

“En el espejo del universo ve Su reflejo y en el espejo del hombre Se contempla y Se ve a Sí mismo”.

Ibn Arabi



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

*Delimitación de secuencias involucradas en el
silenciamiento y transactivación de los genes
tardíos del Virus Huasteco del Chile (PHV)*

Tesis que presenta

Alejandro Juárez Reyes

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

San Luis Potosí, S.L.P., 12 de Enero de 2007



IPICYT

La tesis "***Delimitación de secuencias involucradas en el silenciamiento y transactivación de los genes tardíos del Virus Huasteco del Chile (PHV)***" presentada para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Alejandro Juárez Reyes** y aprobada el **12 de Enero del 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

Dr. Sergio Casas Flores

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís



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

Durante la realización de este trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 192570) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

El proyecto de investigación realizado fué financiado con recursos otorgados al Dr. Gerardo Argüello Astorga por el CONACYT (proyecto SEP-2003-C02-42639).



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 030 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores	Presidente	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Secretario	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Alejandro Juárez Reyes

sobre la Tesis intitulada:

Delimitación de Secuencias Involucradas en el Silenciamiento y Transactivación de los Genes Tardíos del Virus Huasteco del Chile (PHV)

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

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

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes enero de 2007.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



DEDICATORIAS

A mis padres Gonzalo y Marilú, por creer en mí, a veces más de lo que yo creo, por su amor, paciencia, enseñanzas y guía en los momentos más difíciles, que me han llevado a ser lo que soy ahora.

A mis hermanas Amida y Lucy, por todos los momentos que pasamos juntos y por sus esfuerzos en sus respectivos caminos.

A la majestuosa madre tierra y todas sus criaturas.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por permitirme jugar otra vida.

A mis padres Marilú y Gonzalo, por su apoyo y oración para poder realizar este trabajo.

Al Dr. Gerardo Argüello, por su amistad, dirección, enseñanzas y por compartir su fascinación y respeto por la naturaleza.

A Josefát, Bernard, Mayte y Xavier, por su ejemplo, amistad, observaciones y favores.

Al Dr. Sergio Casas, por su amistad y apoyo, y al Dr. Ángel Alpuche por sus importantes observaciones.

Al Dr. Rafael Rivera Bustamante en CINVESTAV-Irapuato, por las facilidades para poder realizar parte de este trabajo, y a la candidata a Doctora Rosa María Rangel Cano por el cuidado y obtención de diferentes plantas transgénicas.

A Salvador y Ruth, por su auxilio técnico, a **todos** mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por su amistad y momentos de convivencia. Y a **todos** mis amigos de otros laboratorios.

A la Sra. Rosita y demás personal de limpieza, cuyo trabajo silencioso es valioso para el eficiente trabajo de laboratorio.

A todos los miembros del Instituto, de los que tengo gratos recuerdos y también en especial a los que aportaron algo para mi formación durante clases, cursos y seminarios.

A CONACYT, por la beca otorgada, y al IPICYT por haberme aceptado como uno de sus estudiantes.

ÍNDICE

Constancia de aprobación de la tesis	<i>i</i>
Creditos Institucionales	<i>ii</i>
Dedicatorias	<i>iii</i>
Agradecimientos	<i>iv</i>
Lista de Figuras	<i>viii</i>
Lista de Tablas	<i>xi</i>
Lista de Material Suplementario	<i>xi</i>
Resumen	<i>xii</i>
Abstract	<i>xiii</i>
INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades y clasificación.....	1
2. Organización genómica de los geminivirus.....	2
3. Regulación temporal de la expresión génica: definición de genes virales “tempranos” y “tardíos”.....	5
4. Regulación de los genes tempranos AC1, AC2 y AC3.....	5
4.1 Autoregulación del gen AC1 (Rep).....	5
4.2 Regulación de los genes AC2 y AC3.....	6
5. Control de la expresión del gen CP de geminivirus.....	7
5.1 Regulación de CP por proteínas virales.....	7
5.2 Evidencia de control del gen CP por elementos activadores y represores.....	8
5.2.1 Delimitación de un elemento silenciador en TGMV.....	8
5.2.2 Identificación de un silenciador en PHV.....	9
5.3 Analogías funcionales del silenciador de CP con otros silenciadores virales y celulares.....	10
5.4 Delimitación de elementos involucrados en la transactivación del gen CP.....	10
5.4.1 Mapeo de los elementos reguladores en TGMV.....	12
5.4.2 Mapeo de los elementos de respuesta en BGMV.....	12
5.4.3 Caracterización funcional de los CLEs.....	12
6.0 Regulación de otros genes tardíos de geminivirus: BC1 y BV1.....	13
7.0 Funciones de TrAP como factor transcripcional y supresor del silenciamiento mediado por ARN de interferencia.....	14

8.0 Arreglos modulares conservados en promotores CP.....	15
OBJETIVO GENERAL.	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	20
MATERIALES Y MÉTODOS.	21
Oligonucleótidos.....	21
Apareamiento de oligonucleótidos para producir ADN de doble cadena.	22
Plásmidos.....	22
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
Aislamiento y manipulación enzimática del ADN.....	23
Cepas bacterianas empleadas para la producción de células competentes.	23
Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> por cloruro de calcio.....	24
Transformación de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico.....	25
Obtención de ADN plasmídico por minipreps de <i>Escherichia coli</i>	26
Obtención de ADN plasmídico por maxipreps de <i>Escherichia coli</i>	27
Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	29
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación.....	30
Obtención de plantas transgénicas.....	31
Cuantificación de GUS por fluorometría.....	31
Detección histoquímica de GUS.....	32
Extracción de ADN viral de plantas.....	33
RESULTADOS	34
Construcciones para delimitar el silenciador de PHV.....	34
Generación de vectores de expresión con los fragmentos Sil-100 y Sil-140 en orientación nativa con respecto a CP.....	35
Generación de vectores binarios para el análisis funcional de las construcciones Sil-proCP-GUS.....	36
Transferencia de los módulos de expresión a vectores binarios.....	40
Construcciones con CMAs que contienen elementos CLE para su análisis funcional.....	42

Generación de vectores de expresión para el análisis del CMA tripartita “CHAT” (CCAAT/ H3-box/ AT-rich motif).....	44
Generación de plantas transgénicas de tabaco con diversas construcciones CMA-promotor mínimo-GUS.....	47
Análisis histoquímico de la expresión del gen reportero en las plantas transgénicas.....	48
Verificación por PCR de la naturaleza transgénica de las plantas generadas.....	49
Resultados del ensayo de GUS por fluorimetría.....	49
DISCUSIÓN	52
Material Suplementario.....	57
REFERENCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Micrografía electrónica de geminivirus.
- Figura 2.** Diagrama simplificado del ciclo de replicación del ADN en geminivirus.
- Figura 3.** Componentes genómicos del Virus Huasteco del Chile (PHV).
- Figura 4.** Región intergénica del componente A de un begomovirus bipartita.
- Figura 5.** Traducción de diferentes ORFs por “leaky scanning”.
- Figura 6.** Posibles interacciones en las regiones silenciadoras de TGMV y PHV debidas a secuencias palindrómicas.
- Figura 7.** Promotores heterólogos que contienen CLEs, para evaluar su función por experimentos de expresión transitoria.
- Figura 8.** Estructura y distancia de los elementos tardíos conservados en el promotor CP de PHV.
- Figura 9.** Tasa de expresión del gen reportero mediada por TrAP en diferentes versiones del promotor truncado CP.
- Figura 10.** Combinación de secuencias de ADN conservadas (“motifs”) que componen la región temprana de los tres linajes principales de begomovirus.
- Figura 11.** CMA constituido por tres elementos distintivos, el CLE, la caja TATA y el motivo TAPE, presente en begomovirus del viejo mundo.
- Figura 12.** Elementos conservados en la región de transactivación y regulación negativa en el promotor CP de TGMV.
- Figura 13.** Algunas posibles líneas de evolución de promotores tardíos de Begomovirus originarios de Asia y Australia.
- Figura 14.** Hipótesis sobre la evolución del promotor CP de begomovirus del NM a partir del promotor V2 de begomovirus asiáticos.
- Figura 15.** Crecimiento de plantas transgénicas de *Nicotiana tabaccum* en condiciones *in vitro*.
- Figura 16.** Vector pCP693B para realizar los ensayos de expresión transitoria.
- Figura 17.** Electroforesis de los productos de PCR que contienen las versiones mínimas del silenciador.
- Figura 18.** Pares de iniciadores empleados para amplificar una parte del genoma viral que contiene el silenciador.
- Figura 19.** Diagrama simplificado de los diferentes casetes silenciador-promotor-reportero.
- Figura 20.** Vector binario pBI121.

Figura 21. Secuencia nucleotídica del polilinker sintético que fué clonado en pBI121.

Figura 22. Vector binario pBIΔGUS.

Figura 23. Análisis de restricción del plásmido pBIΔGUS.

Figura 24. Comprobación de eliminación del sitio *NotI* en pBIΔGUS por digestión con *NotI*.

Figura 25. Comprobación de la incorporación de una parte del polilinker de pBS II SK (+) en el vector pBIθGUS.

Figura 26. Sitio múltiple de clonación en el vector pBIΩGUS.

Figura 27. Comprobación de la obtención de diferentes vectores binarios con las construcciones silenciador-promotor-reportero.

Figura 28. Electroforesis de las clonas potenciales de ser pBIΩGUSSil100*_{inv.} y pBIΩGUSSil140*_{inv.}

Figura 29. Electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la presencia de plásmidos en *Agrobacterium tumefaciens*.

Figura 30. Diferentes oligonucleótidos con tres copias del CLE que se emplearon para construir los vectores pBI46S 3CLE, pBI46S 6 CLE y pBI90S 3CLE.

Figura 31. Dos de los módulos complejos conservados que se estudian en este trabajo.

Figura 32. Apareamiento de los oligonucleótidos *DIR-CCAAT-CMA* y *COM-CCAAT-CMA*.

Figura 33. Diagrama simplificado del plásmido pBI46S.

Figura 34. Electroforesis de comprobación de la incorporación del CMA (CCAAT-CCTGA-AGATA) en pBI 46S.

Figura 35. Análisis del promotor 35S de CaMV.

Figura 36. Apareamiento de los oligonucleótidos *DIR 3-CLE-DH* y *COM 3-CLE-DH*.

Figura 37. Electroforesis de la digestión con *HindIII* para determinar la orientación del inserto 3 –CLE en el vector pBI46SCMA.

Figura 38. Micrografías de los ensayos de GUS histoquímico en hojas de algunas líneas de plantas transgénicas.

Figura 39. Productos de PCR de los genes *nptII* y *uidA* (GUS) presentes en algunas líneas de plantas transgénicas.

Figura 40. Nivel de expresión del reportero GUS medido en ensayos fluorométricos de diferentes líneas de tabaco transgénico.

Figura 41. Promedio y desviación estándar de la actividad de GUS en ensayos fluorométricos sobre diferentes líneas de tabaco transgénico.

Figura 42. Razón de actividades del gen reportero en las líneas transgénicas con respecto al control.

Figura 43. Expresión diferencial de GUS en líneas de tabaco transgénico con respecto al control (-) de tabaco no transformado que representa la medición de fondo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la familia *Geminiviridae*.

Tabla 2. Genes y proteínas de los geminivirus bipartitas.

Tabla 3. Silenciadores presentes en algunos genes de diferentes organismos.

Tabla 4. Oligonucleótidos e iniciadores empleados en el presente trabajo.

Tabla 5. Actividad de GUS en diferentes líneas de tabaco transgénico con diferentes elementos de CMAs.

LISTA DE MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figura S1. Origen de los plásmidos descritos en este estudio.

Figura S2. Secuencia genómica del componente A del Virus Huasteco del Chile (PHV).

Figura S3. Alineamiento obtenido por el método Clustal (DNASstar) de la región de 300 pb (*Bam*HI – *Nhe*I) de TGMV, con la región homóloga en PHV.

Tabla S1. Resumen de la identificación y análisis de elementos CLE y elementos similares al CLE.

RESUMEN

El virus huasteco del chile (PHV) es un miembro de la familia *Geminiviridae*, la cual comprende virus de plantas con un genoma de ADN circular de cadena sencilla y una cápside con apariencia geminada. Varias líneas de evidencia indican que los geminivirus siguen programas de regulación temporal en la expresión de sus genes, al igual que la mayoría de los virus conocidos. Estudios previos han permitido identificar algunos elementos cis-reguladores que controlan la transcripción de los llamados “genes tardíos”. Uno de ellos es el llamado “elemento tardío conservado” (CLE) que funciona, aparentemente, como un blanco funcional de la proteína viral TrAP, involucrada en la transactivación de los genes *CP* (proteína de la cápside) y *BVI*, y otro elemento relevante es un silenciador que funciona de manera atípica, con actividad restringida al promotor *CP*.

La presente investigación está orientada a analizar las secuencias reguladoras del promotor *CP* de PHV, especialmente el silenciador localizado en una región codificante del virus, así como a la caracterización funcional de algunos elementos conservados en los promotores *CP* de begomovirus. Para esto se construyeron casetes de expresión compuestos por el gen reportero *GUS* bajo el control de diversos promotores híbridos de origen viral, los cuales fueron integrados en dos clases de vectores: unos apropiados para ensayos de expresión transitoria en células vegetales, construídos previamente por Gómez-Castañón (2004), y otros para la transferencia del casete de expresión al genoma de las plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*, generados en este trabajo.

A fin de delimitar el elemento silenciador del gen *CP*, fragmentos progresivamente menores de la región genómica de PHV donde dicha actividad ha sido mapeada se colocaron corriente arriba de un promotor *CP* truncado (-697 a +24), que es activo en tejido vascular. De este modo fueron creados seis vectores binarios que fueron transformados a *Agrobacterium tumefaciens* y serán utilizados para generar plantas transgénicas de tabaco. Se construyó además un vector binario en el que el silenciador del virus del mosaico dorado del tomate (TGMV), se fusionó al promotor *CP* de PHV, para determinar si ese silenciador viral tiene un efecto funcional sobre un promotor heterólogo.

Finalmente, se generaron vectores de expresión tanto para ensayos transitorios como para sistemas de expresión estable (“transgénicos”), que contienen promotores sintéticos con múltiplos del CLE, o diferentes combinaciones de elementos evolutivamente conservados en los promotores *CP* de Begomovirus, denominados “Módulos Complejos Conservados”. Siete de estas construcciones fueron transferidas a plantas de tabaco por medio de *A. tumefaciens*, obteniéndose varias líneas independientes en todos los casos. Los datos de expresión preliminares obtenidos de hojas de plantas T₀ jóvenes, indican que la mayor parte de las mismas expresan al gen reportero, aunque los niveles de expresión fueron de muy bajos a moderados, en ausencia de factores virales. Ensayos de transactivación por TrAP por medio de inoculación de las plantas transgénicas con los genomas virales, o por bombardeo de vectores que expresen TrAP, harán posible determinar el papel de las secuencias examinadas en el proceso de activación de la expresión de genes tardíos. Estos ensayos se habrán de llevar a cabo una vez que se obtenga la generación T₁ de las líneas transgénicas originales.

PALABRAS CLAVE: Geminivirus, gen *CP*, secuencias reguladoras, silenciador transcripcional, Arreglos Modulares Conservados, Elemento Tardío Conservado.

ABSTRACT

Pepper Huasteco Virus (PHV) is a member of the *Geminiviridae* family, which groups plant viruses with circular ssDNA genomes and a geminate capsid morphology. Several lines of evidence indicate that geminiviruses follow temporal regulation programs of gene expression, like most of known viruses. Previous studies have allowed to identify some cis-regulatory elements involved in transcription control of “late genes”. One of them is the “Conserved Late Element” (CLE), which apparently works as a functional target of TrAP, a virus-encoded protein involved in transactivation of both CP (encoding the capsid protein) and BV1 genes. The other one is a transcriptional silencer which activity is restricted to the CP promoter in vascular tissues.

The aim of this work is to analyze regulatory sequences of the PHV CP promoter, especially the silencer element located in a virus coding region, as well as functional characterization of some conserved elements in CP promoters of begomoviruses. For this purpose, we constructed a series of expression cassettes made up of the GUS reporter gene under the control of diverse hybrid promoters of viral origin, which were integrated into two kind of vectors: ones appropriate for transitory expression assays in vegetal cells, previously constructed by Gómez-Castañón (2004), and others for transfer of expression cassettes to the plant genome by an *Agrobacterium tumefaciens*-based system, which were generated in this work.

In order to delimit the silencer element of the CP gene, progressively smaller fragments of a PHV genomic region where the silencer activity was previously mapped were placed upstream of a truncated CP promoter (-697 to +24), that is active in vascular tissues. In this way six binary vectors were created, which were transformed into *Agrobacterium tumefaciens*, and will be further employed to generate tobacco transgenic plants. In addition, a binary vector was constructed in which the silencer of *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), was fused to the CP promoter of PHV, to determine if this silencer element has a functional effect on a heterologous viral promoter.

Finally, expression vectors for both transitory assays and stable expression systems were generated; these vectors contained synthetic promoters with either CLE multimers or different combinations of evolutionarily conserved elements of begomovirus CP promoters, denominated “Conserved Modular Arrangements” (CMAs). Seven of these constructions were transferred onto tobacco plants by means of *A. tumefaciens*, and several independent lines of transgenic plants were obtained in all cases. Preliminary expression data showed that most of plants carrying these chimerical genes display detectable levels of the reporter gene in absence of viral factors, ranging from very weak to moderate levels. Transactivation assays by means of transgenic plant microparticle bombardment with either complete viral genomes or TrAP expression vectors, will allow to determine the role of the examined sequences in activation of late genes expression. These assays will be done until T₁ generation of transgenic plant lines had been grown to an appropriate size.

KEY WORDS: Geminivirus, CP gene, regulatory sequences, transcriptional silencer, Conserved Modular Arrangements, Conserved Late Element.

INTRODUCCIÓN

1. Geminivirus: Generalidades y Clasificación

Los *Geminivirus* constituyen una gran familia de virus que infectan una amplia variedad de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Muchas de las plantas que infectan los geminivirus son de consumo humano, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas en los cultivos de las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Estos virus tienen la característica única de que la cápside de la partícula viral tiene la forma de dos icosaedros fusionados parcialmente al observarse con microscopio electrónico. La partícula viral tiene un tamaño aproximado de 22 nm de diámetro x 38 nm de largo (Figura 1).

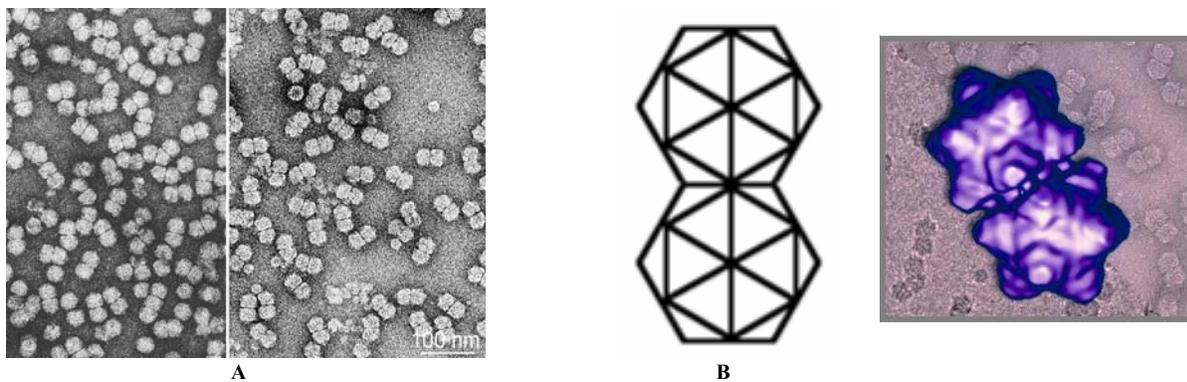


Figura 1. A) Micrografía electrónica de geminivirus.

B) Geometría de las partículas geminadas.

A diferencia de la gran mayoría de virus de plantas cuyo genoma es de ARN, los geminivirus se caracterizan por un genoma circular de ADN de cadena sencilla (ADNcs) cuyo tamaño oscila entre 2.5 y 3.0 kb. En base a la organización genómica, al insecto vector que los transmite y al tipo de hospedero que infectan, los geminivirus se clasifican actualmente en cuatro géneros: Mastrevirus, Curtovirus, Topocovirus y Begomovirus (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la familia *Geminiviridae*.

Familia <i>Geminiviridae</i>			
GÉNERO	GENOMA	PLANTAS HOSPEDERAS	INSECTO VECTOR
Mastrevirus	Monopartita	Monocotiledóneas y Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)
Curtovirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)
Topocovirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Membracidos (<i>Membracidae</i>)
Begomovirus	Monopartita ó Bipartita	Dicotiledóneas	Mosquita blanca (<i>Aleyrodidae</i>)

Los geminivirus solo contienen unos cuantos genes en su genoma y no codifican para ARN- o ADN- polimerasas, por lo que dependen enteramente de la célula huésped para emplear las funciones de estas enzimas.

La replicación de geminivirus requiere de dos orígenes de replicación, uno para la formación de la cadena complementaria (-) al ADNc genómico, y otro para la replicación de la cadena original (+). Sin embargo, el sitio origen para la formación de la cadena complementaria (-) no se encuentra bien definido en los diferentes virus. Este proceso ocurre en el núcleo a través de dos etapas principales: 1) La conversión de genomas de ADNc en intermediarios de ADN de doble cadena y, 2) Replicación por círculo rodante (RCR). Finalmente las moléculas de ADN de doble cadena forman minicromosomas que sirven de base para la transcripción y replicación posterior. A diferencia de otros virus la replicación no requiere de intermediarios de ARN en ninguna parte de este proceso (Figura 2).

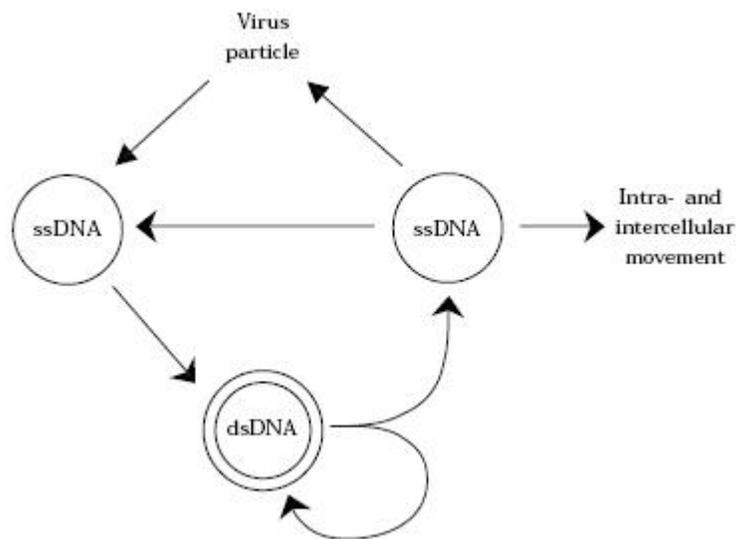


Figura 2. Diagrama simplificado del ciclo de replicación del ADN en geminivirus. (Reproducido de Gutierrez, C., 2002).

Varias evidencias apuntan al hecho de que la replicación viral está de alguna manera acoplada a la vía de regulación del ciclo celular en la célula huésped. Por esta razón los geminivirus son excelentes sistemas modelo para entender la regulación de la replicación y el ciclo celular en plantas.

2. Organización genómica de los geminivirus

Todos los virus pertenecientes al grupo de los geminivirus presentan genomas pequeños y circulares de ADN de cadena sencilla (2.5 – 3.0 Kb). Los genes se encuentran organizados en dos bloques divergentes, los codificados en la cadena del virión (+) y los codificados en la cadena complementaria (-). Ambos grupos génicos se encuentran separados por una región intergénica (IR) en la cual se encuentra el origen de replicación (+) y dos promotores divergentes cuyos límites exactos y elementos funcionales no se han definido todavía. En la región intergénica

existe un segmento con el potencial de formar una estructura tallo-asa que es indispensable para la replicación; dentro de esta estructura se encuentra un motivo nonamérico conservado universalmente en los geminivirus (5'-TAATATT↓AC-3') el cual es reconocido por la proteína de replicación (Rep) como sustrato endonucleolítico, en el cual produce un corte entre las posiciones 7 y 8. Los genes que son transcritos a partir de la cadena de ADN que tiene la misma polaridad que el ADN(+) encapsidado se denominan genes en sentido del virión, mientras que los genes codificados por la otra cadena se denominan genes en sentido complementario.

En el caso de los Begomovirus bipartitas, como lo es el *Virus Huasteco del Chile* (PHV), los componentes genómicos se han denominado A y B (Figura 3), (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). En la región intergénica de ambos componentes se encuentra una región de aproximadamente 200 pb que está altamente conservada entre los dos componentes de un mismo virus, por lo que se le denomina región común (CR). Dentro de esta región común se encuentra el elemento tallo-asa indispensable para la replicación. Un virión solo contiene espacio suficiente para portar un genoma en su interior, por tal razón se requieren partículas virales de los dos tipos para que se produzca la infección, ya que el componente B es incapaz de replicarse en ausencia del componente A y el componente A no puede distribuirse por la planta en ausencia de los factores codificados en el componente B (Stanley y Gay, 1983).

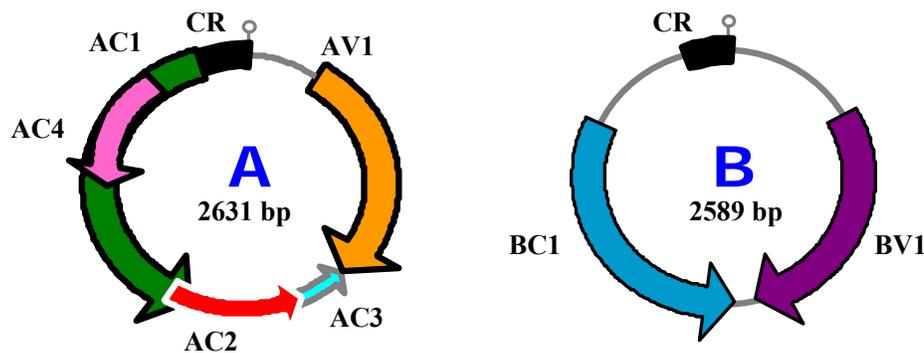


Figura 3. Componentes genómicos del *Virus Huasteco del Chile* (PHV). Miembro del grupo de los Begomovirus bipartitas.

Los genes necesarios para la replicación y la encapsidación se encuentran codificados en el componente A en el cual se encuentran cinco genes principales: AV1, AC1, AC2, AC3 y AC4, mientras que en el componente B se encuentran los genes BV1 y BC1 que están involucrados en el movimiento sistémico del virus y en la producción de síntomas (Tabla 2).

Las reglas para denominar los genes son simples: la primera letra indica a cual componente viral pertenece el gen, la segunda letra indica si el gen está codificado en la cadena original del virión (V) o en la cadena complementaria (C) que se produce durante la replicación. La tercera posición designó originalmente el orden de aparición de los genes con respecto al origen de replicación viral (+). Esta última regla ya no se cumple para los últimos genes identificados como AC4 el cual corresponde a un pequeño marco de lectura abierto dentro del gen AC1 en virus como SiGMV (Hofer *et al.*, 1997), PHV y TGMV, y para el gen AV2 en algunos virus, cuyo marco de lectura abierto aparece antes del de AV1.

AC1: codifica para la proteína Rep, la única proteína del virus indispensable para su replicación. Varios estudios han mostrado que Rep interactúa con retinoblastoma (Rb), una proteína reguladora del ciclo celular en mamíferos, y su homólogo en plantas pRBR, por lo que puede tener funciones similares en regular el ciclo celular de la planta infectada. AC1 es el único ejemplo de una proteína con funciones tanto en la transcripción como en la replicación viral.

AC2: Codifica para la proteína TrAP, la cual es un activador transcripcional de los genes tardíos AV1 y BV1. El mecanismo de acción de TrAP parece ser diferente según el tipo de tejido. También se propone que puede activar genes propios de la planta.

AC3: Codifica para la proteína REn (“Replication Enhancer”). Es una proteína potenciadora de la replicación y del desarrollo de síntomas en la planta, el probable resultado de la estimulación de la replicación. En el geminivirus TGMV REn interactúa con Rep y con una proteína relacionada a retinoblastoma en plantas (pRBR).

AV1: Este gen codifica para la proteína de la cápside CP. En los geminivirus monopartitas es indispensable para el movimiento sistémico.

BV1: Codifica para la proteína NSP (“Nuclear Shuttle Protein”). Esta proteína está relacionada con el transporte del ADN viral naciente hacia el citoplasma, con el movimiento célula-célula y con el movimiento sistémico en la planta. Al parecer actúa cooperativamente con MP.

BC1: Codifica para la proteína MP, necesaria para el movimiento célula-célula. Algunos datos indican que BC1 ejerce un papel al modificar el límite de exclusión de los plasmodesmos. Posee propiedades de unión al ADN y es capaz de transportar ADNs en el rango de 2.5 – 5.5 Kb, de célula a célula (Gilbertson *et al.* 2003).

Tabla 2. Genes y proteínas de los geminivirus bipartitas.

GENES Y PROTEINAS DE LOS BEGOMOVIRUS BIPARTITAS			
GEN	Antiguo nombre del GEN	PROTEÍNA	DESCRIPCIÓN BREVE.
AC1	AL1	Rep	Proteína esencial para la replicación.
AC2	AL2	TrAP	Proteína transactivadora de AV1 y BV1.
AC3	AL3	REn	Proteína potenciadora de la replicación.
*AC4	AL4	AC4	Proteína con funciones de supresión de la respuesta de silenciamiento en la planta.
AV1	AR1	CP	Proteína de la cápside.
BV1	BR1	NSP	Proteína de transporte nuclear.
BC1	BL1	MP	Proteína de movimiento.

Debido a la estructura genómica simple de los geminivirus y a su dependencia de varias moléculas propias de la planta, estos se han convertido en modelos ideales para el estudio de procesos de regulación transcripcional, replicación del ADN, control del ciclo celular, crecimiento celular, diferenciación y tráfico molecular en plantas completas.

3. Regulación temporal de la expresión génica: definición de genes virales “tempranos” y “tardíos”.

Los organismos procariotes y eucariotes poseen mecanismos para expresar diferencialmente sus genes en un determinado momento de su desarrollo ó en presencia de una condición interna ó externa en particular. De igual manera en los virus se observan programas para coordinar la expresión de sus genes. Estos programas resultan de vital importancia para completar sus ciclos de replicación y sin ellos no se producirían infecciones exitosas. La mayoría de los virus presentan sus propias proteínas de regulación, sin embargo esta regulación en muchos casos requiere que las proteínas del virus interaccionen con otras proteínas del hospedero para que se produzca su función.

Como muchos otros virus, los geminivirus requieren de la maquinaria de replicación, transcripción y traducción de la célula para poder expresar la información de su genoma y mantenerse como entidades replicantes. Inicialmente requieren de la ADN polimerasa para sintetizar ADN de doble cadena, y posteriormente requieren de la ARN polimerasa II celular, de factores de activación y co-activadores del huésped para llevar a cabo la transcripción de sus genes.

En las etapas tempranas de la infección se requiere la presencia de las proteínas Rep y REn, la transcripción de sus respectivos genes (AC1 y AC3) debe ser llevada a cabo en ausencia de cualquier factor viral. Estos genes que se activan inicialmente durante la infección son llamados “genes tempranos”, mientras que los genes que su expresión empieza a aumentar en etapas posteriores de la infección son llamados “genes tardíos”, como lo son el gen de la cápside AV1 y los genes de movimiento BV1 y BC1.

4. Regulación de los genes tempranos AC1, AC2 y AC3.

La regulación de la transcripción en begomovirus ha sido ampliamente estudiada tanto en plantas transgénicas como en sistemas de protoplastos (Revisado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Shivaprasad *et al.*, 2005)

4.1 Autoregulación del gen AC1 (Rep).

El producto del gen AC1, Rep, funciona como un regulador negativo por “feedback” de su propio promotor. Se cree que el mecanismo por el cual ocurre esto es debido a que Rep tiene la capacidad de unirse a secuencias repetidas, llamadas iterones, que son compartidas por el origen de replicación y el promotor localizadas dentro de la región común entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción de AC1, por lo que probablemente interfiere con la unión de la ARN polimerasa ó su progreso durante la transcripción (Figura 4) (Eagle *et al.*, 1994). AC1 tiene la propiedad de regular negativamente su propia expresión al unirse a iterones localizados entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción (Eagle *et al.*, 1994).

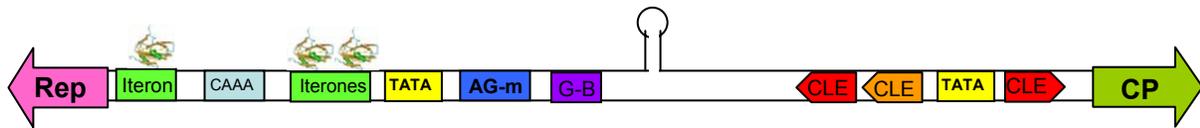


Figura 4. Región intergénica del componente A de un begomovirus bipartita.

Uno de los primeros trabajos de geminivirus en los que se prueba el efecto de los diferentes productos génicos sobre la expresión de los genes virales se realizó con ACMV. En este trabajo fué mostrada una disminución en el nivel de expresión del gen AC1 cuando se encontraba en presencia de su propio producto (Haley *et al.*, 1992).

En TGMV también fué mostrado que AL1 actúa a nivel de la transcripción al reprimir específicamente la actividad de su propio promotor. Estudios previos establecieron que AL1 se une a una secuencia de 13-pb (5'GGTAGTAAGGTAG) que es esencial en la actividad del origen de replicación en TGMV. Análisis posteriores demostraron que este mismo sitio, localizado entre el sitio de inicio de la transcripción y la caja TATA en el promotor, también media la represión transcripcional (Eagle *et al.*, 1994).

La regulación negativa de AL1 por su propio producto es compleja e involucra múltiples secuencias en *cis*, así como las proteínas AL1 y AL4 en TGMV (Eagle y Hanley-Bowdoin, 1997). En este estudio se encontraron dos secuencias que contribuyen a la regulación negativa del promotor de AL1; una localizada 47 pb corriente arriba de la secuencia líder del transcrito mayor que contiene AL1, en el cual se encuentra una copia parcial invertida del sitio de unión de Rep (13-17 pb). La otra secuencia reguladora está relacionada con la represión por AL4, y se mostró que la represión del promotor de AL1 por AL4 es independiente del sitio de unión de AL1.

4.2 Regulación de los genes AC2 y AC3

La expresión de los genes AC2 y AC3 ocurre a partir de un mismo transcrito AC2/3 en el virus bipartita MYMV; este transcrito está mapeado de modo preciso, y es dirigido por un promotor fuerte localizado justo arriba del ORF de AC2. Diversas evidencias indican que la traducción de AC3 es producida por “leaky scanning” a partir del transcrito dicistrónico AC2/3 (Shivaprasad *et al.*, 2005). En el mecanismo de “leaky scanning” se pueden traducir diferentes ORF’s de un transcrito bicistrónico debido a que las subunidades ribosómicas pasan por alto, con frecuencia variable, el primer codón de inicio y empiezan la traducción a partir de un segundo AUG. Las condiciones para que ocurra esto no son bien conocidas, pero se sabe que los nucleótidos que rodean el primer AUG tienen que ver con el proceso (Figura 5).

Transcritos separados que cubren la región de AC2 y AC3 también han sido mapeados en los begomovirus bipartitas AbMV, TGMV y el monopartita TLCV.

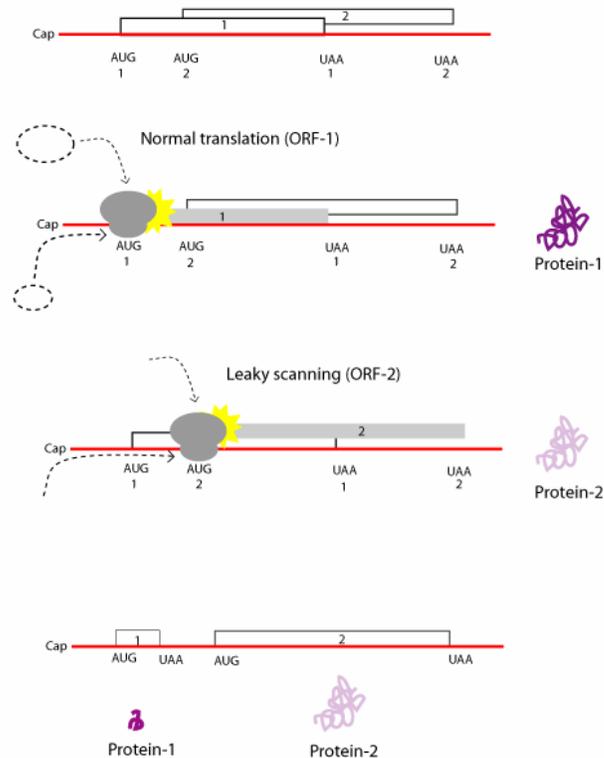


Figura 5. Traducción de diferentes ORFs por “leaky scanning”.

Los virus en general, y los geminivirus muy en particular, economizan las señales requeridas para la expresión de sus genomas. De esta manera para minimizar el tamaño de sus genomas los diferentes elementos como “enhancers” deben ser compartidos por diferentes promotores, los promotores pueden extenderse hasta las regiones codificantes de otros genes ó estar completamente dentro de ellas, se crean múltiples sitios de “splicing” alternativo ó transcritos sobrelapados, los transcritos pueden ser policistronicos o codificar para precursores poliproteicos que al procesarse dan lugar a diferentes proteínas (Shivaprasad *et al.*, 2005).

5. Control de la expresión del gen CP de geminivirus.

Uno de los aspectos más importantes en la regulación de la expresión génica viral, es la regulación temporal de la expresión. Para que ocurra un ciclo infeccioso correcto, algunos genes deben expresarse en etapas tempranas, mientras que otros deben expresarse en las etapas tardías de la infección, tal es el caso del gen AV1 que produce la proteína de la cápside.

5.1 Regulación de CP por proteínas virales

Al igual que otros genes virales, la regulación de la expresión de AV1 ocurre a nivel transcripcional. Los experimentos iniciales en protoplastos de tabaco en los que se sustituyó el ORF de AV1 por el gen reportero GUS mostraron que en presencia de una mutación de AC2 el gen reportero no era expresado a niveles detectables; sin embargo al cotransfectar adicionalmente

esta construcción con un genoma no mutado (“wild-type”) se reestablecía la expresión (Sunter y Bisaro, 1991).

Poco después, en otros experimentos con protoplastos se encontraron resultados similares para ACMV, en los que se observó un claro aumento de la expresión de AC1 cuando se encontraba en presencia del producto de AC2. También se observó un incremento en la expresión de BV1 en presencia de AC2 (Haley *et al.*, 1992). Experimentos posteriores han mostrado que la función activadora de AC2 sobre AV1 puede ser suplementada en *trans* por las proteínas AC2 de algunos virus del mismo grupo, más no por todos, como es el caso de BCTV (Sunter *et al.*, 1994).

El mecanismo por el cual ocurre la expresión de CP mediada por TrAP parece ser diferente en distintos tejidos de la planta. Se han sugerido dos mecanismos diferentes: por activación en mesófilo, y por desrepresión en tejido vascular (Sunter y Bisaro, 1997). La forma de cómo TrAP regula la expresión de CP no se conoce en detalle. Inicialmente se pensó que TrAP actúa directamente sobre secuencias de los promotores tardíos, pero se ha mostrado que TrAP no muestra gran afinidad por el ADN, e incluso muestra mayor afinidad por ADN de cadena sencilla que por ADN de doble cadena.

5.2 Evidencia de control del gen CP por elementos activadores y represores

En 1996 se observó que plantas de tabaco portadoras de un transgén compuesto por el promotor CP ó BV1 truncado de PHV y la secuencia codificante de GUS, presentaban una fuerte actividad del gen reportero en tejido vascular, en ausencia completa de TrAP y cualquier otro factor viral. (Ruiz-Medrano, 1996). De igual manera Sunter y Bisaro (1997), al examinar plantas de *Nicotiana benthamiana* con construcciones transgénicas del promotor CP truncado de TGMV, encontraron una elevada actividad del gen reportero en el floema en ausencia de otros factores virales. Este hecho añadió una nueva pieza al rompecabezas, pero sacó a la luz otro importante fenómeno. La explicación más probable de porque ocurría este fenómeno, era la presencia de un elemento silenciador en algún punto corriente arriba del promotor CP.

5.2.1 Delimitación de un elemento silenciador en TGMV

Con los datos anteriores se supo que además de la activación de AV1 por la proteína TrAP, este gen se encuentra regulado negativamente por un elemento silenciador. El efecto de este elemento ha sido reportado solo para los virus TGMV y PHV. En TGMV ha sido delimitado en una región de 300-pb entre los sitios *Bam*HI y *Nhe*I que corresponden a la región final del gen AC1 y una parte de AC2. En ausencia de esta región silenciadora se observa una alta expresión de AV1 en tejido vascular. Otra propiedad clave de esta región silenciadora es que ejerce las mismas funciones de silenciamiento tanto cuando se encuentra colocado “upstream” como “downstream” del promotor CP, datos que lo hacen encajar en la definición de un silenciador transcripcional clásico (Sunter y Bisaro, 1997). Dentro de la región de 300 pb en la que se ha mapeado el silenciador se encuentra una secuencia palindrómica (5'-GTTTTTCCTCttgtcGAGGAAAAC-3') que podría ser parte crítica del elemento silenciador, puesto que se han encontrado secuencias palindrómicas en otros silenciadores (Tabla 3).

5.3 Analogías funcionales del silenciador de CP con otros silenciadores virales y celulares.

El elemento silenciador de CP tiene las propiedades de ser un silenciador específico de promotor, es decir que solo afecta el nivel de expresión de CP y no tiene efecto sobre los otros genes virales (Sunter y Bisaro, 1997). En la literatura científica existe muy poca información acerca de silenciadores con estas características; un ejemplo de este tipo de silenciador es el del gen PAP, que codifica una proteína que es inducida durante la fase aguda de la pancreatitis en ratas. Este silenciador muestra sus funciones reguladoras en una manera independiente de su posición y orientación con respecto a su promotor específico, pero no ejerce efecto sobre otros promotores como el de la timidin-quinasa de SV40 (Ortiz *et al.*, 1997).

5.4 Delimitación de elementos involucrados en la transactivación del gen CP.

Los primeros estudios en TGMV mostraron que el producto de AC2 es requerido para la expresión del gen CP (Sunter y Bisaro, 1991). Posteriormente, Haley y colaboradores en 1992 encontraron que la expresión de la proteína TrAP aumenta considerablemente la expresión de los genes AV1 y BV1 de ACMV. También se estableció que la función de transactivación de CP por TrAP es intercambiable entre begomovirus lejanamente relacionados (Sunter *et al.*, 1994). La observación de que TrAP funciona de una manera no-específica de virus sugirió que los elementos presentes en los promotores de los genes tardíos CP y BV1 e involucrados en el proceso de transactivación podrían estar también conservados. Dado que TrAP mantiene su capacidad de transactivación aún en promotores heterólogos, se asume que los promotores de los genes tardíos AV1 y BV1 contienen uno ó mas elementos conservados que son blancos funcionales de TrAP, ya sea directa ó indirectamente.

Un análisis de construcciones con el promotor CP de TGMV demostró que los elementos que median la activación por TrAP en células de mesófilo están dentro de los primeros 657 pb del sitio de inicio de CP (Sunter y Bisaro, 1997); esta misma construcción fue capaz de mediar la activación en tejido vascular en ausencia de TrAP. En ese mismo trabajo se dedujo que los elementos requeridos para la activación en tejido vascular se encuentran dentro de los primeros 163 pb del sitio de inicio. Estos datos fueron consistentes con los de un análisis comparativo previo de la región intergénica de geminivirus que infectan dicotiledóneas (Argüello-Astorga *et al.*, 1994). En ese análisis se identificó un elemento con la secuencia consenso GTGGTCCC en la mayoría de los promotores de CP y BV1 examinados. Este elemento fue denominado CLE (“Conserved Late Element”), y se propuso desde entonces que podría ser un blanco funcional de TrAP. Con la identificación teórica de este elemento se tuvo un excelente punto de partida para el análisis funcional de sus propiedades en el laboratorio.

Ruiz Medrano y colaboradores comenzaron a estudiar sus propiedades en experimentos de ganancia de función, en los que un oligonucleótido sintético que contenía dos copias del CLE consenso fué colocado corriente arriba de promotores 35S de CaMV truncados (-46/+8, y -90/+1, respectivamente), que dirigen la expresión del gen reportero *uidA* (GUS). En ensayos de expresión transitoria, al bombardear estas construcciones sobre hojas de tabaco ó chícharo en presencia de una fuente de TrAP, se observó un notable aumento en la expresión del gen reportero. Adicionalmente, se produjeron construcciones con una sola copia del CLE en el promotor digiriendo con una enzima de restricción para la cual existía un sitio único entre las dos copias del CLE, y las construcciones aún fueron capaces de activarse por TrAP (Ver Figura 7).

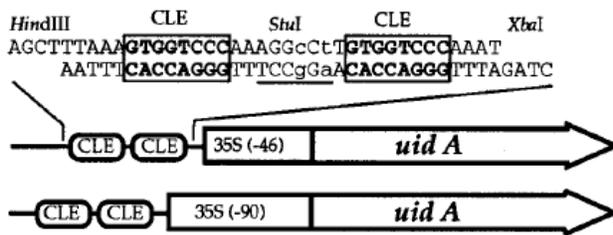


Figura 7. Promotores heterólogos que contienen CLEs utilizados en experimentos de expresión transitoria para evaluar la funcionalidad del CLE. (Tomada de Ruiz-Medrano *et al.*, 1999).

Además de esto se realizaron experimentos de pérdida de función, en los que las tres secuencias con mayor similitud al CLE presentes en el promotor CP de PHV fueron mutadas. Para esto se construyeron vectores con el promotor CP truncado en la posición -693 con respecto al primer codón de traducción de CP, y sobre este vector base se mutaron los CLEs presentes en el promotor (Figura 8). De modo consistente con los resultados anteriores, se observó que la mutación del CLE más proximal al inicio de la transcripción de CP disminuyó casi totalmente la capacidad de respuesta a TrAP, a diferencia del promotor con la secuencia silvestre y que la mutación de ambos elementos similares al CLE ubicados “upstream” de la caja TATA disminuyó también la transactivación mediada por TrAP pero en menor grado.

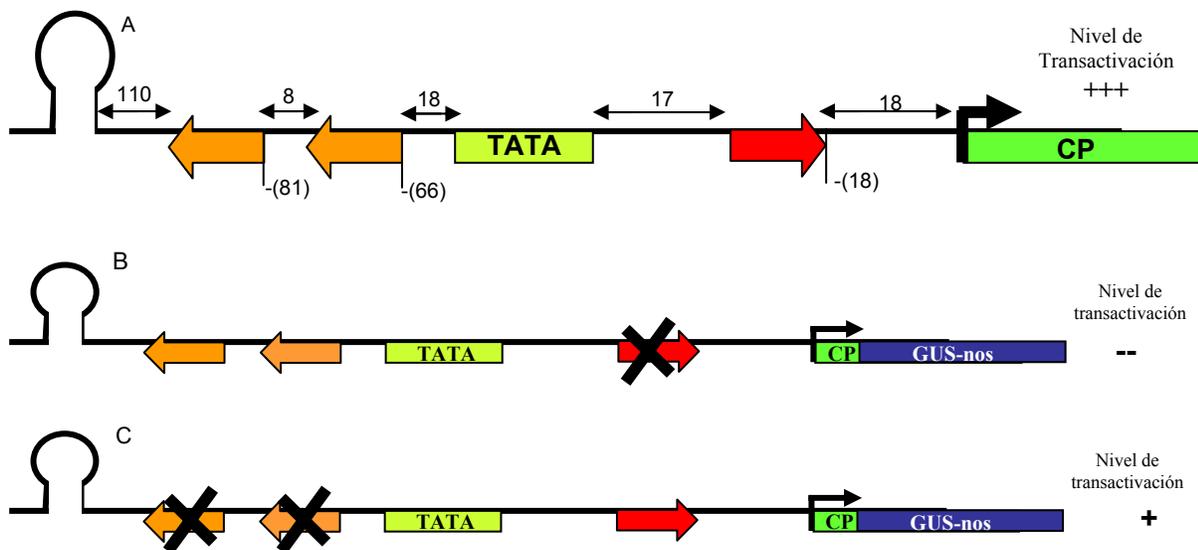


Figura 8. A) Estructura y distancia de los elementos tardíos conservados en el promotor CP del Virus Huasteco del Chile. B) Construcción para evaluar la funcionalidad del CLE proximal a CP en PHV. C) Construcción para evaluar el efecto de los repetidos invertidos del CLE en PHV. La mutación de ambos elementos disminuyó la capacidad de responder a TrAP, pero no la eliminó. El elemento proximal (rojo) es el único con la secuencia idéntica al consenso del CLE. (Tomado de Monsalve-Fonnegra, 2002).

5.4.1) Mapeo de los elementos reguladores en TGMV

Para definir con mayor precisión las secuencias requeridas para la activación por TrAP, Sunter y Bisaro, (2003), construyeron una serie de promotores truncados progresivamente más cortos (-657, -214, -184, -163, -147, -125, -107 y -60) que fueron ligados al gen reportero *uidA*.

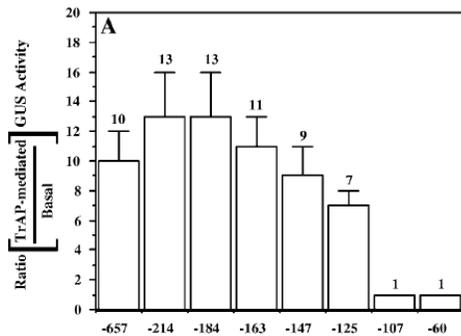


Figura 9. Tasa de expresión del gen reportero mediada por TrAP en diferentes versiones del promotor truncado CP (Tomada de Sunter y Bisaro 2003).

Las construcciones fueron cotransfectadas en protoplastos de *N. benthamiana* en presencia ó ausencia de una fuente de TrAP. La actividad del gen reportero fue medida por fluorometría y se dedujo la presencia de una secuencia importante para la transactivación en la región ubicada de -125 a -107 pb (Figura 9). En esta región de solo 18 pb se localiza el único CLE canónico presente en el promotor CP de TGMV.

5.4.2) Mapeo de los elementos de respuesta en BGMV.

Si bien las evidencias antes citadas apoyan la noción de que el CLE es un elemento de respuesta a TrAP, es claro que no puede ser la única secuencia con esa propiedad, pues existe un número significativo de begomovirus que no contienen CLEs canónicos (es decir, con el consenso GTGGTCCC), particularmente en el continente americano. Uno de estos virus es Bean Golden Mosaic Virus (BGMV) cuyo promotor CP fué analizado por Petty *et al.*, (2001). Estos investigadores fusionaron el gen reportero de la luciferasa a ese promotor viral sin CLEs y caracterizaron su respuesta a TrAP en protoplastos. Sus datos experimentales mostraron que la expresión del gen reportero aumentó considerablemente en presencia de TrAP, tanto de origen homólogo como heterólogo (TGMV). Esto indica que el CLE no es el único elemento que puede mediar la transactivación por esa proteína viral, y plantea el problema de identificar esos elementos de respuesta alternativos de un modo más preciso.

5.4.3) Caracterización funcional de los CLEs

La identificación de secuencias en *cis* requeridas por TrAP para el control transcripcional se ha dificultado porque esta proteína viral no parece poseer actividad de unión secuencia-específica al ADN, *in vitro* (Noris *et al.*, 1996; Sung y Coutts, 1996; Hartitz *et al.*, 1999). En este aspecto TrAP se asemeja a otros transactivadores virales, como el bien caracterizado VP16 de herpesvirus, que interactúan primariamente con otros factores transcripcionales, los cuales son los que interactúan directamente con el ADN.

Si la analogía es correcta, entonces puede esperarse que el CLE, o secuencias similares al consenso del mismo, constituyan el sitio de unión de factores presentes en las plantas. Diversas observaciones indican que esta suposición es correcta. Por ejemplo, se ha encontrado una secuencia similar al CLE (GTGGGCCCGt) identificada dentro del promotor de PCNA (Antígeno Nuclear de Células en Proliferación) en arroz, que une factores transcripcionales de la planta que

contienen el dominio de unión TCP como PCF1-6 y TBP1 (Kosugi y Ohashi, 2002). Por otra parte, la secuencia tccgGTGGGCCCGaaac encontrada en el promotor GapC4 de maíz interactúa con componentes de extractos nucleares de hojas de tabaco (Geffers *et al.*, 2000).

Más recientemente, el laboratorio del Dr. Velten ha reportado evidencia definitiva acerca de la función de los CLEs como elementos activadores de la transcripción en plantas, que refuerzan la actividad de promotores mínimos heterólogos en ausencia de cualquier factor viral. En el primer estudio, Velten *et al.*, (2005) eligieron elementos que se encontraran presentes al menos en dos copias dentro de la región intergénica de diferentes begomovirus, curtovirus y nanovirus. Los elementos identificados fueron colocados inmediatamente corriente arriba de un promotor mínimo funcional en plantas fusionado a un gen reportero de luciferasa. De 105 elementos examinados, solo 14 mostraron un aumento mayor al 25% en la expresión del gen reportero con respecto a la construcción mínima control; de estos 14 elementos 10 se encontraron en secuencias de begomovirus, y 5 de los mismos corresponden al CLE ó secuencias similares al CLE; los restantes 5 elementos incluyeron secuencias ricas en TC, o secuencias similares a la caja G y la caja CAAT (Velten *et al.*, 2005).

En un segundo trabajo del mismo laboratorio, se examinó el efecto sobre la expresión del gen reportero de colocar un número creciente de copias del CLE arriba del promotor mínimo 35S de CaMV. Se encontró que un repetido del CLE duplica la expresión del gen reportero independientemente de la orientación del elemento, y que múltiples copias del elemento incrementan la actividad del reportero en forma aditiva. Adicionalmente, se mostró que sustituciones individuales en 6 de las 8 posiciones de la secuencia consenso del CLE eliminan su capacidad de potenciar la transcripción (Cazzonelli *et al.*, 2005). Dado que estos resultados se obtuvieron en plantas transgénicas no infectadas con virus, resulta evidente que el CLE es reconocido por uno o más factores de la planta que funcionan como activadores transcripcionales. Tales factores, todavía no identificados, podrían interactuar entonces con TrAP para potenciar varias veces la actividad de los promotores virales.

Algunos de los elementos CLE y secuencias similares al CLE que se han identificado se muestran en la tabla S1 del material suplementario (tomada de Cazzonelli *et al.*, 2005).

6.0 Regulación de otros genes tardíos de geminivirus: BC1 y BV1

Se ha mostrado que la expresión de BV1 es regulada positivamente por la proteína AC2 (TrAP) en geminivirus (Haley *et al.*, 1992) y que esta regulación ocurre a nivel de la transcripción (Sunter y Bisaro, 1992). En otros casos también se indica un efecto cooperativo de AC1 junto con AC2 para producir esta transactivación (Shivaprasad *et al.*, 2005). El mecanismo de transactivación mediado por TrAP en los genes tardíos, bien puede involucrar mecanismos de activación y desrepresión de acuerdo al tipo de tejido como, por ejemplo, activación en mesófilo y desrepresión en tejido vascular (Sunter y Bisaro, 1997).

Del control de la expresión de BC1 se tiene poca información como para indicar los posibles mecanismos de regulación; solo se sabe, en el caso de MYMV (*Mungbean Yellow Mosaic Virus*), que los promotores BV1 y BC1 ubicados en la región intergénica del componente B, comparten la región de respuesta ó reconocimiento del activador transcripcional TrAP viral; dicha región no se traslapa con la región común, la cual es casi idéntica entre componentes A y B en un mismo virus (Shivaprasad *et al.*, 2005).

Los geminivirus bipartitas son únicos en que necesitan de dos proteínas de movimiento, BV1 y BC1, ambas de las cuales son codificadas en el componente B. La proteína de movimiento BC1 se ha encontrado primariamente localizada en fracciones celulares de pared y membrana. Esta

proteína tiene el efecto de aumentar el límite de exclusión molecular en los plasmodesmos, mientras que BV1 localizada en el núcleo de células infectadas, es capaz de unir ADN de cadena sencilla. BC1 y BV1 tienen la capacidad de interactuar una con la otra.

Dado que BC1 y BV1 son responsables del movimiento del virus en la planta, es de esperar que sus respectivos promotores estén activos en los tejidos a los cuales tienen acceso. Se ha mostrado que TrAP activa la expresión de AV1 y BV1 a nivel de la transcripción. Así pues debe existir una coordinación en la expresión entre AV1 y BV1. Sin embargo existe muy poca información disponible sobre la regulación de estos genes en la planta y sobre los factores del huésped involucrados en dicha regulación.

En un estudio en el que los promotores BC1 y BV1 de PHV se fusionaron al gen reportero GUS, y se generaron plantas transgénicas de tabaco con esas construcciones, se observó que ambos promotores presentan un patrón de actividad tejido-específico muy similar. Estos son activos principalmente en hoja (incluyendo tanto mesófilo como tejido vascular) y en tejido vascular del tallo. La actividad de ambos promotores se encuentra aumentada en etapas posteriores del desarrollo en casi todos los tejidos, y su regulación en etapas tempranas de desarrollo es muy similar (Ruiz-Medrano, 1996).

7.0 Funciones de TrAP como factor transcripcional y supresor del silenciamiento mediado por ARN de interferencia.

A lo largo de la evolución las plantas han desarrollado mecanismos de defensa ante la entrada o movimiento de ácidos nucleicos invasores. Uno de estos mecanismos es el silenciamiento mediado por ARN de interferencia ó “RNA Silencing” en el cual los genes homólogos a secuencias de ARN de doble cadena son silenciados de una manera específica. Este tipo de defensa es utilizada por las plantas en presencia de virus invasores, tanto de ARN como de ADN, para evitar el progreso de la infección. Sin embargo, los virus también han desarrollado estrategias para contrarrestar los mecanismos de defensa propios de la planta. Uno de estas es la codificación de proteínas que tienen funciones supresoras de la respuesta de silenciamiento de la planta. Tal es el caso de la proteína TrAP, codificada por el gen AC2, la cual es un transactivador de los genes virales tardíos y además presenta las actividades supresoras del silenciamiento en algunos begomovirus virus como EACMV (Vanitharani *et al.*, 2004) y curtovirus como BCTV (Wang *et al.*, 2005).

El nivel de la vía en el cual actúa TrAP para suprimir el silenciamiento no está bien definido todavía, pero se sabe que muchos otros supresores virales del silenciamiento en plantas actúan en diferentes niveles de esta vía. Se ha visto que al infectar plantas de *Nicotiana benthamina* con ACMV-[CM] su proteína TrAP es capaz de suprimir el silenciamiento por un periodo de tiempo, y posteriormente la planta logra recuperarse. En cambio cuando se infectan estas plantas con EACMV el supresor del silenciamiento resulta ser AC4 y su efecto perdura hasta la senescencia de la planta. (Vanitharani *et al.*, 2004). Por otro lado otros trabajos proponen que la manera en que AC2 produce su efecto de supresión del silenciamiento es indirectamente, al activar la transcripción de genes supresores del silenciamiento presentes en la planta (Trinks *et al.*, 2005). Otros autores proponen incluso que los efectos de transactivación de TrAP en los promotores virales que contienen CLEs, son independientes de la presencia de este elemento y son únicamente debidos a un efecto de supresión del silenciamiento postranscripcional mediado por TrAP, ó a un posible efecto de activador transcripcional general presente en dicha proteína (Cazonelli *et al.* 2005)

También existen reportes que muestran que parte del mecanismo es debido a la interacción de TrAP con la serin-treonin cinasa SNF1 que es un regulador global del metabolismo (Hao *et al.*, 2003), de igual forma la interacción con la adenosin cinasa ADK que es requerida para el mantenimiento del “RNA silencing” en la planta. Se ha sugerido que el sinergismo que se produce en infecciones mixtas es debido al efecto supresor del silenciamiento que presentan algunas proteínas virales y al diferente nivel de la vía de silenciamiento en la cual estas actúan. TrAP presenta tres dominios conservados: a) un dominio básico N-terminal que contiene una señal de localización nuclear, b) un dominio central de unión al ADN con un motivo de dedo de zinc no clásico y c) un dominio de activación C-terminal. Se ha determinado que los dos primeros dominios son indispensables para ejercer la función de supresor del silenciamiento génico, y el tercero es indispensable para su función como transactivador.

8.0 Arreglos modulares conservados en promotores CP.

El análisis comparado de secuencias promotoras ha mostrado ser una metodología de gran utilidad para la identificación preliminar de secuencias reguladoras. En 2004, Argüello-Astorga y Gómez-Castañón realizaron un amplio análisis comparativo de la región intergénica de 120 begomovirus, utilizando un método de análisis “filogenético-estructural”, el cual permite identificar secuencias homólogas con diversos grados de divergencia (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1996, 1998), el cual tiene la cualidad de permitir la identificación de elementos multipartitas que no presentan entre sí una similitud global muy grande, y que por ello suelen escapar a la detección por otros métodos de análisis de secuencia. Para realizar ese análisis, los autores mencionados generaron una base de datos de la región intergénica (RI) de geminivirus, la cual dividieron en varias secciones tomando como referencias algunas secuencias invariantes, como la caja TATA del gen AC1 y el elemento tallo-asa del origen de replicación. Esta división en segmentos hizo posible una comparación más adecuada de las regiones homólogas de virus de diferentes continentes. El método F-E recurre inicialmente a comparaciones dentro de linajes bien definidos, para identificar secuencias conservadas (“phylogenetic footprints”) en los promotores de grupos específicos de organismos. En las fases posteriores del análisis, “los elementos identificados se comparan entre linajes progresivamente más alejados evolutivamente, ajustando de modo gradual las semejanzas entre líneas de descendencia hasta obtener un sistema de equivalencias robustas, que permita definir relaciones de homología auténtica, que pueden o no corresponder a similitudes significativas a nivel de secuencia nucleotídica” (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1998).

Como resultado de ese análisis se identificaron varios “footprinting” filogenéticos que podrían ser potenciales sitios de unión de proteínas reguladoras. Por ejemplo, en el segmento temprano de la RI se identificaron cajas TCA y secuencias conservadas asociadas a los iterones, las cuales llamaron ItABE; estos dos elementos se encuentran exclusivamente en begomovirus del viejo mundo (Asia, Europa, África y Australia). En virus del continente americano encontraron una combinación de elementos GA-1 y caja G, que solo se presenta en virus del Nuevo Mundo. En un pequeño linaje de begomovirus de América, llamado “grupo del SLCV”, se encontró una combinación de elementos conservados única (Figura 10).

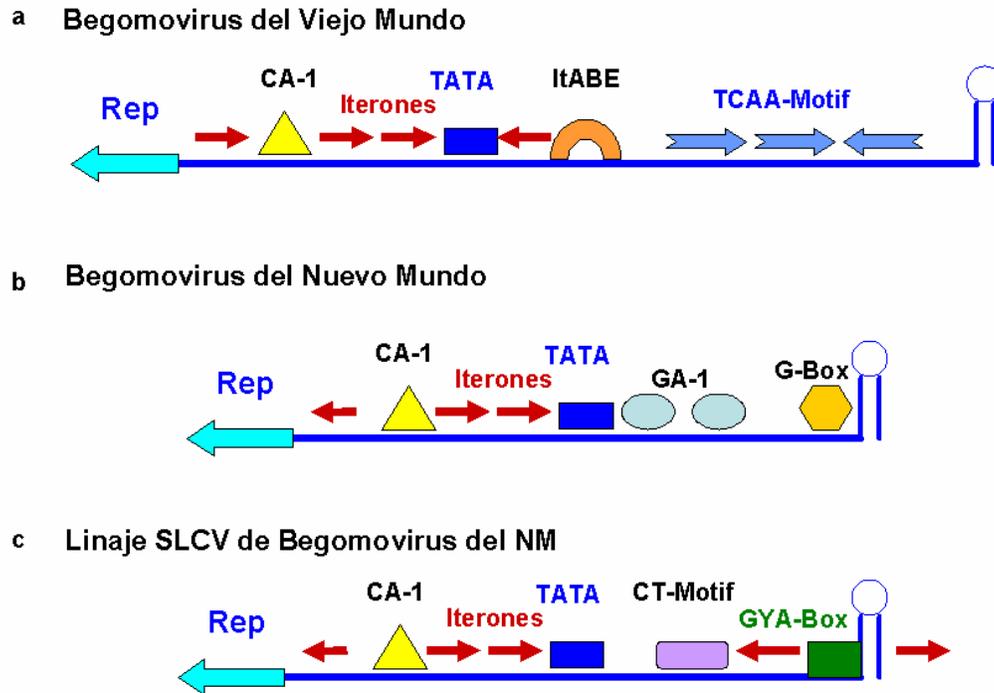


Figura 10. Combinación de secuencias de ADN conservadas (“motifs”) que componen la región temprana (origen de replicación) de los tres linajes principales de begomovirus. La mayoría de los begomovirus americanos tienen entre el elemento conservado “tallo-asa” y la caja TATA, a dos elementos característicos, GA-1 y caja-G. El linaje SLCV, también de América, muestra una combinación única de motivos conservados. Los begomovirus de otros continentes (virus del VM) incluyen varios “motifs” que no existen en los virus del Nuevo Mundo. Notese que el número y arreglo de los iterones también es diferente en los tres linajes virales (Reproducido de Gómez-Castañón, 2004).

A diferencia de las marcadas diferencias en la región temprana de los begomovirus de los diferentes linajes, en la región tardía se encontraron mayores semejanzas, identificándose al menos 6 secuencias distintivas que pueden representar elementos cis-reguladores comunes a todos los begomovirus. Varios de esos elementos conservados se encuentran asociados de manera consistente en series filogenéticas definidas, conformando lo que ha sido denominado “Arreglos Modulares Conservados” o CMAs (por sus siglas en inglés). Lo que resulta más interesante es que varios de los CMAs identificados contienen “motivos” idénticos o similares al CLE (GTGGTCCC). Estos arreglos incluyen las combinaciones Tallo-CLE-caja G; CLE-caja CCAAT; CLE-caja TATA; y caja TATA-TAPE/CLE (Figuras 11 y 12).

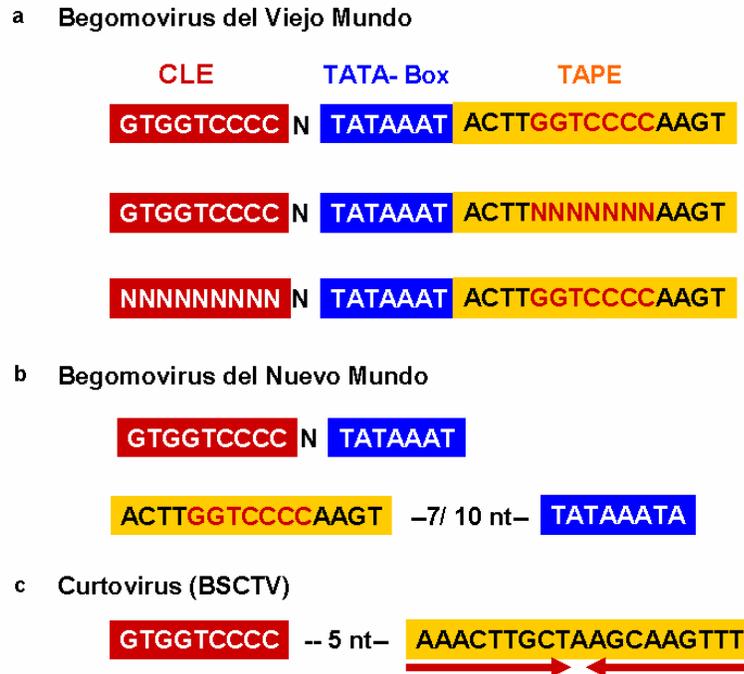


Figura 11. CMA constituido por tres elementos distintivos, el CLE, la caja TATA y el motivo TAPE, presente en begomovirus del viejo mundo. CMAs similares que incluyen algunos de estos elementos también se encuentran en begomovirus del nuevo mundo y en curtovirus (Reproducido de Gómez-Castañón, 2004).

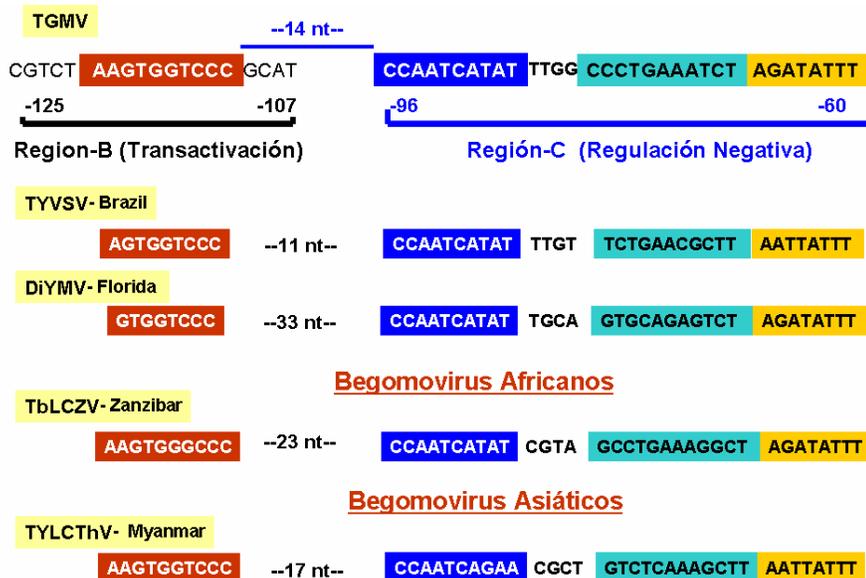


Figura 12. Elementos conservados en las regiones B y C del promotor TGMV que fueron definidas experimentalmente por Sunter y Bisaro (2003) como necesarias para la activación por TrAP. Los elementos marcados son el CLE (región B) y el motif CCAATCA, la caja H3 (azul claro) y la caja rica en A/T (región C). Estos últimos conforman un CMA prácticamente invariante en posición relativa, pero altamente variable en secuencia en la serie evolutiva de los begomovirus (Reproducido de Gómez-Castañón, 2004).

En este mismo estudio se realizó el importante hallazgo de que un amplio grupo de begomovirus del Nuevo Mundo carecen de CLEs, pero poseen CMA que son claramente homólogos a los CMA que contienen CLEs en otros virus de América y del Viejo Mundo. Estas observaciones ponen en una perspectiva más lógica la observación de que promotores virales que carecen de CLEs, como los de BGMV y PYMV sean transactivados por proteínas TrAP provenientes de virus que poseen dichos elementos (Hung y Petty, 2001).

Los CMA identificados por Argüello-Astorga y Gómez-Castañón, 2004, les permitieron elaborar un diagrama hipotético sobre las líneas de evolución de los begomovirus, y proponer la hipótesis de que los mismos se originaron en Asia, más probablemente en lo que hoy es la India, y posteriormente se distribuyeron hacia otros continentes. Las probables líneas de evolución de los promotores tardíos de algunos begomovirus originarios de Asia y Australasia, a partir del hipotético ancestro común se ilustran en la Figura 13. Se elaboró también la hipótesis de que los promotores CP de los begomovirus americanos se derivaron en una serie de pasos, que involucraron duplicaciones parciales y subsecuentes deleciones, a partir del promotor V2 presente en begomovirus asiáticos (Figura 14).

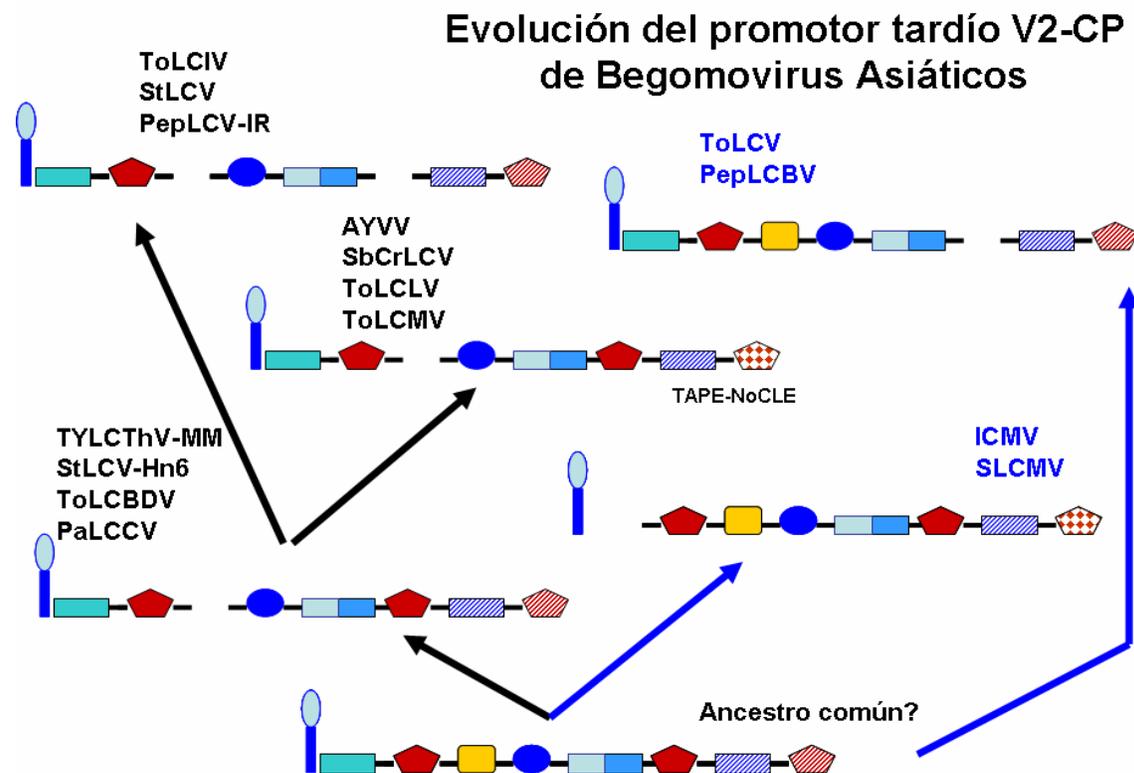


Figura 13. Algunas líneas de evolución de promotores tardíos de Begomovirus originarios de Asia y Australia. Virus: AYVV (*Ageratum yellow vein virus*), ICMV (*Indian cassava mosaic virus*), PaLCCV (*Papaya leaf curl China virus*), PepLCBV (*Pepper leaf curl Bangladesh virus*), PepLCV-IR (*Pepper leaf curl virus*), SbCrLCV (*Soybean crinkle leaf curl virus*) SLCMV (*Sri Lankan cassava mosaic virus*), StLCV (*Stachytarpheta leaf curl virus*), ToLCBDV (*Tomato leaf curl Bangladesh virus*), ToLCLV (*Tomato leaf curl Laos virus*), ToLCMV (*Tomato leaf curl Malasia virus*), ToLCV (*Tomato leaf curl virus*) y TYLCThV-MM (*Tomato yellow leaf curl Thailand virus-Myanmar*) (Reproducido de Gómez-Castañón, 2004).

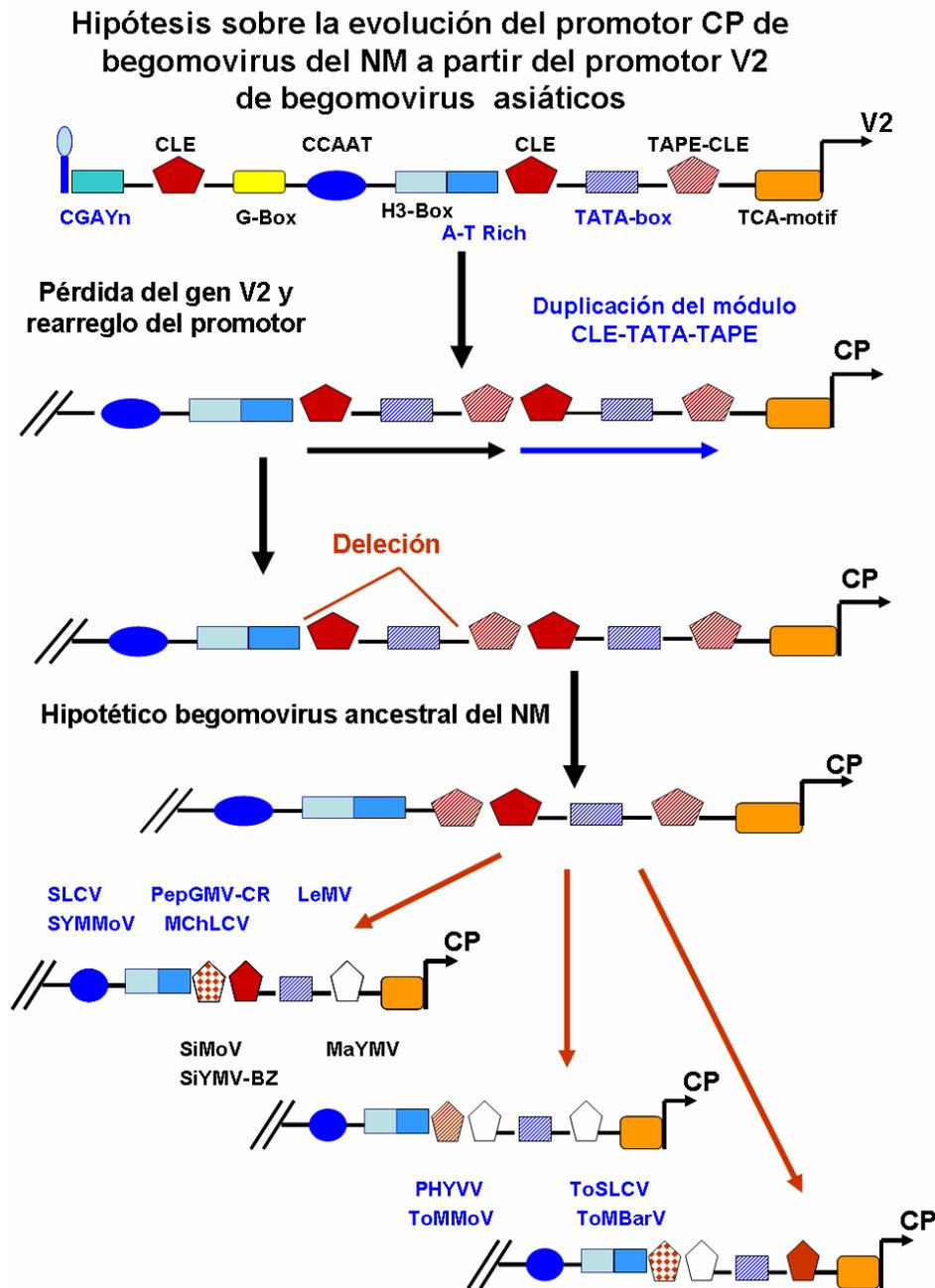


Figura 14. Hipótesis sobre la evolución del promotor CP de begomovirus del NM a partir del promotor V2 de begomovirus asiáticos. El análisis de promotores tardíos de begomovirus del NM sugiere que son derivados de begomovirus asiáticos. Virus: LeMV (*Leonorus mosaic virus*), MaYMV (*Macroptilium yellow mosaic virus*), MChLCBV (*Melon chlorotic leaf curl virus*), PepGMV-CR (*Pepper golden mosaic virus-CR*), PHYVV (*Pepper huasteco yellow vein virus, PHV*), SiMoV (*Sida mottle virus*), SiYMV-BZ (*Sida yellow mosaic virus-(Brazil)*), SLCV (*Squash leaf curl virus*), SYMMoV (*Squash yellow mild mottle virus*), ToMBarV (*Tomato mosaic Barbados virus*), ToMMoV (*Tomato mild mottle virus*) y ToSLCV (*Tomato severe leaf curl virus*). (Reproducido de Gómez-Castañón, 2004).

OBJETIVO GENERAL

Establecer las funciones del “Elemento Tardío Conservado” (CLE) y de algunos Arreglos Modulares Conservados (CMAs) presentes en la región promotora del gen CP de PHV, en relación al proceso de transactivación/desrepresión de ese gen, así como delimitar con mayor precisión las secuencias con función silenciadora que controlan la actividad de ese promotor en tejido vascular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Construir vectores binarios que incluyan segmentos decrecientes de la región “silenciadora” del promotor CP de PHV, a fin de definir con precisión la secuencia genómica más corta que mantenga dicha actividad.
- ✓ Generar un vector de expresión binario para definir experimentalmente si el silenciador de TGMV tiene efecto sobre el promotor CP de PHV.
- ✓ Determinar si un número creciente de copias del CLE aumenta la respuesta a TrAP, tanto en sistemas de expresión transitoria como en plantas transgénicas.
- ✓ Evaluar la función de algunos módulos complejos conservados (CMAs) que incluyen CLEs, en el contexto de promotores heterólogos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las secuencias de los genomas que aparecen en esta tesis fueron obtenidas de la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information). El alineamiento inicial de las secuencias de PHV con TGMV corresponde a las encontradas con los números de acceso (X70418) PHV y (K02029) TGMV. Posteriormente fueron introducidas a esta base de datos otras secuencias más recientes y posiblemente con menos errores en su secuenciación: PHV (AY044162) y TGMV (NC_001507).

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados en su mayoría por Genosys Sigma.

Tabla 4. Oligonucleótidos e iniciadores empleados en el presente trabajo.

OLIGONUCLEÓTIDOS e INICIADORES	SECUENCIAS
DIR-3CLE	5'-AGCTTAAGTGGTCCCCAAGATCTAGTGGTCCCATATGAGTGGTCCCAGTACTT-3'
COM-3CLE	5'-AGCTAAGTACTGGGACCACTCATATGGGGACCACTAGATCTTGGGGACCACTTA-3'
MCS-HindIII-SacI-Long	5'-AGCTTCTCGAGGCCTGGATCCGTCGACGCTAGCTCTAGAGGGCCCCGGGAGCT-3'
MCS-HindIII-SacI-Small	5'-CCCCGGCCCTCTAGAGCTAGCGTCGACGGATCCAGGCCTCGAGA-3'
COM-CCAAT-CMA	5'-CTAGAGTACTAAATATCTAAGCTCGTCAGGCGCAATATGATTGGTCAGGCCTA-3'
DIR-CCAAT-CMA	5'-AGCTTAGGCCTGACCAATCATATTGCGCCTGACGAGCTTAGATATTTAGTACT-3'
Primer BINAR (1) -forward	5'-CCCAGGCTTACACTTTATGCTTCC-3'
Primer BINAR (1) -reverse	5'-GGTTGGGGTTTCTACAGGACGTAAC-3'
Primer BINAR (3) - forward	5'-GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG-3'
Primer BINAR (3) - reverse	5'-CGTCGAGTTTTTTGATTTACGGGT-3'
Primer Sil 100	5'-CAAAGTACTGTCGACTTCTTCCATGGTGACGTAGATGGC-3'
Primer Sil 140	5'-AAACCCGGGTCGACTACGTCGTATCTGTCTCTTTGC-3'
Primer <i>nptII</i> -1	5'-TATTCGGCTATGACTGGGCA-3'
Primer <i>nptII</i> -2	5'-GCCAACGCTATGTCCTGAT-3'
Primer GUS-1	5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3'
Primer GUS-2	5'-GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA-3'
Primer Rep-DGRS-rev	5'-GAGTCTAGACGGCAGATCWGCTAGAGGAGG-3'
Primer Rep-WAR-rev	5'-GAGTCTAGACNGGRAAGACRATGTGGGC-3'

Apareamiento de oligonucleótidos para producir ADN de doble cadena

Para el apareamiento de los oligonucleótidos empleados en esta tesis se emplearon dos procedimientos que difieren ligeramente en los amortiguadores empleados. Ambos procedimientos son derivados del protocolo “Mutagénesis de ADN de cadena sencilla dirigida por oligonucleótidos” (Sambrook *et al.*, (2001). Los oligonucleótidos fueron incubados en un baño con agua a 85°C durante 5 minutos, posteriormente se retiraron los tubos y el agua y se colocaron ambos en una bandeja de plástico hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente se dió un pulso corto a los tubos en la centrifuga y se almacenaron a 4 °C.

Amortiguador de alineamiento PE1 10X (Tris-Cl 200 mM pH 7.5, MgCl₂ 100 mM, NaCl 500 mM, dithiothreitol 10 mM), Amortiguador de alineamiento B -1.111X (Tris 20 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 250 mM). La concentración final de los oligonucleótidos fué de 900 ng/μL y 100 ng/μL respectivamente con los diferentes buffers.

Plásmidos

Los plásmidos que aparecen en este trabajo son los siguientes.

pBI46S	pBI46S CMA-3CLE _{inv.}	pCP693Sil140
pBI90S	pBI121	pCP693Sil248
pBI46S 3-CLE	pBIΔGUS	pCP693Sil300
pBI90S 3-CLE	pBIθGUS	pCP693Sil500
pBI46S 6-CLE	pBIΩGUS	pBIΩSil100* _{inv}
pBI46S tallo-CLE	pBSII KS(+)	pBIΩSil140* _{inv}
pBI46S tallo-CLE	pBSII SK(+)	pBIΩSil100
pBI46S CLE-G	pCP693B	pBIΩSil140
pBI90S CLE-G	pCP693Sil100* _{inv}	pBIΩSil248
pBI46S CMA	pCP693Sil140* _{inv}	pBIΩSil300
pBI46S CMA-3CLE _{dir.}	pCP693Sil100	pBIΩSil500

pBI46S y pBI90S: Vectores binarios que contienen el gen reportero GUS dirigido por versiones truncadas del promotor 35S de CaMV en las posiciones -46 (mínima) y -90 (más el elemento activador as-1) respectivamente (Argüello-Astorga, 1996).

pBI121: Vector binario de Clontech que incluye el gen GUS bajo el control del promotor 35S de CaMV (Jefferson *et al.*, 1989). Contiene dos copias del marcador de selección *nptII* dirigidas por dos diferentes promotores, uno procarionte para expresión en bacterias y el otro por el promotor 35S de CaMV para su expresión en plantas tras la inserción de los transgenes mediada por *Agrobacterium*.

pBSII KS (+) y pBSII SK(+): Vectores de clonación de Stratagene, Inc. que solo difieren en la orientación del sitio múltiple de clonación.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos de 100 y 140 pb de la región silenciadora de PHV se realizó por PCR empleando un termociclador Techne tc-412. Las condiciones de este PCR incluyen 2 min de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de amplificación que se componen de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1.5 min a 72°C. Al final se añaden 5 min a 72°C para una extensión final.

El PCR para confirmar la incorporación de las secuencias de 100 y 140pb en el vector pCP693B utilizó el mismo programa y diferentes iniciadores. Para la confirmación por PCR de la presencia de los plásmidos de interés en las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 se realizó un protocolo idéntico a excepción de que la temperatura de alineamiento de los ciclos fue de 57°C, determinada como la óptima en un gradiente previo.

La confirmación de los transgenes *nptII* y *uidA* en las plantas de tabaco fue realizada a partir de 100-200ng de ADN genómico y los pares de iniciadores respectivos utilizando el siguiente protocolo: 2 min de desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos de amplificación que incluyen 30 s a 95°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C. Finalmente 5 min a 72°C de extensión final.

Aislamiento y manipulación enzimática del ADN

Las técnicas de manipulación del ADN se realizaron de acuerdo a procedimientos estándar (Sambrook y Russell, 2001).

Las enzimas de restricción *Bam*HI, *Nhe*I, *Mfe*I, *Nde*I, *Xmn*I, *Sac*I y *Spe*I fueron de la compañía New England Biolabs; las enzimas *Apa*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Not*I, *Sma*I, *Xba*I, *Sal*I, *Xho*I, *Pst*I, *Sca*I y la ligasa T4 fueron de Invitrogen Inc.

Para la purificación de algunas muestras de ADN se utilizaron en ocasiones los kits QIQquick PCR purification kit y QIAquick Gel Extraction kit de QIAGEN siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Cepas bacterianas empleadas para la producción de células competentes

Para la producción de células competentes por choque térmico de *Escherichia coli* se utilizó la cepa TOP10F'.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* empleada para la electroporación fue LBA4404 y se utilizó un electroporador BIO-RAD Gene Pulser XcellTM con las siguientes condiciones de electroporación: 25µF, 400Ω y un pulso de 2.5 kV.

Preparación de células competentes de *Escherichia coli* por cloruro de calcio.

1. Inocular 500 μ L de un preinóculo de *E. coli* TOP10F' crecido toda la noche en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB.
2. Incubar a 37°C por 90-100 minutos con agitación a 150 rpm.
3. Colocar el cultivo en botellas sorvall frías y centrifugar durante 7 minutos a 8000 rpm. Eliminar el sobrenadante y colocar las botellas rápidamente en un baño de hielo.
4. Agregar a cada botella 7.7 mL de una solución fría de CaCl_2 0.1M y glicerol al 15%. Resuspender las células agitando suavemente en vortex de 5 a 10 segundos y metiendo el tubo en hielo nuevamente. Repetir esto hasta que las células se hayan resuspendido.
5. Centrifugar por 7 minutos a 8000 rpm, desechar el sobrenadante y regresar las botellas a hielo.
6. Agregar 1.27 mL de la solución fría de CaCl_2 0.1 M y glicerol al 15% a cada botella y resuspender con vortex de 5 a 10 segundos y metiendo el tubo nuevamente en hielo. Repetir esto hasta que las células estén resuspendidas completamente.
7. Alicuotar 30 μ L en tubos eppendorf fríos, colocar rápidamente en N_2 líquido y almacenar a -70 °C.

Transformación de *Escherichia coli* por choque térmico

1. A 50 µL ó 100 µL de células competentes por cloruro de calcio, adicionar 1 µL de plásmido.
2. Incubar 10-15 minutos en hielo.
3. Dar el choque térmico por 70 segundos en un baño con agua a 42 °C.
4. Inmediatamente después sumergir el tubo en agua a 0°C y dejar reposar por 5 -10 minutos.
5. Adicionar en campana 250 µL de medio LB sin antibiótico para favorecer la recuperación.
6. Incubar a 37 °C durante 45 minutos y con agitación de 200-220 rpm.
7. Centrifugar a 8000 rpm por 2 minutos
8. Desechar el sobrenadante dejando un pequeño volumen. Resuspender el pellet en ese volumen.
9. Sembrar en una placa de agar-LB con 100µg/mL de ampicilina. (Emplear cajas con el antibiótico adecuado según la resistencia de la cepa.)
10. Distribuir por toda la placa con una espátula.
11. Incubar a 37 °C por 16-24 horas..

Medio LB líquido

Bacto triptona 1%

Extracto de levadura 0.5%

NaCl 1%

H₂O

(Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1 M, aforar al volumen final y esterilizar en autoclave)

Agar LB

Agar bacteriológico al 1.5 % en medio LB líquido.

La concentración de antibiótico varía según la bacteria y el tipo de antibiótico

Antibiótico	Para <i>E. coli</i>	Para <i>A. tumefaciens</i>
Ampicilina / Carbenicilina	100 µg / mL	100 µg / mL
Kanamicina	25 µg / mL	100 µg / mL

Obtención de ADN plasmídico por minipreps de *Escherichia coli*

1. Poner un preinóculo de la bacteria en 3 mL de medio LB con ó sin antibiótico según la cepa. Incubar a 37°C con agitación por 12 horas ó más.
2. Centrifugar el cultivo bacteriano a 8000 rpm durante 2 minutos en tubos eppendorf.
3. Añadir 100 µL de solución Birnboim I y resuspender suavemente la pastilla en vórtex.
4. Añadir 200 µL de solución Birnboim II y mezclar por inversión varias veces.
5. Añadir 150 µL de solución Birnboim III y mezclar varias veces por inversión.
6. Reposar los tubos en hielo por 3 minutos
7. Centrifugar a 13 000 rpm durante 8 minutos.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 5 µL de RNasa 2mg/mL. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.
9. Adicionar 900 µL de etanol absoluto y 45 µL de acetato de sodio 3M. Mezclar vigorosamente.
10. Reposar en hielo 3 minutos.
11. Centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm.
12. Eliminar el sobrenadante por decantación y añadir 500 µL de etanol al 70%.
13. Centrifugar a 13,000 rpm por 1-2 minutos.
14. Eliminar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente.
15. Resuspender el ADN en 50 µL de TE pH 8.0

Solución Birnboim I (Esterilizar en autoclave)

Glucosa 50 mM

Tris 25 mM pH 8.0

EDTA 10 mM pH 8.0

Solución Birnboim II

(Esta solución se prepara poco antes de emplearse utilizando los stocks NaOH 5M y SDS 20%.)

NaOH 0.2 M

SDS 1%

Solución Birnboim III (Esterilizar en autoclave)

Acetato de potasio 3M

Ácido acético glacial 11.5 % v/v

Obtención de ADN plasmídico por maxiprep de *Escherichia coli*

1. Colocar un preinóculo de una colonia bacteriana en 200mL de medio LB con antibiótico. Incubar a 37 °C con agitación por toda a la noche.
2. Transferir el cultivo a botellas sorvall estériles de 200 mL y centrifugar las células a 6000 rpm durante 10 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender con vortex en 5 mL de solución Birnboim I.
4. Adicionar 10 mL de solución Birnboim II y mezclar varias veces por inversión.
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 7.5 mL de solución Birnboim III y mezclar varias veces por inversión.
7. Reposar en hielo durante 10 minutos.
8. Centrifugar a 10,000-13,000 rpm por 10 minutos.
9. Transferir el sobrenadante a tubos sorvall estériles de 50 mL.
10. Adicionar 18 mL de isopropanol y mezclar.
11. Reposar en hielo ó a -20°C por 20 minutos.
12. Centrifugar a 10 000 rpm por 20 minutos y eliminar el sobrenadante.
13. Lavar la pastilla con 5 mL de etanol al 70% sin mezclar.
14. Centrifugar a 10 000 rpm por 5 minutos.
15. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el tubo al invertirlo sobre una pedazo de papel.
16. Resuspender en 600 µL de TE pH 8.0 y pasar a tubos eppendorf.
17. Adicionar un volumen de fenol equilibrado y mezclar muy bien.
18. Centrifugar a 13,000 rpm durante 3 minutos.
19. Transferir la fase superior a un tubo nuevo.
20. Adicionar un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar muy bien.
21. Centrifugar a 13,000 rpm por 3 minutos.

22. Transferir con mucho cuidado el sobrenadante a tubos nuevos y agregar 10 μ L de RNasa 2 mg/mL. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
23. Agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Mezcla muy bien invirtiendo varias veces.
24. Reposar en hielo durante 15 minutos.
25. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante.
26. Lavar la pastilla con 500 μ L de etanol absoluto.
27. Centrifugar a 13,000 rpm durante 3 minutos y desechar el sobrenadante.
28. Secar la pastilla invirtiendo el tubo sobre un pedazo de papel ó secar en una placa de calentamiento a temperatura baja.
29. Resuspender en 300-500 μ L de TE pH 8.0

* Las soluciones Birnboim empleadas son las mismas que en la miniprep.

Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*

1. Transfiera 50mL de cultivo celular a 500mL de medio LB. Permita a las células crecer a 28°C hasta alcanzar una $O.D._{600nm} = 1 - 1.5$ (4 horas aprox.)
2. Transfiera el cultivo a 2 botellas sorvall frías y coloque los tubos en hielo 15 minutos.
3. Centrifugar 15 min a 4,000g (a 4°C)
4. Vacíe el sobrenadante y resuspenda suave y completamente con 250 mL de agua estéril.
5. Centrifugar 15 min a 4,000g (a 4°C)
6. Repita los pasos 4 y 5, tres veces más.

Nota: Es muy importante lavar las células con un exceso de agua para remover las sales.

7. Vacíe el sobrenadante y resuspenda en 25mL de glicerol 10% v/v estéril. Junte el contenido de ambos tubos en un tubo falcon de polipropileno para centrifuga.
8. Centrifugar 10 min a 3,000g (3,500rpm)
9. Vacíe el sobrenadante y resuspenda las células completamente en 2mL de glicerol 10% v/v estéril.
10. Divida en alícuotas de 40 μ L y congele en nitrógeno líquido. Almacenar a -80°C.

Las células deben ser viables por lo menos 6 meses.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación.

1. Alicuotar 1 μL de miniprep ó 0.5 μL de maxiprep en un stock de células electrocompetentes (30 – 50 μL).
2. Incubar en hielo 3 minutos.
3. Colocar la mezcla en una celda fría.
4. Electroporar seleccionando los siguientes parámetros: 25 μF , 2.5 KV y 400 Ω de resistencia.
5. Adicionar inmediatamente 1 mL de medio YM a la solución electroporada.
6. Transferir la mezcla a un tubo estéril e incubar con agitación a 28 °C durante 2 horas para permitir la recuperación.
7. Centrifugar a 8,000 por 2 minutos
8. Resuspender la pastilla en 200 μL de medio YM.
9. Expandir 50 μL del cultivo en una caja de medio YEP conteniendo el antibiótico adecuado.
10. Incubar la caja a 28°C durante 2 días

También se puede utilizar medio YEP en vez de medio YM, pero en ocasiones no se obtienen buenos resultados.

Preparación de medios

Para 400 mL:

Medio	Extracto de levadura	Peptona	NaCl	Agar bacteriológico
YEP líquido.	4g	4g	2g	-
YEP-agar	4g	4g	2g	6g

Medio YM (400mL)

Extracto de levadura 160mg
 Manitol 4 g
 NaCl 40 mg
 Sulfato de magnesio 80 mg
 Fosfato de potasio 200 mg

* Ajustar pH a 7.0 con NaOH.

Agua aforar a 400mL

Obtención de plantas transgénicas

1. Hojas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabaccum*) fueron cortadas en cuadros de 0.5 x 0.5cm.
2. Los recortes de hoja fueron colocados en cajas con medio MS y se pusieron en contacto con la solución de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las plásmidos de interés. Los eventos de transformación son independientes en cada recorte de la hoja.
3. Posteriormente los fragmentos de hoja se pasan a un medio de selección con reguladores de crecimiento para producir brotes (medio MS completo, 2mg/L de Bencil-Amino-Purina (BAP), 150 mg/L kanamicina, 300 mg/L cefotaxima). El marcador de selección específico de la construcción empleada (kanamicina) permite seleccionar a las plantas transformadas y el antibiótico cefotaxima sirve para eliminar a *Agrobacterium tumefaciens*, así como para evitar el crecimiento de otros organismos contaminantes en el medio. Se realizó una segunda selección con el mismo antibiótico para tener un control más riguroso de las líneas transgénicas.
4. Los brotes de planta que sobreviven al proceso de selección anterior fueron transferidas a un medio de mantenimiento (medio MS sin reguladores de crecimiento).

Condiciones de crecimiento

Los frascos con los brotes de planta fueron incubados a 27 °C con periodos de iluminación de 16 horas y 8 horas de oscuridad.



Figura 15. Crecimiento de plantas transgénicas de *Nicotiana tabaccum* en condiciones *in vitro*.

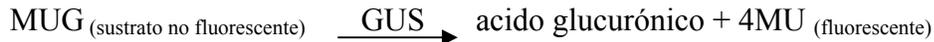
Cuantificación de GUS por fluorimetría

Para el ensayo de GUS fluorométrico la proteína total de las diferentes líneas transgénicas de plantas *in vitro* se extrajo por trituración de pequeños fragmentos de hoja en 150 μ L de amortiguador de extracción de GUS (NaHPO₄ 50 mM pH 7.0, β -mercaptoetanol 10 mM, Na₂EDTA 10 mM, lauril sarcosina sódica 0.1 %, Tritón X-100 al 0.1 %).

La cuantificación de proteína total se realizó por espectrofotometría en placas de 96 pozos y se empleó un espectrofotómetro Ultramark BIO-RAD Microplate Imaging System. Las muestras fueron diluidas 1:10 en buffer de extracción de GUS y 10 μ L de la dilución se hicieron reaccionar con 200 μ L de reactivo de Bradford diluído 1:5 en agua. Se realizó una curva de calibración en el intervalo de 0.05 – 0.5 mg/mL usando como estándar a la albumina sérica bovina (BSA). La medición de las muestras se realizó a 595 nm de longitud de onda.

La reacción de GUS fluorométrico está fundamentada en la generación del producto fluorescente 4MU (7-hidroxi-4-metilcumarina) por la actividad de la enzima β -glucuronidasa (GUS) sobre sustratos que incluyan 4MU como lo es el 4-metilumbeliferil β -D-glucuronido (MUG).

La longitud de onda de absorción de la 4MU es de 365 nm y el pico máximo de emisión se presenta a 455nm.



5 μ g de proteína total de cada muestra fueron adicionados a 100 μ L de amortiguador de ensayo de GUS (MUG 2 mM en buffer de extracción de GUS), posteriormente fueron incubados a 37°C. Finalmente para detener la reacción se añadió 1.9 mL de una solución de Na₂CO₃ 0.2 M que además proporciona un medio básico en el que el producto alcanza su máxima fluorescencia. Los 2 mL resultantes se ocuparon para la medición en una celda de cuarzo y la medición fluorométrica se realizó en un fluorómetro Hoefer® DyNA Quant 200 a 455nm de longitud de onda. Las actividades de la enzima se reportan en pmols/mg proteína/min

DetECCIÓN HISTOQUÍMICA DE GUS.

Se tomaron los brotes de hojas más pequeñas de plantas transgénicas en crecimiento *in vitro* y se colocaron en placas de 96 pozos en 250 μ L de solución de X-Gluc compuesta por Buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.0, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 0.1%, ferrocianuro de potasio 2 mM, ferricianuro de potasio 2 mM, cloranfenicol 100 μ g/mL y 10 μ g/mL de X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónico). Las placas se incubaron por toda una noche a 37 °C y posteriormente se reemplazó la solución de X-gluc por solución metanol-acetona 3:1 para eliminar los pigmentos vegetales hasta desteñir casi completamente. Posteriormente se retiró la última solución y se añadió glicerol al 50-80% para su conservación. Finalmente las muestras fueron observadas con microscopio óptico.

Extracción de ADN viral de plantas.

1. 100mg de tejido vegetal.
2. Agregar 250 μ L de amortiguador AP, macerar.
3. Agregar 500 μ L de amortiguador AP
4. Reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 1 minuto a 12,000 rpm y recuperar sobrenadante.
6. Agregar 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1)
7. Mezclar y centrifugar 3 minutos a 11,000 rpm.
8. Agregar otra vez 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1)
9. Mezclar y centrifugar 3 minutos a 11,000 rpm.
10. Agregar 0.2 volúmenes de acetato de sodio ó amonio 10 M y 1 volumen de isopropanol.
11. Incubar a -20°C por 1 hora.
12. Centrifugar 10 min a 11,000 rpm.
13. Lavar 2 veces con etanol al 70 % (centrifugar 5 min a 11,000 rpm).
14. Resuspender en 30 μ L de H_2O .

Buffer AP.

- Urea 7M
- NaCl 0.35M
- Tris (0.05M) pH 8
- EDTA 0.02 M
- Sarcosina 1%

RESULTADOS

Construcciones para delimitar el silenciador de PHV

El presente trabajo continua el realizado por Rosa Gómez Castañón, reportado en su tesis de maestría titulada “Generación de vectores de expresión para el análisis funcional de secuencias reguladoras del Virus Huasteco del Chile” (IPICYT, 2004). Por esta razón, y para efectos de mayor claridad, antes de describir nuestros resultados haremos un resumen de las características principales de las construcciones realizadas por Gómez-Castañón, que fueron el punto de partida para la generación de los vectores binarios que reportamos en el presente trabajo.

Cuatro fragmentos de la región genómica de PHV que fué identificada como homóloga al segmento de 300 pb de TGMV que contiene el silenciador del promotor CP (Sunter y Bisaro, 1997) fueron clonados en un vector pBluescript II SK+ y posteriormente se transfirieron al vector pCP693B. La Figura 16 muestra un diagrama simplificado de este plásmido y sus principales sitios de restricción. Este vector consta del promotor CP de PHV truncado en la posición -693 y los primeros 8 codones del gen CP fusionados en fase con el gen reportero *uidA* (GUS), es decir, el gen de la capsida ha sido reemplazado casi en su totalidad por GUS. Se ha establecido que plantas transgénicas que portan este casete de expresión muestran una fuerte actividad del gen reportero en tejido vascular, aún en ausencia de factores virales (Ruiz-Medrano, 1996).

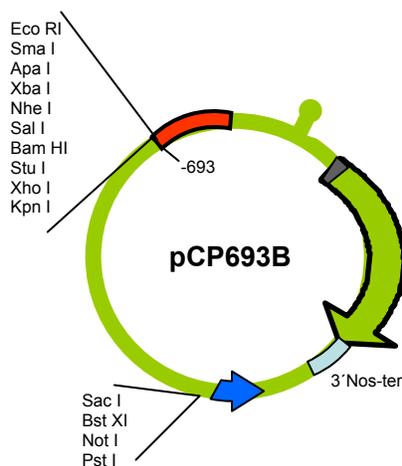


Figura 16. Vector pCP693B para ensayos de expresión transitoria, en el que fueron clonados diferentes fragmentos de la región silenciadora corriente arriba de los 693pb del promotor truncado de CP del virus Huasteco del Chile.

Los fragmentos de la región silenciadora de PHV que fueron subclonados corresponden a fragmentos de tamaño decreciente (500, 248, 140 y 100 pb) de un segmento *ApaI/XbaI* de PHV que comprende la region distal del gen AL1 y la mitad 5' de AL2. Los fragmentos de 500 y 248 pb fueron subclonados en el vector pCP693B, generándose así los vectores pCP693Sil248 y pCP693Sil500. Los fragmentos de 140 y 100 pb fueron clonados en el vector pCP693*GUS, el cual es casi idéntico al vector pCP693B pero difiere en la secuencia del sitio múltiple de clonación (Gómez-Castañón, 2004). En este caso, y debido al orden relativo de los sitios utilizados para la clonación, la orientación de las secuencias de 140 y 100 pb respecto al promotor CP quedó en sentido inverso al arreglo natural. Estos dos últimos vectores fueron denominados pCP693Sil100* y pCP693Sil140*. Por otra parte, y a fin de dar respuesta a la

pregunta de si la región silenciadora de TGMV tiene o no efecto represor sobre un promotor CP heterólogo, como el de PHV, se construyó también un casete regulador híbrido, en el que la secuencia silenciadora de 300 pb de TGMV fue insertada de manera análoga en el vector pCP693B, generándose así el vector pCP693TSil300 (Gómez-Castañón, 2004).

Las construcciones pCP693Sil100*, pCP693Sil140*, pCP693Sil248, pCP693Sil300 y pCP693Sil500 sirvieron de base para preparar los vectores binarios necesarios para generar plantas transgénicas, único sistema en el que puede examinarse experimentalmente las propiedades reguladoras de un silenciador tejido-específico, como el que se pretende analizar.

Generación de vectores de expresión con los fragmentos Sil-100 y Sil-140 en orientación nativa con respecto a CP

Como se señaló antes, los fragmentos potencialmente silenciadores de 100 y 140 pb integrados en los vectores de expresión transitoria pCP693Sil100* y pCP693Sil140* no se encuentran en la dirección 5'-3' natural con respecto al promotor CP. Aún cuando los silenciadores transcripcionales clásicos funcionan de manera independiente de la orientación, resulta preferible examinar el efecto de la orientación en el caso de elementos que no han sido todavía bien caracterizados, como es el caso de la región silenciadora de PHV. Por lo tanto, procedimos a construir vectores en los que las secuencias Sil-100 y Sil-140 se encuentren en la orientación nativa respecto al promotor CP. Para esto se amplificaron por PCR fragmentos que incluyen parte de la región silenciadora de interés, a partir del plásmido pARA, que contiene el genoma completo de PHV (Figura 17). El fragmento Sil-100 pb fue amplificado utilizando dos pares de iniciadores, prDGRS_{rev}/prSil100, y prWAR_{rev}/prSil100, respectivamente. Para la amplificación del fragmento de 140 pb se emplearon los iniciadores prDGRS_{rev}/prSil140, y prWAR_{rev}/prSil140 (Figura 18). Los iniciadores prSil100 y prSil140 fueron diseñados para incorporar sitios Sal I en sus extremos y aparearse a 100 y 140 pb respectivamente del sitio nativo Apa I de la región de interés. Los iniciadores prDGRS_{rev} y prWAR_{rev} se alinean con secuencias conservadas dentro del gen AC1. Al digerir los productos de PCR con las enzimas Apa I y Sal I se producen los fragmentos de 100 y 140 pb de la región silenciadora. Estos fragmentos fueron clonados en los mismos sitios de restricción del vector pCP693B.

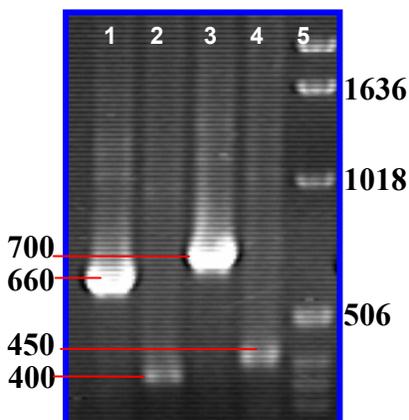


Figura 17. Electroforesis de los productos de PCR amplificados con los diferentes pares de iniciadores: prDGRS_{rev}-prSil100 (660pb) carril 1; prWAR_{rev}-prSil100 (400pb) carril 2; prDGRS_{rev}-prSil140 (700pb) carril 3; prWAR_{rev}-prSil140 (450pb) carril4; MPM 1 kb, carril 5.

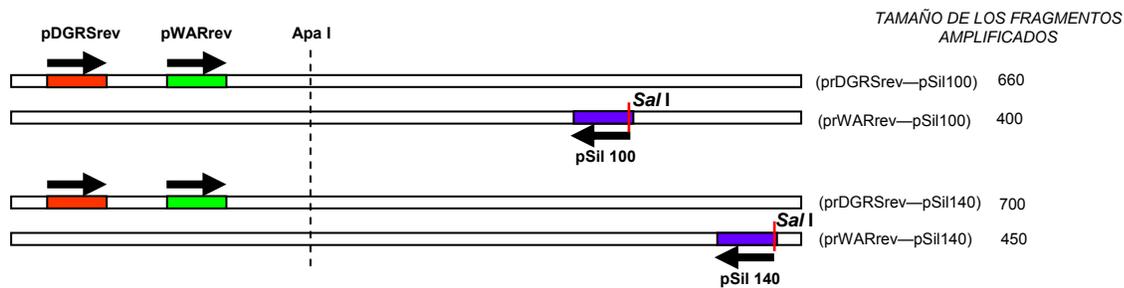


Figura 18. Pares de iniciadores empleados para amplificar una parte del genoma A de PHV que potencialmente contiene al silenciador, y de cuyos productos de PCR se obtuvieron, luego de digerir con *Apa*I y *Sal*I, los fragmentos de 100 y 140 pb de la región silenciadora.

Generación de vectores binarios para el análisis funcional de las construcciones Sil-proCP-GUS

Dado que el análisis funcional de elementos reguladores que exhiben actividad dependiente de tejido y/o relacionada al proceso de desarrollo de la planta, como es el caso del silenciador CP de begomovirus, solo puede realizarse en un sistema vegetal íntegro, las diversas construcciones Sil-proCP-GUS (Figura 19) insertas en los vectores de expresión transitoria antes citados, debieron ser transferidos a vectores binarios de *Agrobacterium tumefaciens*, a fin de hacer posible la generación de plantas transformadas con los casetes de expresión de nuestro interés.

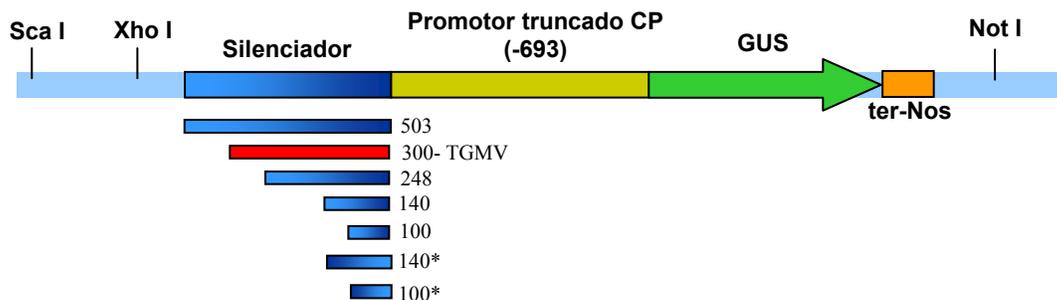


Figura 19. Diagrama simplificado de los diferentes casetes silenciador-promotor-reportero que fueron transferidos de vectores de expresión transitoria a vectores binarios. * Secuencias introducidas en dirección no nativa con respecto al promotor CP

Para llevar a cabo del modo más sencillo posible la transferencia de los 6 casetes Sil-CP-GUS a vectores binarios, se decidió generar un vector con sitios de restricción apropiados a través de modificaciones progresivas del vector binario pBI121 (Figura 20), cuya secuencia completa se encuentra disponible en varias bases de datos (Jefferson *et al.*, 1987). La primera modificación consistió en insertar un polilinker sintético (cuya secuencia se muestra en la Figura 21) entre los sitios Hind III y Sac I de pBI121. Esta operación eliminó del plásmido la totalidad de la secuencia codificante del gen *uidA* (GUS) y el promotor 35S de CaMV. El vector resultante se

La inserción del polilinker en pBI121 fue confirmada por digestión con *NheI*. El plásmido pBI121 solo contiene un sitio *NheI* y la incorporación del polilinker añade otro sitio *NheI* que permite identificar a los recombinantes por digestión con esa enzima de restricción, que genera bandas de 2263 y 9782 pb (Figura 23). Una verificación adicional se realizó digiriendo con las enzimas *NotI* y *BamHI*, que producen 2 fragmentos cuyo tamaño esperado es de 6947 y 5098 pb.

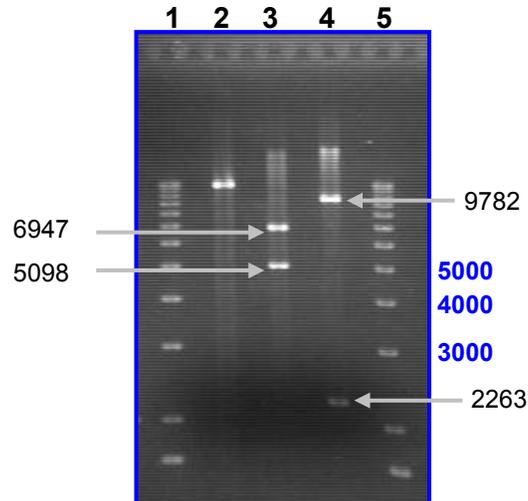


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa en el que se muestra el análisis de restricción del plásmido pBIΔGUS. Carril 1 y 5: MPM 1kb. Carril 2: pBIΔGUS linearizado. En el carril 3 se observan las bandas de 5098 y 6947 producto de la digestión doble con *NotI* y *BamHI*. En el carril 4 se observan las bandas de 2263 y 9782pb al digerir con *NheI*.

El vector pBIΔGUS aún carece de los sitios de restricción únicos requeridos para la subclonación de los casetes Sil-CP-GUS. De acuerdo al esquema previsto para dicha transferencia, que incluye escindir los cartuchos de expresión como fragmentos *XhoI-NotI*, era necesario primero eliminar un sitio *NotI* presente en pBIΔGUS en una posición inconveniente, e introducir un nuevo sitio *NotI* en el sitio múltiple de clonación del mismo plásmido. Para lograr esto pBIΔGUS fue digerido con *NotI*, los extremos fueron luego rellenados utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, y finalmente el plásmido se religó. El plásmido resultante, carente de sitio *NotI*, fue designado pBIθGUS. Para verificar la obtención del plásmido deseado se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10F' con los productos de religación y se realizaron digestiones con *NotI* de ADN plasmídico de varias transformantes. La mayoría de estas clonas portaban plásmidos que habían perdido el sitio *NotI*, como pudo determinarse por electroforesis en gel (Figura 24).

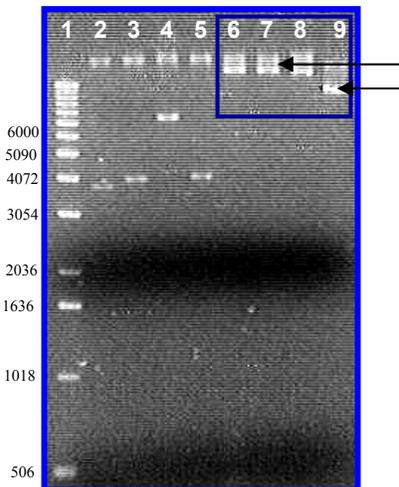


Figura 24. Comprobación de la eliminación del sitio *NotI* en pBIΔGUS por digestión con *NotI*. Carril 1: MPM; carriles 6,7,8: clonas que no se digieren con *NotI*; carril 9: digestión pBIΔGUS con *NotI*. Los carriles 2-5 incluyen muestras de ADN que no son relevantes para este trabajo.

El sitio *NotI* en el plásmido pBI121 queda comprendido dentro de una región que incluye al origen de replicación que es funcional en *Agrobacterium*. Por esta razón se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* a fin de determinar si la modificación introducida en pBIθGUS no afecta la replicación del plásmido en esa bacteria. Los resultados mostraron que la alteración realizada no afectó dicha función.

Finalmente, para obtener el vector binario apropiado para la transferencia de todas las construcciones Sil-CP-GUS, la secuencia comprendida entre los sitios *SacI* y *XhoI* del sitio múltiple de clonación del vector pBlueScriptII KS+ fue subclonada en el vector pBIθGUS, lo que dió lugar al vector pBIΩGUS. Esta inserción duplicó en el sitio múltiple de clonación los sitios de restricción *HindIII* y *EcoRI*, eliminó el sitio *StuI*, e introdujo nuevos sitios *NotI*, *EcoRV*, *PstI* y *SpeI* (Figura 26). La verificación del plásmido resultante se realizó por análisis de restricción (Figura 25).

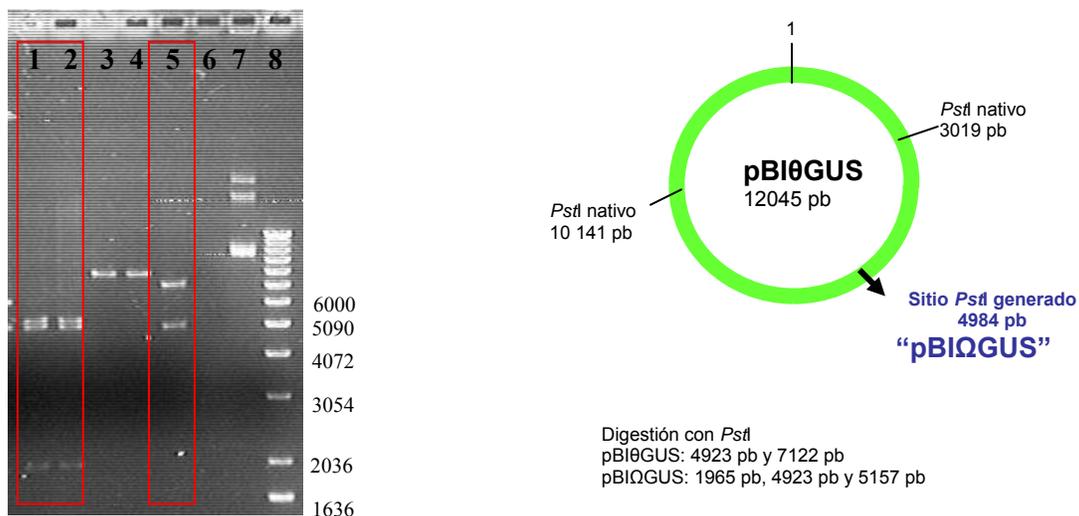


Figura 25. Comprobación de la incorporación de una parte del polilinker de pBS II SK (+) en el vector pBIθGUS para generar al vector pBIΩGUS. El fragmento incorporado incluye un nuevo sitio *PstI* lo que permite su identificación por análisis de restricción. Digestiones con *PstI*: carriles 1 y 2, las bandas de 1965, 4923 y 5157 producidas por dos clonas positivas correspondientes a pBIΩGUS; carriles 3 y 4, clonas con patrón anómalo; carril 5, bandas de 4923 y 7122 producidas por la digestión del plásmido control, pBIθGUS; carril 6, sin muestra; carril 7, pBIθGUS sin digerir; carril 8, MPM 1 kb.

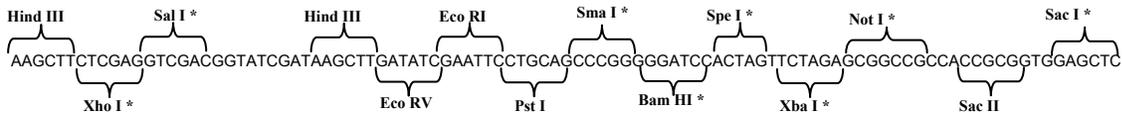
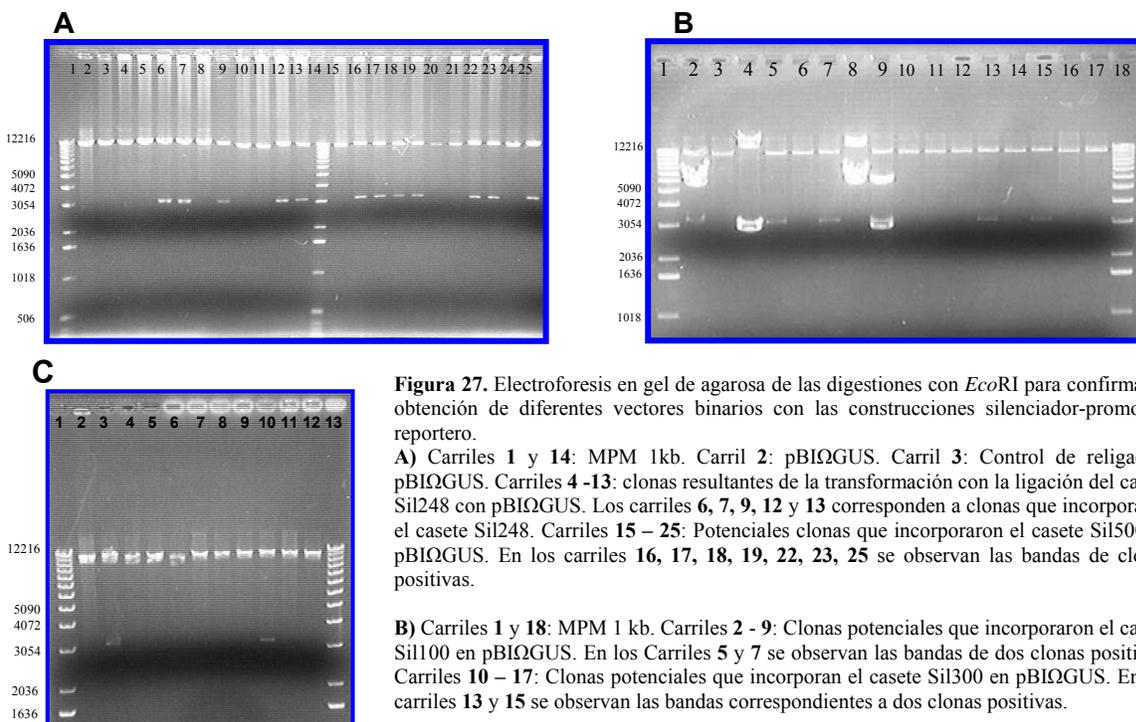


Figura 26. Sitio múltiple de clonación en el vector pBIΩGUS. Los sitios marcados con (*) son sitios únicos en el vector.

Transferencia de los módulos de expresión a vectores binarios

Para transferir los casetes Sil-proCP-GUS de los vectores de expresión transitoria a los binarios se escindieron los primeros mediante digestión con *XhoI* y *NotI* de pCP693Sil100, pCP693Sil140, pCP693Sil248, y pCP693Sil500, y se clonaron en los mismos sitios del vector pBIΩGUS.

Para verificar la inserción de los casetes en pBIΩGUS se digirieron los plásmidos resultantes con *EcoRI*. El plásmido control pBIΩGUS (12094 pb) contiene dos sitios *EcoRI*, localizados en las posiciones 4989 y 5314, por lo que se esperan bandas de 325 y 11769 pb cuando se digiere el plásmido con esa enzima. Por otro lado, los patrones de restricción de los recombinantes diferirán del control en forma predecible, y diferente en cada caso. Por ejemplo, al insertarse el casete Sil248-proCP-GUS en los sitios *XhoI-NotI* para producir pBIΩSil248 se pierde un sitio *EcoRI* pero aparece otro nuevo. El resultado de la digestión produce bandas de 12013 y 3456-pb (Figura 27). Bandas con ligeras variaciones de tamaño se obtienen para la misma digestión en pBIΩSil100, pBIΩSil140, pBIΩSil300 y pBIΩSil500.



Los casetes Sil-proCP-GUS de pCP693Sil100* y pCP693Sil140* (orientación no nativa) fueron extraídos con *ScaI* y *NotI* y posteriormente fueron clonados en *SmaI* y *NotI* en el vector pBIΩGUS. La comprobación de esta inserción también se realizó por digestión con *EcoRI*. (Figura 28).

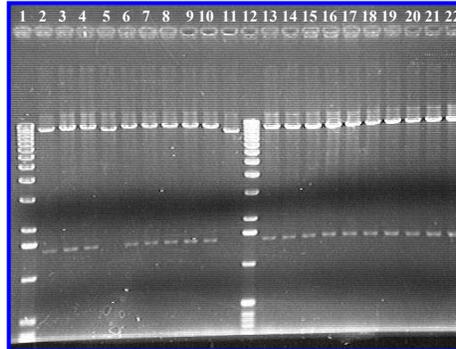


Figura 28. Gel de electroforesis de las clonas potenciales de ser pBIΩGUSSil100*_{inv.} y pBIΩGUSSil140*_{inv.} Digestiones con *EcoRI*.

Carril 1 y 12: MPM 1kb. Carriles 2 -11: Clonas potenciales de pBIΩGUS que incorporaron el inserto Sil 100*_{inv.}
Carriles 13 – 22: Clonas potenciales que incorporaron el casete Sil140*_{inv.} en pBIΩGUS.

Los diferentes plásmidos así obtenidos fueron transformados en células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404. La comprobación de que estas cepas habían incorporado el plásmido se realizó por PCR, además de la evidencia simple del crecimiento de las transformantes en el medio de selección específico. Para esto se diseñaron dos pares de iniciadores. En ambos casos, el iniciador “reverso” se aparea con secuencias de la parte inicial de GUS y el iniciador “forward” hibrida con una parte del vector pBIΩGUS anterior al sitio múltiple de clonación en el que fueron introducidos los módulos de expresión, por lo que el tamaño de la región amplificada fué diferente dependiendo el tamaño del casete (Figura 29).

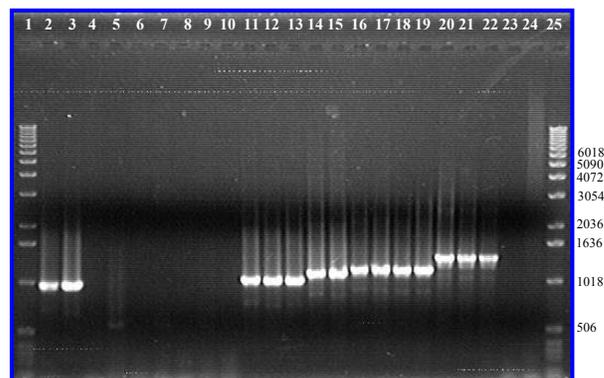


Figura 29. Electroforesis de productos de PCR para confirmar la presencia de plásmidos en *Agrobacterium tumefaciens*. Carriles 1 y 25: MPM 1 kb. Carriles 2 y 3: pBIΩSil100. Carriles 4 – 7: pBIΩSil100*_{inv.}. Carriles 8 -10: pBIΩSil140*_{inv.}. Carriles 11-13: pBIΩSil140. Carriles 14 y 15: pBIΩSil248. Carriles 16-19: pBIΩSil300. Carriles 20-22: pBIΩSil500. Carriles 23 y 24: Controles (-) de los pares de iniciadores. Obsérvese la ligera variación de tamaño de las bandas correspondiente a los diferentes tamaños del casete.

La banda obtenida por restricción con *EcoRI* de ~1500 pb (Figura 28) en los plásmidos pBIΩSil100*_{inv} y pBIΩSil140*_{inv} fué menor a la banda esperada (~3300 pb.). Adicionalmente la amplificación por PCR (Figura 29) de dichos plásmidos extraídos de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas, empleando los iniciadores BINAR 1 y 3 forward y BINAR 1 y 3 reverse que se alinean con GUS y con una parte del vector pBIΩGUS respectivamente, no produjo ninguna banda. Estos resultados sugieren que el plásmido obtenido para la construcción pBIΩSil100*_{inv} y pBIΩSil140*_{inv} no es el esperado, probablemente por contaminación con una banda *ScaI/NotI* generada en la digestión. Por esta razón la banda *ScaI-NotI* de los vectores pCP693Sil100*_{inv} y pCP693Sil140*_{inv} fué extraída recientemente y un nuevo intento para clonarla se encuentra en marcha.

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* en las que se comprobó la presencia de las construcciones de interés fueron almacenadas a -80°C en stabs de glicerol al 50%.

Construcciones con CMAs que contienen elementos CLE para su análisis funcional

Como se indicó anteriormente, Ruiz-Medrano *et al.* (1999) establecieron mediante experimentos de ganancia de función y expresión transitoria, que el elemento tardío conservado (CLE; GTGGTCCC) es necesario y suficiente para permitir la transactivación por TrAP en promotores heterólogos. Para examinar la posibilidad de que un número creciente de copias del CLE tenga un mayor efecto sobre la expresión de un promotor mínimo heterólogo, Gómez-Castañón (2004) construyó vectores de expresión con tres y seis copias del CLE a partir del vector binario pBI46S, que tiene un promotor mínimo (-46/+8) 35S de CaMV fusionado al gen reportero GUS (Figura 30), pero no llevó a cabo su caracterización funcional. Posteriormente, un grupo de investigación norteamericano generó construcciones muy similares y mostró que la expresión del gen reportero aumentaba de 10-15 veces de acuerdo al número de copias del CLE, en forma aparentemente aditiva (Cazzonelli *et al.*, 2005; Velten *et al.*, 2006), pero no encontraron evidencia de que los CLEs medien la acción de TrAP, al menos en el caso de PHV, que fue el virus que utilizaron como fuente de transactivador (Velten *et al.*, 2006). Dado que ellos utilizaron un método semiestable de expresión (agroinoculación) para sus experimentos, los resultados contradictorios de este grupo respecto a los hallazgos de Ruiz-Medrano *et al.* (1999) deberán ser re-examinados a través de métodos experimentales más robustos, por ejemplo, la infección sistémica por PHV de plantas transgénicas portadoras de las construcciones con múltiplos de CLEs.

Independientemente de la función que pueda demostrarse para los CLEs aislados, esos elementos se encuentran naturalmente asociados a otras secuencias conservadas en los promotores de los begomovirus, conformando los llamados CMAs, tal como se describió en la parte introductoria de este trabajo. Para iniciar la exploración de la función de tales Arreglos Modulares Conservados, Gómez-Castañón (2004) generó varios vectores de expresión en los que CMAs específicos se insertaron arriba de dos versiones truncadas del promotor 35S de CaMV, presentes en los vectores binarios pBI46S y pBI90S (Figura 31).

5´-AGCTTGACTA**GTGGTCCCGCTAGCA****GTGGTCCCAAGGCCTA****GTGGTCCCGTTAACT**-3´
 3´-ACTGAT**CACCAGGGGCGATCGT****CACCAGGGTTCCGGAT****CACCAGGGCAATTGAGATC**-5´

5´-AGCTTAAAGTG**GTGGTCCCAAGATCTA****GTGGTCCCATATGAG****GTGGTCCAGTACTT**-3´
 3´-ATTCAC**CACCAGGGGGTTCTAGAT****CACCAGGGGTATACT****CACCAGGGTCATGAATCGA**-5´

Figura 30. Diferentes oligonucleótidos con tres copias del CLE que se emplearon para construir los vectores pBI46S 3CLE, pBI46S 6 CLE y pBI90S 3CLE (Tomado de Gómez-Castañón, 2004).

Oligonucleótido CLE-G

5´-AGCTTTGTCGACAA**GTGGTCCCTTT****CACGTGGCATGCAAG****GTGGTCCCACGCGCCT**-3´

Oligonucleótido Tallo-CLE

5´-AGCTTTGTCGAC**ACCGGATGGCCGCGGATTTTT****AA****GTGGTCCC****CGTTAACT**-3

Figura 31. Dos de los módulos complejos conservados que se estudian en este trabajo, y que fueron introducidos a pBI46S y pBI90S para dar origen a los vectores pBI46S-(CLE-G), pBI46S-(Tallo-CLE), pBI90S-(CLE-G), y pBI90S-(Tallo-CLE). (Reproducido de Gómez-Castañón, 2004).

Los CMAs elegidos para estudiarse en mayor detalle fueron los siguientes: **a)** el llamado “Tallo-CLE”, que incluye tres secuencias conservadas, la mitad del llamado “tallo” del origen de replicación viral, un elemento CGATn y un CLE. Este CMA es característico de la mayoría de los begomovirus de Asia y algunos de América, y queda íntegramente comprendido en la secuencia de 35pb (-146/-112) cuya delección redujo de modo drástico la actividad del promotor de AC1 de CLCMV, considerado uno de los más potentes que se han caracterizado en sistemas vegetales (Xie *et al.*, 2003); **b)** el CMA “CLE-G”, que consiste de dos CLEs flanqueando a una caja G, y que se observa en forma modificada en algunos virus asiáticos como ICMV, africanos como AREV, y australianos como ToLCV; **c)** un tercer CMA está constituido por el “motif” CCAATCA, la “caja H3” y la caja rica en A/T. Este CMA se conserva prácticamente invariante en posición relativa en la mayoría de los begomovirus conocidos, pero su secuencia global es altamente variable entre los mismos (Argüello-Astorga, comunicación personal). Gómez-Castañón (2004) realizó construcciones para el estudio de los dos primeros CMAs mencionados, y en este trabajo se finalizaron las construcciones que incluyen al tercer CMA. Enseguida se describe la generación de estas últimas construcciones, y posteriormente se presentan los avances alcanzados en la caracterización funcional de los CMAs bajo estudio.

Generación de vectores de expresión para el análisis del CMA tripartita “CHAT” (CCAAT/ H3-box/ AT-rich motif)

Para obtener vectores de expresión con el tercer CMA mencionado, se realizó el apareamiento de los oligonucleótidos sintéticos CCAAT-CMA(+) y CCAAT-CMA(-), lo cual dió lugar a una secuencia corta de ADN de doble cadena con extremos compatibles para los sitios *SpeI/XbaI* y *HindIII* (Figura 32).

```
AGCTTAGGCCTGA CCAATCATATTGCG CCTGACGAGCTTAGATATTTAGTACT
ATCCGGACTGGTTAGTATAACGCGGACTGCTCGAATCTATAAAATCATGAGATC
```

Figura 32. Secuencia de doble cadena obtenida por el apareamiento de los oligonucleótidos *CCAAT-CMA+* y *CCAAT-CMA-*. En color rojo se muestra el motivo CCAATCA, en verde la caja H3, en azul la caja rica en A/T y en negritas el sitio de restricción *ScaI* que se empleó para la comprobación de la inserción de esta secuencia en pBI46S. Este tipo de elementos conforman un CMA prácticamente invariante en posición relativa, pero altamente variable en secuencia específica en la serie evolutiva de los begomovirus.

Este ADN sintético fué clonado en el vector binario pBI46S empleando los sitios *HindIII* y *SpeI*. Este vector consta básicamente de un marcador de selección (*nptII*) y el gen reportero *uidA* (GUS) dirigido por el promotor 35S de CaMV truncado en la posición -46 (Ruiz-Medrano, 1996) Las características más importantes de este plásmido se muestran en la Figura 33.

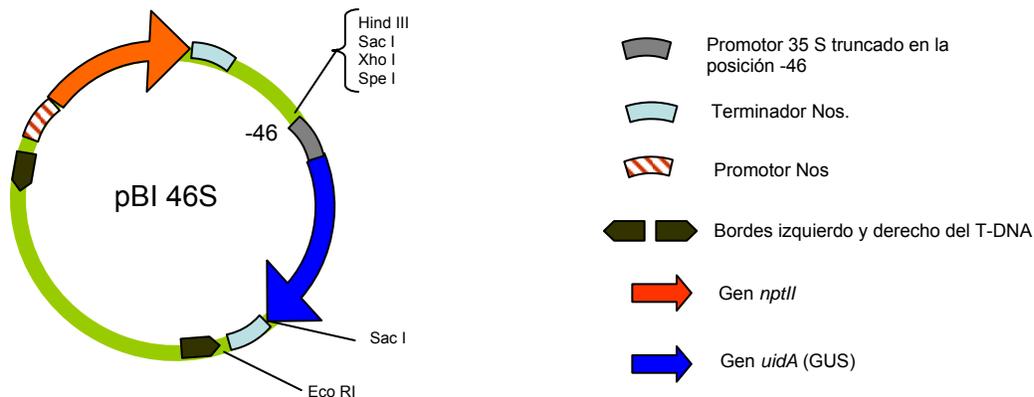


Figura 33. Diagrama simplificado del plásmido pBI46S.

Nota: El plásmido pBI90S es casi idéntico, difiriendo solo en la región del promotor 35S de CaMV, que se encuentra truncado en la posición -90 en vez de -46.

La clonación de la secuencia fué confirmada por análisis de restricción con la enzima *ScaI*. El plásmido pBI46S no posee sitios *ScaI*, mientras que la secuencia introducida contiene un sitio para la enzima (Figura 34).

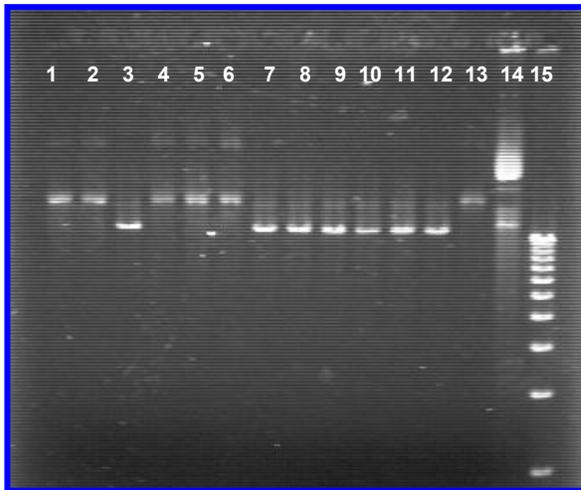


Figura 34. Comprobación de la incorporación del CMA (CCAAT-H3 -AGATA) por digestión con Sca I. La secuencia sintética incorpora un sitio Sca I al plásmido, por lo que al digerirlo con esa enzima se produce un ADN lineal que tiene diferente migración electroforética que la forma circular cerrada. Carriles 7-12: ADN plasmídico de transformantes independientes digeridas con ScaI; algunas incorporaron el ADN sintético. Carril 13: ligación control (-) Carril 14 : pBI46S+ScaI. Carril 15: marcador de peso molecular 1 kb.

El vector resultante de esta clonación fué denominado pBI46SCMA3. Es previsible que esta construcción no producirá altos niveles de expresión del reportero en plantas transgénicas, ya que el CMA involucrado corresponde a una región de regulación negativa identificada por Sunter y Bisaro (2003), además de incluir un promotor truncado 35S de CaMV en la posición -46, el cual carece de elementos de activación (Figura 35).

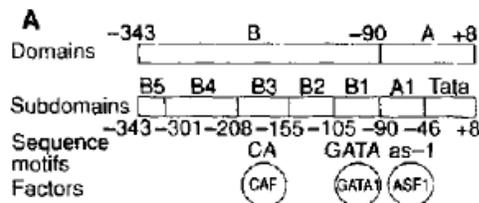


Figura 35. Promotor 35S de CaMV en el cual se observan las posiciones truncadas -46 que representa un core promoter y -90 que incluye un elemento de activación as-1 que es unido por el factor ASF1. Tomada de Benfey y Chua, (1990).

La construcción pBI46SCMA3, sin elementos activadores adicionales, fué utilizada para generar un segundo vector, el cual contiene tres copias del CLE ubicadas corriente arriba del módulo complejo conservado, lo cual simula la combinación y posición relativa de estos elementos en diferentes begomovirus, aunque en esos casos lo usual es la presencia de una o dos copias del CLE, no tres como en nuestra construcción.

Para la construcción de los nuevos vectores se realizó un apareamiento de los oligonucleótidos sintéticos DIR-3CLE-DH y COM-3CLE-DH. Estos oligonucleótidos al aparearse producen un ADN de doble cadena que contiene 3 copias del CLE en la misma orientación. Los oligonucleótidos fueron diseñados de tal manera que al aparearse fueran compatibles con extremos cohesivos *HindIII*, pero que al clonarse solo se reconstituyera el sitio *HindIII* en uno de sus extremos (Figura 36).

AGCTTAA **GTGGTCCC** CAAGATCTA **GTGGTCCC** CATATGA **GTGGTCCC** AGTACTT
 ATTCACCAGGGGTTCTAGATCACCAGGGGTATACTCACCAGGGTCATGAATCGA

Figura 36. Apareamiento de los oligonucleótidos *DIR 3-CLE-DH* y *COM 3-CLE-DH*. En verde se observan resaltadas tres copias idénticas del elemento tardío conservado (CLE) el cual tiene la secuencia consenso *GTGGTCCC*. En rojo se muestra el par de bases diseñadas para no restituir el sitio *HindIII* en este extremo al ligarse al vector.

La secuencia sintética que contiene tres copias del elemento tardío conservado fué entonces introducida al vector pBI46SCMA al digerirlo con *HindIII* y ligarlo en presencia del inserto. El inserto se incorporó al vector en las dos orientaciones posibles, pero la manera en que fueron diseñados los oligonucleótidos permitió identificar la orientación mediante digestión enzimática (Figura 37).

Las diferentes construcciones obtenidas de los módulos complejos conservados fueron introducidas en *Agrobacterium tumefaciens* y se almacenaron a -80°C en glicerol al 50%.

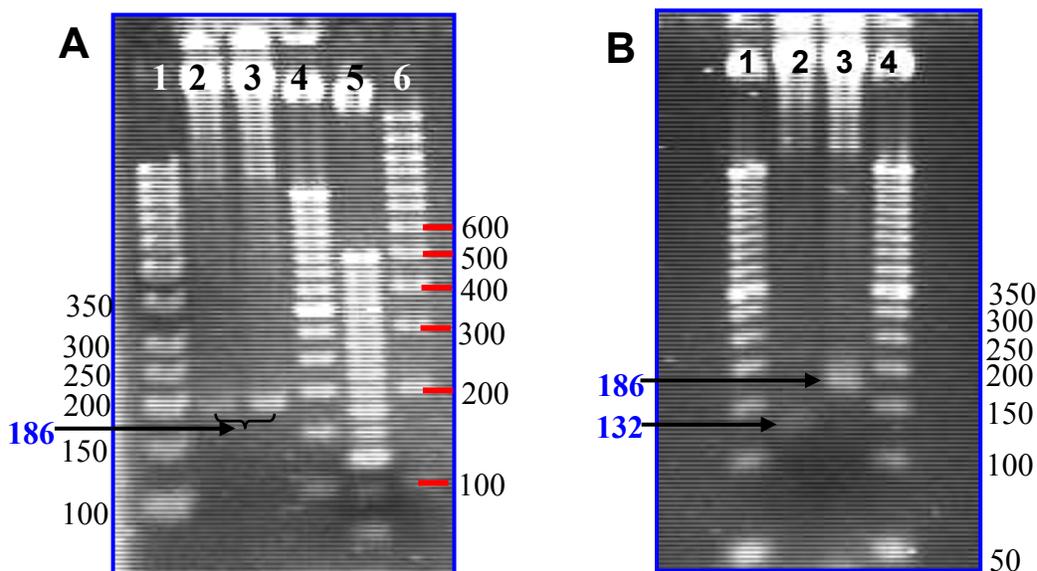


Figura 37. Electroforesis de la digestión con *HindIII* para determinar la orientación del inserto 3CLE en el vector pBI46SCMA. **A)** Carril 1: MPM 50pb; carriles 2 y 3: plásmido con inserción de la secuencias repetidas en dirección directa (→→→) con respecto al promotor; carril 4: MPM 50 pb (invitrogen); carril 5: MPM 25 pb (Invitrogen); carril 6: MPM 100 pb. **B)** Carriles 1 y 4: MPM 50 pb, Carril 2: plásmido con inserción de la secuencias repetidas en orientación opuesta (←←←) con respecto al promotor, carril 3: plásmido con inserción de las secuencias repetidas en orientación directa (→→→) con respecto al promotor.

Generación de plantas transgénicas de tabaco con diversas construcciones CMA-promotor mínimo-GUS

Para estudiar las propiedades reguladoras de los diferentes módulos complejos conservados se hizo necesario obtener plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). La generación de plantas transgénicas se llevó a cabo por el sistema binario de *Agrobacterium tumefaciens* (ver Materiales y Métodos). Este trabajo estuvo a cargo de la Biól. Rosa María Rangel, del Departamento de Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Se generaron plantas transgénicas con tres de las construcciones que incluyen multímeros del CLE: pBI46S-3CLE, pBI90S-3CLE, y pBI46S-6CLE, y con cuatro de las construcciones con CMAs: pBI46S-Tallo-CLE, pBI90S-Tallo-CLE, pBI46S-CLE-G y pBI90S-CLE-G. En todos los casos, al menos 8 líneas independientes se regeneraron (plantas T₀) y varias de ellas fueron examinadas por métodos histoquímicos para determinar si había expresión del gen reportero en ausencia de factores virales.

Análisis histoquímico de la expresión del gen reportero en las plantas transgénicas

En general, se observó una baja expresión del gen reportero GUS en las plantas transgénicas obtenidas. Las líneas de transgénicas que mostraron mayor actividad fueron pBI90S 3CLE (Figura 38), pBI46S-6CLE, y pBI46S-Tallo/CLE (datos no mostrados). Esta actividad fue mayor en las puntas de las hojas y en los extremos de los tricomas (“vellos” foliares). Las líneas de plantas que mostraron más baja actividad fueron pBI46S CLE-G y pBI46S-3CLE, en las cuales en ninguna de las plantas se observó la coloración típica azul al observarse bajo microscopio. Las construcciones en las que el promotor truncado 35S se encuentra en la posición -90, en general mostraron mayor actividad que las construcciones en las que dicho promotor se encontraba truncado en la posición -46, siendo la excepción pBI90S-Tallo/CLE.

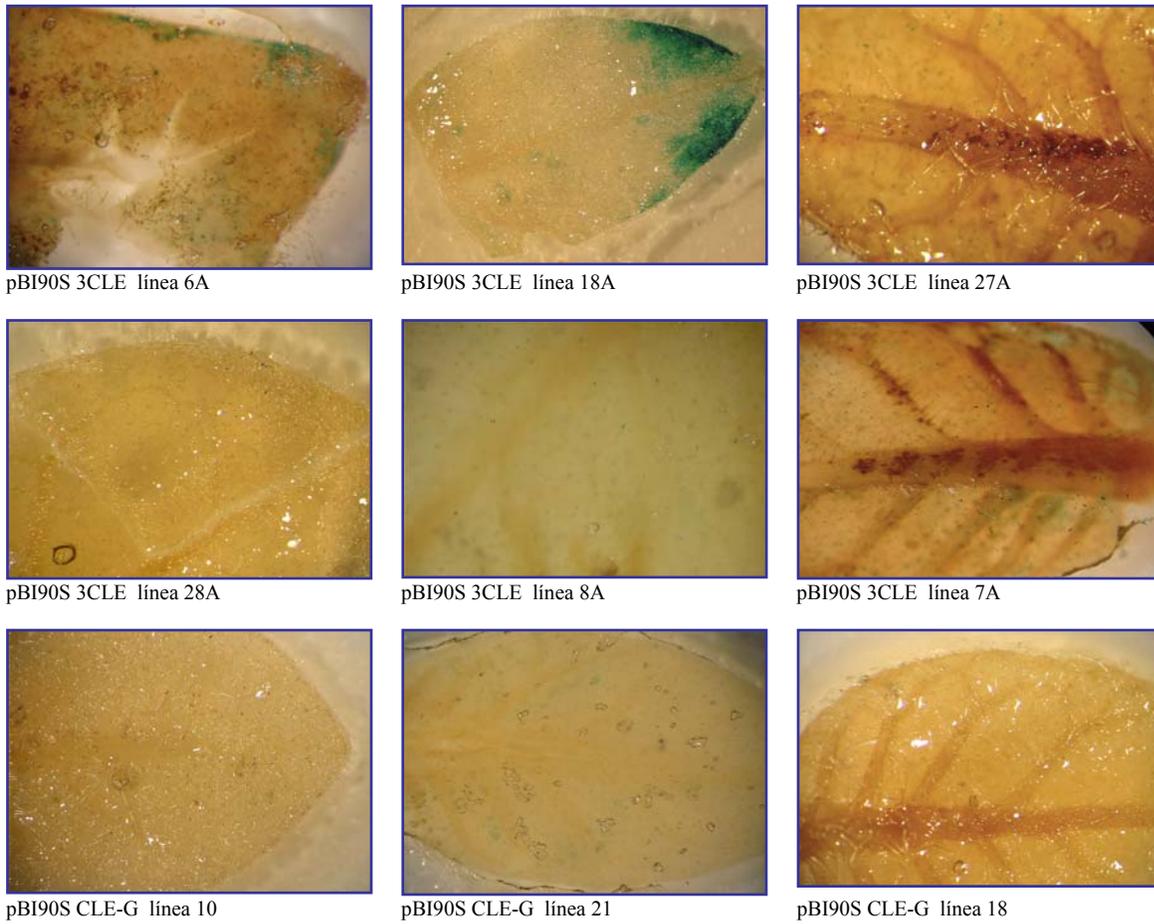


Figura 38. Fotografías de los ensayos de GUS histoquímico en hojas de algunas líneas de plantas transgénicas.

Verificación por PCR de la naturaleza transgénica de las plantas generadas

Se seleccionaron algunas plantas de tabaco de algunas líneas en las que no se había obtenido actividad de GUS en el ensayo histoquímico y se extrajo ADN genómico para confirmar la presencia de los transgenes por PCR. Las plantas analizadas incluyeron algunas portadoras de las construcciones pBI46S-CLE/G, pBI46S-3CLE, pBI46S-Tallo/CLE y pBI46S-6CLE. Los ensayos de PCR confirmaron la presencia de los transgenes *nptII* y *uidA* en casi todas las plantas seleccionadas (Figura 39).

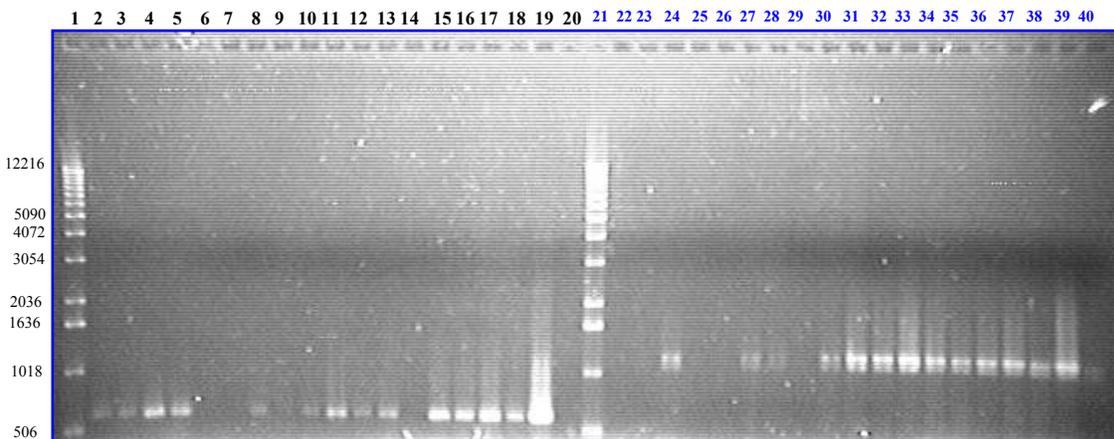


Figura 39. Productos de PCR de los genes *nptII* y *uidA* (GUS) presentes en algunas líneas de plantas transgénicas. En la amplificación de *nptII* se espera un producto de 615 pb y para GUS se espera un producto de 1202 pb. Carriles 1 y 21: MPM 1kb. Carriles 2-18: amplificación con *nptII* de varias líneas transgénicas pBI46S-3CLE y pBI46S-CLE/G. Carril 19: control (+) *nptII*. Carril 20: control (-) sin ADN. Carriles 22-38: amplificación con GUS de líneas transgénicas. Carril 39: control (+) GUS. Carril 40: control (-).

Resultados del ensayo de GUS por fluorimetría

Se analizó la actividad de GUS de las diferentes líneas de plantas correspondientes a los diversos arreglos modulares conservados por estudiar. Además de los ensayos histoquímicos, se realizaron mediciones fluorométricas en las que se evaluó la actividad de β -glucuronidasa por miligramo de proteína total de las diferentes plantas. Se realizaron dos mediciones independientes en las que se utilizaron diferentes stocks de reactivos para elaborar la curva de cuantificación. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5, y se ilustran en las Figuras 40 y 41.

Cabe destacar que los ensayos de GUS histoquímico y fluorométrico que se llevaron a cabo solo nos proporcionan una idea general del nivel de expresión basal en condiciones de no infección, pero el propósito principal es determinar la expresión del reportero en presencia de factores virales, principalmente de TrAP.

Tabla 5. Actividad de GUS en diferentes líneas To de tabaco transgénico, portadoras de construcciones con CMAs .

Plántula	Actividad (pmols/mg prot/min)	Plántula	Actividad (pmols/mg prot/min)
Control (-)	31.333	46S-Stem-CLE 1A	34.666
Control (-)	32	46S-Stem-CLE 2A	36
		46S-Stem-CLE 3A	33.333
		46S-Stem-CLE 4A	38
46S-CLE-G 1A	31.333	46S-Stem-CLE 5A	42.666
46S-CLE-G 4A	30.666	46S-Stem-CLE 6A	37.333
46S-CLE-G 6A	30	46S-Stem-CLE 1	71.333
46S-CLE-G 12A	30	46S-Stem-CLE 3	57.333
46S-CLE-G 13A	31.333	46S-Stem-CLE 4	54.666
46S-CLE-G 15A	30	46S-Stem-CLE 5	56.666
46S-CLE-G 16A	32	46S-Stem-CLE 8	37.333
46S-CLE-G 19A	32	46S-Stem-CLE 9	34.666
		46S-Stem-CLE 10	77.333
90S-3CLE 1A	33.333	46S-Stem-CLE 11	31.333
90S-3CLE 4A	31.333	46S-Stem-CLE 12	32
90S-3CLE 5A	34.666	46S-Stem-CLE 13	34.666
90S-3CLE 6A	63.333	46S-Stem-CLE 14	32
90S-3CLE 7A	100	46S-Stem-CLE 17	30.666
90S-3CLE 8A	65.333	46S-Stem-CLE 18	33.333
90S-3CLE 10A	32	46S-Stem-CLE 19	32.666
90S-3CLE 12A	64	46S-Stem-CLE 20	34
90S-3CLE 18A	96.666	46S-Stem-CLE 21	32
90S-3CLE 21A	45.333		
90S-3CLE 22A	47.333	90S-CLE-G 1	34.666
90S-3CLE 27A	35.333	90S-CLE-G 2	33.333
90S-3CLE 28A	39.333	90S-CLE-G 3	34.666
		90S-CLE-G 6	32.666
90S-Stem-CLE 1A	30	90S-CLE-G 7	34.666
90S-Stem-CLE 2A	38.666	90S-CLE-G 9	38.666
90S-Stem-CLE 3A	30	90S-CLE-G 10	34
90S-Stem-CLE 4A	30.666	90S-CLE-G 11	35.333
90S-Stem-CLE 5A	34.666	90S-CLE-G 12	38
90S-Stem-CLE 6A	66	90S-CLE-G 14	43.333
90S-Stem-CLE 7A	39.333	90S-CLE-G 15	39.333
90S-Stem-CLE 9A	34	90S-CLE-G 16	39.333
90S-Stem-CLE 12A	68	90S-CLE-G 17	37.333
90S-Stem-CLE 13A	32.666	90S-CLE-G 18	34
90S-Stem-CLE 16A	37.333	90S-CLE-G 19	30
90S-Stem-CLE 19A	37.333	90S-CLE-G 20	34
90S-Stem-CLE 22A	32.666	90S-CLE-G 21	38.666
90S-Stem-CLE 23A	33.333	90S-CLE-G 22	32
		90S-CLE-G 23	40
46S-3CLE 1A	43.333	90S-CLE-G 24	32.666
46S-3CLE 2A	38	90S-CLE-G 25	33.333
46S-3CLE 3A	55.333		
46S-3CLE 4A	38	46S-6CLE 1B	37.333
46S-3CLE 7A	35.333	46S-6CLE 1	36
46S-3CLE 8A	40	46S-6CLE 6	32.666
46S-3CLE 10A	32	46S-6CLE 9	37.333
46S-3CLE 16A	32.666	46S-6CLE 10	37.333
46S-3CLE 17A	36	46S-6CLE 11	38
46S-3CLE 18A	34.666	46S-6CLE 12	44.666
46S-3CLE 19A	30.666	46S-6CLE 13	52
46S-3CLE 20A	32	46S-6CLE 14	140.666
46S-3CLE 21A	32	46S-6CLE 15	50
46S-3CLE 1	32	46S-6CLE 16	63.333
46S-3CLE 3	42.666	46S-6CLE 17	33.333
46S-3CLE 10	32	46S-6CLE 19	33.333
46S-3CLE 11	40	46S-6CLE 21	38.666
46S-3CLE 13	42.666	46S-6CLE 22	35.333
46S-3CLE 14	40.666	46S-6CLE 23	85.333
46S-3CLE 15	35.333		

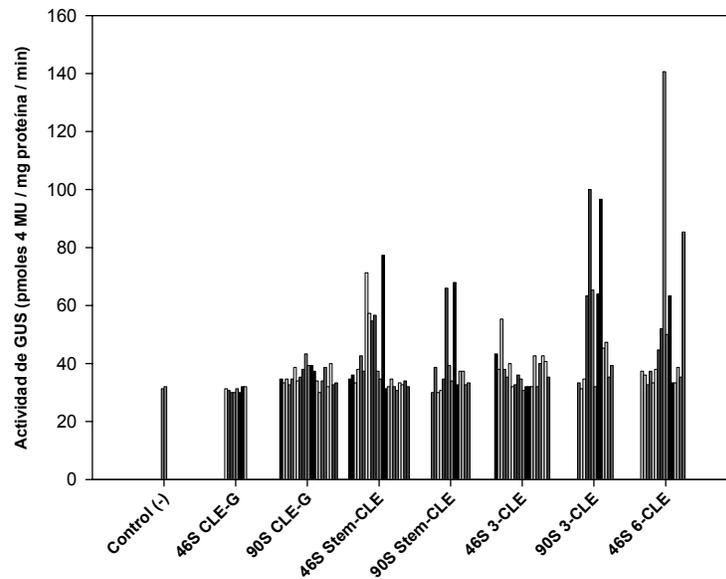


Figura 40. Nivel de expresión del reportero GUS medido en ensayos fluorométricos de diferentes líneas de tabaco transgénico.

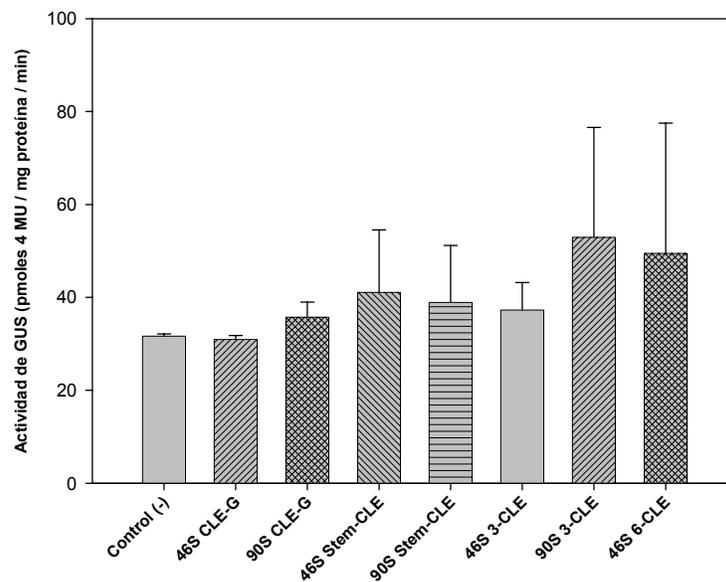


Figura 41. Promedio y desviación estándar de la actividad de GUS en ensayos fluorométricos sobre diferentes líneas de tabaco transgénico.

DISCUSIÓN

Delimitación del elemento silenciador del promotor CP.

Diversos estudios realizados en virus muestran que la regulación de la expresión génica es un proceso finamente controlado durante el curso de la infección. Los geminivirus no son la excepción, y poseen programas de regulación temporal en la expresión de sus genes, que incluyen tanto procesos de activación como de represión. Uno de estos procesos de regulación negativa es llevado a cabo por un elemento silenciador de acción en *cis*, el cual ha sido identificado en los begomovirus TGMV y PHV. Lo interesante de este silenciador es que es específico para el gen de la cápside (AV1) y no tiene efecto sobre otros genes virales. Silenciadores de este tipo son poco comunes, y hasta donde se sabe los reportes de este tipo de silenciadores específicos de promotor se reducen a los encontrados en estos virus (Ruiz-Medrano, 1996; Sunter y Bisaro, 1997) y al del gen PAP I de rata (Ortiz *et al.*, 1997). El mecanismo de acción de este tipo de silenciadores no se ha determinado experimentalmente, pero se sugiere que podría involucrar la inhibición de factores generales de transcripción (GTFs) o la alteración de la estructura del promotor a través de un factor específico o componente mediador.

En el presente trabajo de investigación se logró completar la serie de vectores de expresión que permitirán mapear con mayor precisión al silenciador de PHV. Hasta este punto se dispone de 6 construcciones con segmentos de diferente longitud de la región silenciadora; estas construcciones se encuentran en vectores de expresión transitoria y en vectores binarios que ya han sido incorporados en *Agrobacterium tumefaciens*. Estas bacterias serán utilizadas para generar plantas transgénicas con las construcciones silenciador-promotor-reportero de interés. De los resultados de los ensayos histoquímicos y fluorométricos realizados en estas plantas se podrá concluir que las construcciones que no expresen GUS en floema contienen un silenciador funcional, y las construcciones que expresen al reportero en ausencia de infección no contienen un silenciador o éste está incompleto y no funcional. Dado que los fragmentos examinados tienen un extremo 5' similar, pudiese darse el caso que aún la construcción con solo 100 pb de la región silenciadora reprima la expresión del reportero en floema. Si ese fuera el resultado, entonces la delimitación del silenciador podría realizarse de modo aún más fino, por técnicas de mutagénesis en bloques cortos ("linker-scanning"), deleciones internas o mutagénesis de secuencias específicas.

Aunque no hay a la fecha información más precisa de la localización y la extensión del silenciador de CP de begomovirus que la que Sunter y Bisaro (1997) obtuvieron en el caso de TGMV, se puede anticipar, por analogía con sistemas eucarióticos mejor estudiados, que ese elemento posiblemente es corto, ya que la mayoría de las secuencias silenciadoras que se han caracterizado en sistemas eucarióticos son, generalmente, menores a los 25 pb (Ogbourne y Antalis, 1998). Un examen detenido de la región silenciadora de TGMV y su homóloga en PHV y otros virus revela la dificultad de intentar identificar algunas secuencias de ADN potencialmente críticas para esta función reguladora, utilizando el criterio de conservación de un segmento de ADN en una serie de virus emparentados. En primer término, la región Sil300 de TGMV comprende una región de solapamiento de secuencias codificantes (los genes AL1 y AL2), lo que complica enormemente el análisis, pues no es posible decidir si la conservación de una secuencia dada está relacionada con la presión selectiva para preservar la secuencia de

aminoácidos de las proteínas, o a su papel como elemento regulador en *cis*. Sin embargo, un análisis en el que se utilizó el enfoque filogenético-estructural previamente citado, identificó a una secuencia de 24 pb con estructura semi-palindrómica, cercana al codón de inicio del gen AL2 de TGMV y PHV, como un elemento *cis*-regulador potencial (Argüello-Astorga, comunicación personal). La secuencia en TGMV está compuesta por dos repetidos invertidos de 9 pb, separados por 6 pb (GTTTTCTCttgtcGAGGAAAAC), aunque en PHV y algunos otros begomovirus presenta una estructura palindrómica menos clara. Las razones para pensar que esta secuencia pudiese ser parte de un elemento regulador son tres, principalmente: 1) su semejanza estructural con varios silenciadores bien caracterizados, como el elemento palindrómico de 18 pb que regula la expresión de la lisozima de pollo (TTGACCcCAGCTGaGGTCAA; Baniahmad *et al.*, 1990), y el silenciador del gen PAI-2 humano (CCTCTCTAGAGAG; Antalis *et al.*, 1996); 2) su conservación a nivel de ADN no parece correlacionar con el grado de conservación de las regiones codificantes; por ejemplo, en TGMV esta secuencia de 24 pb codifica la secuencia VFLDKEEN de la proteína AL1, pero en PHV la secuencia correspondiente es DYLSEEKN (38% de identidad, pues solo 3 de 8 aminoácidos son similares); 3) la secuencia se encuentra ubicada entre la caja TATA putativa del gen AL2/AL3 y el codón de inicio de AL2, una posición que sugiere una función reguladora.

No se sabe aún cual es el mecanismo molecular por el cual funcionan los elementos silenciadores de PHV y TGMV, pero lo más probable es que operen de un modo similar a otros silenciadores de eucariotes, vía su interacción con uno o más proteínas reguladoras que reconocen secuencias específicas de ADN y que además son capaces de interactuar con factores de la maquinaria de transcripción basal, o con activadores transcripcionales unidos corriente arriba del promotor base (“core promoter”), cuya acción anulan. En cualquier caso, la o las proteínas que interactúan con el silenciador deben expresarse principal o exclusivamente en tejido vascular, lo que explicaría la función tejido-específica de ese elemento regulador.

Arreglos Modulares Conservados (CMAs)

Las regiones de control de la expresión génica en los geminivirus debieron adecuarse a los programas de regulación transcripcional de sus huéspedes en el curso de su largo proceso de co-evolución. Por esta razón, cabe esperar que los virus dispongan de estrategias de regulación basadas en la maquinaria celular eucarionte. Los programas de regulación de la expresión génica involucran tanto a secuencias específicas del ADN (elementos o reguladores en *cis*) como las proteínas que reconocen específicamente a esas secuencias (factores o reguladores en *trans*). El control preciso de la transcripción en sistemas complejos requiere de mayor versatilidad y especificidad que la que puede lograrse por la unión de un solo factor. En vez de esto la fuerza y especificidad de un promotor está determinada por conjuntos de elementos reguladores, tanto cercanos al sitio de inicio de la transcripción, como localizados a mayor distancia del promotor. La diversidad de estos componentes permite un control fino de la expresión génica. Es de suponer que los virus de igual forma requieran la presencia de numerosos elementos de control y factores para llevar a cabo sus estrictos programas de regulación de la expresión génica.

Los arreglos modulares conservados (CMAs) presentes en los promotores tardíos de los begomovirus funcionarían de un modo similar a los conjuntos de elementos de control presentes en los genes de sus huéspedes. Sin embargo los virus no codifican para todas las proteínas que

están involucradas en la regulación transcripcional de sus genes; esto les permite conservar genomas pequeños pero los restringe a emplear solo las moléculas del huésped. A la fecha no se conocen cuales son las proteínas que se unen a las secuencias consenso encontradas en los CMAs de los promotores geminivirales. Incluso no se puede afirmar con toda seguridad que estas secuencias consenso sean reconocidas por alguna proteína, pero el hecho de que se encuentren conservadas sugiere fuertemente dicha hipótesis. De igual modo los elementos propuestos que conforman un CMA identificado por análisis comparativos son definidos en cierto modo arbitrariamente, basándose solo en su conservación y ubicación cercana. Por supuesto, los límites precisos de un CMA, así como los de los elementos funcionales que lo componen, deben determinarse experimentalmente.

En lo referente a regulación de la expresión génica por activación, los genes AV1 y BV1 son transactivados por la proteína TrAP en etapas tardías de la infección. La manera por la que TrAP realiza su función de activación es, más probablemente, por interacciones proteína-proteína, ya que TrAP no parece ser capaz de unir secuencias específicas de ADN de doble cadena. Esta noción es también compatible con la observación de que TrAP parece actuar de dos maneras diferentes sobre los promotores tardíos, por un lado activando la expresión de CP en mesófilo, y desreprimiéndola en tejido vascular (Sunter y Bisaro, 1997). El único elemento para el que existen datos experimentales que indican su función como elemento de respuesta a TrAP, es el CLE (“conserved late element”) el cual se encuentra en promotores de un gran número de geminivirus. Los CLEs se encuentran dispuestos en diferentes arreglos en cuanto a su número y orientación en los promotores virales, pero siempre parecen formar parte de módulos complejos conservados (CMAs) mencionados anteriormente. Se postula que los CMA funcionan como elementos reguladores multipartitas, es decir, como unidades reguladoras complejas. La función del CLE dentro de cada uno de los distintos CMAs puede ser diferente, aún cuando se ha demostrado que este elemento aislado, en una o más copias, puede mediar el efecto de activación transcripcional de TrAP sobre un promotor mínimo no geminiviral (Monsalve-Fonnegra, 2002). Repetidos directos del CLE fusionados a dos versiones truncadas del promotor 35S (-46 y -90) confieren un mayor nivel de expresión del gen reportero GUS en presencia de una fuente de TrAP (Genoma A) al bombardearse en tejidos de hoja de tabaco y chícharo (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). Kosugi y colaboradores observaron que un dímero de un motivo similar al CLE (GTGGGCC) insertado en una construcción con el promotor truncado 35S (-54 a +5) fusionado a GUS estimuló la actividad del reportero en razón de 5.5 veces con respecto a un control sin CLE en protoplastos de tabaco (Kosugi *et al.*, 1995).

Según los criterios de búsqueda empleados por Velten y colaboradores, (2005), para identificar elementos de regulación positiva de la expresión génica, estos elementos se encuentran en muchas ocasiones como repetidos directos ó invertidos. En su búsqueda in silico dentro de la región intergénica de diferentes geminivirus y nanovirus contenidos en la base de datos del GenBank encontraron nuevamente la secuencia consenso del CLE. Es importante hacer notar que los diferentes enfoques que se han empleado para buscar elementos reguladores en la región intergénica de geminivirus han arrojado como resultado la presencia del CLE, ya sean los estudios iniciales basados en la búsqueda de elementos conservados entre diferentes virus (Argüello-Astorga, 1994), como el criterio de búsqueda de elementos repetidos directos ó invertidos en un mismo virus (Velten *et al.*, 2005). Adicionalmente a la búsqueda realizada, fue probado por este último grupo que los elementos CLE introducidos en una construcción con el promotor mínimo 35S (-46 a +1) fusionado a un gen reportero de luciferasa tienen un efecto positivo en la expresión del reportero en ausencia de factores virales. También mostraron que

este elemento se encuentra enriquecido 17 veces más con respecto a secuencias aleatorias de la misma longitud y composición dentro de las secuencias genómicas de geminivirus; así como ~4 veces más en las secuencias promotoras (-1 a -500) de *Arabidopsis* comparado con las secuencias de regiones codificantes.

Sin embargo TrAP no se une a secuencias específicas de ADN de doble cadena según diferentes experimentos (Noris *et al.*, 1996; Sung y Coutts, 1996). Lo más probable es que TrAP actúe uniéndose indirectamente a dicho elemento al interactuar con otras proteínas nucleares de la planta. Este caso ocurre con otros transactivadores virales, como VP16, que no se une directamente al ADN sino que interactúa con factores que unen secuencias específicas de los promotores blanco.

Algunos reportes recientes han descrito proteínas de unión al ADN que se unen con motivos similares al CLE presentes en muchos promotores de plantas. Por ejemplo, el motivo GTGGGCCCGT, presente en el promotor del gen PCNA (Antígeno Nuclear de Células en Proliferación) (Kosugi *et al.*, 1995). Este motivo contiene la secuencia consenso GGNCCC, la cual es necesaria para la unión de los factores PCF1-6 en arroz (Kosugi y Ohashi., 2002) y TBP1 en maíz (Doebley *et al.*, 1997) que contienen el dominio TCP de unión al ADN.

La secuencia tccgGTGGGCCCGaaac presente en el promotor GapC4 de maíz también posee un motivo casi idéntico al CLE y puede unir un factor presente en extractos nucleares de hoja de plantas de tabaco. (Gefferes *et al.*, 1999). Esta evidencia sugiere que el CLE puede estar involucrado en la regulación de la expresión génica viral al interactuar con factores propios de la planta, que son empleados para regular algunos de sus genes.

El núcleo central de la secuencia consenso CLE (G¹T²G³G⁴T⁵C⁶C⁷C⁸) estudiado por mutaciones puntuales parece encontrarse en las posiciones 2-7 (Monsalve-Fonnegra, 2002) y 2-4, 6-7 (Cazzonelli *et al.*, 2005). La posición 5, que resultó ser la que produjo una reducción menos significativa de la expresión del reportero coincide con la única base diferente en el elemento similar al CLE presente en el promotor de GapC4.

A la fecha no queda claro si el efecto activador de TrAP sobre los genes tardíos virales es mediado por el CLE, ó es un efecto de activación mucho más general. Sin embargo, el CLE, se encuentra naturalmente formando parte de CMAs, por lo que deben determinarse experimentalmente las propiedades transactivadoras de esas unidades putativas, así como la función de los diferentes elementos que componen dichos módulos. Además, resulta conveniente identificar los factores que unen a las secuencias de control propuestas, haciendo uso de ensayos de movilidad electroforética, “footprinting” con DNaseI, cromatografía de afinidad para secuencias específicas de ADN, y otras técnicas moleculares modernas.

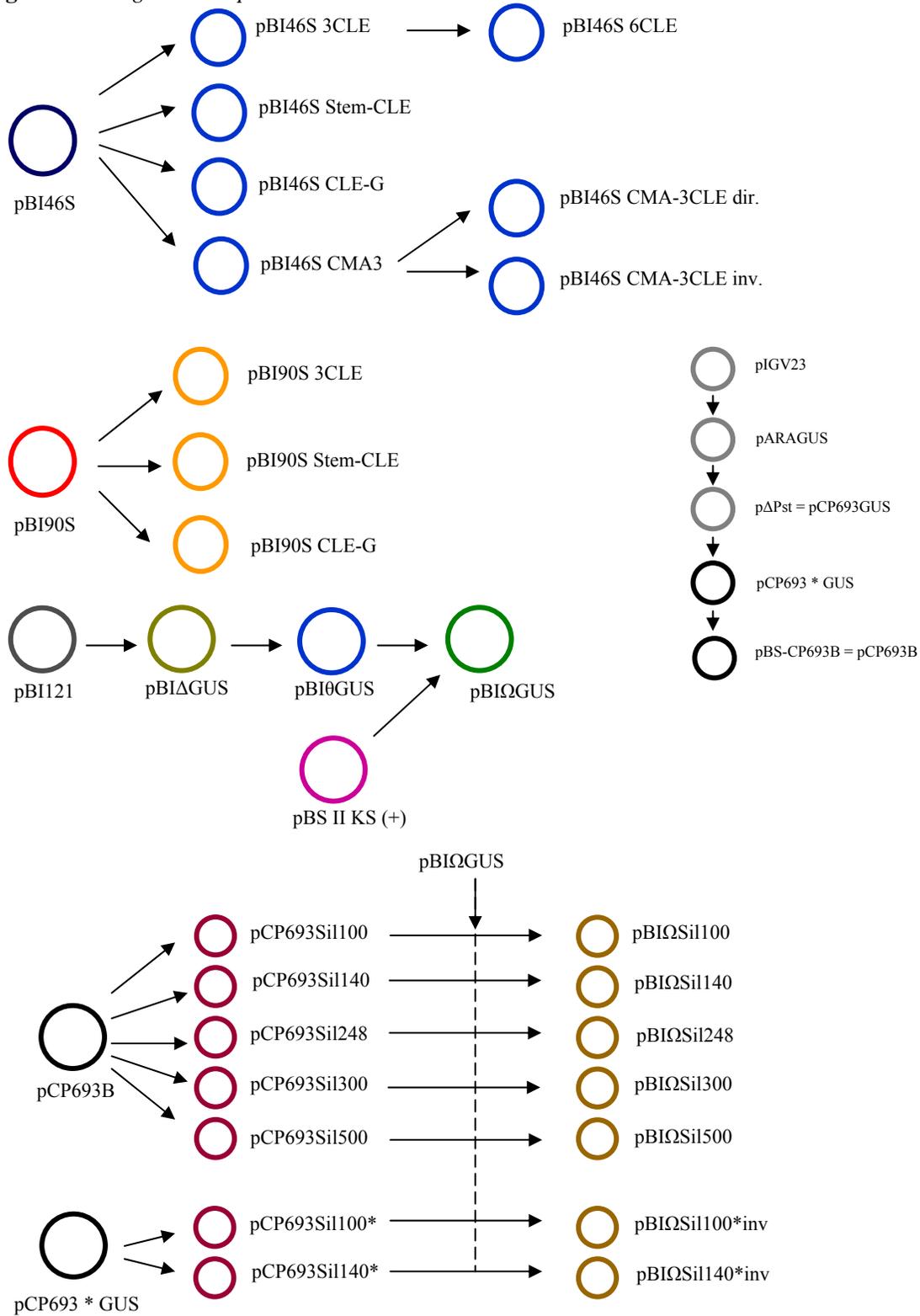
En este trabajo se logró establecer, en sistemas transgénicos, la capacidad del CLE para actuar como un elemento activador de la transcripción, en el contexto de un promotor mínimo heterólogo (35S, -46) desprovisto de cualquier otro elemento activador. Esto fué más claro en el caso de las plantas transformadas con la construcción 46S-6CLE, en las que encontramos varias líneas con actividad de GUS significativa. Si bien Cazzonelli *et al.*, (2005) generaron plantas transgénicas con un promotor similar, el gen reportero que utilizaron fué el de luciferasa (RiLUC), lo que dificulta considerablemente el análisis del patrón de expresión tisular del transgen. Dado que en este estudio las plantas fueron transformadas con el gen reportero GUS (*uidA*), el cual es idóneo para el análisis histoquímico fino, será posible ahora determinar la actividad tejido-específica de ese promotor sintético, constituido exclusivamente por CLEs y las secuencias que funcionan como plataforma para el ensamblaje de la maquinaria transcripcional

basal (caja TATA e iniciador), lo que proporcionará información muy valiosa acerca de las propiedades reguladoras del CLE, e indirectamente de los factores transcripcionales de la planta que interactúan con dicho elemento. Pese a lo preliminar de los datos de actividad de GUS en las plantas 46S-3CLE y 46S-6CLE que se han evaluado al presente, resulta claro que el efecto aditivo sobre el nivel de expresión génica que observaron Cazzonelli *et al.*, (2005) al incrementar el número de copias del CLE en los promotores, se ha reproducido muy bien en nuestro sistema. Por otra parte, en las líneas transgénicas 46S-Tallo/CLE se observó asimismo una clara diferencia de expresión de GUS con respecto al control en diversas plantas, y si bien dicha expresión se da a niveles muy bajos resulta, sin embargo, significativa porque es consecuencia de la acción exclusiva de los elementos activadores presentes en el CMA estudiado, ya que como se señaló antes, el promotor mínimo utilizado carece de otros elementos activadores. Lo más interesante será, sin duda, examinar en las plantas T1, las alteraciones cuantitativas y cualitativas en la expresión del gen reportero como resultado de la infección por PHV u otros begomovirus, lo que nos proporcionará información importante acerca de las propiedades reguladoras de los CMAS y los multímeros del CLE, en presencia de factores virales, lo que esperamos conduzca a una comprensión más completa de la regulación de los genes tardíos, en general, y del proceso de transactivación por TrAP, en particular.

El conocimiento más detallado de la función del CLE por sí mismo y en conjunto con otros elementos reguladores que forman parte de CMAs, tiene un uso potencial en biotecnología. Un ejemplo podría ser su uso en promotores sintéticos que dirijan la expresión de genes de resistencia en la planta al inducirse por factores virales. Por otro lado, la ubicación de la secuencia silenciadora que controla específicamente el promotor de CP en PHV puede ser un punto de partida para el desarrollo de vectores que controlen de modo muy estricto la expresión de genes de interés.

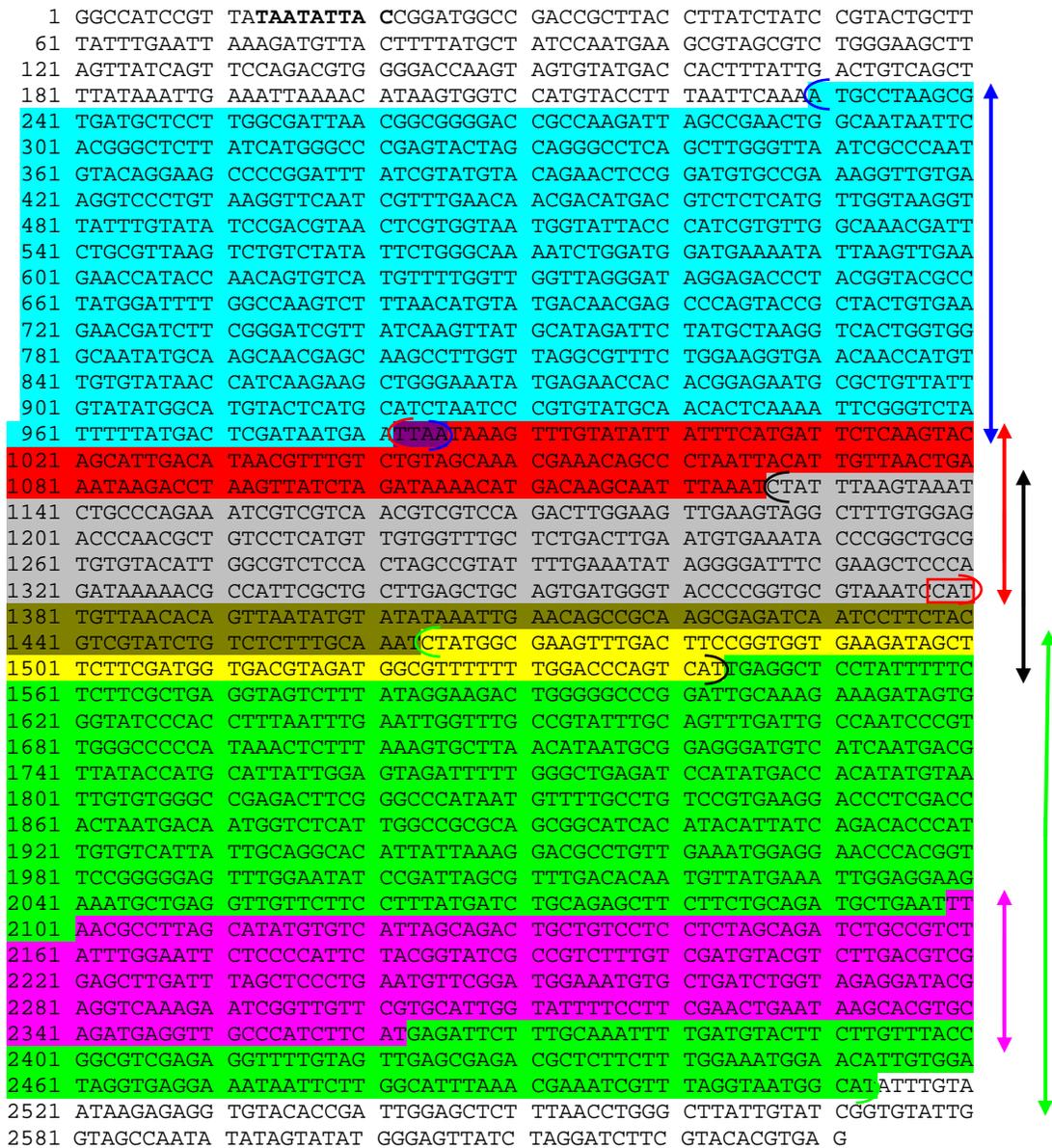
MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figura S1. Origen de los plásmidos descritos en este estudio.



Virus Huasteco del Chile (PHV) componente A

Número de acceso: X70418



- Gen AV1 (CP): 230-985 ↔ comprende las zonas coloreadas azul y morado
- Gen AC1 (Rep): 1464-2513 ↔ comprende las zonas coloreadas verde, violeta y amarillo
- Gen AC2 (TrAP): 1127-1543 ↔ comprende las zonas coloreadas amarillo, café y gris
- Gen AC3 (REn): 982-1380 ↔ comprende las zonas coloreadas gris, rojo y morado
- Gen AC4: 2099-2362 ↔ comprende la zona color violeta

La zona no coloreada corresponde a la región intergénica.

Figura S2. Secuencia genómica del componente A del Virus Huasteco del Chile (PHV).

Tabla S1. Resumen de identificación y análisis de elementos CLE y elementos similares al CLE. (Tomado de Cazzonelli *et al.* 2005).

Virus ú organismo	Nº de acceso	Comentarios	Sistema de identificación	Efecto del CLE	CLE-like element	Referencia
Geminivirus		Comparación de secuencias de la RI de Geminivirus define el CLE	<i>In silico</i>		(A/G)(A/T)GTGGTCCC	Arguello-Astorga <i>et al.</i> (1994)
Arabidopsis		CLE consenso enriquecido en promotores de Arabidopsis	<i>In silico</i>		GTGGNCCC	Velten <i>et al.</i> (2005)
PHV (B) ←???	X70420	AC2/TrAP transactiva el promotor CP	Bombardeo de partículas en N. benthamiana y chicharo.	Enhancer transcripcional	GTGGTCCC	Ruiz-Medrano <i>et al.</i> (1999)
TGMV (A)	NC001507	AL2/TrAP falla para transactivar el promotor CP	Protoplastos de N. benthamiana		GTGGTCCC	Sunter <i>et al.</i> (2003)
BGMV (A)	NC001439	AL2 transactiva promotores AV1 y BV1 que carecen de CLEs	Protoplastos de N. benthamiana			Hung y Petty (2001)
Rice/Maize (proteínas de unión al ADN)		Proteínas TCP de unión a ADN. PCF1-6 y TB1 unen elementos similares al CLE	<i>In vitro</i> (ensayo de movilidad electroforética)		GTGGBCCC (clase II) GGNCCC (clase I)	Kosugi y Ohashi. (2002)
Promotores marcados TCP de Arabidopsis		Mutaciones en los elementos similares al CLE disminuye la actividad de promotores	N.tabacum-Sumsun Callos transgénicos			
Elementos I y II similares al CLE en arroz		Elementos similares al CLE Clase I potencian la función del promotor	N.tabacum-Sumsun Callos transgénicos.	Enhancer clase I		
Arroz	X54046	Elementos IIa y IIb similares al CLE necesarios para la actividad específica en meristemos.	Protoplastos de N. benthamiana	Enhancer-IIa ~5.5 veces	GTGGBCCC (IIa) ATGGTCCAC (IIb)	Kosugi <i>et al.</i> (1995, 1997)
Maiz	L40803	Elemento similar al CLE es sitio de unión de extractos nucleares (GapC4)	<i>In vitro</i> (ensayo de movilidad electroforética)		tccgGTGGGCCCGaac	Geffer <i>et al.</i> (2000)
Ageratum yellow vein virus (A)	X74516	Enhancer transcripcional	N. tabacum-SR1 (Agro-infusión)	Enhancer ~ 1.61 veces	TACGTGGTCCCC* TACGTAGTCTCC	Velten <i>et al.</i> (2005)
Leonorus mosaic virus (A)	U92532	Enhancer transcripcional	N. tabacum-SR1 (Agro-infusión)	Enhancer ~ 1.72 veces	CGTGGTCCCT [^] CGTGGTCCCT	Velten <i>et al.</i> (2005)
Leonorus mosaic virus (A)	U92532	Enhancer transcripcional	N. tabacum-SR1 (Agro-infusión)	Enhancer ~ 1.95 veces	CGTGGTCCCT [^] CGTGGTCCCT	Velten <i>et al.</i> (2005)
Pepper golden mosaic virus (A)	U57457	Enhancer transcripcional	N. tabacum-SR1 (Agro-infusión)	Enhancer ~ 2.16 veces	GTGGTCCCT [^] GTGGTCCCA	Velten <i>et al.</i> (2005)
Pepper Huasteco Virus (B)	X70420	Enhancer transcripcional	N. tabacum-SR1 (Agro-infusión)	Enhancer ~ 1.86 veces	GTGGTCCCAAAGGAC* GTGGTCCCAAATGAC	Velten <i>et al.</i> (2005)
Tomato Leaf Curl Virus	U38239	Enhancer transcripcional	N. tabacum-SR1 (Agro-infusión)	Enhancer ~ 2.03 veces	TTTTGTGGGCCCT* TTTTGTGGTCCCT	Velten <i>et al.</i> (2005)
Cauliflower mosaic virus	V00141	Sin caracterizar			gacaGTGGTCCCaaag	Benfey Chua (1990)
Figwort mosaic virus	X16673	Sin caracterizar			tggGTGGTCCCcac	Sanger <i>et al.</i> (1990)
Mirabilis mosaic virus	NC004036	Sin caracterizar			tccaGTGGTCCCtcca	Dey Maiti (1999)
Cotton leaf curl virus	AY312430	Sin caracterizar			tttGTGGGCCcgg	Xie <i>et al.</i> (2003)
Bacterial (T-DNA) "octopine synthase"	AF242881	Sin caracterizar			TtgGTGGACCCtgag	Leisner y Gelvin (1989)

Clave ^ : espaciado de 10 pb (GAAGATAATC)

REFERENCIAS:

Akbergenov, R., Si-Ammour, A., Blevins, T., Amin, I., Kutter, C., Vanderschuren, H., Zhang, P., Gruissem, W., Meins Jr, F. Hohn, T. y Poogin, M. (2006). **Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species.** *Nucleic Acids Res.*, 34:462-471.

Antalis, T. M., Costelloe, E., Muddiman, J., Ogbourne, S. y Donnan, K. (1996). **Regulation of the plasminogen activator inhibitor type-2 gene in monocytes: localization of an upstream transcriptional silencer.** *Blood* 88, 3686-3697

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

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

Argüello-Astorga, G. R., Monsalve-Fonnegra, Z.I. y Rivera-Bustamante, R. F. (2002) **Geminivirus replication and gene expression.** Capítulo en: **Plant Viruses as Molecular Pathogens.** The Haworth Press, Inc., USA.: 257-277.

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

Argüello-Astorga, G. y Herrera-Estrella, L. (1998). **Evolution of light-regulated plant promoters.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 525-555.

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

Argüello-Astorga, G. y Herrera-Estrella, L. (1995). **Theoretical and experimental definition of minimal photoresponsive elements in cab and rbcS genes.** *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology.* Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 501-511.

Arnosti, D.N. (2004). **Multiple mechanisms of transcriptional repression in eukaryotes.** *HEP*, 166: 33-67.

Baniahmad, A., Steiner, C., Kohne, A. C. y Renkawitz, R. (1990). **Modular**

structure of chicken lysozyme silencer: Involvement of an unusual thyroid receptor binding site. *Cell*, 61: 505-514

Benfey, P.N., y Chua, N-H. (1990). **The Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter: Combinatorial regulation of transcripts in plants.** *Science*, 250: 959-966.

Boucher, P. D. y Hines, R. N. (1995). **In vitro binding and functional studies comparing the human CYP1A1 negative regulatory element with the orthologous sequences from rodent genes.** *Carcinogenesis*, 16: 383–392.

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

Carey C. y Smale, S. T. (2000). **Transcriptional Regulation in Eukaryotes. Concepts, Strategies and Techniques.** Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cazonelli, C.I., Burke, J. y Velten, J. (2005). **Functional characterization of the geminiviral conserved late element (CLE) in uninfected tobacco.** *Plant Mol. Biol.*, 58: 465-481.

Cooper, G. M. y Hausman, R. E., (2004). **The Cell. A Molecular Approach.** Third edition. ASM Press, Washington, D. C. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Masschusets.

Doebley, J., Stec, A. y Hubbard, L., (1997). **The evolution of apical dominance in maize.** *Nature*, 386: 485 – 488.

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

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

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

Gafni, Y. y Epel, B. L. (2002). **The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses.** *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 60: 231-241.

Gaston, K. y Jarayaman, P.S. (2003). **Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms.** *Cell. Mol. Life. Sci.*, 60: 721-741.

Geffers, R., Cerff, R. y Hehl, R. (2000). **Anaerobiosis-specific interaction of tobacco nuclear factors with cis-regulatory sequences in maize GapC4 promoter.** Plant Mol. Biol. 43: 11-21

Gilbertson, R. L., Sudarsana, M., Jiang, H., Rojas, M. R. y Lucas, W. J. (2003). **Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: Insights into DNA trafficking.** Plant Cell, 15: 2578-2591.

Gómez-Castañón, R. G., (2004). **Generación de Vectores de Expresión Para el Análisis Funcional de Secuencias Regulatoras del Virus Huasteco del Chile.** Tesis de Maestría. San Luis Potosí, S.L.P., IPICYT.

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

Gutierrez, C. (2002). **Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference.** Physiol. Mol. Plant Pathol., 60: 219-230.

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

Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S., Orozco, B.M., Nagar, S. y Robertson, D. (1999). **Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation.** Crit. Rev. Plant. Sci., 18: 71-106.

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

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

Hehnle, S., Wege, C. y Jeske, H. (2004). **Interaction of DNA with the Movement Proteins of Geminiviruses Revisited.** J. Virol., 78 (14): 7698-7706.

Hofer, P., Engel, M., Jeske, H., Frischmuth, T. (1997). **Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica.** J. Gen. Virol., 78: 1785-1790

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

Ishige, F., Takaichi, M., Foster, R., Chua, N-M. y Oeda, K. (1999). **A G-box motif**

(GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants. *Plant J.*, 18: 443-448.

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

Jeske, H., Lutgemeier, M. y PreiB W. **DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus.** *EMBO Journal*, 20: 6158-6167.

Krawczyk, S., Thurow, C., Niggeweg, R. y Gatz, C. (2002). **Analysis of the spacing between the two palindromes of activation sequence-1 with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation potential.** *Nucleic Acids Res.*, 30: 775-781.

Kosugi, S., Suzuka, I. y Ohashi, Y. (1995). **Two of three promoter elements identified in a rice gene for proliferating cell nuclear antigen are essential for meristematic tissue-specific expression.** *Plant J.*, 7: 877-886.

Kosugi, S. y Ohashi, Y. (2002). **DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family.** *Plant J.*, 30: 337-348.

Levy, A. y Czosnek, H. (2004). **The DNA-B of the non-phloem-limited bean dwarf mosaic virus (BDMV) is able to move the phloem-limited Abutilon mosaic virus (AbMV) out of the phloem, but DNA-B of AbMV is unable to confine BDMV to the phloem.** *Plant Mol. Biol.*, 53: 789-803.

López-Ochoa, L., Ramírez-Prado, J. Hanley-Bowdoin, L. (2006). **Peptide aptamers that bind to a geminivirus replication protein interfere with viral replication in plant cells.** *J. Virol.*, 80: 5841-5853.

Malik, P. S., Kumar, V., Bagewadi, B. y Mukherjee, S. K. (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.

Malone, C. S., Patrone, L., Buchanan, K. L., Webb, C. F. y Wall, R. (2000). **An Upstream Oct-1 and Oct-2-Binding Silencer Governs B29 (Ig β) Gene Expression.** *The Journal of Immunology*, 164: 2550-2556

Malone, C.S., Omori, S.A. y Wall, R. (1997). **Silencer elements controlling the B29 (Ig β) promoter are neither promoter- nor cell-type-specific.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94: 12314-12319.

Monsalve-Fonnegra, Z. I. (2002). **Caracterización funcional de los Elementos Tardíos Conservados (CLEs) presentes en el gen de la proteína de la cápside del**

Virus huasteco del chile. Tesis de Doctorado. Irapuato, Gto., Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Morris, D. R. y Geballe, A. P. (2000). **Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation.** *Mol. Cell. Biol.*, 20: 8635-8642.

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

O'Prey, J. y Harrison, P. R. (1995). **Tissue-specific regulation of the rabbit 15-lipoxygenase gene in erythroid cells by a transcriptional silencer.** *Nucleic Acids Res.*, 23: 3664-3672.

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

OH, C. K., Neurath, M., Cho, J-J., Semere, T., Metcalfe, D. D. (1997). **Two different negative regulatory elements control the transcription of T-cell activation gene 3 in activated mast cells.** *Biochem J.*, 323: 511-519.

Orozco, B. M. y Hanley-Bowdoin, L. (1996). **A DNA structure is required for geminivirus replication origin function.** *J. Virol.*, 70: 148-158.

Ortiz, E. M., Duseti, N. J., Dagorn, J-C. y Iovanna, J. L. (1997). **Characterization of a silencer regulatory element in the rat PAP I gene which confers tissue-specific expression and is promoter dependent.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 340: 111-116.

Pierce, J. W., Gifford, A. M. y Baltimore, D. (1991). **Silencing of the expression of the immunoglobulin kappa gene in non-B cells.** *Mol. Cell. Biol.*, 11: 1431-1437.

Preiss, W. y Jeske, H. (2003). **Multitasking in replication is common among geminiviruses.** *J. Virol.*, 77: 2972-2980.

Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J. y Gilbertson, R. L. (2005) **Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses.** *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43: 361-394.

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

Ruiz-Medrano, R., Guevara-González, R.G., Argüello-Astorga, G.R., Monsalve-Fonnegra, Z., Herrera-Estrella, L.R., y Rivera-Bustamante, R.F. (1999). **Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the Pepper Huasteco Virus coat protein gene.** *Virology*, 253 (2): 162-169.

Saksela, K. y Baltimore, D. (1993). **Negative regulation of immunoglobulin kappa light-chain gene transcription by a short sequence homologous to the murine B1 repetitive element.** *Mol. Cell. Biol.* 13: 3698–3705.

Sambrook, David W, Joseph y Russell,. (2001). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, third edition. Vol (1,2,3). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Trinks, D., Rajeswaran, R., Veluthambi, K., Hohn, T. y Poogin, M.M. (2005). **Promoters, transcripts, and regulatory proteins of Mungbean Yellow Mosaic Geminivirus.** *J. Virol.* 79: 8149–8163.

Stanley, J., y R. Gay, M. (1983). **Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA.** *Nature*, 301: 260-262

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

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

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

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

Sunter, G. y Bisaro, D.M. (1997). **Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): Evidence for activation and derepression mechanisms.** *Virology*, 232: 269-280.

Sunter, G. y Bisaro, D. M. (1991). **Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression.** *Virology*, 180: 416-491.

Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Oakeley, E. J., Veluthambi, K., Hohn, T. y Poogin, M. M. (2005). **Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes.** *J. Virol.*, 79: 2517-2527

Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J. S. y Fauquet, C. M. (2004). **Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing.** *J. Virol.*, 78: 9487-9498.

Velten, J., Morey, K.J. y Cazzonelli, C.I. (2005). **Plant viral intergenic DNA sequence repeats with transcription enhancing activity.** *Virol. J.*, 2: 16.

Wang, H., Buckley, K. J., Yang, X., Buchmann, R. C. y Bisaro, D. M. (2005). **Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins.** J. Virol., 79 (12): 7410-7418.

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