this work are located on the surface of the protein (Fig. 7), where they are accessible for interactions with other proteins.

BiFC results established key roles for K68 and K96 in the AL1-SCE1 interaction *in planta*, since a clear reduction in such interactions was detected with both the K68A and K96A mutant versions of AL1. BiFC assays also indicated that K102 is not essential for the interaction in the context of the plant but plays a supporting role by enhancing the effect of the K68A mutation, since there were no significant differences between wild-type AL1 and the K102 single mutant, while leaves agroinfiltrated with the K68A/K102A and K96A/K102A double mutants did not display any fluorescent signal. Although the interaction was reduced to a similar extent in both double mutants, suggesting an equivalent contribution to the AL1-SCE1 interaction for both lysine residues (K68 and K96A), the quantitative yeast two-hybrid analysis indicated that these residues do not play an equal role in SCE1 binding. The difference in the reduction of the interaction shown by the K96A/K102A mutant in yeast and *in planta* could also be due to differences in the cell type. The position predicted by the AL1 three-dimensional model for the three lysine residues supports the results. Lysines 68 and 96 are located close together and point in the same direction, while K102 is positioned on opposite sides of the structure (Fig. 7). SCE1-AL1 binding is likely to be mediated by the protein region where K68 and K96 are located, while additional interactions that enhance binding may involve residues on the opposite side of the protein. The three lysines involved in SCE1 binding are highly conserved among all begomoviruses and curtoviruses. K68 and K96 are also conserved in mastreviruses, while K102 is either absent or has been replaced by an arginine.

Infection analyses and viral replication assays of tobacco protoplasts with the lysine mutants suggested a direct link

between the AL1-SCE1 interaction and efficient viral replication. The mutants with a diminished capacity to interact with SCE1 (the K68A and K96A single mutants and all the double mutants) were affected in their ability to infect the plant, while the K102A single mutant was indistinguishable from the wild-type virus. Likewise, the K68A and K96A single mutants and all the double mutants displayed no detectable replication in protoplast assays, while the K102A mutant replicated to wild-type levels. However, while the K96A mutation and all double mutations seemed to disable viral replication completely, the severe restriction of K68A replication was not complete, because this mutant was still able to infect the plants.

We showed that single or double mutants of lysines 68, 96, and 102 are active for DNA binding, oligomerization, and interactions with RBR, and it is therefore unlikely that the mutations alter the general structure of the AL1 protein. However, although the K68A and K96A single mutants exhibited a similar reduction in SCE1 interactions, they displayed clear differences in DNA replication and infectivity, with the latter displaying an almost complete failure to replicate. The radical replication defect of the K96A mutant may reflect the involvement of this residue in additional AL1 activities other than SCE1 binding, such as AL3 binding (see Fig. S1C in the supplemental material) or DNA cleavage (68). In contrast, the K68A mutant seemed to be affected exclusively by the SCE1-AL1 interaction. Although the K102A mutation does not affect viral replication or SCE binding, the additive effect on both activities observed for the K68A/K102A double mutant further suggests a functional correlation between SCE1 binding and replication. This notion is also supported by the results obtained with the arginine substitutions for K68 and K102, which do not impair AL1-SCE1 binding or affect the ability of the mutant viruses to infect and replicate in plants.

Interactions with the sumoylation system have been described for several proteins encoded by mammalian DNA viruses that replicate in the nucleus. Among these DNA viruses, all viral proteins known to interact with the sumoylation system are immediate-early or early proteins, like AL1/Rep (reviewed in references 9, 17, 88, and 89). The biological effects of these interactions are in most cases the sumoylation of the viral protein and/or the interference with the host sumoylation program. Although TGMV AL1 has three putative sumoylation sites, we have not detected a sumoylation of the viral protein using many different experimental approaches. This negative result does not exclude the possibility that AL1 is a target for SUMO modification, especially if only a small fraction of the protein is modified.

In addition to taking advantage of their host modification system to sumoylate their own proteins, viruses can alter the sumoylation of host proteins either by preventing or inducing *de novo* sumoylation or by enhancing desumoylation, as long as the outcome is a more favorable environment for viral propagation. For example, the adenovirus Gam1 and papillomavirus E6 proteins cause widespread changes in the sumoylation level of host proteins by inhibiting E1/E2 sumoylation enzymes (17, 38, 74). In other cases, the effect on host sumoylation is not general but restricted to specific host factors. This specific effect can result in a reduction of sumoylation, as exemplified by herpes simplex virus (HSV) ICPO and human cytomegalovirus (HCMV) IE1, which reduce the sumoylation of the pro-

myelocytic leukemia protein (PML) (6, 51), and the papillomavirus E7 and E1A proteins, which abrogate the SUMO modification of the pRB tumor suppressor (50). Conversely, viral proteins can increase the sumoylation of specific proteins, as illustrated by the adenovirus E1B-55K stimulation of p53 sumoylation (66). The overexpression of AL1 in plant leaves does not produce an overall alteration of host protein sumoylation, as would be expected if the interaction with AL1 modified SCE1 activity. Thus, it seems more likely that by interacting with SCE1, AL1 modulates the sumoylation level of a subset of host targets, creating a suitable environment for viral replication. Since this multifunctional viral protein is able to interact with host proteins that are sumoylated (for example, PCNA and RBR), we speculate that AL1/Rep stimulates or impairs SUMO attachment to one or more of its host protein partners. The determination of the number and identity of these plant targets will require a broad proteomic analysis, with prime candidates being host proteins that are sumoylated and also interact with AL1/Rep.

From the results generated in the last 10 years, it is clear that SUMO is important for animal viruses. The results presented in this paper demonstrate that this is also true for plant DNA viruses. Although many putative effects have been attributed to sumoylation, the precise biological role that this process plays in terms of viral fitness remains to be determined. Future experiments that identify host proteins whose sumoylation is modulated by AL1/Rep will clarify the role of the AL1-SCE1 interaction during infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Vicente Pallas for providing the bimolecular fluorescent complementation vectors. We thank M. A. Botella, C. Gutiérrez, R. Flores, and J. Jiménez for helpful suggestions and discussions.

This research was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2007-66062-C02-02/AGR) and the National Science Foundation (MCB-0110536) to L.H.-B. M.A.S.-D. was awarded a predoctoral fellowship from the Junta de Andalucía and an EMBO short-term fellowship (ASTF no. 240-05).

REFERENCES

1. Ach, R. A., et al. 1997. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**:5077–5086.
2. Ankar, J., and L. Sistonen. 2007. SUMO: getting it on. *Biochem. Soc. Trans.* **35**:1409–1413.
3. Aparicio, F., J. A. Sanchez-Navarro, and V. Pallas. 2006. In vitro and in vivo mapping of the Prunus necrotic ringspot virus coat protein C-terminal dimerization domain by bimolecular fluorescence complementation. *J. Gen. Virol.* **87**:1745–1750.
4. Arguello-Astorga, G., et al. 2004. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *J. Virol.* **78**:4817–4826.
5. Bagewadi, B., S. Chen, S. K. Lal, N. R. Choudhury, and S. K. Mukherjee. 2004. PCNA interacts with Indian mung bean yellow mosaic virus Rep and downregulates Rep activity. *J. Virol.* **78**:11890–11903.
6. Bailey, D., and P. O'Hare. 2002. Herpes simplex virus 1 ICPO co-localizes with a SUMO-specific protease. *J. Gen. Virol.* **83**:2951–2964.
7. Bejarano, E. R., and C. P. Lichtstein. 1994. Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. *Plant Mol. Biol.* **24**:241–248.
8. Bernier-Villamor, V., D. A. Sampson, M. J. Matunis, and C. D. Lima. 2002. Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**:345–356.
9. Boggio, R., and S. Chiocca. 2006. Viruses and sumoylation: recent highlights. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:430–436.
10. Bossis, G., and F. Melchior. 2006. SUMO: regulating the regulator. *Cell Div.* **1**:13.

11. **Budhiraja, R., et al.** 2009. Substrates related to chromatin and to RNA-dependent processes are modified by Arabidopsis SUMO isoforms that differ in a conserved residue with influence on desumoylation. *Plant Physiol.* **149**:1529–1540.
12. **Campos-Olivas, R., J. M. Louis, D. Clerot, B. Gronenborn, and A. M. Gronenborn.** 2002. The structure of a replication initiator unites diverse aspects of nucleic acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:10310–10315.
13. **Castillo, A., et al.** 2007. Identification of plants genes involved in TYLCV replication, p. 207–222. *In* H. Czosnek (ed.), *Tomato yellow leaf curl virus diseases*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
14. **Castillo, A. G., D. Collinet, S. Deret, A. Kashoggi, and E. R. Bejarano.** 2003. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Rep) and viral replication protein (Rep). *Virology* **312**:381–394.
15. **Castillo, A. G., L. J. Kong, L. Hanley-Bowdoin, and E. R. Bejarano.** 2004. Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. *J. Virol.* **78**:2758–2769.
16. **Catala, R., et al.** 2007. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *Plant Cell* **19**:2952–2966.
17. **Chiocca, S.** 2007. Viral control of the SUMO pathway: Gam1, a model system. *Biochem. Soc. Trans.* **35**:1419–1421.
18. **Choudhury, N. R., et al.** 2006. The oligomeric Rep protein of Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) is a likely replicative helicase. *Nucleic Acids Res.* **34**:6362–6377.
19. **Clerot, D., and F. Bernardi.** 2006. DNA helicase activity is associated with the replication initiator protein Rep of tomato yellow leaf curl geminivirus. *J. Virol.* **80**:11322–11330.
- 19a. **Clontech Laboratories, Inc.** July 2009. *Yeast protocols handbook*, PT3024-1 (PR973283). Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA.
20. **Colby, T., A. Matthai, A. Boeckelmann, and H. P. Stuibler.** 2006. SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **142**:318–332.
21. **Conti, L., et al.** 2008. Small ubiquitin-like modifier proteases overly tolerant to SALT1 and -2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**:2894–2908.
22. **Desvoyes, B., E. Ramirez-Parra, Q. Xie, N. H. Chua, and C. Gutierrez.** 2006. Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol.* **140**:67–80.
23. **Elmer, J. S., et al.** 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.
24. **Elrouby, N., and G. Coupland.** 2010. Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify Arabidopsis proteins implicated in diverse biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:17415–17420.
25. **Fauquet, C. M., et al.** 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Arch. Virol.* **148**:405–421.
26. **Fauquet, C. M., et al.** 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.* **153**:783–821.
27. **Fields, S., and O. Song.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245–246.
28. **Fontes, E. P., P. A. Eagle, P. S. Sipe, V. A. Luckow, and L. Hanley-Bowdoin.** 1994. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J. Biol. Chem.* **269**:8459–8465.
29. **Geiss-Friedlander, R., and F. Melchior.** 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:947–956.
30. **Gietz, R. D.** 2006. Yeast two-hybrid system screening. *Methods Mol. Biol.* **313**:345–371.
31. **Gutierrez, C., et al.** 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet. Microbiol.* **98**:111–119.
32. **Hanania, U., N. Furman-Matarasso, M. Ron, and A. Avni.** 1999. Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death. *Plant J.* **19**:533–541.
33. **Hanley-Bowdoin, L., J. S. Elmer, and S. G. Rogers.** 1990. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:1446–1450.
34. **Hanley-Bowdoin, L., S. B. Settlege, B. M. Orozco, S. Nagar, and D. Robertson.** 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**:105–140.
35. **Hanley-Bowdoin, L., S. B. Settlege, and D. Robertson.** 2004. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol. Plant Pathol.* **5**:149–156.
36. **Hay, R. T.** 2005. SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* **18**:1–12.
37. **Hayashi, N., H. Shirakura, T. Uehara, and Y. Nomura.** 2006. Relationship between SUMO-1 modification of caspase-7 and its nuclear localization in human neuronal cells. *Neurosci. Lett.* **397**:5–9.
38. **Heaton, P. R., A. F. Deyrieux, X. L. Bian, and V. G. Wilson.** 2011. HPV E6 proteins target Ubc9, the SUMO conjugating enzyme. *Virus Res.* **158**:199–208.
39. **Hietakangas, V., et al.** 2006. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:45–50.
40. **Hotson, A., R. Chosed, H. Shu, K. Orth, and M. B. Mudgett.** 2003. Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol. Microbiol.* **50**:377–389.
41. **Huang, L., et al.** 2009. The Arabidopsis SUMO E3 ligase AtMMS21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root. *Plant J.* **60**:666–678.
42. **Ishida, T., et al.** 2009. SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**:2284–2297.
43. **Jin, J. B., et al.** 2008. The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure. *Plant J.* **53**:530–540.
44. **Kerppola, T. K.** 2008. Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods Cell Biol.* **85**:431–470.
45. **Kim, J. G., et al.** 2008. XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in Xanthomonas-infected tomato leaves. *Plant Cell* **20**:1915–1929.
46. **Kong, L. J., et al.** 2000. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* **19**:3485–3495.
47. **Koonin, E. V., and T. V. Ilyina.** 1993. Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. *Biosystems* **30**:241–268.
48. **Kurepa, J., et al.** 2003. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J. Biol. Chem.* **278**:6862–6872.
49. **Laufs, J., et al.** 1995. Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* **77**:765–773.
50. **Ledl, A., D. Schmidt, and S. Muller.** 2005. Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene* **24**:3810–3818.
51. **Lee, H. R., et al.** 2004. Ability of the human cytomegalovirus IE1 protein to modulate sumoylation of PML correlates with its functional activities in transcriptional regulation and infectivity in cultured fibroblast cells. *J. Virol.* **78**:6527–6542.
52. **Lee, J., K. Miura, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, and D. J. Yun.** 2007. Regulation of plant innate immunity by SUMO E3 ligase. *Plant Signal. Behav.* **2**:253–254.
53. **Lin, D., et al.** 2002. Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *J. Biol. Chem.* **277**:21740–21748.
54. **Lois, L. M., C. D. Lima, and N. H. Chua.** 2003. Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**:1347–1359.
55. **Luckow, V. A., S. C. Lee, G. F. Barry, and P. O. Olins.** 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **67**:4566–4579.
56. **Malik, P. S., V. Kumar, B. Bagewadi, and S. K. Mukherjee.** 2005. Interaction between coat protein and replication initiation protein of Mung bean yellow mosaic India virus might lead to control of viral DNA replication. *Virology* **337**:273–283.
57. **Mansoor, S., R. W. Briddon, Y. Zafar, and J. Stanley.** 2003. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends Plant Sci.* **8**:128–134.
58. **Miller, M. J., G. A. Barrett-Wilt, Z. Hua, and R. D. Vierstra.** 2010. Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:16512–16517.
59. **Miura, K., et al.** 2007. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**:1403–1414.
60. **Miura, K., J. Lee, T. Miura, and P. M. Hasegawa.** 2010. SIZ1 controls cell growth and plant development in Arabidopsis through salicylic acid. *Plant Cell Physiol.* **51**:103–113.
61. **Miura, K., et al.** 2005. The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:7760–7765.
62. **Moldovan, G. L., B. Pfander, and S. Jentsch.** 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**:665–679.
63. **Morales, F. J., and P. K. Anderson.** 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* **146**:415–441.
64. **Morilla, G., A. G. Castillo, W. Preiss, H. Jeske, and E. R. Bejarano.** 2006. A versatile transreplication-based system to identify cellular proteins involved in geminivirus replication. *J. Virol.* **80**:3624–3633.
65. **Mukhopadhyay, D., and M. Dasso.** 2007. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem. Sci.* **32**:286–295.
66. **Muller, S., and T. Dobner.** 2008. The adenovirus E1B-55K oncoprotein induces SUMO modification of p53. *Cell Cycle* **7**:754–758.
67. **Murtas, G., et al.** 2003. A nuclear protease required for flowering-time regulation in Arabidopsis reduces the abundance of small ubiquitin-related modifier conjugates. *Plant Cell* **15**:2308–2319.
68. **Nash, T. E., et al.** 2011. Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. *J. Virol.* **85**:1182–1192.

69. Novatchkova, M., R. Budhiraja, G. Coupland, F. Eisenhaber, and A. Bachmair. 2004. SUMO conjugation in plants. *Planta* **220**:1–8.
70. Orozco, B. M., and L. Hanley-Bowdoin. 1996. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *J. Virol.* **70**:148–158.
71. Orozco, B. M., and L. Hanley-Bowdoin. 1998. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* **273**:24448–24456.
72. Orozco, B. M., L. J. Kong, L. A. Batts, S. Elledge, and L. Hanley-Bowdoin. 2000. The multifunctional character of a geminivirus replication protein is reflected by its complex oligomerization properties. *J. Biol. Chem.* **275**:6114–6122.
73. Orozco, B. M., A. B. Miller, S. B. Settlege, and L. Hanley-Bowdoin. 1997. Functional domains of a geminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* **272**:9840–9846.
74. Pozzebon, M. 2009. Inhibition of the SUMO pathway by Gam1. *Methods Mol. Biol.* **497**:285–301.
75. Rangasamy, D., and V. G. Wilson. 2000. Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J. Biol. Chem.* **275**:30487–30495.
76. Roden, J., L. Eardley, A. Hotson, Y. Cao, and M. B. Mudgett. 2004. Characterization of the *Xanthomonas AvrXv4* effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**:633–643.
77. Rojas, M. R., C. Hagen, W. J. Lucas, and R. L. Gilbertson. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**:361–394.
78. Rosas-Acosta, G., W. K. Russell, A. Deyrieux, D. H. Russell, and V. G. Wilson. 2005. A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol. Cell. Proteomics* **4**:56–72.
79. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
80. Sampson, D. A., M. Wang, and M. J. Matunis. 2001. The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* **276**:21664–21669.
81. Saracco, S. A., M. J. Miller, J. Kurepa, and R. D. Vierstra. 2007. Genetic analysis of SUMOylation in Arabidopsis: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol.* **145**:119–134.
82. Seal, S. E., M. J. Jeger, and F. Van den Bosch. 2006. Begomovirus evolution and disease management. *Adv. Virus Res.* **67**:297–316.
83. Settlege, S. B., A. B. Miller, W. Gruissem, and L. Hanley-Bowdoin. 2001. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology* **279**:570–576.
84. Settlege, S. B., A. B. Miller, and L. Hanley-Bowdoin. 1996. Interactions between geminivirus replication proteins. *J. Virol.* **70**:6790–6795.
85. Seufert, W., B. Futcher, and S. Jentsch. 1995. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* **373**:78–81.
86. Sunter, G., M. D. Hartitz, S. G. Hormuzdi, C. L. Brough, and D. M. Bisaro. 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.
87. Ulrich, H. D. 2009. The SUMO system: an overview. *Methods Mol. Biol.* **497**:3–16.
88. Wilson, V. G., and D. Rangasamy. 2001. Viral interaction with the host cell sumoylation system. *Virus Res.* **81**:17–27.
89. Wilson, V. G., and G. Rosas-Acosta. 2005. Wrestling with SUMO in a new arena. *Sci. STKE* **2005**:pe32.
90. Yang, S. H., A. Galanis, J. Witty, and A. D. Sharrocks. 2006. An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J.* **25**:5083–5093.
91. Yang, X., et al. 2007. Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction. *J. Virol.* **81**:11972–11981.
92. Yoo, C. Y., et al. 2006. SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in Arabidopsis independent of salicylic acid. *Plant Physiol.* **142**:1548–1558.

C2 from *Beet curly top virus* promotes a cell environment suitable for efficient replication of geminiviruses, providing a novel mechanism of viral synergism

Zaira Caracuel^{1*}, Rosa Lozano-Durán^{1*}, Stéphanie Huguet², Manuel Arroyo-Mateos¹, Edgar A. Rodríguez-Negrete¹ and Eduardo R. Bejarano¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, Campus Teatinos, 29071 Málaga, Spain; ²Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV), UMR INRA 1165 – Université d'Evry Val d'Essonne – ERL CNRS 8196, 2 rue G. Crémieux, CP 5708, F-91057 Evry Cedex, France

Author for correspondence:

Eduardo R. Bejarano

Tel: +34 952 131 677

Email: edu_rodri@uma.es

Received: 27 October 2011

Accepted: 13 January 2012

New Phytologist (2012) **194**: 846–858

doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04080.x

Key words: C2, cell cycle, geminivirus, replication competency, synergism.

Summary

- Geminiviruses are plant viruses with circular, single-stranded (ss) DNA genomes that infect a wide range of species and cause important losses in agriculture. Geminiviruses do not encode their own DNA polymerase, and rely on the host cell machinery for their replication.
- Here, we identify a positive effect of the curtovirus *Beet curly top virus* (BCTV) on the begomovirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) infection in *Nicotiana benthamiana* plants.
- Our results show that this positive effect is caused by the promotion of TYLCSV replication by BCTV C2. Transcriptomic analyses of plants expressing C2 unveil an up-regulation of cell cycle-related genes induced on cell cycle re-entry; experiments with two mutated versions of C2 indicate that this function resides in the N-terminal part of C2, which is also sufficient to enhance geminiviral replication. Moreover, C2 expression promotes the replication of other geminiviral species, but not of RNA viruses.
- We conclude that BCTV C2 has a novel function in the promotion of viral replication, probably by restoring the DNA replication competency of the infected cells and thus creating a favourable cell environment for viral spread. Because C2 seems to have a broad impact on the replication of geminiviruses, this mechanism might have important epidemiological implications.

Introduction

Geminiviruses constitute a group of plant viruses with circular, single-stranded (ss) DNA genomes packaged within geminate particles that infect a wide range of plants and cause important losses in agriculture (Rojas *et al.*, 2005; Seal *et al.*, 2006). The family *Geminiviridae* is classified into four genera, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* and *Mastrevirus*, based on their genomic organization, host range and insect vector (Fauquet *et al.*, 2003, 2008). Whitefly (*Bemisia tabaci*)-transmitted geminiviruses, with either bipartite (like *Tomato golden mosaic virus*, *TGMV*) or monopartite (like *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, *TYLCSV*) genomes, are included in the genus *Begomovirus*, whereas those having monopartite genomes, which are transmitted by leafhopper vectors and infect dicotyledonous plants, are included in the genus *Curtovirus*, with *Beet curly top virus* (BCTV) as the type species.

Over the past 20 yr, geminiviruses have emerged as serious constraints to the cultivation of a variety of vegetable crops in various parts of the world. The emergence of geminiviral diseases is often associated with the high genetic variation of the viral populations and the occurrence of mixed infections. Simultaneous infections with distinct viruses have been observed in nature, and may result in unpredictable effects, from disease amelioration to symptom synergy (Hammond *et al.*, 1999). Although both synergism and interference have been reported previously for begomovirus and curtovirus species, most of the effort has been focused on the analysis of the synergism between species of the same genus (Fondong *et al.*, 2000; Briddon & Markham, 2001; Pita *et al.*, 2001; Morilla *et al.*, 2004; Vanitharani *et al.*, 2004; Alves-Junior *et al.*, 2009; Renteria-Canett *et al.*, 2011), the only exception being the synergism reported between geminiviruses and the +ssRNA viruses (Pohl & Wege, 2007; Wege & Siegmund, 2007; Sardo *et al.*, 2011).

Monopartite begomovirus and curtovirus genomes encode six and seven open reading frames (ORFs), respectively. In both cases, the virion sense strand contains two ORFs (V2 and CP),

These authors contributed equally to this work.

and an extra one (V3) can be identified in the curtovirus genome; the complementary sense strand encodes four ORFs (Rep, C2/L2, C3/L3 and C4/L4). So far, the described functions of the viral proteins include cell cycle manipulation, suppression of host defence (including gene silencing), viral replication, and intra- as well as intercellular trafficking of nucleoprotein complexes (reviewed in Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000, 2004; Gutierrez *et al.*, 2004).

Geminiviruses replicate in the nucleus of plant cells through double-stranded (ds) DNA intermediates that can form minichromosomes (Pilartz & Jeske, 1992). Two viral proteins have been found to be involved in viral replication: Rep (also called AL1, L1 and C1), which is the only viral protein essential for this process (Elmer *et al.*, 1988a), and C3 (also called AL3, L3 and REn), which enhances viral DNA accumulation (Sunter *et al.*, 1990; Stanley *et al.*, 1992; Hormuzdi & Bisaro, 1995). Although geminiviruses do not encode their own DNA polymerases and rely on the host DNA replication machinery for their propagation, they are able to replicate in differentiated cells that no longer contain detectable levels of host DNA polymerases and associated factors. To overcome such restriction, geminiviruses must induce the accumulation of the DNA replication machinery in mature plant cells by reprogramming host gene expression. Evidence suggests that the cell cycle in infected plant cells is reprogrammed differently by different geminivirus genera. Some bipartite begomoviruses modify gene expression to allow DNA replication primarily by triggering endoreduplication (Bass *et al.*, 2000; Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008), whereas curtoviruses are also able to induce extensive mitosis (Latham *et al.*, 1997). To date, two geminiviral proteins have been shown to play a role in the induction of DNA replication competency in the infected cells: Rep and the curtovirus C4. Rep is a multifunctional protein that interferes with the host cell cycle through its interactions with the plant retinoblastoma-related protein (RBR), an activator of G1/S-phase transition in plant cells (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004), and with essential components of the DNA replisome, such as the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Castillo *et al.*, 2003; Bagewadi *et al.*, 2004), replication protein A (RPA32) (Singh *et al.*, 2007) or replication factor C (RFC) (Luque *et al.*, 2002). Expression of the curtovirus C4 induces a severe developmental phenotype and extensive cell division in all tissue types examined (Latham *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2008; Mills-Lujan & Deom, 2010). Although the mechanism of action of C4 is unclear, previous studies have suggested that it may regulate the expression of host genes directly or indirectly to control the cell cycle (Lai *et al.*, 2008).

In this work, we identify a positive effect of the curtovirus BCTV on the begomovirus TYLCSV infection using *Nicotiana benthamiana* 2IRGFP plants (Morilla *et al.*, 2006). Agroinfiltration experiments show that BCTV is able to enhance TYLCSV replication by a novel mechanism which is dependent on C2, but independent of Rep and C4; similar experiments reveal that this feature is not shared by the begomoviral C2. The analysis of plants expressing BCTV C2 unveils an up-regulation of the genes involved in DNA replication and control of the G2/M transition, which are known to be induced on cell cycle re-entry. These results strongly suggest that C2 triggers a re-activation of the cell

cycle, restoring the DNA replication competency and therefore creating a cell environment favourable for geminiviral replication.

Materials and Methods

Details of the microorganisms and general methods, transient expression assays, plant materials, immunoblot analysis and PCR conditions are provided in Supporting Information Methods S1, Tables S1, S2.

Plasmids

The constructs expressing TYLCSV Rep (pACS1) and BCTV C2 have been described in Morilla *et al.* (2006) and Lozano-Duran *et al.* (2011), respectively. The binary plasmid to express BCTV V2 was obtained by cloning a PCR fragment, amplified with primers V2BCup and V2BClow, into the *EcoRV* site of pBSSKII+ to yield pV2BC. A *BamHI*–*SalI* fragment of pV2BC, containing the complete V2 ORF, was cloned into the *BamHI*–*SalI* site of pBINX1 (Sanchez-Duran *et al.*, 2011) to yield pBIV2BC. The binary plasmid to express BCTV C4 was obtained by cloning a PCR fragment, amplified with primers C4BCup and C4BClow, into the *EcoRV* site of pBSSKII+ to yield pC4BC. An *SmaI*–*KpnI* fragment of pC4BC, containing the complete C4 ORF, was cloned into the *SmaI*–*KpnI* site of pBINX1 to yield pBIC4BC.

To yield the binary plasmid to express BCTV Rep (named pBINL1BCTV), a fragment of 1.1 kbp from pBIN1.2 (Briddon *et al.*, 1989), containing the BCTV *Rep* ORF (positions 2906 to 1802), was PCR amplified with primers L1BCup and L1BClow, and cloned into the *EcoRV* site of pBSSKII to obtain pBL1BCTV. A 1.1-kbp *KpnI*–*XbaI* fragment of pBL1BCTV was cloned into pBINX1 to yield pBINL1BCTV. Infective BCTV clones for wild-type (pBIN1.2) and $\Delta C2$ (L2-2), $\Delta V2$ and $\Delta C4$ (L4-1) mutants have been described in Briddon *et al.* (1989), Stanley & Latham (1992) and Stanley *et al.* (1992). BCTV C2 mutants C2-2 and C2-3 (L2-2 and L2-3, respectively) have been described in Hormuzdi & Bisaro (1995). Infective TGMV (pGA2 and pGB2) and TYLCSV (pTYA14) clones have been described in Briddon *et al.* (1989), Bejarano & Lichtstein (1994) and Morilla *et al.* (2004).

To obtain the plasmid containing the BCTV 2IRGFP construct, an *EcoRI*–*HindIII* fragment from pBINGFP (Morilla *et al.*, 2006), containing the 35S cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter, the complete green fluorescent protein (GFP) ORF and the Nos terminator, was cloned into the *EcoRI*–*HindIII* site of pGreenII0229 (Hellens *et al.*, 2000) to yield pGGFP. A 1.08-kbp fragment of pBIN1.2 (Briddon *et al.*, 1989) containing the intergenic region (IR) of BCTV (positions 2535 throughout 2993, to 599) was amplified by PCR using primers OBCFHindIII and OBCRHindIII, and cloned into the *EcoRV* site of pBSSKII (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) to yield pBBCIR. A *HindIII* fragment from pBBCIR, containing the IR of BCTV, was cloned into the *HindIII* site of pGGFP to obtain pGIRGFP. An *EcoRI* fragment from pBBCIR, containing the IR of BCTV, was then cloned into the *EcoRI* site of pGIRGFP to yield pG2IRGFP. The orientation of the IR fragments was determined by PCR using

primers pBINX2 and either oBCF *Hind*III (for the IR cloned into the *Hind*III site) or oBCF *Eco*RI (for the IR cloned into the *Eco*RI site). The CP promoter in the IRs is in the same direction as the 35S CaMV promoter. The binary vector containing the P19 protein of *Tomato bushy stunt virus* (pBIN61-P19) was kindly provided by Voinnet *et al.* (2003).

Viral infections

TYLCSV infections of *Nicotiana benthamiana* L. plants were performed by agroinoculation, as described previously (Elmer *et al.*, 1988b). Seven plants were agroinoculated with pGreenTYA14 (binary vector containing a partial dimer of TYLCSV; Lozano-Duran *et al.*, 2011) and/or pBIN1.2 (binary vector containing a partial dimer of BCTV; Briddon *et al.*, 1989); as a control, two plants were mock inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* harbouring the empty binary vector pGreenII0229 (Hellens *et al.*, 2000) or pBIN (van Engelen *et al.*, 1995). Symptoms were evaluated every week until 21 d post-inoculation (dpi), when samples were taken.

Viral DNA accumulation was quantified by quantitative real-time PCR or Southern blot hybridization. For hybridizations, 10 µg of total plant DNA were used. Membranes were hybridized with TYLCSV radiolabelled probes. Viral DNA accumulation was quantified by Phosphorimager analyses of DNA gel blots and normalized to genomic DNA. DNA probes are described in Table S3.

Viral replication assays were performed by agroinfiltration with *Agrobacterium* cultures containing infectious clones. For DNA viruses (TYLCSV and BCTV), the same infectious clones as employed in the infection assays were used. Infectious clones of Tobacco mosaic virus and Potato virus X expressing the green fluorescent protein (TMV-GFP and PVX-GFP) were kindly provided by Dr Peter Moffett, and have been described elsewhere (Peart *et al.*, 2002). For *Tobacco rattle virus* (TRV), clones to deliver TRV RNA1 and RNA2 (pTV00 and pBINTRA6) were used (Ratcliff *et al.*, 2001).

Microarray analysis

Three independent biological replicates were produced. For each biological repetition and each point, RNA samples were obtained by pooling RNAs from 15 plants. Samples were collected on plants at 1.02 developmental growth stages (Boyes *et al.*, 2001), cultivated at 24°C with an 18-h light cycle. Total RNA was isolated from three replicates of control or transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing BCTV C2 using TRIzol (Invitrogen), and subsequently cleaned using an RNeasy MinElute Cleanup Kit (Invitrogen). RNA quantity and quality were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech, Ringmer, East Sussex, UK) and an Agilent 2100 bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), respectively.

Microarray hybridization was carried out at the Affymetrix platform at INRA-URGV (Evry, France) using an Affymetrix GeneChip® ATH1. One microgram of total RNA was used to synthesize biotin-labelled cRNAs with the One-Cycle cDNA

Synthesis Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Superscript II reverse transcriptase and T7-oligo (dT) primers were used to synthesize the ss cDNA at 42°C during 1 h, followed by the synthesis of the ds cDNA using DNA ligase, DNA polymerase I and RNaseH during 2 h at 16°C. Cleanup of the ds cDNA was performed with the Sample Cleanup Module (Affymetrix), followed by *in vitro* transcription (IVT) in the presence of biotin-labelled UTP using a GeneChip® IVT Labelling Kit (Affymetrix). The quantity of the cRNA labelled with RiboGreen® RNA Quantification Reagent (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA) was determined after cleanup by the Sample Cleanup Module (Affymetrix). Fragmentation of 15 µg of labelled cRNA was carried out for 35 min at 94°C, followed by hybridization for 16 h at 45°C to an Affymetrix GeneChip® Arabidopsis genome array representing 22 500 probe sets corresponding to 24 000 gene sequences. After hybridization, the arrays were washed with two different buffers (stringent, 6 × Saline-sodium phosphate-EDTA, 0.01% Tween-20; nonstringent, 100 mM Mes, 0.1 M [Na⁺], 0.01% Tween-20) and stained with a complex solution including streptavidin R-phycoerythrin conjugate (Invitrogen/Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) and anti-streptavidin biotinylated antibody (Vectors Laboratories, Burlingame, CA, USA). The washing and staining steps were performed in a GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix). The Affymetrix GeneChip® Genome Arrays were finally scanned with the GeneChip® Scanner 3000 7G piloted by the GeneChip® Operating Software (GCOS).

For the data analysis, the data were normalized using the GCRMA algorithm (Irizarry *et al.*, 2003), available in the Bioconductor package (Gentleman & Carey, 2002). To determine the differentially expressed genes, we performed a usual two-group *t*-test that assumes equal variance between groups. The variance of the gene expression per group was a homoscedastic variance, in which genes displaying extremes of variance (too small or too large) were excluded. The raw *P* values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the Family Wise Error Rate (FWER) (Ge *et al.*, 2003). A gene was declared to be differentially expressed if the Bonferroni *P* value was < 0.05.

The raw CEL files were imported into R software for data analysis. All raw and normalized data are available through the CATdb database (AFFY_L2bctv_Ath; Gagnot *et al.*, 2008) and from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Barrett *et al.*, 2007), accession number GSE24214.

Results

Synergistic infections of BCTV and TYLCSV in *N. benthamiana*

To analyse potential synergistic interactions between TYLCSV and other geminivirus species, we tested a co-infection between TYLCSV and BCTV in the model plant *N. benthamiana*. In comparison with the single infections, co-infection of *N. benthamiana* with BCTV and TYLCSV resulted in increased systemic symptoms at 21 dpi (Fig. 1a), indicating the existence

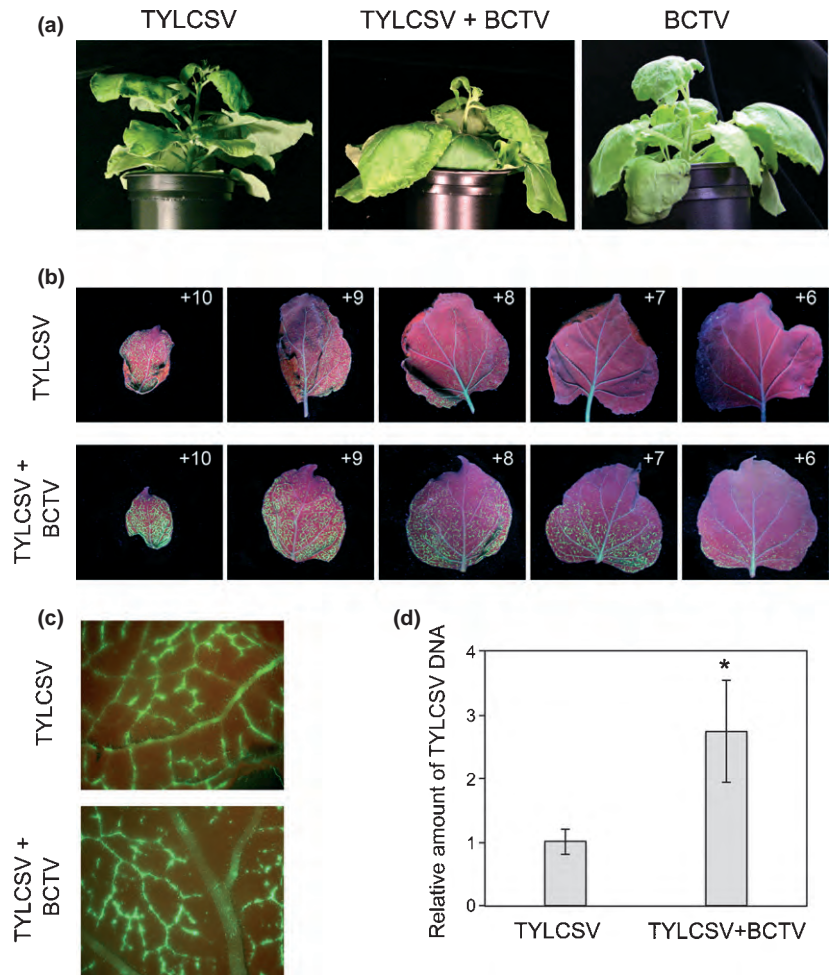


Fig. 1 Synergism between *Beet curly top virus* (BCTV) and *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) in *Nicotiana benthamiana* 2IRGFP plants. (a) Representative systemic symptoms in plants inoculated with TYLCSV, BCTV or both. (b) Green fluorescent protein (GFP) expression in leaves from plants infected with TYLCSV or co-infected with BCTV and TYLCSV. Leaves were numbered from the inoculation point, leaf + 1 being the first leaf placed on the agroinfection site. (c) Details of GFP expression in the leaves from plants infected with TYLCSV or co-infected with BCTV and TYLCSV. (d) Relative amount of TYLCSV DNA in plants. Viral DNA was determined by quantitative real-time PCR of total DNA extracted from leaves + 8, + 9 and + 10. Values are the average of 10 plants from two independent experiments. Bars represent standard error. All photographs and samples were taken from plants at 4 wk (TYLCSV) and 3 wk (BCTV) post-infection. Asterisks indicate a statistically significant difference according to Student's *t*-test ($P < 0.05$).

of a positive synergistic relationship between the symptomatologies caused by these two geminivirus species. To study this interaction further, we took advantage of transgenic 2IRGFP *N. benthamiana* plants (Morilla *et al.*, 2006). These plants harbour a 35S:GFP expression cassette between two direct repeats of the TYLCSV IR that allows the monitoring of TYLCSV replication *in vivo*. Following viral infection or heterologous expression of TYLCSV Rep protein, these plants display a Rep-dependent GFP overexpression driven by the generation of mGFP replicons (hereafter referred to as 'mGFP') (Morilla *et al.*, 2006), which correlates with Rep activity. 2IRGFP plants were co-inoculated with TYLCSV and BCTV, or inoculated with either virus alone as a control. GFP expression was exhaustively monitored at different times post-infection, and samples were collected to determine the accumulation of viral DNA in the infected plants. When the plants were observed under UV light, we noticed that the extension of GFP expression in leaves was clearly higher in those plants co-infected with TYLCSV and BCTV than in those infected with TYLCSV alone, as the number of leaves showing GFP overexpression and the GFP-expressing area in each leaf were larger (Fig. 1b). However, the pattern of GFP overexpression remained unaltered in the presence of BCTV (green fluorescence was restricted to vascular bundles; Fig. 1c). As expected, the analysis of total DNA extracted from the infected plants

proved that the increase in GFP correlated with a greater accumulation of TYLCSV DNA (Fig. 1d). No differences in the accumulation of BCTV DNA were detected in the presence of TYLCSV (Fig S1a). Taken together, these results suggest that BCTV promotes TYLCSV accumulation by increasing the number of leaves capable of sustaining its replication, and probably by enhancing the efficiency of the replication itself, but without altering its phloem-limited distribution.

The activity of TYLCSV Rep is enhanced by the curtovirus BCTV, but not by the begomoviruses TGMV or *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)

In order to confirm that BCTV promotes TYLCSV replication, we performed a leaf patch test in 2IRGFP plants, comparing the expression of GFP following the agroinfiltration of a binary vector to express TYLCSV Rep or the co-agroinfiltration of this binary vector and an infectious clone of BCTV. In this assay, *A. tumefaciens* strains harbouring a Rep expression construct or an infectious clone of BCTV were infiltrated alone or co-infiltrated in different patches of the same leaf. At 3 dpi, samples were harvested and photographs were taken. As shown in Fig. 2, co-infiltration with BCTV triggered a clear increase in the Rep-derived overexpression of GFP (Fig. 2a), which correlated

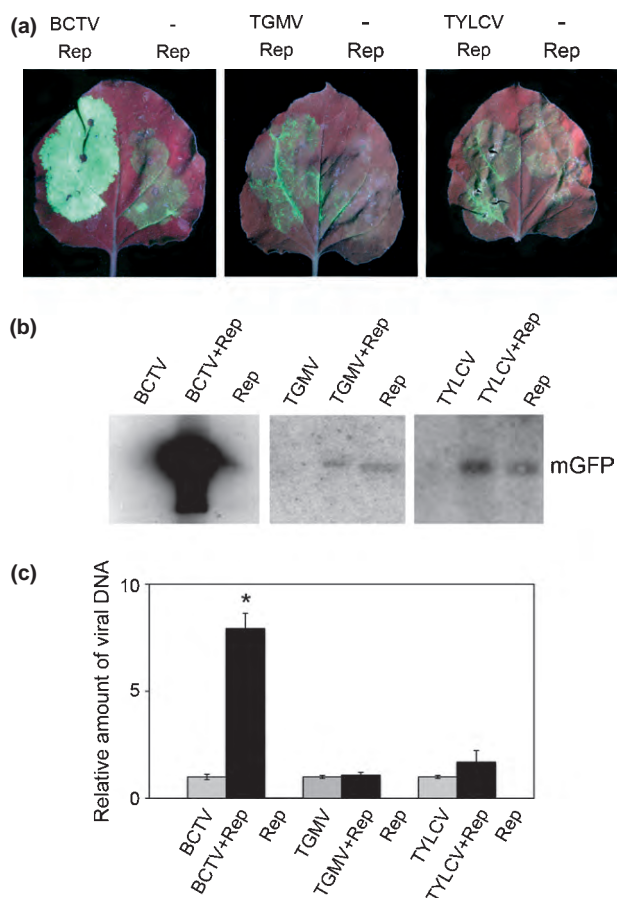


Fig. 2 Rep-dependent green fluorescent protein (GFP) expression and mGFP production are enhanced by *Beet curly top virus* (BCTV), but not *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) or *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCSV). (a) Leaves from transgenic 2IRGFP *Nicotiana benthamiana* plants were co-agroinfiltrated to express TYLCSV Rep, and either an infectious clone of geminiviruses BCTV, TGMV (DNA A and B) or TYLCSV, or the binary vector pGA482 (–) as a negative control. (b) DNA was extracted from the agroinfiltrated leaf patches and used to detect mGFP by Southern blotting. Undigested DNA (4 µg per lane) was blotted and hybridized with a specific probe for mGFP. Similar results were obtained in three independent experiments. (c) Relative amount of BCTV, TGMV (DNA-A) or TYLCSV DNA in agroinfiltrated leaf patches. Viral DNA was determined by quantitative real-time PCR of total DNA extracted from the infiltrated patches. Values are the average of 10 plants from two independent experiments. Bars represent standard error. Asterisks indicate a statistically significant difference according to Student's *t*-test ($P < 0.05$).

with a strong increase in the Rep-assisted production of mGFP replicons (Fig. 2b). To determine whether other geminivirus species might exert a similar effect, we performed similar leaf patch tests using infectious clones of TGMV and TYLCSV. Co-agroinfiltration with either TGMV or TYLCSV led to a modest increase in the expression of GFP, which did not result from an enhanced production of mGFP replicons, as shown in Fig. 2(b), indicating the specificity of the effect of BCTV on TYLCSV replication. The presence of these viruses in the agroinfiltrated patches was confirmed in all cases using quantitative real-time PCR (Fig. 2c). Intriguingly, although TYLCSV Rep did not affect the accumulation of TGMV or TYLCSV, it enhanced the accumulation of BCTV (Fig. 2c).

BCTV C2, but not C4 or V2, enhances the activity of geminivirus Rep

As increasing experimental evidence has indicated the important roles of viral silencing suppressor proteins in the emergence of synergistic diseases (Vanitharani *et al.*, 2005; Latham & Wilson, 2008), we decided to analyse whether any of the putative silencing suppressors encoded by BCTV were involved in the observed effect on TYLCSV replication. Although several reports have confirmed the gene silencing suppression activity of C2, recent data obtained in our laboratory have shown that C4 and V2 are also able to restrict post-transcriptional gene silencing (PTGS) in *N. benthamiana* (A. P. Luna *et al.*, unpublished). Therefore, all three genes were included in this analysis: leaf patch tests were performed on 2IRGFP *N. benthamiana* plants with BCTV mutants in C2 (BCTVΔC2), C4 (BCTVΔC4) or V2 (BCTVΔV2) genes (Stanley & Latham, 1992; Stanley *et al.*, 1992). Although co-agroinfiltration with BCTV wild-type, BCTVΔC4 and BCTVΔV2 triggered a strong increase in fluorescence, co-agroinfiltration with BCTVΔC2 did not (Fig. 3a). The increase in green fluorescence correlated with an enhanced production of mGFP replicons (Fig. 3b), whereas the accumulation of TYLCSV Rep protein remained unaltered (Fig. 3c). As reported previously, no differences in DNA accumulation were detected between wild-type and mutant viruses (Fig. S1c) (Hormuzdi & Bisaro, 1995).

The specific role of C2 in enhancing the production of mGFP replicons was confirmed using leaf patch tests on 2IRGFP plants with the three BCTV proteins (C2, C4 and V2) separately. As shown in Fig. 4(a), co-agroinfiltration with a binary vector expressing C2, but not C4 or V2, resulted in a notable increase in the Rep-dependent production of GFP. This increase correlated with an enhanced production of mGFP replicons (Fig. 4b), whereas the accumulation of Rep protein remained unaltered (Fig. 4c). Remarkably, TYLCSV C2 did not have such an effect (Fig. S2). Taken together, these results indicate that C2 is the BCTV protein responsible for the enhancement of TYLCSV Rep-derived production of mGFP replicons.

In order to test whether C2 could have a similar effect on the replication activity of BCTV Rep, we performed leaf patch tests by co-agroinfiltration of binary vectors expressing C2, C4 or V2 together with BCTV Rep and a BCTV 2IRGFP construct. This construct contains a 35S:GFP expression cassette between two direct repeats of BCTV IR; in the presence of BCTV Rep protein, there was a Rep-dependent production of mGFP replicons and a concomitant GFP overexpression, in a similar manner to that in the TYLCSV 2IRGFP transgenic plants/TYLCSV Rep system described previously (Fig. S3a). The co-infiltration of a binary vector expressing C2 in this system led to a higher production of GFP and mGFP replicons, whereas binary vectors expressing C4 and V2 did not have such an effect (Fig. S3a,b).

Suppression of PTGS is not sufficient to enhance the activity of geminivirus Rep

As BCTV C2 has been described to function as a suppressor of PTGS (Wang *et al.*, 2005), it is possible that the promoting

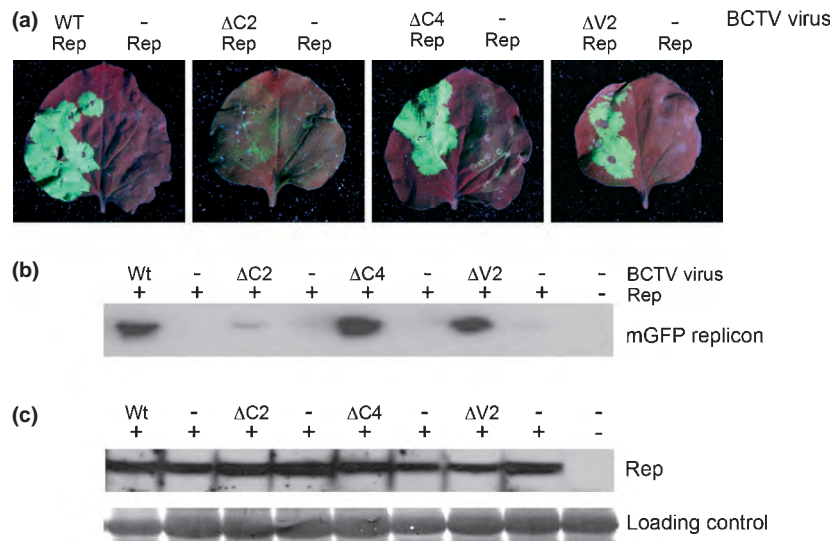


Fig. 3 Rep-dependent green fluorescent protein (GFP) expression and mGFP production are enhanced by both wild-type and C4 or V2 *Beet curly top virus* (BCTV) mutant viruses, but not by a C2 BCTV mutant virus. (a) Leaves from transgenic 2IRGFP *Nicotiana benthamiana* plants were co-agroinfiltrated to express *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) Rep, and either an infectious clone of BCTV wild-type (WT), C2 (Δ C2), C4 (Δ C4) or V2 (Δ V2) mutant, or the binary vector pGA482 (–) as a negative control. (b) DNA was extracted from the agroinfiltrated leaves and used to detect mGFP by Southern blotting. Undigested DNA (4 μ g per lane) was blotted and hybridized with a specific probe for mGFP. (c) Immunoblot analysis of protein extracts from agroinfiltrated leaf patches to detect TYLCSV Rep. The molecular weight of the observed band is 48 kDa. Coomassie staining of the large subunit of Rubisco is shown as loading control. Similar results were obtained in three independent experiments.

effect of C2 over viral Rep could be related to this activity. In order to determine whether this was the case, we decided to test the effect of the well-known silencing suppressor P19 from the tombusvirus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) on the Rep-assisted production of mGFP replicons in 2IRGFP plants. As shown in Fig. 5(a,b), co-infiltration with P19 triggered an increase in fluorescence which, unlike in the case of C2, did not correlate with an increased production of mGFP replicons. As expected from its silencing suppressor activity, however, co-expression of P19, but not C2, led to a higher accumulation of Rep (Fig. 5c). Moreover, the simultaneous infiltration with both C2 and P19 led to a further increase in fluorescence, suggesting that these two proteins have an additive effect (Fig. 5a). Taken together, these results suggest that the suppression of PTGS is not sufficient to boost the activity of geminivirus Rep.

Geminivirus replication is enhanced by BCTV C2

To further confirm that the increase in TYLCSV replication observed in the co-infections is dependent on the effect of BCTV C2, we measured the accumulation of TYLCSV DNA and mGFP replicons in leaf patch tests of 2IRGFP plants agroinfiltrated with infectious clones of TYLCSV and BCTV wild-type or BCTV Δ C2 mutant. As shown in Fig. 6, mutation in C2 abolished the enhancement in TYLCSV and mGFP accumulation, demonstrating that C2 is the viral protein responsible for the promotion of TYLCSV replication triggered by BCTV. No differences in DNA accumulation of BCTV were detected among the wild-type and mutant virus (Fig. S1b).

Based on the observation that BCTV C2 promoted the activity of both BCTV and TYLCSV Rep proteins, and that BCTV

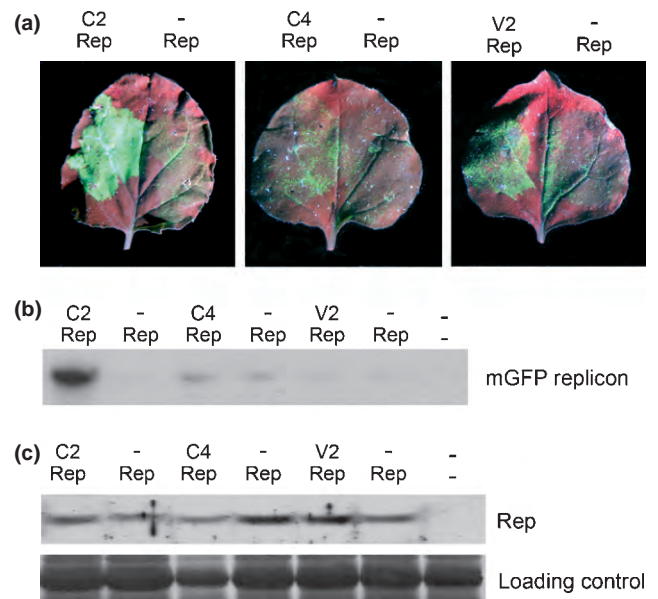


Fig. 4 Rep-dependent green fluorescent protein (GFP) expression and mGFP production are enhanced by C2, but not by C4 or V2. (a) Leaves from transgenic 2IRGFP *Nicotiana benthamiana* plants were co-agroinfiltrated to express *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) Rep, and either a binary plasmid containing expression constructs of *Beet curly top virus* (BCTV) C2, C4 or V2, or the binary vector pGA482 (–) as a negative control. (b) DNA was extracted from the agroinfiltrated leaves and used to detect mGFP by Southern blotting. Undigested DNA (4 μ g per lane) was blotted and hybridized with a specific probe for mGFP. (c) Immunoblot analysis of protein extracts from agroinfiltrated leaf patches to detect TYLCSV Rep. The molecular weight of the observed band is 48 kDa. Coomassie staining of the large subunit of Rubisco is shown as loading control. Similar results were obtained in three independent experiments.

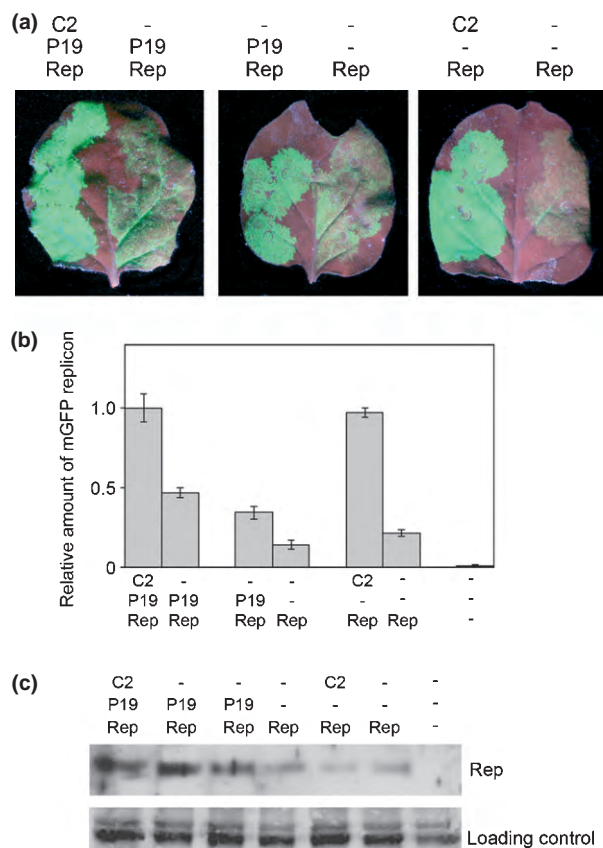


Fig. 5 Rep-dependent mGFP production is enhanced by C2, but not by the silencing suppressor P19. (a) Leaves from transgenic 2IRGFP *Nicotiana benthamiana* plants were co-agroinfiltrated to express *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) Rep, and either a plasmid containing expression constructs of C2 or P19, or the binary vector pGA482 (-) as a negative control. (b) Total DNA was extracted from agroinfiltrated leaf patches and used to determine the relative amount of mGFP replicons by quantitative real-time PCR. The amplification of 25s rRNA was used as the internal control. Values are the mean of three independent experiments with three replicates each. Bars represent standard error. Asterisks indicate a statistically significant difference according to Student's *t*-test ($P < 0.05$). All values are normalized to the value in the mock sample, where a background can be detected because of the presence of the transgene. (c) Immunoblot analysis of protein extracts from agroinfiltrated leaf patches to detect TYLCSV Rep. The molecular weight of the observed band is 48 kDa. Coomassie staining of the large subunit of Rubisco is shown as loading control. Similar results were obtained in three independent experiments.

enhanced the accumulation of TYLCSV in a C2-dependent manner, we hypothesized that the expression of C2 could have a similar impact on different geminiviruses. With the aim of determining the effect of BCTV C2 on geminivirus accumulation, we performed leaf patch tests by co-agroinfiltration of BCTV C2 together with infectious clones of a curtovirus (BCTV) or monopartite and bipartite begomoviruses (TYLCSV and TGMV) in wild-type *N. benthamiana* leaves. Co-infiltration with C2 led to a higher viral accumulation, between two- and 13-fold, in all cases (Fig. 7). However, as shown in Fig. S4, C2 did not exert a positive effect on the accumulation of RNA viruses. These results indicate that the mechanism by which BCTV C2 enhances geminiviral accumulation is not species specific, but impacts only DNA viruses.

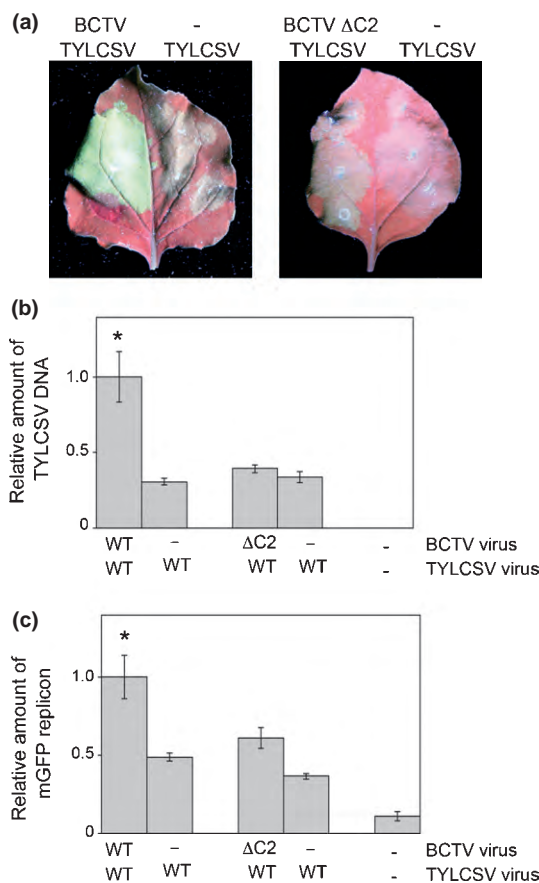


Fig. 6 Beet curly top virus (BCTV)-mediated induction of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) replication is lost in a C2 BCTV mutant. (a) Leaves from transgenic 2IRGFP *Nicotiana benthamiana* plants were co-agroinfiltrated with an infectious clone of TYLCSV and either an infectious clone of wild-type (BCTV) or C2 mutant (Δ C2BCTV) BCTV, or the binary vector pGA482 (-) as a negative control. The relative accumulation of TYLCSV DNA (b) and mGFP replicons (c) was determined by quantitative real-time PCR on total DNA extracted from agroinfiltrated leaf patches. Values are the mean of three independent experiments with three replicates each. Bars represent standard error. Asterisks indicate a statistically significant difference according to Student's *t*-test ($P < 0.05$). All values are normalized to the value in the mock sample, where a background can be detected because of the presence of the transgene.

Transcriptomic analysis reveals an induction of cell cycle genes by BCTV C2

Geminiviral replication relies heavily on the expression of host genes involved in DNA replication and/or cell cycle regulation. According to our results, it would be feasible that the effect of BCTV C2 on geminivirus replication might depend on the promotion of the expression of host genes favourable for geminivirus replication. With the aim of shedding light on the transcriptional changes triggered by BCTV C2, we performed a microarray analysis of transgenic *Arabidopsis* plants expressing this viral gene (Lozano-Duran *et al.*, 2011). T2 transgenic C2 or control seedlings were grown on plates with kanamycin, samples were harvested and total RNA was extracted after 10 d; three biological and three technical replicates were used. The RNA obtained from each technical replicate in the different biological replicates was

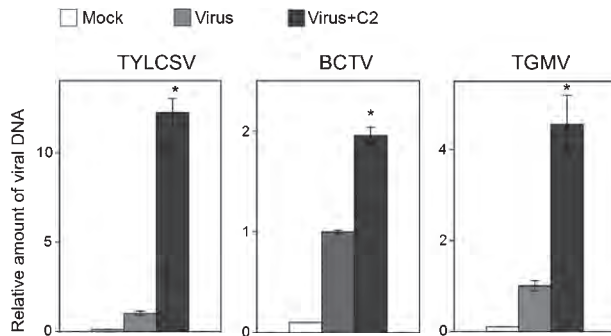


Fig. 7 C2 induces replication of other geminiviruses. DNA was extracted from *Nicotiana benthamiana* leaves co-agroinfiltrated with an infectious clone of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Beet curly top virus* (BCTV) or *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (DNA A and B) and either a binary plasmid to express BCTV C2 (C2) or the binary vector pGA482 (mock) as a negative control. Samples were collected at 7 d post-inoculation. Viral DNA accumulation was determined by quantitative real-time PCR using specific primers for each virus. Values are the mean of three independent experiments. Bars represent standard error. Asterisks indicate a statistically significant difference according to Student's *t*-test ($P < 0.05$).

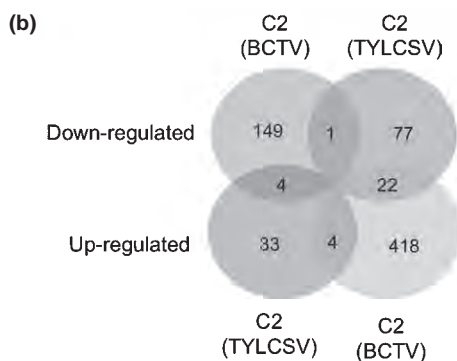


Fig. 8 Transcriptomic analysis of transgenic *Arabidopsis* plants expressing *Beet curly top virus* (BCTV) C2. (a) Functional categorization of differentially expressed genes (either up- or down-regulated) in transgenic *Arabidopsis* plants expressing BCTV C2. The total numbers of up- and down-regulated genes, as well as the total numbers of genes in each category, are indicated. Nonredundant gene ontology (GO) categories over-represented in each subset of genes are shown. (b) Venn diagrams depicting the intersection between up- and down-regulated genes in transgenic *Arabidopsis* plants expressing BCTV C2 or *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) C2.

pooled and subsequently used for the microarray hybridizations (GEO accession number GSE24214).

As shown in Fig. 8(a), 444 genes were significantly up-regulated and 154 were significantly down-regulated in the transgenic C2 plants. To explore which functional categories were affected by the expression of BCTV C2, gene ontology (GO) functional enrichment analysis was performed using the VirtualPlant BioMaps tool (Katari *et al.*, 2010; <http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb2/>). Several functional categories were over-represented in the subsets of up- or down-regulated genes, as shown in Fig. 8(a). Interestingly, among those biological processes over-represented in the subset of up-regulated genes, cell cycle-related categories (cell cycle, regulation of cell cycle, DNA packaging, nucleosome assembly, establishment and/or maintenance of chromatin architecture) can be found. The up-regulated genes in the C2 plants in these functional categories are listed in Table 1. As expected from the existence of nonoverlapping functions between curtovirus C2 and its begomovirus counterpart, the transcriptional changes driven by BCTV C2 were not equivalent to those triggered by TYLCSV C2 (R. Lozano-Durán *et al.*, unpublished; GEO accession number GSE18667), and the intersections between the subsets of up- or down-regulated genes in these transgenic lines were minimal (Fig. 8b).

To validate the microarray data, we measured the expression of several up-regulated cell cycle-related genes in the transgenic *Arabidopsis* plants expressing C2 by quantitative real-time PCR, including cyclin-dependent kinases (CDKs) (*CDKB1;2*, *CDKB2;1*), cyclines (*CYCA1;1*, *CYCB1;4*, *CYCB1;5* and *CYCB2;4*) and histones (*HISTONE H2A*, *HISTONE H2B*, *HISTONE H3* and *HISTONE H4*). Proliferating cellular nuclear antigen 1 (*PCNA1*) was included in the analysis as a control, as the expression of this gene, which is not altered according to the microarray data, is induced during geminiviral infection by a Rep-dependent mechanism (Nagar *et al.*, 1995; Egelkrout *et al.*, 2001); transgenic plants expressing TYLCSV C2 (Lozano-Duran *et al.*, 2011) were used as a control. As shown in Fig. S5, the results confirmed the microarray data for all genes, except for At3g54560, which encodes a Histone H2A. The expression of most of the tested genes was approximately between two- and four-fold higher in plants expressing BCTV C2. Interestingly, no increase in the expression of these cell cycle-related genes was detected in plants expressing TYLCSV C2, with the exception of *PCNA1*, in which a modest increase could be detected. To determine whether C2 induced similar changes in *N. benthamiana*, we analysed the expression of three cell cycle-related genes (*CDBK2*, *CYCA1* and *CYCA2*) in leaves agroinfiltrated with a binary vector to express C2 by semi-quantitative reverse transcription-PCR. As shown in Fig. S6, C2, but not C4 or V2, also induced the up-regulation of all three genes when transiently expressed in *N. benthamiana*. Most cell cycle-related genes up-regulated in the transgenic *Arabidopsis* plants expressing BCTV C2, depicted in Table 1, are up-regulated in cell cycle re-entry and present their maximum expression during mitosis or S-phase (Menges *et al.*, 2003). These transgenic plants, however, did not display any obvious phenotype in plant growth or development (Lozano-Duran *et al.*, 2011), indicating that aberrant cellular divisions probably do not occur.

Table 1 Cell cycle-related genes up-regulated in the transgenic *Arabidopsis* L2 plants according to the microarray data

Gene	Fold	P value	Peak	Cell cycle re-entry	ACC <i>Arabidopsis thaliana</i>
Cell cycle/cell cycle regulation					
FAR1 (alcohol-forming fatty acyl-CoA reductase 1)	1.80	6.24E-4			At5g22500
CYCB1;4 (cyclin B1;4)	1.68	2.16E-2			At2g26760
CYCB2;4 (cyclin B2;4)	1.73	5.94E-3	M	UR	At1g76310
DMC1 (disruption of meiotic control 1)	2.30	1.47E-10			At3g22880
FAR4 (alcohol-forming fatty acyl-CoA reductase 4)	2.30	1.17E-10			At3g44540
MAD2 (mitotic arrest-deficient 2)	2.20	2.63E-9	M	UR	At3g25980
CYCA1;1 (cyclin A1;1)	2.10	6.54E-8	M	UR	At1g44110
CDKB2;1 (cyclin-dependent protein kinaseB2;1)	2.13	2.30E-8	M	UR	At1g76540
CDKB2;2 (cyclin-dependent protein kinaseB2;2)	1.68	2.57E-2	M	UR	At1g20930
CDKB1;2 (cyclin-dependent protein kinaseB1;2)	1.72	8.20E-3			At2g38620
Kinesin 12B/PAKRP1L (microtubule motor kinesin)	1.69	1.48E-2	M	UR	At3g23670
ATMAP65-3 (microtubule-associated protein 65-3)	2.39	4.89E-12			At5g51600
CYCB1;5 (cyclin B1;5)	1.95	9.02E-6	M	UR	At1g34460
CKS2 (CDK-subunit 2)	2.04	3.34E-7			At2g27970
CYCA2;4 (cyclin A2;4)	1.97	4.47E-6			At1g80370
Nucleosome assembly/chromatin assembly or disassembly					
Histone H2A	2.04	3.55E-7	S	UR	At3g54560
Histone H2A	1.89	5.15E-5	S	UR	At3g20670
Histone H2B	1.69	1.44E-2	S	UR	At3g45980
Histone H2B	2.01	8.72E-7	S	UR	At3g53650
Histone H3	2.08	8.67E-8			At5g10400
Histone H3	1.75	2.77E-3	S	UR	At3g27360
Histone H4	1.69	1.73E-2	S	UR	At3g45930
Histone H4	1.77	1.79E-3	S	UR	At5g59690
Histone H4	1.68	2.54E-2	S	UR	At1g07820
NFD4 (nucleosome/chromatin assembly factor D4)	1.71	1.06E-2			At2g17560

The peak of expression in the cell cycle and the induction on cell cycle re-entry, as described by Menges *et al.* (2003), are indicated: M, mitosis; S, S phase; UR, up-regulation.

The N-terminal region of C2 is sufficient to induce the expression of cell cycle genes and to promote the activity of geminivirus Rep

In order to gain an insight into the molecular mechanisms by which C2 promotes the induction of cell cycle genes and enhances geminiviral replication, we tested the effect of two different mutated versions of C2, C2-2 and C2-3 (Hormuzdi & Bisaro, 1995), on the activity of TYLCSV Rep and the expression of *CDBK2*, *CYCA1* and *CYCA2* in transgenic 2IRGFP *N. benthamiana* plants. Although the wild-type C2 protein is 173 amino acids in length, C2-2 and C2-3 mutated versions contain premature stop codons, generating truncated proteins of 72 and 13 amino acids, respectively (Fig. 9a). As shown in Fig. 9(b), C2-3 mutant protein did not lead to a higher GFP expression when co-expressed with TYLCSV Rep, but C2-2 did, which correlated with an enhanced production of mGFP replicons (Fig. 9c). Moreover, C2-2, but not C2-3, triggered an over-expression of *CDKB2*, *CYCA1* and *CYCA2*, similar to that triggered by wild-type C2 (Fig. S7). Interestingly, these results suggest that the N-terminal region of C2, containing only the first four amino acids of the conserved zinc finger domain, is sufficient to trigger an induction of cell cycle genes and the promotion of the activity of geminivirus Rep.

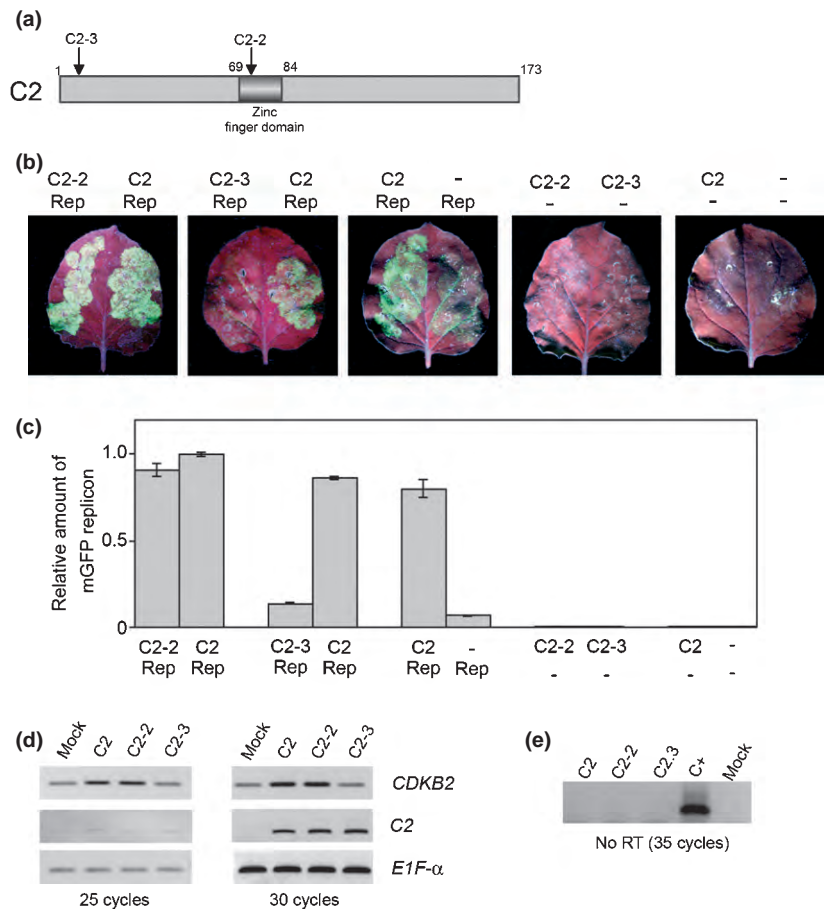
Discussion

BCTV exerts a C2-dependent synergistic effect over TYLCSV and other begomovirus species

Nicotiana benthamiana 2IRGFP plants are an excellent tool to detect positive or negative viral synergisms between TYLCSV and other viruses. Using these plants, we have been able to detect a synergistic effect exerted by a curtovirus, BCTV, over a begomovirus (TYLCSV) infection. Co-infection with both viruses results in more severe symptoms and increased TYLCSV DNA accumulation. Subsequent experiments in leaf patch tests, using BCTV C2, C4 and V2 mutants, have proven that this positive synergism on TYLCSV infection is a result of the promoting effect of BCTV C2 over TYLCSV replication, as wild-type BCTV as well as C4 and V2 mutants, but not the C2 mutant, enhanced TYLCSV accumulation. Because we did not perform similar experiments with BCTV mutants in Rep or C3 (as mutations in these genes abolish or reduce viral replication) or in the CP gene, we cannot completely rule out the possibility that any of these genes could, in addition to C2, contribute to this synergistic effect on TYLCSV.

As both viruses replicate in phloem cells and the co-infection of nuclei has been described in geminiviruses (Morilla *et al.*,

Fig. 9 Rep-dependent green fluorescent protein (GFP) expression and mGFP production are enhanced by C2-2, but not by the C2-3 mutant. (a) Diagram of the *Beet curly top virus* (BCTV) C2 protein showing residue number, the relative position of the zinc finger-like motif and the stop codon in the C2-2 and C2-3 mutated versions. (b) Leaves from transgenic 2IRGFP *Nicotiana benthamiana* plants were co-agroinfiltrated to express *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) Rep (Rep), and either wild-type C2, the mutated versions (C2-2, C2-3) or the binary vector pGA482 (-) as a negative control. (c) Total DNA was extracted from agroinfiltrated leaf patches and used to determine the relative amount of mGFP replicons by quantitative real-time PCR. Values are the mean of three independent experiments with three replicates each. Bars represent standard error. Asterisks indicate a statistically significant difference according to Student's *t*-test ($P < 0.05$). All values are normalized to the value in the mock sample, where a background can be detected because of the presence of the transgene. (d) Total RNA extracted from the same leaves was used to determine the expression levels of *CDKB2* and *C2* in the agroinfiltrated leaves by semi-quantitative reverse transcription-PCR. *E1F α* was used as the internal control. Results at 25 and 30 cycles (for *CDKB2* and *C2*) and at 30 and 35 cycles (for *E1F α*) are shown. (e) Total RNA extracted from the agroinfiltrated leaves was used as a template for PCR before cDNA synthesis. The absence of amplification confirms that there is no DNA contamination. Similar results were obtained in two independent experiments.



2004), it is feasible that these two viruses share similar cell environments, allowing BCTV induction of TYLCSV replication in a natural mixed infection. The synergy described here might have epidemiological implications, given that C2 also exerts its positive effect on all geminivirus species analysed, suggesting a general mechanism to enhance the replication of DNA viruses (Fig. 7). Interestingly, Briddon & Markham (2001) reported a positive effect of BCTV over the spreading of the DNA-A of the begomovirus TGMV in *N. benthamiana* plants. Although they interpreted their observations as complementation in movement functions, they may have been caused by the replicational support described in this work.

BCTV C2, but not TYLCSV C2, promotes the activity of geminivirus Rep and enhances geminivirus accumulation

Our data show that the curtovirus BCTV, but not begomoviruses, increases the Rep-assisted accumulation of mGFP replicons in *N. benthamiana* 2IRGFP plants, suggesting that the ability to enhance TYLCSV replication is specific to curtoviruses. This result is supported by the fact that BCTV C2, but not TYLCSV C2, is able to increase the accumulation of mGFP. BCTV C2 shares some functions and sequence similarities with its begomoviral counterpart: (1) both proteins interact with and inactivate SNF1-related kinase (SnRK1) (Sunter *et al.*, 2001; Hao *et al.*, 2003) and the adenosine kinase (ADK) (Wang *et al.*, 2003); (2)

both proteins have a conserved zinc finger motif; (3) both proteins produce an enhanced susceptibility phenotype when expressed in transgenic plants (Sunter *et al.*, 2001); and (4) both proteins function as gene silencing suppressors of PTGS and TGS (reviewed in Raja *et al.*, 2010). However, they are also known to have functional differences, as BCTV C2 does not complement a mutation in the TGMV C2 gene (Stanley *et al.*, 1992; Sunter *et al.*, 1994; Hormuzdi & Bisaro, 1995; Baliji *et al.*, 2004, 2007) and, unlike the begomoviral C2, BCTV C2 does not harbour a formal transcriptional activation domain, and thus is considered to lack the transcriptional activation activity required for the expression of late viral genes (Sunter & Bisaro, 1992; Hormuzdi & Bisaro, 1995). Strikingly, comparison between the transcriptome of plants expressing either TYLCSV C2 or BCTV C2 (Fig. 8) unveiled clear differences, confirming the functional divergence between these viral proteins. Although both induce changes in gene expression, the sets of genes altered in each case are mostly dissimilar, suggesting that C2 from begomoviruses and curtoviruses might use different mechanisms to reprogram gene expression in the host cell.

BCTV C2 has a novel function in the re-activation of the cell cycle

The assay used in this work, based on 2IRGFP constructs, allows us to study the replication efficiency of geminiviruses, which is

dependent on both the activity of Rep and the availability of the required cell machinery. It has been suggested that geminiviral DNA replication is coupled to changes in the cell cycle stage of the host cell because of the requirement for cellular factors. Transcriptomic analysis of transgenic *Arabidopsis* plants expressing BCTV C2 unveiled an up-regulation of the genes involved in cell cycle regulation and chromatin structure. Most of these genes have been identified as being up-regulated on cell cycle re-entry from G1-phase after sucrose starvation (Menges *et al.*, 2003). Bearing in mind that geminiviruses usually infect terminally differentiated cells, and thus must trigger the re-activation of the DNA replication machinery, the cell cycle re-entry might be an essential step in the infectious process. Taking together these results, it is tantalizing to speculate that C2 mediates the up-regulation of genes required to re-initiate the cell cycle.

So far, two geminiviral proteins have been implicated in the reprogramming of the cell cycle: Rep from mastreviruses and begomoviruses, through its interactions with RBR (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004), and C4 from curtoviruses (Latham *et al.*, 1997; Mills-Lujan & Deom, 2010). Our results raise the unexpected possibility that BCTV might rely on at least two different proteins (C2 and C4), in addition to Rep, to create a cellular environment favourable for viral replication. The fact that the positive effect of BCTV C2 on viral accumulation is specific to DNA viruses, as it does not trigger dramatic changes in the accumulation of RNA viruses, supports this idea. Although mutations in curtovirus C2 could lead to reduced viral accumulation, lower infectivity and/or a recovery phenotype (Hormuzdi & Bisaro, 1995; Baliji *et al.*, 2007; Lozano-Durán & Bejarano, 2011), C2 is not essential for replication, suggesting that the gene induction triggered by C2 is not required, but favourable, for viral replication.

The use of two mutated versions of BCTV C2 allowed us to determine that the N-terminal region of C2, containing only the first 72 amino acids (C2-2), is sufficient to trigger both the promoting effect over the activity of TYLCSV Rep and the transcriptional changes in *N. benthamiana*. This region of C2 contains the first four amino acids of the zinc finger domain (C-X-C-X), which has been described in begomoviruses as being essential for the transactivation activity and to mediate homodimerization. However, BCTV C2 has not been found to form homodimers despite the fact that the zinc finger domain is conserved (Yang *et al.*, 2007). The N-terminal region of begomovirus C2 also contains the nuclear localization signal (NLS) that is essential for targeting of the protein to the nucleus (Dong *et al.*, 2003); although this signal is not strictly conserved in curtoviruses, BCTV C2, similar to begomovirus C2, contains a large percentage of positively charged amino acid residues in this region. To date, the subcellular localization of BCTV C2 has not been elucidated; it will be interesting to determine whether BCTV C2, like its begomoviral counterpart, is localized to the nucleus and, if this is the case, whether the diverging NLS is still functional, as suggested by the functionality of the mutant C2-2.

In this work, we describe a novel function for curtovirus C2 in promoting geminiviral replication, most likely through the re-activation of the cell cycle. This novel function resides in the N-terminal part of the protein and seems to have a broad impact

on the replication of geminiviruses, which has important epidemiological implications. Future work will aim to dissect the molecular mechanisms underlying this novel role of C2.

Acknowledgements

We thank Mayte Duarte and Silvia Hernández for excellent technical assistance, Miguel A. Sánchez-Durán for generating the anti-Rep antibodies, Peter Moffett and Olivier Voinnet for sharing materials and Javier Ruiz-Albert for critical discussions. This research was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2007-66062-C02-02/AGR and AGL2010-22287-C02-02) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Z. C. was awarded a Postdoctoral Fellowship JAE-Doc from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); R.L.-D. and M.A.-M. were awarded Predoctoral Fellowships from the Spanish Ministerio de Educación y Cultura.

References

- Alves-Junior M, Alfenas-Zerbini P, Andrade EC, Esposito DA, Silva FN, F da Cruz AC, Ventrella MC, Otoni WC, Zerbini FM. 2009. Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. *Virology* 387: 257–266.
- Ascencio-Ibanez JT, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R, Hanley-Bowdoin L. 2008. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology* 148: 436–454.
- Bagewadi B, Chen S, Lal SK, Choudhury NR, Mukherjee SK. 2004. PCNA interacts with Indian mung bean yellow mosaic virus rep and downregulates rep activity. *Journal of Virology* 78: 11890–11903.
- Baliji S, Black M, French R, Stenger D, Sunter G. 2004. Spinach curly top virus: a newly described curtovirus species from southwest Texas with incongruent gene phylogenies. *Phytopathology* 94: 772–779.
- Baliji S, Sunter J, Sunter G. 2007. Transcriptional analysis of complementary sense genes in spinach curly top virus and functional role of C2 in pathogenesis. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 20: 194–206.
- Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomaszewski M, Edgar R. 2007. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update. *Nucleic Acids Research* 35: D760–D765.
- Bass HW, Nagar S, Hanley-Bowdoin L, Robertson D. 2000. Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. *Journal of Cell Science* 113: 1149–1160.
- Bejarano ER, Lichtenstein CP. 1994. Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. *Plant Molecular Biology* 24: 241–248.
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorlach J. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13: 1499–1510.
- Bridson RW, Markham PG. 2001. Complementation of bipartite begomovirus movement functions by topocoviruses and curtoviruses. *Archives of Virology* 146: 1811–1819.
- Bridson RW, Watts J, Markham PG, Stanley J. 1989. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* 172: 628–633.
- Castillo AG, Collinet D, Deret S, Kashoggi A, Bejarano ER. 2003. Dual interaction of plant pcna with geminivirus replication accessory protein (Rep) and viral replication protein (Rep). *Virology* 312: 381–394.
- Dong X, van Wezel R, Stanley J, Hong Y. 2003. Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 77: 7026–7033.

- Egelkroun EM, Robertson D, Hanley-Bowdoin L. 2001. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* 13: 1437–1452.
- Elmer JS, Brand L, Sunter G, Gardiner WE, Bisaro DM, Rogers SG. 1988a. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the all coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Research* 16: 7043–7060.
- Elmer JS, Sunter G, Gardiner WE, Brand L, Browning CK, Bisaro D, Rogers SG. 1988b. *Agrobacterium*-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. *Plant Molecular Biology* 10: 225–234.
- van Engelen FA, Moltzoff JW, Conner AJ, Nap JP, Pereira A, Stiekema WJ. 1995. pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research* 4: 288–290.
- Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, Stanley J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148: 405–421.
- Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153: 783–821.
- Fondong VN, Pita JS, Rey ME, de Kochko A, Beachy RN, Fauquet CM. 2000. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of General Virology* 81: 287–297.
- Gagnot S, Tamby JP, Martin-Magniette ML, Bitton F, Taconnat L, Balzergue S, Aubourg S, Renou JP, Lecharny A, Brunaud V. 2008. CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the urgycatma platform. *Nucleic Acids Research* 36: D986–D990.
- Ge Y, Dudoit S, Speed TP. 2003. Resampling-based multiple testing for microarray data analysis. *Test* 12: 1–77.
- Gentleman R, Carey V. 2002. Bioconductor. *RNews* 2: 11–16.
- Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Mar Castellano M, Sanz-Burgos A, Luque A, Miksich R. 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology* 98: 111–119.
- Hammond J, Lecoq H, Raccach B. 1999. Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Advances in Virus Research* 54: 189–314.
- Hanley-Bowdoin L, Settlege SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D. 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35: 105–140.
- Hanley-Bowdoin L, Settlege SB, Robertson D. 2004. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant Pathology* 5: 149–156.
- Hao L, Wang H, Sunter G, Bisaro DM. 2003. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell* 15: 1034–1048.
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 42: 819–832.
- Hormuzdi SG, Bisaro DM. 1995. Genetic analysis of beet curly top virus: examination of the roles of L2 and L3 genes in viral pathogenesis. *Virology* 206: 1044–1054.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249–264.
- Katari MS, Nowicki SD, Aceituno FF, Nero D, Kelfer J, Thompson LP, Cabello JM, Davidson RS, Goldberg AP, Shasha DE *et al.* 2010. Virtualplant: a software platform to support systems biology research. *Plant Physiology* 152: 500–515.
- Lai J, Chen H, Teng K, Zhao Q, Zhang Z, Li Y, Liang L, Xia R, Wu Y, Guo H *et al.* 2008. RKP, a ring finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. *Plant Journal* 57: 905–917.
- Latham J, Saunders K, Pinner M, Stanley J. 1997. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *Plant Journal* 6: 1273–1283.
- Latham JR, Wilson AK. 2008. Transcomplementation and synergism in plants: implications for viral transgenes? *Molecular Plant Pathology* 9: 85–103.
- Lozano-Durán R, Bejarano ER. 2011. Mutation in Arabidopsis CSN5A partially complements the lack of *Beet curly top virus* pathogenicity factor L2. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 2: 1000108.
- Lozano-Durán R, Rosas-Díaz T, Gusmaroli G, Luna AP, Taconnat L, Deng XW, Bejarano ER. 2011. Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 1014–1032.
- Luque A, Sanz-Burgos A, Ramirez-Parra E, Castellano M, Gutierrez C. 2002. Interaction of geminivirus rep protein factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. *Virology* 302: 83–94.
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA. 2003. Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Molecular Biology* 53: 423–442.
- Mills-Lujan K, Deom CM. 2010. Geminivirus C4 protein alters Arabidopsis development. *Protoplasma* 239: 95–110.
- Morilla G, Castillo AG, Preiss W, Jeske H, Bejarano ER. 2006. A versatile transreplication-based system to identify cellular proteins involved in geminivirus replication. *Journal of Virology* 80: 3624–3633.
- Morilla G, Krenz B, Jeske H, Bejarano ER, Wege C. 2004. Tete a tete of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl Sardinia virus in single nuclei. *Journal of Virology* 78: 10715–10723.
- Nagar S, Pedersen TJ, Carrick KM, Hanley-Bowdoin L, Robertson D. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7: 705–719.
- Peart JR, Cook G, Feys BJ, Parker JE, Baulcombe DC. 2002. An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 29: 569–579.
- Pilartz M, Jeske H. 1992. Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology* 189: 800–802.
- Pita JS, Fondong VN, Sangare A, Otim-Nape GW, Ogwal S, Fauquet CM. 2001. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* 82: 655–665.
- Pohl D, Wege C. 2007. Synergistic pathogenicity of a phloem-limited begomovirus and tobamoviruses, despite negative interference. *Journal of General Virology* 88: 1034–1040.
- Raja P, Wolf JN, Bisaro DM. 2010. RNA silencing directed against geminiviruses: post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimica et Biophysica Acta* 1799: 337–351.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal* 25: 237–245.
- Renteria-Canett I, Xoconostle-Cazares B, Ruiz-Medrano R, Rivera-Bustamante RF. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal* 8: 104.
- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43: 361–394.
- Sanchez-Duran MA, Dallas MB, Ascencio-Ibanez JT, Reyes MI, Arroyo-Mateos M, Ruiz-Albert J, Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER. 2011. Interaction between geminivirus replication protein and the sumo-conjugating enzyme is required for viral infection. *Journal of Virology* 85: 9789–9800.
- Sardo L, Wege C, Kober S, Kocher C, Accotto GP, Noris E. 2011. RNA viruses and their silencing suppressors boost Abutilon mosaic virus, but not the old world tomato yellow leaf curl Sardinia virus. *Virus Research* 161: 170–180.
- Seal SE, Jeger MJ, Van den Bosch F. 2006. Begomovirus evolution and disease management. *Advances in Virus Research* 67: 297–316.
- Singh DK, Islam MN, Choudhury NR, Karjee S, Mukherjee SK. 2007. The 32 kDa subunit of replication protein (RPA) participates in the DNA replication of mung bean yellow mosaic India virus (MYMIV) by interacting with the viral rep protein. *Nucleic Acids Research* 35: 755–770.
- Stanley J, Latham JR. 1992. A symptom variant of beet curly top geminivirus produced by mutation of open reading frame C4. *Virology* 190: 506–509.
- Stanley J, Latham JR, Pinner MS, Bedford I, Markham PG. 1992. Mutational analysis of the monopartite geminivirus beet curly top virus. *Virology* 191: 396–405.

- Sunter G, Bisaro DM. 1992. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4: 1321–1331.
- Sunter G, Hartitz MD, Hormuzdi SG, Brough CL, Bisaro DM. 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 DC, Bisaro DM. 1994. Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. *Virology* 203: 203–210.
- Sunter G, Sunter JL, Bisaro DM. 2001. Plants 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.
- Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM. 2005. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends in Plant Science* 10: 144–151.
- Vanitharani R, Chellappan P, Pita JS, Fauquet CM. 2004. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 78: 9487–9498.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* 33: 949–956.
- Wang H, Buckley KJ, Yang X, Buchmann RC, Bisaro DM. 2005. Adenosine kinase inhibition and suppression of rna silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology* 79: 7410–7418.
- Wang H, Hao L, Shung CY, Sunter G, Bisaro DM. 2003. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 15: 3020–3032.
- Wege C, Siegmund D. 2007. Synergism of a DNA and an RNA virus: enhanced tissue infiltration of the begomovirus abutilon mosaic virus (AbMV) mediated by cucumber mosaic virus (CMV). *Virology* 357: 10–28.
- Yang X, Baliji S, Buchmann RC, Wang H, Lindbo JA, Sunter G, Bisaro DM. 2007. Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction. *Journal of Virology* 81: 11972–11981.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 *Beet curly top virus* (BCTV) DNA accumulation is not affected by co-infection with *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) or mutations in C2, C4 or V2 genes

Fig. S2 Rep-dependent green fluorescent protein (GFP) expression and mGFP production are enhanced by *Beet curly top virus*

(BCTV) C2, but not by *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) C2.

Fig. S3 *Beet curly top virus* (BCTV) Rep-dependent green fluorescent protein (GFP) expression and mGFP production from BCTV 2IR constructs are enhanced by C2, but not by C4 or V2.

Fig. S4 *Beet curly top virus* (BCTV) C2 does not enhance the accumulation of RNA viruses.

Fig. S5 Expression levels of cell cycle and DNA packaging genes in *Arabidopsis* transgenic plants expressing *Beet curly top virus* (BCTV) C2 or *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) C2.

Fig. S6 *Beet curly top virus* (BCTV) C2 induces the expression of CDKB2, CYCA1 and CYCA2 in *Nicotiana benthamiana*.

Fig. S7 Wild-type *Beet curly top virus* (BCTV) C2 and C2-2 mutant, but not C2-3 mutant, induce the expression of CDKB2, CYCA1 and CYCA2 in transgenic 2IRGFP *Nicotiana benthamiana* plants.

Table S1 Oligonucleotides used in this work

Table S2 Primer combinations used to amplify plant or viral genes

Table S3 Probes used in this work

Methods S1 Additional information for experimental procedures.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.