

Tesis Doctoral

Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre el Mal de Río Cuarto virus (MRCV) y el delfácido transmisor *Delphacodes kuscheli*

Maroniche, Guillermo Andrés

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Maroniche, Guillermo Andrés. (2011). Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre el Mal de Río Cuarto virus (MRCV) y el delfácido transmisor *Delphacodes kuscheli*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Maroniche, Guillermo Andrés. "Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre el Mal de Río Cuarto virus (MRCV) y el delfácido transmisor *Delphacodes kuscheli*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de la interacción hospedante-
patógeno entre el *Mal de Río Cuarto*
virus (MRCV) y el delfácido transmisor
Delphacodes kuscheli

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Guillermo Andrés Maroniche

Director: Mariana del Vas
Consejero de Estudios: Esteban H. Hopp

Lugar de trabajo:
Instituto de Biotecnología,
Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agrícolas,
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Buenos Aires, 2011

INDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. El Mal de Río Cuarto	7
1.2. El virus del Mal de Río Cuarto y otros reovirus	11
1.2.1. La familia <i>Reoviridae</i>	11
1.2.2. El ciclo replicativo de los reovirus	12
1.2.3. Los reovirus vegetales	14
El género <i>Fijivirus</i>	16
El género <i>Oryzavirus</i>	22
El género <i>Phytoreovirus</i>	22
1.3. La transmisión del virus del Mal de Río Cuarto	23
1.3.1. Características de la transmisión	24
1.3.2. Determinantes moleculares de la transmisión de virus por insectos vectores	24
CAPÍTULO I	27
2. Objetivos	29
3. Métodos	31
3.1. Aislamiento viral y ensayos de transmisión	31
3.2. Extracción de ARN y síntesis de ADNC	31
3.3. Aislamiento de secuencias de genes candidatos y diseño de oligonucleótidos	32
3.4. PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de datos	32
4. Resultados y discusión	33
4.1. Adaptación del protocolo de extracción de ARN a un delfácido individual	33
4.2. Aislamiento de secuencias de genes de mantenimiento de <i>Delphacodes kuscheli</i> y diseño de oligonucleótidos específicos	34
4.3. Análisis de la expresión de los potenciales genes de referencia	35
4.3.1. Análisis de la estabilidad de la expresión de los genes candidatos	36
4.3.2. Determinación del perfil de expresión de los genes candidato estudiados	38
CAPÍTULO II	41
2. Objetivos	43
3. Métodos	45
3.1. Técnicas clásicas de biología molecular	45
3.2. Sistema de clonado Gateway	45
3.3. Construcción de los vectores utilizados	46
3.3.1. Vectores de expresión en insectos de las proteínas de MRCV	46
3.3.2. Vectores de destino para obtener fusiones fluorescentes	47
3.3.3. Vectores de expresión de marcadores fluorescentes de referencia	47

3.3.4. Vectores de expresión de proteínas de MRCV fusionadas a proteínas fluorescentes.....	48
3.3.5. Vectores de expresión en bacterias	48
3.4. Cultivo y transfección de células Sf9	49
3.5. Localización subcelular por inmunofluorescencia	49
3.6. Localización subcelular en células vivas.....	49
3.7. Expresión y purificación de proteínas en bacterias	50
3.8. Inmunización y obtención de un antisuero anti-P5-2	51
4. Resultados y discusión	53
4.1. Estudio funcional de las proteínas de MRCV mediante su localización subcelular en células de insecto	53
4.1.1. Análisis de la localización subcelular de las proteínas de MRCV por inmunofluorescencia	53
4.1.2. Diseño y construcción de un juego de vectores para estudios de localización subcelular en células vivas de insecto	57
4.1.3. Análisis de la localización subcelular de las proteínas de MRCV en células vivas	62
4.1.4. Análisis de la colocalización subcelular de diferentes proteínas de MRCV en células vivas	75
4.2. Estudio del mecanismo de expresión de P5-2	78
CAPÍTULO III	85
2. Objetivos	87
3. Métodos	89
3.1. Construcción de vectores.....	89
3.2. Expresión de P9-1 recombinante en bacterias y purificación	89
3.3. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).....	90
3.4. Ensayos de hidrólisis de ATP	91
3.5. Localización subcelular y microscopía de fluorescencia	92
3.6. Análisis de interacción por Transferencia de Energía de Resonancia Föster (FRET)....	92
4. Resultados y discusión	93
4.1. Expresión y purificación de P9-1 en bacterias	94
4.2. P9-1 autointeractúa <i>in vivo</i> , asociándose en complejos de alto peso molecular	96
4.3. P9-1 une ácidos nucleicos de cadena simple	98
4.4. P9-1 posee actividad ATPasa.....	100
4.5. La segunda mitad de P9-1 es indispensable para la formación de VIBs	102
5. CONCLUSIONES	107
5.1. Establecimiento de un protocolo útil para la cuantificación de ARNm viral o endógeno en <i>Delphacodes kuscheli</i> mediante RT-qPCR	107
5.2. Análisis del posible rol que cumplen las proteínas de MRCV durante la infección del insecto vector.....	107
5.3. Analisis del mecanismo de expresión de P5-2	108
5.4. Caracterización funcional de la proteína P9-1 de MRCV	108
6. BIBLIOGRAFÍA.....	111
APÉNDICE	130

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN	7
Figura A. Sintomatología del Mal de Río Cuarto en maíz e insecto vector.	8
Figura B. Zona de producción de maíz y distribución del Mal de Río Cuarto en el año 2004.....	9
Figura C. Evolución del área de incidencia del Mal de Río Cuarto.....	10
Tabla A. Subfamilias y géneros de la familia Reoviridae.....	12
Tabla B. Géneros, especies y características biológicas generales de los reovirus vegetales	15
Figura D. Análisis bioinformático de las proteínas del MRCV.....	18
Figura E. Distribución de las proteínas estructurales del MRCV en el virión.	19
Tabla C. Análisis molecular del genoma de MRCV, FDV, RBSDV y NLRV.	21
CAPÍTULO I	27
Figura 1.1. Efecto de diferentes condiciones de almacenamiento en la integridad del ARN extraído....	34
Figura 1.2. Ensayo de amplificación por RT-PCR a tiempo final.....	35
Tabla 1.1. Genes candidatos de <i>Delphacodes kuscheli</i> seleccionados y características de los oligonucleótidos empleados para la RT-qPCR.	36
Figura 1.3. Análisis de la estabilidad de expresión de los genes candidatos.....	38
Figura 1.4. Análisis de los niveles de expresión de los genes candidatos.....	39
CAPÍTULO II	41
Figura 2.1. Localización subcelular de las proteínas de MRCV en células Sf9	56
Figura 2.2. Esquema de los vectores de expresión de fusiones fluorescentes construidos	58
Figura 2.3. Análisis de la funcionalidad de los vectores construidos	59
Tabla 2.1. Proteínas celulares de distribución conocida empleadas en la construcción de marcadores fluorescentes de referencia para experimentos de localización subcelular	60
Figura 2.4. Localización subcelular de los marcadores de organelas fluorescentes obtenidos.....	61
Figura 2.5. Localización subcelular de la proteína MRCV P3	62
Figura 2.6. Localización subcelular de la proteína MRCV P4	63
Figura 2.7. Localización subcelular de la proteína MRCV P5-1	64
Figura 2.8. Localización subcelular de la proteína MRCV P5-2	65
Figura 2.9. Localización subcelular de la proteína MRCV P6	67
Figura 2.10. Localización subcelular de la proteína MRCV P7-1	68
Figura 2.11. Localización subcelular de la proteína MRCV P7-2	69
Figura 2.12. Localización subcelular de la proteína MRCV P8	70
Figura 2.13. Localización subcelular de la proteína MRCV P9-1	70
Figura 2.14. Localización subcelular de la proteína MRCV P9-2	72
Figura 2.15. Localización subcelular de la proteína MRCV P10	73

Figura 2.16. Localización subcelular de diferentes combinaciones de proteínas de MRCV	76
Figura 2.17. Colocalización de diferentes proteínas de MRCV.....	77
Figura 2.18. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes P5-1 y P5-2	79
Figura 2.19. Ensayo de los antisueros policlonales contra P5-2.....	80
Figura 2.20. Inmunodetección de P5-2 en plantas infectadas con MRCV.....	81
Figura 2.21. Vector recombinante para estudiar la expresión in vivo del segundo ORF del segmento S5	83
CAPÍTULO III	85
Figura 3.1. Localización subcelular de la proteína P9-1	94
Figura 3.2. Ensayos de expresión en bacterias y purificación de la proteína recombinante P9-1	95
Figura 3.3. Expresión y purificación de P9-1	96
Figura 3.4. P9-1 se asocia en complejos de alto peso molecular y autointeracciona in vivo para formar cuerpos de inclusión.....	97
Figura 3.5. P9-1 se une inespecíficamente a ácidos nucleicos de simple cadena	99
Figura 3.6. P9-1 posee actividad ATPasa.....	101
Figura 3.7. Alineamiento múltiple de proteínas homólogas a P9-1 de diferentes Fijivirus.....	103
Figura 3.8. Localización subcelular por inmunofluorescencia de las versiones mutantes de P9-1	104
Figura 3.9. Localización subcelular en células Sf9 vivas de las versiones delecionadas de P9-1	105
CONCLUSIONES	107
Tabla D. Características funcionales asignadas a las proteínas de MRCV.	109

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que de alguna u otra manera aportaron a la realización de esta Tesis. En especial a las autoridades del Instituto de Biotecnología del CNIA, INTA-Castelar por el espacio y el apoyo brindado, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET) por subvencionar mis estudios y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por el apoyo financiero a este proyecto.

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AEC	Cromatografía de intercambio aniónico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
CFP	Proteína fluorescente cyan (“cyan fluorescent protein”)
Ci	Curio
CIP	Fosfatasa intestinal de cabra
Ct	Umbral del ciclo (“cycle threshold”)
DIC	Contraste por interferencia diferencial (“Differential interference contrast”)
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (“enzyme-linked Immunosorbent assay”)
EMSA	Ensayo de retardo de la electromovilidad (“electromobility shift assay”)
EST	Etiqueta de secuencia expresada (“expressed sequence tag”)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (“fluorescein isothiocyanate”)
GFP	Proteína verde fluorescente (“green fluorescent protein”)
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (“Immobilized metal ion affinity chromatography”)
IRES	Sitio intrínseco de entrada del ribosoma (“internal ribosome entry site”)
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
ml	Mililitros
MP	Proteína de movimiento (“movement protein”)
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
nM	Nanomolar
nt	Nucleótido
NTP	Nucleósido trifosfato
OpNPV	<i>Orgyia pseudotsugata nuclear polyhedrosis virus</i>
ORF	Marco abierto de lectura (“open reading frame”)

pb	pares de bases
PBS	buffer salino de fosfato (“phosphate buffered saline”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”)
PEI	Poli(etileno)imino
pg	Picogramos
Pi	Pirofosfato inorgánico
PM	Peso molecular
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional (“pos-transcriptional gene silencing”)
RE	Retículo endoplasmático
rpm	Revoluciones por minuto
RpRd	ARN polimerasa ARN dependiente (“RNA polymerase RNA dependent”)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato (“sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”)
TLC	Cromatografía en capa delgada (“thin layer chromatography”)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad
UTR	Región no traducida (“untranslated region”)
VIB	Cuerpo de inclusión viral (“viral inclusion body”)
YFP	Proteína fluorescente amarilla (“yellow fluorescent protein”)
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
μM	Micromolar

Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre el *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) y el delfácido transmisor *Delphacodes kuscheli*

RESUMEN

El virus del Mal de Río Cuarto (MRCV, *Reoviridae*, *Fijivirus*) causa la principal enfermedad que afecta al maíz en la Argentina. Su genoma consiste en diez segmentos de ARN de doble cadena (S1 a S10) que codifican para un total de trece proteínas. El virus es transmitido de manera persistente y propagativa por insectos de la familia *Delphacidae*. Luego de adquirir el virus, sólo una pequeña proporción de los insectos vectores pueden transmitir la enfermedad al alimentarse de plantas sanas. Se desconocen aún las bases moleculares de la transmisión de MRCV y en general de las funciones que las proteínas virales cumplen durante la infección.

Para establecer si existe una correlación entre la acumulación viral y la transmisión, se desarrolló un protocolo útil para la cuantificación de MRCV u otros ARN endógenos en insectos individuales mediante RT-qPCR. Se optimizaron los pasos a seguir desde el almacenamiento de muestras hasta la cuantificación viral. Debido a que la técnica de RT-qPCR requiere la previa validación de controles internos invariables en los tratamientos a estudiar, se seleccionaron, clonaron y secuenciaron 7 genes de mantenimiento del delfácido transmisor *Delphacodes kuscheli* y se evaluó la estabilidad de su expresión durante la infección con MRCV. Se determinó que, de los 7 genes estudiados, el gen de la ubiquitina es el más establemente expresado y por lo tanto adecuado para ser utilizado como control interno de referencia. La plataforma desarrollada no sólo permitirá la cuantificación precisa del título de MRCV en individuos *D. kuscheli*, sino que además abre el camino a futuros estudios del cambio en la expresión de genes endógenos de los insectos infectados con MRCV. Esto permitirá aportar datos moleculares para lograr una comprensión más integral de la interacción MRCV-delfácido vector.

En paralelo, se decidió estudiar la función que cumplen las proteínas de MRCV durante la replicación viral en el insecto expresándolas en células Sf9 (de insecto no hospedante) y se analizó su localización subcelular por inmunofluorescencia y en células vivas. Se determinó que tanto las proteínas estructurales P3, P4 y P8 como la proteína no estructural P7-1, se distribuyen en el núcleo y el citoplasma celular. Dado que el tamaño de estas proteínas excede el límite permitido por el complejo del poro nuclear, los resultados sugieren que las mismas serían transportadas activamente al núcleo celular. Asimismo, se observó que la proteína P5-2 se localiza exclusivamente en el núcleo. Es posible que estas proteínas de MRCV capaces de ingresar al núcleo celular jueguen un rol en la regulación transcripcional de las células del hospedante. Se observó que la proteína P5-1 posee una distribución citoplasmática heterogénea de aspecto granuloso y que dicha distribución se torna homogénea en ausencia del tripéptido carboxilo terminal TKF, el cual es un presunto motivo de unión a proteínas PDZ o de importación a peroxisomas. Por otro lado, se determinó que P6 forma grandes cúmulos

perinucleares amorfos y es capaz de relocalizar parte de la tubulina celular a éstas formaciones. Esto sugiere un posible rol para P6 en la formación del material fibrilar que se observa en células de insecto y planta infectadas con MRCV. La proteína P9-2 fue capaz de localizar en la membrana plasmática e indujo la formación de filopodios membranosos en la superficie de las células, por lo que esta proteína podría estar involucrada en el transporte del virus a través de la membrana durante la infección del insecto vector. Por su lado, la proteína de cápside externa P10 fue capaz de localizar en el retículo endoplasmático y de colocalizar completamente con tubulina, sugiriendo que el MRCV explota el sistema de secreción y el citoesqueleto de tubulina para el ensamblado y/o transporte viral. Finalmente, P9-1 fue capaz de formar inclusiones citoplasmáticas conspicuas similares a cuerpos de inclusión virales (VIBs) o viroplasma.

A continuación, se utilizaron algunas combinaciones de fusiones fluorescentes de proteínas del MRCV para analizar su colocalización subcelular. No se logró observar colocalización entre la proteína P9-2 y P5-1, P7-1, P7-2, P9-1 o P10. Tampoco se observó colocalización entre P9-1 y P10 o P5-2. Por otro lado, se determinó que P6 colocaliza con P10, P9-1 y P7-2, indicando que P6 podría cumplir algún rol en la formación del viroplasma y/o reclutamiento de otras proteínas a estas estructuras, así como en el movimiento intracelular de los viriones.

Dado que la localización subcelular de P9-1 es similar a la distribución característica de las proteínas mayoritarias de viroplasma de reovirus, decidimos estudiar más en profundidad sus propiedades funcionales y bioquímicas. Observamos que, al igual que otras proteínas mayoritarias de viroplasma de reovirus, P9-1 se auto asocia en complejos de alto peso molecular al ser expresada en bacterias, auto interacciona *in vivo* localizadamente en los cuerpos de inclusión que forma en células de insecto, tiene la capacidad de unir ácidos nucleicos de simple cadena, posee actividad ATPasa y alberga un dominio importante para la formación de cuerpos de inclusión en su mitad carboxilo terminal. Estos resultados indican que P9-1 es el componente mayoritario de los viroplasma y por lo tanto juega un rol fundamental en la replicación y ensamblado del MRCV en las células hospedantes.

Palabras claves: *Virus del Mal de Río Cuarto*, reovirus, viroplasma, localización subcelular, insecto vector.

Study of the host-pathogen interaction between *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) and its delphacid vector *Delphacodes kuscheli*

ABSTRACT

Mal de Río Cuarto virus (MRCV, *Reoviridae*, *Fijivirus*) causes the most important maize disease in Argentina. Its genome consists of ten double-stranded RNA segments (S1 to S10) that encode a total of thirteen proteins. The virus is persistently and propagatively transmitted by planthoppers of the family *Delphacidae*. Planthoppers acquire the virus by feeding on infected plants and after a 10 days latency period (during which the virus replicates and moves) a small proportion of them become infective and can transmit the virus to healthy plants. The molecular basis of the transmission and the general function of MRCV proteins during infection are still unknown.

To establish whether the differences in transmission between individuals are due to differences in viral accumulation, a protocol useful for quantification of MRCV or endogenous RNAs in individual insects by RT-qPCR was developed. The protocol steps, from the sample storage to the viral quantification were optimized. Since the RT-qPCR technique requires the previous validation of invariable internal controls in the studied conditions, 7 housekeeping genes from the planthopper vector *Delphacodes kuscheli* were selected, cloned, sequenced and evaluated for their expression stability during MRCV infection. Out of the 7 studied genes, the polyubiquitin gene was the most stably expressed and consequently the most reliable as a reference internal control. The platform developed along this work will be useful for the precise quantification of MRCV titers in individual *D. kuscheli* insects as well as for future gene expression studies in MRCV infected delphacids.

In parallel, we studied the role of MRCV proteins during the insect viral infection by expressing them in Sf9 non-host insect cells and analyzing their subcellular localization by immunofluorescence and live imaging. We determined that the structural proteins P3, P4, and P8, and the non-structural protein P7-1, are distributed in the nucleus and cytoplasm. Because the size of these proteins exceeds the limits allowed by the nuclear pore complex, the results suggests that they are actively transported to the cell nucleus. Likewise, we observed that P5-2 is located exclusively in the nucleus. Those MRCV proteins able to enter the cellular nucleus may perhaps be involved in transcriptional regulation of the host genes. We also observed that P5-1 displays a heterogeneous granular cytoplasmic distribution that turns into a homogeneous localization when the C-terminal tripeptide TKF, which in turn is a putative PDZ protein interaction motif and/or a peroxisomal import motif, is absent. On the other hand, it was shown that P6 accumulates in big amorphous perinuclear inclusions, being able to re-localize some of the cellular tubulin to these structures. This suggests that P6 might be involved in the formation of the fibrillar material observed in MRCV-infected insect and plant cells. The P9-2 protein was able to localize to the plasma membrane of cells and induced the

formation of superficial filopodia-like formations, suggesting that this protein might be involved in the viral transport across the plasma membrane during the insect vector cells infection. The putative outer capsid protein P10 was located in the endoplasmic reticulum and completely co-localized with tubulin, suggesting that MRCV might also exploit the secretion pathway and the microtubules cytoskeleton for assembly and/or viral transport. Finally, P9-1 was able to form conspicuous cytoplasmic VIB-like structures.

Next, some of the fluorescent fusions of MRCV proteins were used to analyze its subcellular co-localization. We could not observe co-localization between P9-2 and P5-1, P7-1, P7-2, P9-1 or P10. Similarly, co-localization of P9-1 with P10 or P5-2 was not detected. On the other hand, we showed that P6 co-localize with P10, P9-1 and P7-2, which suggests that P6 might play a role in viroplasm formation and/or recruitment of other proteins to this structure as well as in the viral intracellular movement.

Given that P9-1 subcellular localization is similar to the distribution characteristically displayed by reovirus major viroplasm proteins, we carried out a more comprehensive study of its functional and biochemical properties. We observed that, like other reoviral major viroplasm proteins, P9-1 self-associates to form high molecular weight complexes when expressed in bacteria, displays a localized *in vivo* self-interaction in the inclusion bodies formed in insect cells, has the ability to bind single stranded nucleic acids, has ATPase activity and contains an important domain for the formation of inclusion bodies at its C-terminal half. These results suggest that P9-1 is the major component of viroplasms, and thus plays a fundamental role in MRCV replication and assembly during the infection of host cells.

Keywords: *Mal de Río Cuarto virus*, reovirus, viroplasm, subcellular localization, insect vector.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Mal de Río Cuarto

El Mal de Río Cuarto es una enfermedad que afecta a plantas de la familia de la gramíneas y es la principal causa de pérdidas económicas en la producción de maíz (*Zea mays*) de nuestro país. La misma es causada por un virus llamado *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) que pertenece al género *Fijivirus* de la familia *Reoviridae* y que es transmitido por la chicharrita *Delphacodes kuscheli* Fennah (Distéfano y col., 2002; Laguna y col., 2002; Ornaghi y col., 1993; Remes Lenicov y col., 1985). El MRCV presenta un amplio rango de hospedadores naturales además del maíz; se lo ha encontrado infectando naturalmente especies de gramíneas silvestres como *Digitaria sanguinalis* L. o “pata de gallina” (Luisoni y col., 1973), *Setaria verticillata* (Klein, 1967), *Sorghum halepense* L. o “sorgo de Alepo” (Lenardón, Comunicación personal), *Echinochloa colonum* L., *Eleusine indica* L. o “cola de zorro” (Conci y col., 1992) y *Cynodon dactylon* L. o “gramón” (Klein, 1967). En general estas especies son malezas del maíz y no sólo constituyen un reservorio natural del virus sino que además favorecen el desarrollo del insecto vector. Asimismo, el MRCV infecta naturalmente a otras gramíneas cultivadas, como el trigo (*Triticum aestivum* L.) (Rodríguez Pardina y col., 1998; Rodríguez Pardina y col., 1994), la avena (*Avena sativa* L.) (Giménez Pecci y col., 1997), el sorgo (Giorda y col., 1993), el centeno (*Secale cereale*), la grama rhodes (*Chloris gayana*) y el alpiste (*Phalaris canariensis*) (Truol y col., 2001). Estudios llevados a cabo en las fluctuaciones poblacionales del insecto vector sobre las plantas de maíz, otras gramíneas cultivadas y malezas permitieron comprobar que en invierno la avena y el trigo son el principal hábitat en donde las poblaciones de *D. kuscheli* Fennah se desarrollan para luego migrar al maíz (Dagoberto y col., 1985; Ornaghi y col., 1993).

La sintomatología de la enfermedad en maíz depende fundamentalmente del estadio de desarrollo de la planta en el momento de la infección de MRCV. Cuando la infección ocurre en la etapa de plántula, la altura final de la planta se ve notablemente reducida variando entre 20 y 60 cm (Figura A.A), las espigas muestran malformaciones y por lo general una necrosis que comienza en el ápice del tallo causa la muerte de la planta. Si la infección se produce en los estadios más avanzados de desarrollo, la altura de las plantas adultas no supera los 120 cm, la longitud de los entrenudos superiores se ve reducida y se observan otros síntomas como tallos achatados, hojas superiores con la lámina foliar poco desarrollada, ocasionalmente cortadas transversalmente o incluso reducidas a la vaina foliar (Figura A.B). En este caso, si bien las espigas son numerosas (hasta ocho) presentan deformidades, son pequeñas y generalmente estériles (Figura A.C). En tercer lugar, las plantas que son infectadas hacia el final de su desarrollo muestran una altura normal, sus hojas del tercio superior se encuentran acartuchadas y erguidas, y sus mazorcas presentan escasa producción de granos (Figuras A.D). Como la sintomatología es variada y en determinadas situaciones pueden presentarse dudas acerca de su origen, se considera que las enaciones (proliferación de tejidos en forma de verruga) formadas en las nervaduras del envés de la hoja son el síntoma distintivo del “Mal de Río Cuarto” (Lenardon y col., 1985)(Figura A.E).

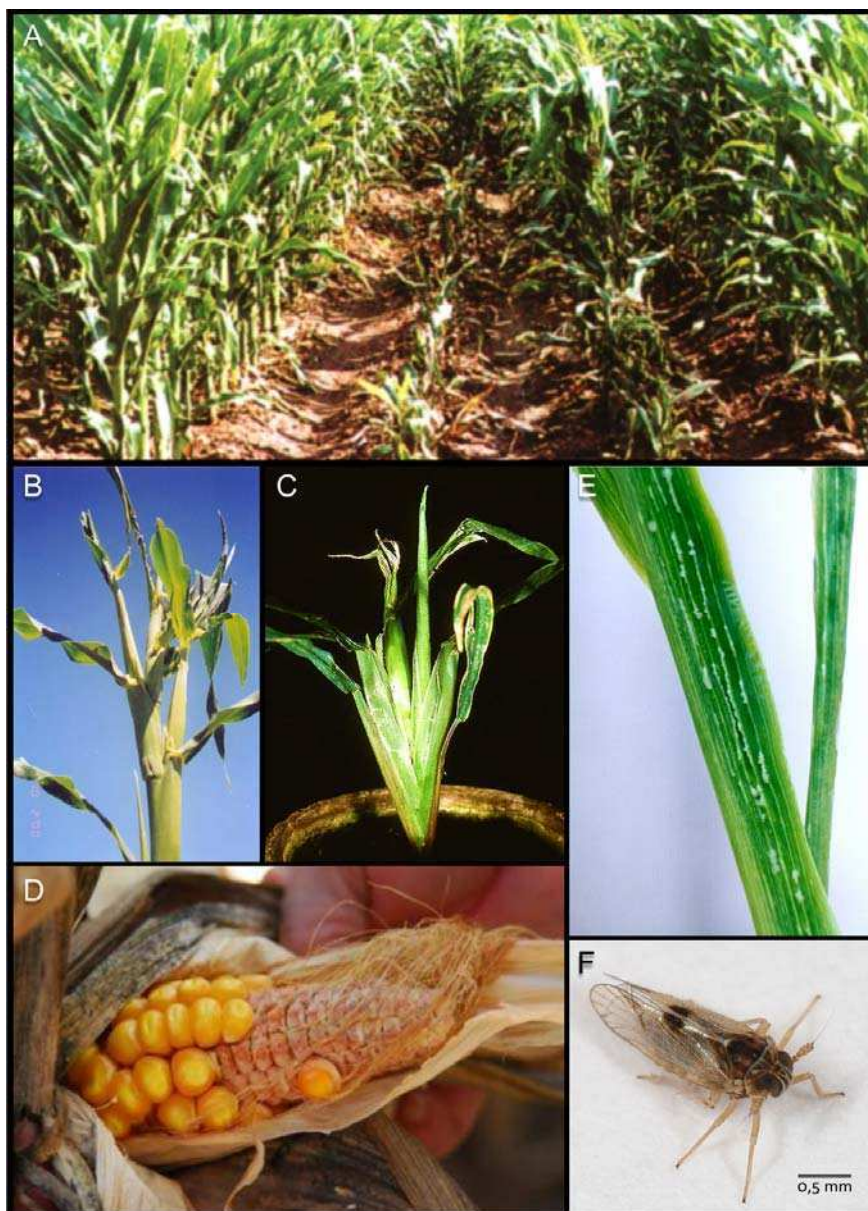


Figura A. Sintomatología del Mal de Río Cuarto en maíz e insecto vector. Algunos de los síntomas consisten en plantas de tamaño severamente reducido (A), tallos engrosados y chatos (B), plantas con espigas múltiples y pequeñas (C), espigas con deficiencia en la formación de granos (D) y enaciones sobre la nervadura en el envés de la hoja (E). También se muestra una fotografía de una chicharrita *Delphacodes kuscheli* Fennah, vector del MRCV (F).

El primer reporte de plantas de maíz con síntomas de la enfermedad fue realizado en el año 1967 por miembros de la Agencia de Extensión Rural del INTA-Río Cuarto. Sin embargo, el Mal de Río Cuarto adquirió por primera vez características de epifitía durante la campaña agrícola 1976/77, extendiéndose gradualmente, hasta que en la campaña 1981/82 causó la pérdida de 55.000 de las 360.000 hectáreas de maíz en la localidad de Río Cuarto, Córdoba. En la campaña agrícola 1996/97, la enfermedad causó pérdidas de un 28,50% en la producción total de maíz, registrándose pérdidas del 32,47% en la provincia de Córdoba y del 22,62% en la provincia de

Buenos Aires. En el año 2004 el Mal de Río Cuarto ya se había extendido en toda la zona maicera de Argentina, en donde afectó 1.000.000 de las 4.400.000 hectáreas sembradas.

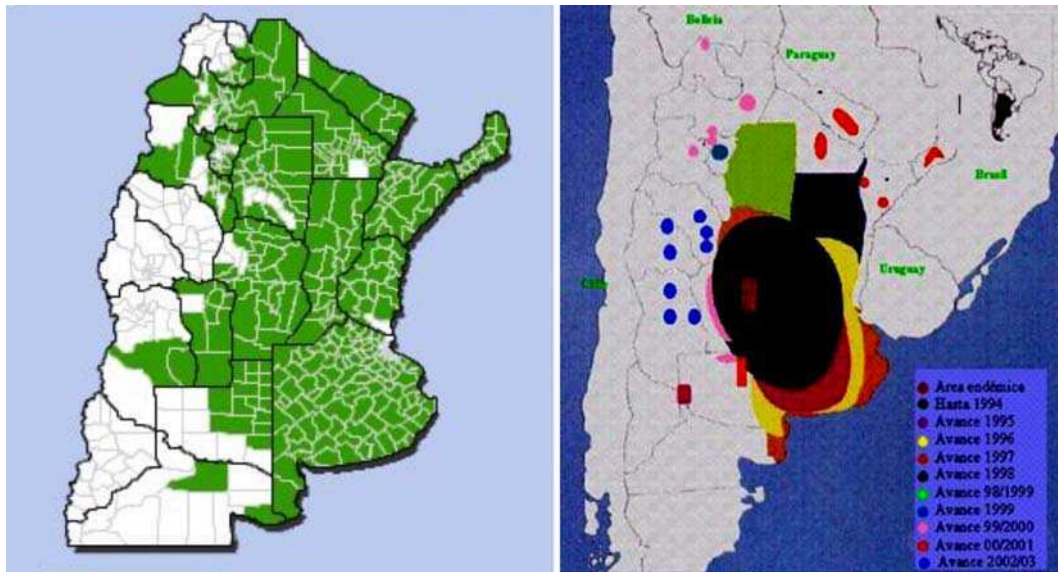


Figura B. Zona de producción de maíz y distribución del Mal de Río Cuarto en el año 2004. Se muestra la distribución geográfica de la zona productora de maíz en la Argentina (izquierda, verde) según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, y el avance anual del Mal de Río Cuarto hasta la campaña agrícola 2002/2003 (Laguna y col., 2003; Memoria institucional IFFIVE-INTA).

Desde el punto de vista epidemiológico, la zona endémica establecida inicialmente cubre una extensa área del sur de la Provincia de Córdoba. Esta área de distribución se incrementó después de la severa epidemia de la campaña 1996/97 (Lenardón y col., 1998) ya que los cambios climáticos producidos en los años siguientes fueron propicios para el desarrollo del insecto vector en otras zonas productoras de maíz del país (Laguna y col., 2003; Laguna y col., 1999; Laguna y col., 2002). Un relevamiento del avance de las zonas de incidencia de la enfermedad realizado en el Instituto de Fisiología y Fitopatología Vegetal (IFFIVE) del INTA del año 2004 demostró que el Mal de Río Cuarto causó la pérdida total de la cosecha en zonas del centro-oeste de la provincia de Buenos Aires (Trenque Lauquen, Bolívar y General Villegas) y pérdidas severas en el norte de La Pampa, en el sur de Santa Fé y en el este-sudeste de la provincia de Córdoba (Figura B). También fue detectada la presencia del virus con diferentes porcentajes de infección en lotes de maíz de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Formosa, Corrientes, Misiones y San Luis (Laguna y col., 2002).

Finalmente, a pesar de que en las siguientes campañas la incidencia disminuyó hasta circunscribirse sólo a la zona endémica de Río Cuarto en donde se detectaron altos niveles de ataque en las siembras de Noviembre (Avila, 2005), durante la campaña 2006/07 la enfermedad se volvió a expandir a casi todas las zonas maiceras (Giménez Pecci y col., 2008a; Giménez Pecci y col., 2008b; March y col., 2008)(Figura C)

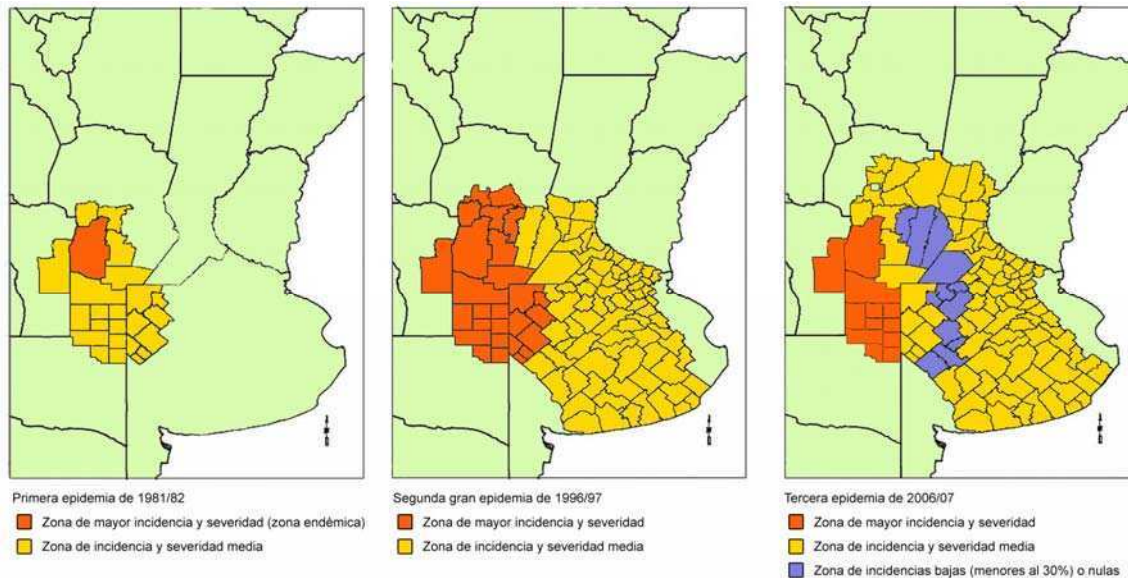


Figura C. Evolución del área de incidencia del Mal de Río Cuarto. Se muestra la distribución geográfica de las zonas afectadas por la enfermedad en las campañas 1981/82 (izquierda), 1996/97 (centro) y 2006/07 (derecha) y los diferentes grados de severidad (Información extraída del informe del Departamento Técnico de Pioneer Argentina, 2007).

En la actualidad es posible controlar la enfermedad a través de la utilización de técnicas de manejo del cultivo basadas en el conocimiento de los factores que influyen en su incidencia y severidad (la edad en la cual la planta es infectada, el genotipo de la planta hospedante y fundamentalmente las condiciones climáticas que favorecen el desarrollo del insecto vector). La incidencia depende especialmente de la superposición entre el período migratorio de la chicharrita vector, la densidad poblacional de las mismas y el estadio de crecimiento de las plantas de maíz dado que es más susceptible durante las tres primeras semanas del cultivo (Lenardon y col., 1985; Ornaghi y col., 1993). Una de las principales estrategias implementada por los productores para el manejo de la enfermedad consiste en realizar una siembra temprana para que las plantas de maíz estén lo suficientemente desarrolladas en el momento del año en el que la población de chicharritas es más abundante en el campo (Lenardon y col., 1985; March y col., 1995). Existen además híbridos de maíz que exhiben diferentes grados de tolerancia al Mal de Río Cuarto (Bonamico y col., 2006; Bonamico y col., 2005). Sin embargo, a pesar de que la incidencia de la enfermedad puede ser atemperada empleando estos cultivares, los mismos acumulan virus al ser infectados y la tolerancia se ve ampliamente sobrepasada cuando la carga viral es alta. Además, estos híbridos de maíz tolerantes al MRCV presentan menor productividad frente variedades con mayor rendimiento, lo que hace que su implementación sea en ese sentido desventajosa.

Nuestro país exporta anualmente alrededor de 15 millones de toneladas de maíz, siendo el cuarto exportador mundial. Es fundamental, por lo tanto, mejorar el manejo de la enfermedad mediante técnicas alternativas más eficaces y/o que complementen a las ya desarrolladas. Con este objetivo, nuestro grupo ha propuesto, desarrollado y patentado una estrategia de control basada en desencadenar silenciamiento génico postranscripcional contra el MRCV en plantas transgénicas de maíz mediante la sobreexpresión de secuencias derivadas del genoma viral (del Vas y col., 2003). Para ello, en el marco de un Convenio de Vinculación Tecnológica con la empresa BIOCERES, se construyeron vectores de expresión adecuados y se los empleó para

obtener plantas transgénicas de maíz y trigo en colaboración con investigadores del Instituto de Genética INTA-Castelar. Actualmente el proyecto se encuentra en etapas finales de evaluación a través de ensayos biológicos de desafío a campo.

1.2. El virus del Mal de Río Cuarto y otros reovirus

1.2.1. La familia *Reoviridae*

La familia *Reoviridae* está compuesta por dos subfamilias que incluyen 15 géneros (Informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV, 2009) cuyo rango de hospedantes en conjunto abarca todos los reinos eucariotas. Dentro de esta familia, los virus pertenecientes a los géneros *Fijivirus*, *Phytoreovirus* y *Oryzavirus* son capaces de infectar plantas e insectos (Tabla A).

Con respecto a sus características moleculares, el genoma de los reovirus está compuesto por 10 a 12 fragmentos ARN de doble cadena (ARNdc) dependiendo del género. Sus viriones, no envueltos de 60-80 nm de diámetro y simetría icosaédrica, pueden estar compuestos por una, dos o tres cápsides concéntricas. La familia está dividida en dos subfamilias que se diferencian por la presencia (subfamilia *Spinareovirinae*) o ausencia (subfamilia *Sedoreovirinae*) de proyecciones proteicas o “torretas” en los vértices del núcleo o “core” viral. El “core” tiene un diámetro de 50-60 nm y contiene en su interior una única copia de cada uno de los segmentos genómicos de ARNdc asociados a proteínas estructurales del virus. La cadena positiva (codificante) de cada fragmento genómico, que actúa como ARN mensajero (ARNm), tiene una estructura de tipo capuchón o “cap” en su extremo 5’ (“Cap type 1 structure”: 7mGpppN2’OmpNp....) y es probable que en algunos casos el extremo 5’ terminal de la cadena negativa (no codificante) se encuentre fosforilado. Únicamente una de las cadenas de cada segmento genómico es codificante y en general los segmentos son monocistrónicos, aunque hay excepciones. Todos los segmentos contienen extremos 5’ y 3’ no codificantes (NC) compuestos por una porción de secuencia conservada dentro del género, seguida de secuencias únicas dentro de la especie para cada segmento genómico. Se ha propuesto que estas secuencias específicas de cada segmento actuarían como señales de empaquetamiento en el virión. Los extremos 5’ y 3’ NC conservados de los ARNm de los reovirus presentan regiones no continuas de bases complementarias que tienen la capacidad de formar una estructura secundaria de mango de sartén ó “panhandle” seguida por una horquilla ó “stem loop” y una cola en el extremo 3’ NC formada por una porción no complementaria. La distribución y organización de las estructuras secundarias mencionadas cumplen roles regulatorios en procesos como la traducción, la replicación genómica y el empaquetamiento viral. Por otro lado, existen indicios de que dentro de la partícula viral, cada segmento existe como un espiral compacto ubicado en los vértices del icosaedro junto con un complejo proteico transcripcional implicado en la síntesis del ARNm a partir de los segmentos genómicos durante la replicación. Este complejo ejerce su actividad protegido dentro del “core” viral e incluye enzimas con actividad de ARN polimerasa ARN dependiente (RpRd), NTPasa, helicasa, guanilil transferasa (enzima que realiza el “capping” del ARNm viral) y transmetilasas.

Tabla A. Subfamilias y géneros de la familia Reoviridae.

Familia Reoviridae			
	Género	Especie tipo	Hospedantes
Subfamilia Sedoreovirinae	<i>Cardoreovirus</i>	<i>Eriochair sinensis virus</i>	Cangrejos
	<i>Mimoreovirus</i>	<i>Micromonas pusilla reovirus</i>	Protozoos
	<i>Orbivirus</i>	<i>Bluetongue virus</i>	Vertebrados y artrópodos
	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Wound tumor virus</i>	Plantas e insectos
	<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus A</i>	Mamíferos y aves
	<i>Seadornavirus</i>	<i>Banna virus</i>	Mamíferos y mosquitos
Subfamilia Spinareovirinae	<i>Aquareovirus</i>	<i>Aquareovirus A</i>	Peces y cefalópodos
	<i>Coltivirus</i>	<i>Colorado thick fever virus</i>	Mamíferos e insectos
	<i>Cypovirus</i>	<i>Cypovirus 1</i>	Artrópodos
	<i>Dinovernavirus</i>	<i>Aedes pseudoscutellaris reovirus</i>	Mosquitos
	<i>Fijivirus</i>	<i>Fiji disease virus</i>	Plantas e insectos
	<i>Idnoreovirus</i>	<i>Idnoreovirus 1</i>	Insectos
	<i>Mycoreovirus</i>	<i>Mycoreovirus 1</i>	Hongos
	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Mammalian orthoreovirus</i>	Vertebrados
	<i>Oryzavirus</i>	<i>Rice ragged stunt virus</i>	Plantas e insectos

1.2.2. El ciclo replicativo de los reovirus

El ciclo de replicación viral ocurre en el citoplasma y comienza con el ingreso del virus a las células hospedantes mediante mecanismos que varían según el género. Una vez dentro de la célula, los componentes de la cápside externa se desprenden del virión para dar lugar a partículas virales transcripcionalmente activas que inmediatamente comienzan a sintetizar los ARNm virales y a incorporarles la estructura del “cap” a medida que son expulsados a través de canales presentes en los vértices de la partícula viral. Estos canales a su vez posibilitan la entrada de nucleótidos y demás sustratos requeridos por la maquinaria transcripcional del virus. Luego de esta etapa de transcripción y traducción primaria, las proteínas virales producidas forman macroestructuras citoplasmáticas de material electro denso denominadas viroplasmos o cuerpos de inclusión virales (“viral inclusion bodies”- VIB) que funcionan como fábricas virales e inician una segunda etapa de replicación genómica. Estas estructuras son altamente dinámicas y están compuestas por una o dos proteínas virales mayoritarias, ARN viral y otras proteínas virales minoritarias o estructurales que formarán parte de la progenie (Antczak yJoklik, 1992; Brookes y col., 1993) y proteínas del citoesqueleto celular (Cabral-Romero y Padilla-Noriega, 2006; Eaton y col., 1987; Parker y col., 2002). La mayor parte de los

trabajos describiendo estas etapas se realizaron sobre reovirus de los géneros *Rotavirus* y *Orthoreovirus*. Sin embargo, estudios pioneros de microscopía electrónica sobre células de plantas e insectos infectados con diferentes *Fijivirus* han demostrado que su citopatología es similar a la del resto de los reovirus. Durante la infección se describieron viroplasmos de material electrodensito (en ocasiones observado como inclusiones esféricas definidas y en otras como amorfo y fibrilar) conteniendo en su interior ARN y partículas virales inmaduras, lo que concuerda con su rol de zona de empaquetamiento y ensamblado de nuevos viriones con ARNdc genómico generado por la síntesis de la cadena negativa de ARN. Al contrario, en la periferia de estas estructuras se observan los viriones maduros, que migran al resto del citoplasma y se ubican esparcidos al azar (y asociados a material fibrilar), alineados dentro de estructuras tubulares o dispuestos en grandes arreglos cristalinos (Bassi y Favali, 1972; Favali y col., 1974; Francki y Grivell, 1972; Giannotti y Milne, 1977; Shikata y Kitagawa, 1977; Vidano, 1970). La citopatología que produce el MRCV es en esencia la misma (Arneodo, 2003; Arneodo y col., 2002b).

Si bien las proteínas mayoritarias que componen los viroplasmos de los diferentes géneros de reovirus animales no muestran identidad de secuencia a nivel aminoacídico, sí comparten algunas propiedades funcionales. Por ejemplo, muchas forman homomultímeros mediante una fuerte autointeracción, son fosforiladas, poseen la capacidad de unirse con alta afinidad a ácidos nucleicos de simple o doble cadena generalmente de forma independiente de la secuencia nucleotídica, hidrolizan nucleósidos trifosfato (NTP), y en algunos casos también muestran actividad de desplazamiento de hebras en ácidos nucleicos de doble cadena (Taraporewala y Patton, 2004). Asimismo, recientemente se estableció que algunas de ellas interactúan con otras proteínas virales, principalmente estructurales, reclutándolas a los viroplasmos para la replicación y ensamblado viral (Broering y col., 2004; Contin y col., 2010; Miller y col., 2010). Aún se desconoce hasta qué nivel estas características comunes de las proteínas mayoritarias de viroplasma de reovirus animales (*Rotavirus*, *Orbivirus* u *Orthoreovirus*) son compartidas por las ortólogas de reovirus vegetales, cuya caracterización funcional está comparativamente retrasada.

Una vez producida la progenie viral, existen mecanismos específicos del hospedante explotados por los virus para permitir el movimiento de los viriones. En el caso de hospedantes vegetales, el virus se traslada a las células adyacentes a través de los plasmodesmos (movimiento célula a célula) y posteriormente a toda la planta por los tubos cribosos del sistema vascular floemático (Lucas, 2006; Scholthof, 2005). Los plasmodesmos son comunicaciones entre células contiguas en forma de canales que atraviesan la pared celular y comunican el citoplasma y el retículo endoplasmático de ambas células, permitiendo el pasaje de moléculas de forma altamente regulada (Matthews y col., 2002). Los virus vegetales utilizan dos estrategias básicas de movimiento de célula a célula. Existen proteínas de movimiento (MP) virales con capacidad de unión inespecífica al ARN/ADN viral que forman complejos nucleoproteicos que son capaces de atravesar los plasmodesmos. Por otro lado, hay MPs que inducen la formación de estructuras tubulares que atraviesan los plasmodesmos y que son utilizadas para el pasaje de las partículas virales completas (Waigmann y col., 2004) Estos mecanismos dependen de la interacción de las MPs con distintas proteínas del hospedante que auxilian el transporte intracelular de los complejos virales (explotando el citoesqueleto de

la célula) hacia los plasmodesmos, causan el aumento del diámetro de los mismos y finalmente asisten en el pasaje del virus a la célula vecina (Lucas, 2006; Nelson y col., 2010; Nelson y Citovsky, 2005; Scholthof, 2005). Si bien se han identificado MPs en los *Phytoreovirus* (Li y col., 2004) y *Oryzavirus* (Wu y col., 2010c), los mecanismos de movimiento específicos de los reovirus vegetales en las plantas son aún desconocidos.

En cuanto al movimiento viral en células animales, éste depende de otros mecanismos. Los reovirus de animales como los *Rotavirus*, los *Orthoreovirus* y los *Orbivirus* ingresan a las células del hospedante por endocitosis luego de la unión a un receptor de membrana y, una vez cumplido el ciclo replicativo, el egreso puede ocurrir por lisis celular (Guglielmi y col., 2006; Gutierrez y col., 2010; Roy, 2008). En *Rotavirus* se ha descrito además un mecanismo de egreso no lítico en células intestinales polarizadas que aún no es completamente comprendido e involucra a la proteína de la espícula externa VP4 (Chwetzoff y Trugnan, 2006). En cuanto a los *Orbivirus*, que a diferencia de los dos otros dos géneros (y tal como ocurre con los reovirus vegetales) son transmitidos por insectos, existe un mecanismo de egreso lítico en células de mamífero y otro no lítico en las células del mosquito vector. Este último requiere la acción de NS3/NS3A, una glicoproteína integral de membrana plasmática que es capaz de interactuar específicamente con proteínas involucradas en el tráfico y direccionamiento de vesículas en el sistema secretor, que se une a la proteína de cápside externa VP2 y facilita el transporte de los viriones hacia la membrana plasmática y su egreso por brotación (Roy, 2008). El movimiento en el insecto ha sido también caracterizado en el género *Phytoreovirus* mediante el uso de monocapas de células de insecto vector. Se propuso que el movimiento del RDV en el insecto, pero no en las plantas, es llevado a cabo a través de estructuras tubulares que contienen viriones maduros en su interior y que se observan durante la infección del virus en ambos hospedantes. La proteína Pns10 es el componente mayoritario de dichas estructuras y es capaz de formarlas espontáneamente al ser expresada en células de insecto no hospedante. Los túbulos se ubican radialmente en el citoplasma y protruyen de la superficie celular asociados a filopodios de actina que hacen contacto con células vecinas y permiten la dispersión del virus (Wei y col., 2006a). La formación estas estructuras requiere de la asociación de Pns10 al sistema de endomembranas, mientras que su normal funcionamiento en la dispersión viral utiliza la capacidad de elongación de los filamentos de actina y su movimiento a través de motores de miosina (Wei y col., 2008). Llamativamente, la red de microtúbulos no está involucrada en dicho proceso a pesar de que se observó que los mismos median el transporte y liberación de los viriones del RGDV (otro *Phytoreovirus*) en células de insecto (Wei y col., 2009). Este proceso no ha sido estudiado en los *Fijivirus* y los *Oryzavirus*.

1.2.3. Los reovirus vegetales

Dentro de la familia *Reoviridae*, los géneros *Fijivirus*, *Phytoreovirus* y *Oryzavirus* son capaces de infectar plantas e insectos hemípteros que actúan como vectores. En la Tabla B se describen algunas características distintivas de cada uno de los tres géneros de reovirus vegetales. Los reovirus vegetales son particularmente relevantes debido a que infectan especies de cultivos económicamente importantes como el maíz y el arroz, causando pérdidas de producción sustanciales en los principales países productores. Por otro lado, estos virus también son

interesantes desde el punto de vista básico dado que presentan características biológicas interesantes:

- Poseen genoma de ARNdc segmentado y de gran tamaño.
- Su transmisión depende exclusivamente de insectos vectores (no es posible transmitirlos mecánicamente ni por semilla).
- Tienen la capacidad de replicar tanto en células de las plantas hospedantes como en las del insecto vector.
- Generan severos síntomas en sus hospedantes vegetales, mientras que no producen efectos citopáticos durante la infección del insecto vector.
- Generalmente se encuentran limitados al floema de la planta hospedante.
- Su rango de hospedantes vegetales está limitado casi exclusivamente a monocotiledóneas.

Las diferencias de inducción de síntomas en ambos hospedantes llevaron a proponer que los reovirus de plantas se han originado a partir de virus de insectos. Esta hipótesis es respaldada por la presencia del *Nilaparvata lugens reovirus* (NLRV) entre las especies del género *Fijivirus*, el cual es un virus de insectos (Nault y Ammar, 1989). Es interesante notar que, al igual de lo que pasa entre géneros de reovirus animales, es imposible detectar homología de secuencia a nivel aminoacídico entre las proteínas de los tres géneros de reovirus que infectan plantas (*Fijivirus*, *Phytoreovirus* y *Oryzavirus*).

Tabla B. Géneros, especies y características biológicas generales de los reovirus vegetales.

Reovirus vegetales					
Género (Nro. de segmentos)	Especie Acrónimo	Localización geográfica	Hospedante vegetal	Tropismo en la planta	Insecto vector
<i>Phytoreovirus</i> (12)	<i>Wound tumor virus</i> WTV	N. América	Dicotiledóneas	Floema	Cotorrita
	<i>Rice dwarf virus</i> RDV	S.E. Asiático	Dicotiledóneas	Todos	
	<i>Rice gall dwarf virus</i> RGDV	S.E. Asiático			
<i>Fijivirus</i> (10)	<i>Fiji disease virus</i> FDV	Oceania	Monocotiledóneas (gramíneas)	Floema	Chicharrita
	<i>Maize rough dwarf virus</i> MRDV	Europa			
	<i>Mal de Río Cuarto virus</i> MRCV	S. América			
	<i>Oat sterile dwarf virus</i> ORDV	N. y centro de Europa			
	<i>Pangola stunt virus</i> PSTV	América central Australia		Monocotiledóneas (lileáceas)	
	<i>Rice black streaked dwarf virus</i> RBSDV	N.E. Asiático			
	<i>Southern rice black streaked dwarf virus</i> RRBSDV	S.E. Asiático			
	<i>Garlic dwarf virus</i> GDV	Europa			
<i>Oryzavirus</i> (10)	<i>Rice ragged stunt virus</i> RRSV	S.E. Asiático	Monocotiledóneas (gramíneas)		
	<i>Echinochloa ragged stunt virus</i> EGSV	S.E. Asiático			

El género *Fijivirus*

Los miembros del género *Fijivirus*, así como los del género *Oryzavirus* (ver siguiente sección), poseen genomas compuestos por 10 segmentos de ARNdc, viriones con doble capa proteica de simetría icosaédrica, su rango de hospedantes vegetales abarca exclusivamente monocotiledóneas y son transmitidos por chicharritas o “planthoppers” de la familia *Delphacidae* incluida dentro de la superfamilia *Fulgoroidea* del suborden *Auchenorrhyncha*.

El género *Fijivirus* contiene hasta el momento 8 especies: *Fiji disease virus* (FDV), *Maize rough dwarf virus* (MRDV), *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV), *Oat sterile dwarf virus* (OSDV), *Pangola stunt virus* (PaSV), *Rice black streaked dwarf virus* (RBSDV), *Southern rice black streaked dwarf virus* (SRBSDV), *Garlic dwarf virus* (GDV) y *Nilaparvata lugens reovirus* (NLRV). Los miembros de este género causan enfermedades económicamente relevantes en caña de azúcar (FDV en Australia), arroz (RBSDV en China) y maíz (MRCV en Argentina y MRDV en España, Italia, Grecia e Israel) (Achon y Alonso-Duenas, 2009; Dovas y col., 2004; Jiang y col., 2008; Lenardón y col., 1998; Zhang y col., 2008b). La mayoría de los fijivirus replican en células del floema de plantas de la familia *Gramineae* (FDV, MRDV, MRCV, OSDV, PaSV, RBSDV y SRBSDV) ó *Liliaceae* (GDV). Estos virus producen hipertrofia en los tejidos floemáticos (que incluye expansión y multiplicación celular) que da lugar a la formación de un síntoma característico denominado enación en la cara abaxial de las hojas. Además en general producen enanismo y supresión de la floración y formación de semillas. Por otro lado, el NLRV replica únicamente en el insecto *Nilaparvata lugens* (de donde fue aislado originalmente) produciendo una infección asintomática, aunque el virus es también capaz de permanecer y moverse por los tejidos vasculares de plantas de arroz. Estas plantas virulíferas actúan como el reservorio natural del NLRV ya que el virus se transmite a las chicharritas *N. lugens* sanas que se alimenta de sus fluidos floemáticos y xilemáticos. Debido a esto, se postula que el NLRV es un antecesor de los fijivirus que no adquirió la capacidad de replicar en plantas (Nakashima y Noda, 1995).

El genoma de los fijivirus está compuesto por 10 segmentos de ARNdc que se denominan S1 a S10 según su movilidad electroforética. Actualmente están completamente secuenciados los genomas del MRCV (Distéfano y col., 2002; Distéfano y col., 2003; Distéfano y col., 2005; Guzmán, 2005), del FDV (McQualter y col., 2004; McQualter y col., 2003), del RBSDV y SRBSDV (Wang y col., 2003; Zhang y col., 2001a; Zhang y col., 2001b), y del NLRV (Nakashima y col., 1996). Además, se dispone de secuencias parciales de los genomas del OSDV y del MRDV (Isogai y col., 1998b; Marzachi y col., 1996; Marzachi y col., 1991). Todos los fijivirus secuenciados comparten 3 segmentos genómicos biscistrónicos (S5, S7 y S9 en el caso del MRCV), con excepción del NLRV que sólo posee dos segmentos biscistrónicos. Dos de estos segmentos (MRCV S7 y S9) poseen dos marcos abiertos de lecturas u ORFs no superpuestos separados por una región intergénica. Se desconoce el mecanismo de expresión de los segundos ORF de estos dos segmentos y sus productos no han podido ser detectados mediante el uso de antisueros policlonales (Isogai y col., 1998a). El tercer segmento biscistrónico (MRCV S5) contiene un ORF principal grande y un segundo ORF más pequeño ubicado en el extremo 3' del segmento y parcialmente solapado con el primero pero en un marco de lectura diferente. Si bien la expresión de este segundo ORF durante la infección no ha podido ser demostrada experimentalmente, un análisis bioinformático realizado

recientemente indicó que este ORF tiene una significativa capacidad codificante que sugiere que la proteína codificada por el mismo (P5-2) sería funcional (Firth y Atkins, 2009). Adicionalmente, estos autores propusieron tres mecanismos posibles para la expresión de este ORF: a) la utilización de un sitio de entrada del ribosoma (IRES) interno que permita la traducción del ORF de manera independiente, b) el salto de marco de lectura del ribosoma o “frameshift” desde el marco de lectura del primer ORF al del segundo ORF produciendo una proteína de fusión, o c) mediante el desvío del ribosoma o “shunting” que permitiría el salto de la mayor parte del segmento para iniciar la traducción en el codón de inicio del segundo ORF. Notablemente, este tercer mecanismo es el responsable de la expresión del tercer ORF de un segmento tricistrónico en una especie de *Orthoreovirus* (Racine y col., 2007).

Las partículas virales de los fijivirus son icosaédricas y están compuestas por un núcleo o “core” de 51-55 nm de diámetro y una cápside externa de 65-75 nm de diámetro. La cápside del “core” está compuesto por una proteína mayoritaria y por otra minoritaria que se encuentra en los vértices del icosaedro formando espículas de tipo B, mientras que la cápside externa está formada por una proteína mayoritaria y por una minoritaria que conforma las espículas de tipo A ubicadas en los vértices del virión. Los estudios funcionales de las proteínas de los fijivirus se han centrado principalmente en las proteínas estructurales y, dado que es posible detectar homología entre las proteínas codificadas por los diferentes segmentos genómicos de las especies de fijivirus, en muchos casos se han asignado funciones a las proteínas comparándolas con sus homólogas de otra especie del género (Tabla C). El trabajo previo de nuestro grupo demostró que el MRCV constituye una especie independiente dentro del género de los *Fijivirus* y que su genoma está compuesto por 10 segmentos de ARNdc (S1 a S10) que codifican para un total de 13 proteínas (P1, P2, P3, P4, P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P8, P9-1, P9-2 y P10) (Distéfano y col., 2002; Distéfano y col., 2003; Distéfano y col., 2005; Guzmán, 2005; Mongelli, 2010). El análisis de purificaciones virales de MRCV a partir de plantas de maíz infectadas demostró que el virus codifica para al menos 5 proteínas estructurales cuya probable identidad es P1, P3, P4, P8 y P10 (Distéfano, 2004). Por otro lado, ha sido posible predecir la presencia de los dominios y motivos en algunas de las proteínas codificadas por el MRCV (Figura D) mediante un análisis bioinformático de sus secuencias aminoacídicas con el servidor “Predict Protein” (Mongelli, 2010).

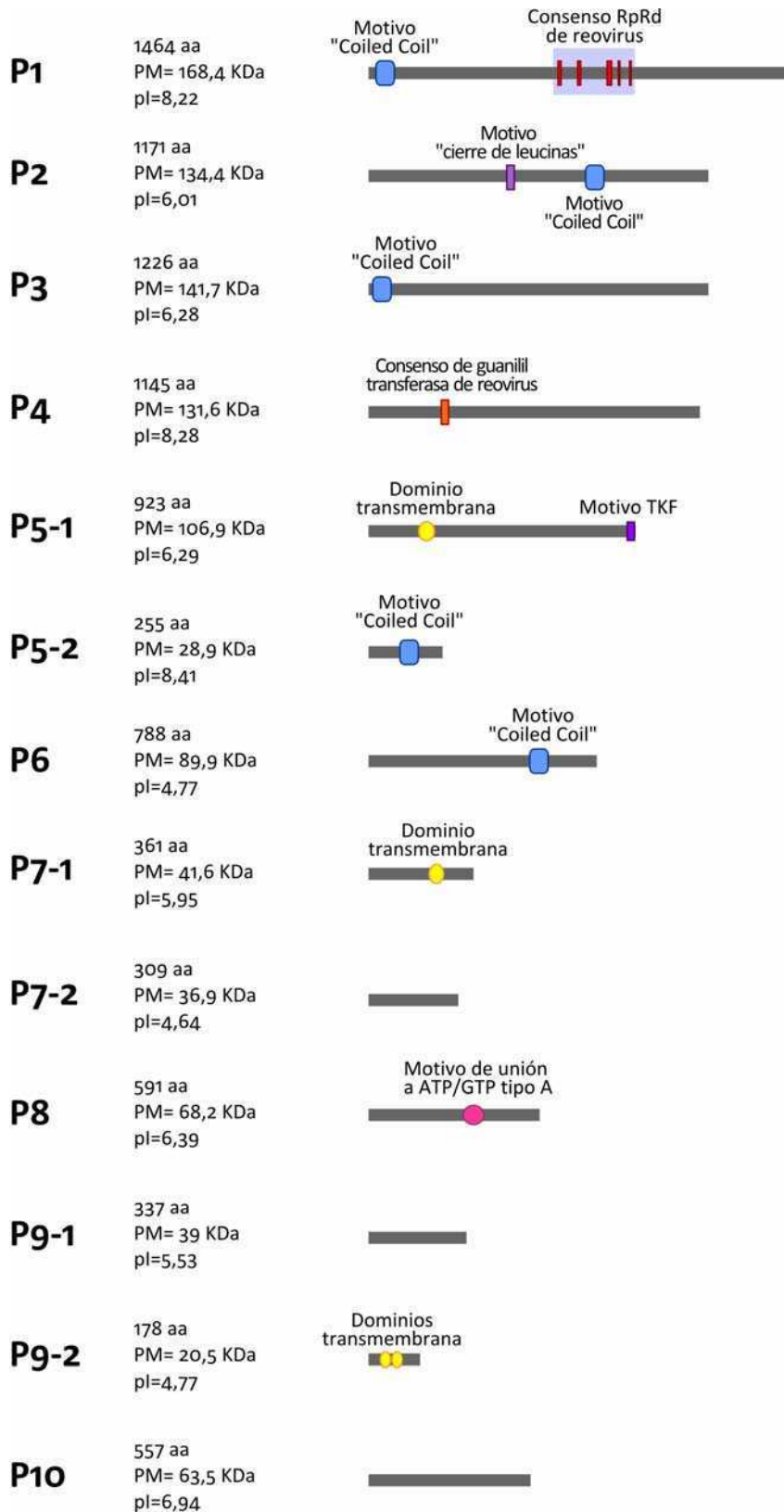


Figura D. Análisis bioinformático de las proteínas del MRCV. Las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por el MRCV fueron analizadas bioinformáticamente con el servidor "Predict Protein". Para cada proteína se detalla el peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) estimados, y los potenciales dominios y/o motivos detectados en su secuencia.

Con respecto a la función asignada a las diferentes proteínas estructurales de MRCV, se ha establecido que **P1** es la RpRd viral dado que presenta motivos característicos de este tipo de enzimas (Distéfano y col., 2003), **P3** es la proteína mayoritaria de cápside interna ó “core” (Distéfano y col., 2009) y **P4** sería la espícula tipo B (Distéfano, 2004). Como era de esperar, se observó que P3 es capaz de interactuar con ella misma, con P1 y con P4 en ensayos de “far Western blot” (Distéfano, 2004). Adicionalmente, se ha detectado que P4 contiene un motivo conservado característico de guanilil transferasas de reovirus con torretas que refuerza su rol de espícula tipo B e indica que podría funcionar como enzima de “capping” del ARNm viral (Supyani y col., 2007). La proteína **P2** ha sido inmunodetectada en extractos de plantas infectadas como una proteína de 90 kDa (lo que indica que sufriría un clivaje postraducciona dado que su PM teórico es 134,4 kDa) e inmunolocalizada en viroplasmos de células de plantas infectadas. Esto, sumado a que el antisuero no reacciona contra proteínas de partículas virales, ha llevado a proponer que P2 sería una proteína no estructural (Distéfano, 2004). Sin embargo, dado que las partículas virales purificadas son muy inestables y normalmente pierden casi completamente la cápside externa, no debe descartarse la posibilidad de que P2 sea estructural y constituya la espícula tipo A del virión. La proteína **P8** es un componente minoritario del núcleo o “core” viral y presenta un motivo de unión a nucleósidos trifosfato (“NTP-binding motif”) que sugiere que esta proteína podría jugar un rol en la transcripción viral (Distéfano y col., 2002; Nibert y Kim, 2004). Más recientemente se ha demostrado que P8 de RBSDV es una proteína homodimérica capaz de ingresar al núcleo de células de planta e insecto mediante una señal presente en los primeros 40 aminoácidos de la proteína y que actúa como regulador negativo de la transcripción de genes nucleares (Liu y col., 2007a). Finalmente, la proteína **P10** es el componente mayoritario de la cápside externa (Distéfano y col., 2005). Un estudio más profundo de la P10 de RBSDV demostró que esta proteína es capaz de auto interactuar en el sistema de doble híbrido de levaduras e *in vitro*, y que el dominio de interacción se ubica en los primeros 230 aminoácidos de la proteína (Liu y col., 2007b). En la Figura E se esquematiza un virión de MRCV, indicando el rol asignado a cada proteína estructural.

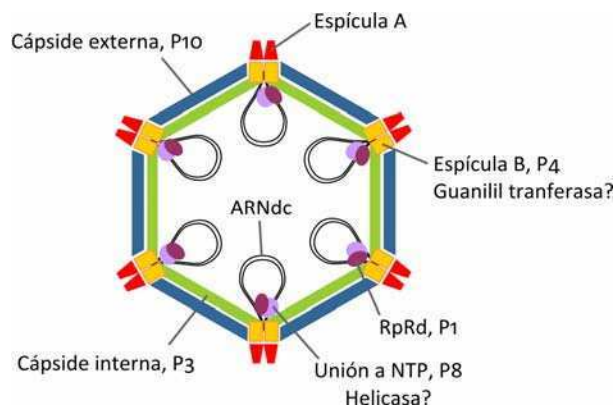


Figura E. Distribución de las proteínas estructurales del MRCV en el virión. Esquema hipotético de la partícula viral del MRCV en donde se muestra la distribución de las proteínas estructurales y el genoma viral según los antecedentes en MRCV, *Fijivirus* y en otros reovirus animales.

Comparativamente, la funcionalidad de las proteínas no estructurales de los fijivirus ha sido pobremente estudiada. Los únicos trabajos publicados al respecto al iniciar esta Tesis demostraban que las proteínas P7-1 y P9-1 del RBSDV inmunolocalizan en túbulos

citoplasmáticos y viroplasma, respectivamente, que se observan al microscopio electrónico en cortes de células de plantas e insectos infectados. Esto llevó a proponer que P7-1 sería responsable de la formación de las estructuras tubulares mencionadas, y que P9-1 sería un componente del viroplasma. Luego, durante el transcurso de esta Tesis, se reportó que P9-1 del RBSDV es una proteína mayoritariamente alfa-helicoidal que forma dímeros *in vitro*, auto interactúa en el sistema de doble híbrido de levaduras y se localiza en cúmulos citoplasmáticos al ser expresada en protoplastos de *Arabidopsis* como fusión a la proteína GFP (Zhang y col., 2008a). Por otro lado, un estudio sobre P6 del RBSDV fue publicado en China en el 2005 reportando que la expresión de esta proteína a partir de vectores recombinantes del *Potato virus X* (PVX) aumenta los síntomas del virus y que además impide parcialmente el desarrollo normal del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) en *Nicotiana benthamiana* (Zhang y col., 2005). En paralelo, en los últimos años nuestro grupo llevó a cabo estudios funcionales de las proteínas de MRCV con el objetivo de detectar si alguna de ellas posee actividad supresora del silenciamiento génico postranscripcional local y sistémico en plantas. Asimismo, se ha trabajado para determinar cual de las proteínas es responsable del movimiento del virus célula a célula, intentando complementar un PVX defectivo en esta función. Si bien no se logró identificar proteínas virales responsables de los dos primeros procesos, se detectó que las proteínas P7-2 y P7-1 son capaces de alterar los niveles de ARNm de transgenes expresados transitoriamente en plantas *N. benthamiana*, mediante mecanismos postranscripcionales. Asimismo se demostró que la expresión de P7-2 a partir de un vector PVX recombinante da lugar a síntomas más severos que los producidos por el virus salvaje en *N. benthamiana* (Mongelli, 2010).

A modo de resumen, en la Tabla C se detallan las homologías a nivel aminoacídico entre las proteínas de los cuatro fijivirus cuyo genoma está completamente secuenciado (MRCV, FDV, RBSDV y NLRV), así como las funciones asignadas a las mismas.

Tabla C. Análisis molecular del genoma de MRCV, FDV, RBSDV y NLRV.

MRCV					FDV			RBSDV			NLRV				
Segmento	Tamaño (pb)	ORF	PM (kDa)	Función asignada	Segmento homólogo / id	Función asignada	Segmento homólogo / id	Función asignada	Segmento homólogo / id	Función asignada	Segmento homólogo / id	Función asignada			
MRCV S1	P1	4501	38 - 4432	168,4	RpRd		FDV S1	64,2	RpRd	RBSDV S1	77,9	RpRd	NLRV S1	77,9	RpRd
MRCV S2	P2	3617	34 - 3549	134,4	Viroplasma No estructural?		FDV S3	40,3	FD	RBSDV S4	56,8	Espícula B?	NLRV S2	20,4	Espícula B?
MRCV S3	P3	3826	47 - 3727	141,7	Mayoritaria de cápside interna		FDV S2	57,6	Mayoritaria de capsida interna	RBSDV S2	84,5	Proteína de capsida interna	NLRV S3	33,6	Mayoritaria de capsida interna
MRCV S4	P4	3566	16 - 3453	131,7	Espícula B Guanilil transferasa		FDV S4	56	FD	RBSDV S3	73,6	Mayoritaria cápside interna Guanilil transferasa	NLRV S4	29,2	FD
MRCV S5	P5-1 P5-2	3162	16 - 2814	107	FD		FDV S5	35,7	FD	RBSDV S5	62,8	FD	NLRV S6	23	FD
			2366 - 3133	28,8	FD		29,2	FD					56,4	FD	
MRCV S6	P6	2639	80 - 2446	90	FD		FDV S6	27,4	FD	RBSDV S6	44,8	Supresor PTGS	NLRV S5	20	FD
MRCV S7	P7-1 P7-2	2186	41-1126	41,5	Estructuras tubulares?		FDV S7	53,17	FD	RBSDV S7	61,3	Estructuras tubulares	NLRV S10	27,8	Estructuras tubulares?
			1176- 2105	36,8	FD		27,92	FD							
MRCV S8	P8	1931	25 - 1800	68,3	Minoritaria del "core", unión NTP		FDV S8	38	Minoritaria del "core", unión NTP	RBSDV S8	53,6	Minoritaria del "core", unión NTP	NLRV S7	28,7	Minoritaria del "core", unión NTP
MRCV S9	P9-1 P9-2	1870	52 - 1065	39	Viroplasma?		FDV S9	37,3	Viroplasma?	RBSDV S9	64,5	Mayoritaria de viroplasma	NLRV S9	24,6	Viroplasma?
			1180 - 1756	24,7	FD		35,3	FD					60,5	FD	
MRCV S10	P10	1870	52 - 1065	39	Mayoritaria de capsida externa		FDV S10	49	Mayoritaria de capsida externa	RBSDV S10	72,4	Mayoritaria de capsida externa	NLRV S8	35,8	Mayoritaria de capsida externa

/ id: porcentaje de identidad a nivel amino ácido entre la proteína de MRCV y su homóloga correspondiente; FD: falta determinar. En azul y celeste se indican los segmentos que codifican para proteínas posiblemente estructurales y no estructurales, respectivamente.

El género *Oryzavirus*

El género *Oryzavirus* está integrado por dos especies: el *Rice ragged stunt virus* (RRSV), que es el miembro tipo, y el *Echinochloa ragged stunt virus* (ERSV). Sus partículas virales completas miden entre 75 y 80 nm de diámetro, mientras que sus “cores” miden entre 57 y 65 nm de diámetro. El RRSV infecta arroz y es transmitido por la chicharrita *Nilaparvata lugens* mientras que el ERSV infecta plantas del género *Echinochloa* o “pasto dentado” y es transmitido por los deléfidos *Sogatella longifurcifera* y *Sogatella vibix*. Ambos virus afectan cultivares del Sudeste de Asia induciendo enanismo y hojas curvadas con enaciones en sus caras abaxiales (Ling y col., 1978). El genoma de RRSV codifica para 8 proteínas estructurales (P1, P2, P3, P4a y P4b, P5, P8 y P9) y 3 proteínas no estructurales (Pns6, Pns7 y Pns10) (Hagiwara y col., 1986; Li y col., 1996; Omura y col., 1983; Upadhyaya y col., 1998; Upadhyaya y col., 1995; Upadhyaya y col., 1996; Uyeda y col., 1995b). El “core” viral estaría formado por las proteínas minoritarias P1 y P2, y la proteína mayoritaria de la cápside interna P3. La proteína P4a es la RpRd (Upadhyaya y col., 1998) y P5 podría ser la enzima responsable del “capping” (Li y col., 1996), aunque en un trabajo más reciente se sugiere que P2 cumpliría esta función (Supyani y col., 2007). La capa exterior del virión estaría formada por la proteína mayoritaria de cápside externa P8 (que es clivada en los productos P8a y P8b) y por la espícula P9, importante para la transmisión por el insecto vector (Guoying y col., 1999; Upadhyaya y col., 1996). En un trabajo más reciente se demostró que líneas transgénicas de arroz expresando P9 de RRSV eran altamente tolerantes a la infección viral y que, después de alimentarse a partir de estas plantas transgénicas, el insecto vector *N. lugens* queda protegido ante la infección viral (Chaogang y col., 2003). Por otro lado, Pns6 estaría implicada en el movimiento de célula a célula del RRSV en la planta ya que es capaz de complementar un *Tobacco mosaic virus* (TMV) defectivo en movimiento, se localiza en la pared celular formando un patrón semejante a los plasmodesmos (Wu y col., 2010c) y tiene capacidad de unión a ácidos nucleicos (Shao y col., 2004), una función que fue descrita para varias proteínas de movimiento de otros virus. Finalmente, un trabajo reciente estableció que Pns6 es también capaz de actuar como supresor del PTGS gatillado por ARN de simple cadena (Wu y col., 2010a).

El género *Phytoreovirus*

El género *Phytoreovirus* está compuesto por tres especies: el *Wound tumor virus* (WTV), el *Rice dwarf virus* (RDV) y el *Rice gall dwarf virus* (RGDV). Estos virus poseen genomas de 12 segmentos de ARNdc y son transmitidos por cotorritas o “leafhoppers” que pertenecen a la familia *Cicadellidae* del suborden *Auchenorrhyncha*. A pesar de que el WTV es el miembro tipo del género, presenta dos características biológicas que lo distinguen de las otras especies e incluso de todos los reovirus vegetales: sus viriones se componen de tres capas proteicas concéntricas y sus hospedantes vegetales son dicotiledóneas. Los viriones del RGDV y el RDV tienen dos cápsides concéntricas e infectan exclusivamente monocotiledóneas. Al infectar plantas de arroz ambos virus inducen enanismo y escasa producción de granos, pero solamente el RGDV produce enaciones en las hojas. Por otro lado, el RDV es el único reovirus vegetal que no está limitado al floema de las plantas hospedantes. La enfermedad causada por este virus tiene gran incidencia en los principales países productores de arroz, principalmente en el sur de China y otros países Asiáticos. Esto sumado a la disponibilidad de células de

insecto vector en cultivo como sistema experimental para estudiar la replicación del virus (Uyeda y col., 1995a), ha provocado que el RDV sea la especie de reovirus vegetal más estudiada. El genoma de RDV codifica para 7 proteínas estructurales (P1, P2, P3, P5, P7, P8 y P9) y 5 no estructurales (Pns4, Pns6, Pns10, Pns11 y Pns12) (Omura y Yan, 1999; Zhong y col., 2003). El “core” de la partícula viral de RDV está compuesto por P3 que es la proteína mayoritaria de la cápside interna (Zheng y col., 2000), P1 que es la RpRd (Suzuki y col., 1992), P5 que posiblemente posea actividad guanilil transferasa o de “capping” de los ARNm virales (Suzuki y col., 1996) y P7 que tiene capacidad de unión a ácidos nucleicos y podría estar implicada en el ensamblado y replicación viral (Zhong y col., 2005). La capa externa del virión está formada por P8, la proteína mayoritaria de la cápside externa, y minoritariamente por P2 y P9 (Nakagawa y col., 2003; Omura y Yan, 1999; Zheng y col., 2000). Si bien la función de P9 no está muy clara (Zhong y col., 2003), P2 interviene en la transmisión del RDV por el insecto vector y parece ser crucial para la infección del mismo (Omura y col., 1998; Tomaru y col., 1997; Yan y col., 1996). Además, dado que P2 interactúa con la enzima oxidasa de entkauranos que forma parte de la ruta de biosíntesis de giberelinas en plantas, se la ha involucrado en el desarrollo de los síntomas del RDV en sus hospedantes vegetales (Zhu y col., 2005). La proteína mayoritaria de cápside externa P8 es también importante en las etapas iniciales de infección de las células del insecto vector, particularmente en la entrada y dispersión entre las células (Miyazaki y col., 2010; Wei y col., 2007). Adicionalmente, esta proteína tiene la capacidad de interactuar con la enzima peroxisomal glioxilato oxidasa, lo que llevó a proponer que P8 podría estar involucrada en dirigir al RDV a su sitio replicativo intracelular (Zhou y col., 2007). Con respecto a las proteínas no estructurales del RDV, se reportó que Pns4 es una fosfoproteína que se asocia a fibrillas citoplasmáticas y forma minitúbulos proteicos en la periferia de las células de insecto infectadas (Wei y col., 2006b). La proteína Pns6 estaría implicada en el movimiento de célula a célula del RDV en plantas, dado que es capaz de complementar un virus PVX defectivo en movimiento y que se localiza en los plasmodesmos de células de arroz infectadas con el virus (Li y col., 2004). La proteína Pns10 posee actividad supresora del PTGS local y sistémico gatillado por ARN de simple cadena (Cao y col., 2005; Ren y col., 2010), y al ser expresada en células de insecto hospedante forma estructuras tubulares que se asocian a filopodios que contienen microfilamentos de actina y protruyen de la superficie celular para penetrar células vecinas (Wei y col., 2006a), lo que sugiere que Pns10 facilita la dispersión intercelular del RDV entre las células del insecto. Finalmente, la proteína Pns11 tiene capacidad de unión a ácidos nucleicos de simple cadena y podría cumplir un rol en la replicación viral (Xu y col., 1998) y la proteína Pns12 es una fosfoproteína y el componente mayoritario de los viroplasmos (Suzuki y col., 1999; Wei y col., 2006c).

1.3. La transmisión del virus del Mal de Río Cuarto

En el campo, el principal vector que transmite al MRCV entre las plantas es la chicharrita *Delphacodes kuscheli* Fennah, un hemíptero perteneciente a la superfamilia *Fulgoroidea* de la familia *Delphacidae* (Figura A.F). Sin embargo, existen otras especies de delfácidos también

implicadas en la dispersión de la enfermedad (Laguna y col., 2002; Mattio y col., 2008; Ornaghi y col., 1993; Remes Lenicov y col., 1985; Velazquez y col., 2003; Velázquez y col., 2006).

1.3.1. Características de la transmisión

Al igual que ocurre con todos los reovirus vegetales, el MRCV no es transmisible mecánicamente ni por semilla y la única forma de transmisión viral es a través del delfácido vector, de manera propagativa y persistente. Al contrario de lo que ocurre en hospedantes vegetales donde la replicación de los fijivirus está confinada a células del floema, la replicación en el insecto vector se extiende por un amplio rango de tipos celulares (Milne y Lovisolo, 1977). De esta manera, el MRCV es capaz de ingresar y llevar a cabo su ciclo replicativo en el insecto vector, el cual permanecerá infectado de por vida sin presentar ningún tipo de síntoma (Arneodo y col., 2002a). A pesar de que en otras especies de fijivirus se ha detectado transferencia vertical (transferencia transovarial de las hembras infectadas a la descendencia), esto no ha sido confirmado para MRDV, una especie cercanamente relacionada al MRCV (Milne y Lovisolo, 1977).

El proceso de transmisión de MRCV, tal como ocurre con otros fijivirus, comienza cuando las chicharritas adquieren el virus alimentándose del floema de plantas enfermas y luego de un período de latencia durante el cual el virus replica en el intestino para luego movilizarse a otros tejidos. Cuando el virus finalmente infecta las glándulas salivales, el delfácido puede tornarse infectivo de por vida y transmitir la enfermedad a plantas sanas al alimentarse de ellas. Sólo un porcentaje de los insectos infectados son capaces de transmitir el virus (Milne y Lovisolo, 1977; Truol y col., 2001). Este porcentaje es reducido en poblaciones naturales de *D. kuscheli* en donde se observa que tan solo del 1/ al 5,2/ de los individuos son infectivos (Ornaghi y col., 1999). Este fenómeno ha sido estudiado más profundamente en condiciones experimentales y se ha observado que, si bien la eficiencia de transmisión es altamente variable, el 25/ (en promedio) de las chicharritas que se alimentan de plantas infectadas con MRCV son capaces de transmitirlo a plantas sanas, con un período mínimo y medio de latencia de 9 y 17 días, respectivamente (Arneodo y col., 2002a). Asimismo, se determinó que individuos de *D. kuscheli* que adquieren el MRCV en el estadio ninfal I son capaces de transmitir el virus con una eficiencia del 53/ y un período de latencia mínimo de 7 días, mientras que al utilizar ninfas de estadio III este porcentaje disminuye a 33/ y la latencia mínima es de 9 días (Arneodo y col., 2005).

1.3.2. Determinantes moleculares de la transmisión de virus por insectos vectores

Las bajas eficiencias de transmisión y su alta variabilidad, así como la dependencia con la edad del vector, reflejan la complejidad del proceso de transmisión. Para que la transmisión sea exitosa, luego de ser ingerido el virus debe atravesar la membrana peritrófica, infectar las células epiteliales del tracto digestivo, luego atravesar la lámina basal, transitar en la hemolinfa hasta diferentes tejidos y finalmente ingresar e infectar las glándulas salivales que consecuentemente excretarán el virus en la saliva (Ammar y col., 2009). Es probable que diversos mecanismos fisiológicos, la carga viral y/o otros factores (actuando

independientemente o en conjunto) sean determinantes de la capacidad infectiva del insecto y por ende de la eficiencia de transmisión. Incluso existen reportes sobre determinantes genéticos de transmisión con herencia mendeliana en las poblaciones del insecto vector de diversos virus (Bosque-Pérez, 2000; Gamez y Leon, 1988; Jackson y col., 2005; Zeigler y Morales, 1990).

En primer lugar, la eficiencia de transmisión varía con la tasa de infección de los insectos vectores, que a su vez depende directamente de la concentración viral o tiempo de adquisición a la que se los expone. Por ejemplo, la infección exitosa del vector de muchos virus persistentes propagativos transmitidos por mosquitos requiere de una concentración inicial superior a un determinado umbral o “threshold” (Mellor, 2000). Esta dependencia de la dosis se observó también durante la infección del delfácido vector de un *Rhabdovirus* de maíz (Ammar el y Hogenhout, 2008).

Una vez en el tracto digestivo, los diversos tejidos que los virus deben atravesar al movilizarse en el delfácido constituyen potenciales barreras que pueden interferir con la capacidad infectiva del vector (Ammar y col., 2009; Mellor, 2000; Nagata y col., 1999). Por otro lado, la correlación negativa observada entre la edad del vector y la eficiencia de transmisión en numerosos patosistemas (Conti, 1984; Hutchinson y Francki, 1973; Nagata y col., 1999) parece ser un factor común en el proceso de transmisión de los virus persistentes propagativos. Una explicación sugerida para este hecho en delfácidos es que la falta de desarrollo de la membrana peritrófica en insectos jóvenes podría ser un determinante de la mayor infección viral y consiguiente eficiencia de transmisión (Ammar y col., 2009; Sinha, 1967). Puede existir también un componente de inmunidad, dado que en muchos casos se demostró que los mecanismos fisiológicos de defensa del insecto, como el sistema de inmunidad innata o el sistema de ARN interferente, están involucrados en la modulación de la infección viral (Fragkoudis y col., 2008; Medeiros y col., 2004; Myles y col., 2008; Sanchez-Vargas y col., 2009; Sim y Dimopoulos, 2010; Zhang y col., 2010).

Otros factores que modulan la capacidad de transmisión viral en insectos vectores son la temperatura, ya que se ha visto que individuos tratados con altas temperaturas pierden la capacidad de transmisión (Klein y Harpaz, 1970; Maramkosch, 1950; Sinha, 1967), y la presencia de endosimbiontes que influyen en la persistencia de algunos virus en el insecto (Glaser y Meola, 2010; Moreira y col., 2009; Teixeira y col., 2008).

Por último, el título viral alcanzado durante la replicación del virus en el vector (que a su vez podría estar vinculado a los factores mencionados anteriormente como la concentración de virus adquirida, la capacidad del virus de saltar las barreras fisiológicas y/o evasión del sistema de inmunidad) es un factor que se ha visto asociado a la capacidad de transmisión, tanto en *Fijivirus* (Hughes y col., 2008) como en otros virus (Rotenberg y col., 2009; Todd y col., 2010).

Por lo dicho, queda en evidencia que el desarrollo de técnicas cuantitativas para determinar el título viral en los insectos vectores es indispensable para realizar estudios moleculares sobre la transmisión de los virus de plantas. Aunque técnicas como el “Western blot”, el ELISA o la hibridación del genoma viral han sido las metodologías clásicamente utilizadas con este objetivo, están siendo rápidamente desplazadas por la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real por ser una plataforma más sensible, rápida y sencilla de establecer (Narayanasamy,

2011). Sin embargo, dada la alta sensibilidad de esta técnica, debe ser utilizada cuidadosamente y con los recaudos necesarios para que la cuantificación sea fiable. Uno de los principales puntos a tener en cuenta es la disponibilidad de un control interno de expresión invariable en la condición que se está estudiando (normalmente genes de mantenimiento o “housekeeping”) que sirve como referencia para normalizar la variabilidad entre muestras (Huggett y col., 2005). Muchas veces o no se emplean los controles necesarios o los controles empleados no son debidamente validados en su estabilidad antes de ser utilizados para normalizar el valor de expresión de los genes de interés, lo cual es particularmente problemático si se tiene en cuenta que la expresión de muchos genes considerados clásicamente como “housekeeping” suele variar con las infecciones virales (Brault y col., 2010; Matis y Kudelova, 2001; Zhang y col., 2010). Existen numerosos trabajos que estudian la estabilidad de la expresión de posibles genes de referencia para su posterior uso como control interno en ensayos de PCR cuantitativa en una gran diversidad de sistemas de estudio y de situaciones (Bower y Johnston, 2009; Brenndörfer y Boshart, 2010; Exposito-Rodriguez y col., 2008; Hornáková y col., 2010; Jarosova y Kundu, 2010; Lord y col., 2010; Nyström y col., 2004; Radonic y col., 2005; Scharlaken y col., 2007; Van Hiel y col., 2009; Watson y col., 2007). Lamentablemente, aún no se han realizado estudios de este tipo para ningún sistema virus-insecto.

Las bases moleculares de los mecanismos determinantes de la transmisión persistente y propagativa de virus vegetales por parte de insectos vectores es un campo de investigación muy poco desarrollado, a pesar de que presenta un alto potencial biotecnológico para el desarrollo de estrategias alternativas de control de las enfermedades causadas por este tipo de virus. Consecuentemente, el desarrollo de técnicas cuantitativas para estudiar la relación del MRCV y el delfácido vector *D. kuscheli* será imprescindible para entender los factores moleculares que determinan su transmisión y desarrollar nuevas herramientas de control viral.

CAPÍTULO I

2. Objetivos

Objetivo General

Establecimiento de un protocolo útil para la cuantificación de ARNm viral o endógeno en *Delphacodes kuscheli* mediante RT-qPCR.

Objetivos Particulares

- a) Desarrollo de un protocolo para la extracción de ARN total de delfácidos individuales y posterior síntesis de ADNc apto para RT-qPCR.
- b) Selección, asilamiento y secuenciación parcial de un conjunto de genes de mantenimiento de *Delphacodes kuscheli* con potencial como referencia interna para ensayos de RT-qPCR.
- c) Diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR a partir de las secuencias determinadas en el punto anterior.
- d) Estudio de la estabilidad de expresión de los potenciales genes de referencia frente a una infección con MRCV persistente y transmisiva.

3. Métodos

3.1. Aislamiento viral y ensayos de transmisión

La obtención de las muestras utilizadas en este trabajo se realizó mediante un ensayo de transmisión de MRCV en invernadero, a cargo del grupo de la Dra. Truol en el IFFIVE (INTA, Córdoba).

Se partió de poblaciones sanas del vector *D. kuscheli* mantenidas en salas de cría y en fitotrones, a una temperatura constante de 24 °C, fotoperíodo de 12 horas y 50% de humedad, y del aislamiento Río Cuarto (RC) del MRCV que fue obtenido de una planta de avena proveniente de la zona endémica de la enfermedad, con severos síntomas de enaciones, hojas en tirabuzón y enanismo. La presencia del MRCV fue corroborada mediante la prueba serológica de DAS ELISA (Clark y Adams, 1977), empleando un antisuero contra MRCV (Giménez Pecci y col., 1986; Rodríguez Pardina y col., 1998).

Para realizar el ensayo de transmisión, se tomaron 50 ninfas del tercer estadio y se las alimentó colocándolas sobre una planta de avena infectada con el aislamiento RC del MRCV, cumpliendo con un período de adquisición de 2 días. Se dejó transcurrir un período de latencia de 19 días colocándolas sobre plantas de trigo sanas. A continuación se inoculó una plántula de trigo sana del cultivar Prointa Federal (de susceptibilidad comprobada al MRCV), en estadio de primera hoja desarrollada, con cada delfácido durante un día. Finalizado el período de infección, los insectos individualizados fueron fijados en etanol absoluto y guardados a 4°C hasta su uso, y las plantas de trigo, también individualizadas, fueron mantenidas en invernáculo durante 25 días para examinar la aparición de síntomas de MRCV y evaluar la presencia del virus por DAS ELISA. Los insectos alimentados en plantas que posteriormente desarrollaron la infección viral fueron catalogados como transmisores y utilizados para el posterior ensayo de RT-qPCR, junto con chicharritas sanas control que fueron sometidas al mismo procedimiento pero con plantas sin infectar.

3.2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La extracción de ARN total de cada chicharrita se realizó a partir de un protocolo básico de Trizol (Invitrogen, E.E.U.U.), con las modificaciones que se describen a continuación. Antes de agregar el reactivo de extracción Trizol, se molió exhaustivamente la muestra con nitrógeno líquido dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Por otro lado, se auxilió la precipitación del ARN con 1-2 µg de glicógeno (Sigma Chemical Co., E.E.U.U.) antes de agregar isopropanol. En tercer lugar, el ARN purificado fue resuspendido en 20 µl de agua libre de RNAsas. La concentración y pureza del ARN fue examinada con un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, E.E.U.U.) y su integridad fue controlada por electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Luego, 500 ng de ARN fueron tratados con DNAsa I para eliminar contaminantes de ADN y utilizados para sintetizar ADNc usando la enzima Superscript III y oligonucleótidos al azar, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen, USA). Se realizaron reacciones paralelas sin la retrotranscriptasa para descartar posibles contaminaciones con ADN genómico.

3.3. Aislamiento de secuencias de genes candidatos y diseño de oligonucleótidos

Para determinar las secuencias de los genes de *Delphacodes kuscheli* candidatos para su utilización como control interno en experimentos de RT-qPCR, se diseñaron oligonucleótidos degenerados en base a zonas conservadas de secuencias de genes homólogos pertenecientes a otros insectos (especialmente Hemípteros) que se encuentran disponibles públicamente. Luego, los oligonucleótidos degenerados Ph.Act FW (5'- CACCAGGGWGTGATGGTSGGTATGG-3'), Ph.Act RV (5'- SACGTGCACTTCATGATSGAGTTG-3'), Ph.Tub FW (5'- ACAACGARGCYATCTACGACATCTG-3'), Ph.Tub RV (5'- CTCCTTCTCCATACCCTCWCCGAC-3'), Ph.eF1a FW (5'- GGAAATGGGYAARGGTTCTTCAAG-3'), Ph.eF1a RV (5'- AGCCTGAGGGCTTSTCAGTRGGTC-3'), Ph.RpS18 FW (5'- ARCGNAARGTBATGTTYGCCATGAC-3'), Ph.RpS18 RV (5'- TCTTNGABACACCAACAGTNTCTCC-3'), Ph.GAPDH FW (5'- TGGTNTACWTGTTCAARTAYGAYTC-3'), Ph.GAPDH RV (5'- ATTGGNACTGGBACTCGGAARGCC-3'), Ph.UbiC FW (5'- GWGGTATGCARATCTTCGTSAAARAC-3') y Ph.UbiC RV (5'- TGTAGTCRGARAGGGTTCTGCCATC3') fueron utilizados para amplificar fragmentos de los genes de actina (ACT), α -1-tubulina (TUB), factor de elongación 1- α (EF1A), proteína ribosomal S18 (RPS18), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y poliubiquitina C (UBI) por RT-PCR usando ADNc de *D. kuscheli* como templado. Los amplicones fueron separados en geles de agarosa 0,8% , purificados usando QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany), clonados en el vector pGemT Easy (Promega, E.E.U.U) y secuenciados automáticamente en el Servicio de Secuenciación y Genotipificación del CICV, INTA-Castelar. Las secuencias de todos los genes de *D. kuscheli* obtenidas se detallan en el Apéndice y fueron depositadas en la base de datos GenBank bajo los códigos de acceso detallados en la Tabla 1.1. Finalmente, a partir de estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos para RT-qPCR utilizando el software Primer Express 3 (Applied Biosystems, E.E.U.U.), con excepción de los del gen 18S que fueron diseñados usando la secuencia de *Laodelphax striatellus* (GenBank: AB085211) (Tabla 1.1).

3.4. PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de datos

Las reacciones de RT-qPCR fueron realizadas usando el kit comercial QuantiTec SYBR Green PCR kit (QIAGEN, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y corridas en un sistema ABI7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, E.E.U.U.) con un programa de temperaturas estándar (1 minuto de elongación a 60 °C). Se empleó una concentración de oligonucleótidos de 200 nM y una dilución 1/10 del ADNc como templado en un volumen final de reacción de 25 μ l. A las reacciones del control negativo no se le agregó templado. Los resultados fueron exportados como datos crudos e introducidos en el software LinReg (Ruijter y col., 2009) para realizar una corrección de línea de base y calcular la eficiencia de amplificación para cada par de oligonucleótidos. Los valores de "cycle threshold" (Ct) resultantes fueron usados para analizar la estabilidad de expresión utilizando las herramientas geNorm 3.5 (Vandesompele y col., 2002), Normfinder 0.953 (Andersen y col., 2004) y Bestkeeper v1 (Pfaffl y col., 2004) siguiendo las instrucciones de los desarrolladores. La significancia estadística de las diferencias de Ct entre tratamientos fue calculada usando el test T de Mann-Whitney incluido en el software Graphpad Prism 5.

4. Resultados y discusión

El hecho de que no todos los delfácidos que son infectados por MRCV son luego capaces de transmitirlo es interesante ya que sugiere la presencia de barreras que deben ser superadas por el virus para establecer la persistencia y lograr una infectividad exitosa.

Nos propusimos establecer si la condición infectiva del insecto se debe a una mayor acumulación viral o a diferencias en la distribución tisular del virus por la posible existencia de barreras morfológicas o fisiológicas. Se estableció para ello una colaboración con el grupo dirigido por la Dra. Graciela Truol (IFFIVE, Córdoba), entomóloga especialista en la transmisión del MRCV. El proyecto planteado tiene como objetivo estudiar la correlación entre el título viral, la distribución tisular de MRCV y la capacidad de transmitir el virus, empleando individuos de *D. kuscheli*. Dentro del marco de este proyecto, se decidió desarrollar un sistema de cuantificación del ARN viral en cada delfácido mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

4.1. Adaptación del protocolo de extracción de ARN a un delfácido individual

Para lograr cuantificar el ARN viral en delfácidos *D. kuscheli* individuales infectados con MRCV, fue necesario contar con un protocolo que permitiera extraer el ARN total de cada insecto en cantidad y calidad suficiente para realizar la posterior retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real. Esto es particularmente dificultoso en nuestro sistema experimental debido al reducido tamaño de cada muestra, ya que un individuo de *D. kuscheli* mide cerca de 2 mm largo y pesa entre 1 y 1,5 mg aproximadamente.

Por lo tanto, se optimizó la técnica de extracción de ARN de cada insecto introduciendo algunas modificaciones al protocolo de Trizol básico (ver sección 3.2 de Métodos). Se observó que el empleo de glicógeno para auxiliar la precipitación del ARN en isopropanol fue determinante para lograr buenos rendimientos.

Posteriormente, se analizó la efectividad de diferentes condiciones de almacenamiento para conservar la integridad del ARN de las muestras. Para ello, se extrajo ARN total de insectos guardados a temperatura ambiente durante 10 días en Trizol, etanol absoluto o acetona. Como control se emplearon delfácidos congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C, ya que éstas son las condiciones óptimas de almacenamiento de tejidos. Luego de realizar las extracciones, se analizó la integridad del ARN extraído en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se determinó que, de los tres tratamientos a temperatura ambiente, el método más adecuado es el almacenamiento en etanol absoluto ya que permite la obtención de ARN de integridad similar al de las muestras mantenidas a -70 °C. Notablemente, los tejidos conservados en Trizol mostraron un alto grado de degradación de ARN indicando que se debe evitar mantener las muestras por tiempos prolongados a temperatura ambiente en este medio (Figura 1.1). Lamentablemente, no existen estudios sobre condiciones de almacenamiento de muestras de insectos para conservación de ARN, siendo todos los trabajos publicados orientados a la conservación del ADN. En este caso, se han reportado buenos resultados al emplear etanol absoluto para la conservación de insectos pertenecientes al orden de los Himenópteros (Quicke y col., 1999), aunque se observó que la

acetona es más adecuada para Lepidópteros (Mandrioli y col., 2006) y Coleópteros (Bisanti y col., 2009; Reiss y col., 1995). Adicionalmente, se observó que el almacenamiento en etanol absoluto es efectivo también en áfidos, aunque para mezclas acuosas la acetona podría ser una mejor opción (Fukatsu, 1999).

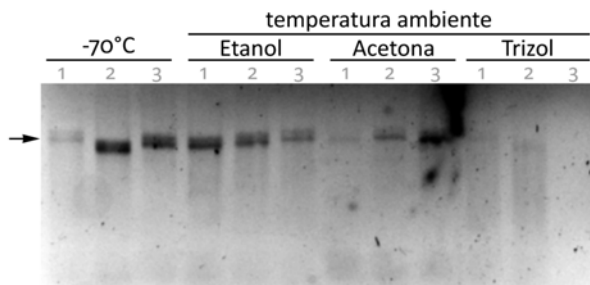


Figura 1.1. Efecto de diferentes condiciones de almacenamiento en la integridad del ARN extraído. Se fijaron y almacenaron 3 delfácidos en etanol absoluto, acetona o Trizol durante 10 días a temperatura ambiente. Luego, se les extrajo ARN total y se lo visualizó por electroforesis en un gel de agarosa. Como control de la extracción, se utilizaron 3 insectos congelados instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C . Se señala con una flecha la posición del ARN ribosomal.

Finalmente, se realizó la síntesis del ADN copia (ADNc) mediante retrotranscripción empleando $500\ \mu\text{g}$ del ARN extraído de cada individuo por reacción. Se observó que esta cantidad de ARN es suficiente para una amplificación eficiente en ensayos de RT-PCR a tiempo final y qPCR en tiempo real (ver sección 4.3).

En resumen, se logró adaptar un protocolo de almacenamiento y extracción de ARN total de delfácidos individuales para posteriores ensayos de RT-qPCR.

4.2. Aislamiento de secuencias de genes de mantenimiento de *Delphacodes kuscheli* y diseño de oligonucleótidos específicos

Debido a que en el momento de comenzar los experimentos no existía ningún estudio sobre la expresión de genes de mantenimiento de insectos frente a una infección viral, se seleccionaron 7 genes de mantenimiento candidatos que son comúnmente utilizados como control interno en experimentos de RT-qPCR en animales, para analizar la estabilidad de su expresión y en base a ello seleccionar el/los más útiles como referencia (Tabla 1.1). En lo posible, se intentó no seleccionar dos genes candidatos que estuvieran involucrados en el mismo proceso celular. Los candidatos fueron los genes de actina (ACT), α -1-tubulina (TUB), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación 1- α (EF1A), proteína ribosomal S18 (RPS18), poliubiquitina (UBI) y del ARN ribosomal 18S (18S).

A continuación, se procedió a aislar las secuencias de los genes candidatos seleccionados de *Delphacodes kuscheli* ya que no existen secuencias de esta especie depositadas en bases de datos públicas. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de secuencias de insectos disponibles, especialmente de las pertenecientes Hemípteros relacionados (Noda y col., 2008), y se los utilizó para amplificar fragmentos de ARNm de los genes candidatos a partir de ARN total de *D. kuscheli* por RT-PCR. Los fragmentos amplificados fueron clonados, secuenciados y depositados en la base de datos GenBank (Tabla 1.1). Las secuencias determinadas para los genes ACT, TUB, GAPDH, EF1A, RPS18 y UBI (Apendice) de *D. kuscheli* mostraron una identidad del 95 / , 86 / , 90 / , 92 / , 92 / y 84 / al ser alineadas con fragmentos de secuencias expresadas (EST) del hemíptero *Nilaparvata lugens*, respectivamente.

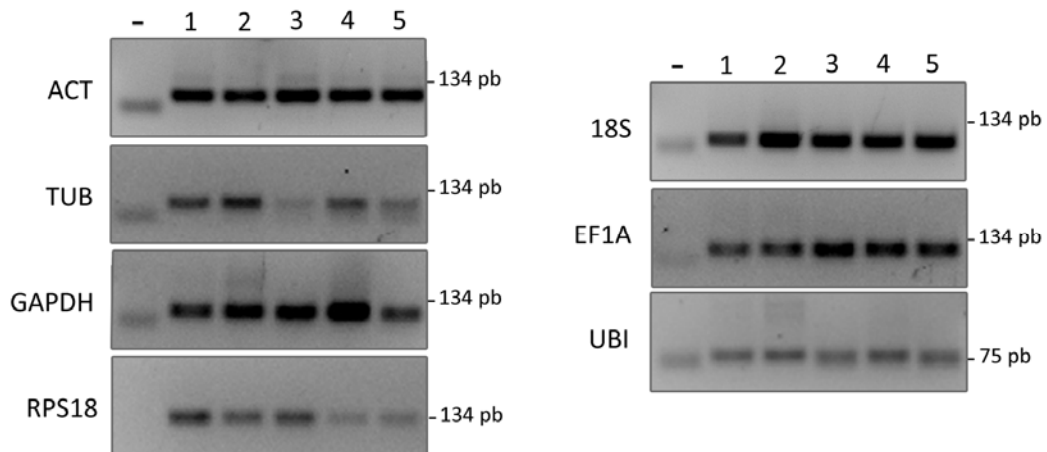


Figura 1.2. Ensayo de amplificación por RT-PCR a tiempo final. Los oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias aisladas de *D. kuscheli* fueron utilizados en un ensayo de RT-PCR a tiempo final para evaluar su capacidad para amplificar el fragmento de tamaño esperado. Como templado se utilizó ADNc sintetizado a partir de ARN total de 5 insectos sanos (1 a 5) o no se agregó templado como control negativo (-).

Luego, empleando las secuencias aisladas de *D. kuscheli*, se diseñaron oligonucleótidos específicos para RT-qPCR en tiempo real (Tabla 1.1). Dado que las secuencias de ARN ribosomal son altamente conservadas, los oligonucleótidos para 18S fueron diseñados a partir de secuencia disponibles del delfácido *Laodelphax striatellus*. Para evaluar la capacidad de amplificación de los oligonucleótidos diseñados se realizaron reacciones de RT-PCR y los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1,5 / , observándose amplicones del tamaño esperado sin la formación de dímeros de iniciadores (Figura 1.2). A continuación, los oligonucleótidos fueron evaluados en su capacidad de amplificación por RT-qPCR usando la tecnología de SYBR Green I. Todos los pares de iniciadores fueron capaces de amplificar un solo producto que mostró una temperatura de desnaturalización esperada en las curvas de disociación (resultados no mostrados). Empleando el software LinReg se calculó una eficiencia de amplificación media para cada par de oligonucleótidos, a partir de las eficiencias individuales extraídas de la porción lineal de cada curva de amplificación (Ruijter y col., 2009). Las eficiencias medias se encontraron entre 1,83 (83 /) para los iniciadores de UBI y 1,55 (55 /) para los de 18S (Tabla 1.1). La baja eficiencia de los oligonucleótidos de 18S podría deberse a un anillado incompleto causado por diferencias puntuales entre las secuencias de los iniciadores empleados y las secuencias blanco, ya que estos oligonucleótidos fueron diseñados en base a secuencias de una especie emparentada.

4.3. Análisis de la expresión de los potenciales genes de referencia

Para examinar la estabilidad de la expresión de un gen, es necesario contar con muestras sometidas al tratamiento de interés y muestras provenientes de una situación control frente a la cual comparar. En nuestro caso, dado que el objetivo final es la cuantificación de MRCV en delfácidos infectados para correlacionar los niveles de acumulación del virus con la capacidad de transmitirlo, decidimos partir de insectos infectados y transmisores en comparación con insectos alimentados en plantas sanas (situación control). Para ello la Ing. Mónica Sagadín del IFFIVE realizó un ensayo de

transmisión de MRCV en invernáculo partiendo de 50 individuos, de los cuales finalmente 4 fueron capaces de transmitir el virus a plantas sanas (ver sección 3.1). Estos insectos, junto con delfácidos control sometidos al mismo procedimiento pero siempre con plantas sanas, se utilizaron como punto de partida de este trabajo para la subsiguiente extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de la expresión de genes potencialmente utilizables como referencia en ensayos de RT-qPCR.

Tabla 1.1. Genes candidatos de *Delphacodes kuscheli* seleccionados y características de los oligonucleótidos empleados para la RT-qPCR.

Nombre	Abrev.	Función	Acceso GenBank	Secuencia de iniciadores (de 5' a 3')	A ^a (pb)	E ^b (✓)
Actina	ACT	Citoesqueleto / Contracción muscular	HM565964	FW: AGCGTGTTACAGCTTACAAC RV: GGCCATTTCTGTTCGAAGTC	101	76
α -1-tubulina	TUB	Citoesqueleto	HM565965	FW: GTTTTGAACCGCCAATCAG RV: ACGTCTTTCGGCACGACATC	100	82
Factor de elongación 1- α	EF1A	Traducción de proteínas	HM565967	FW: TTGAGGCTGGTATCTCGAAGAAC RV: GCTCGGTGGAGTCCATCTTG	111	79
Proteína ribosomal S18	RPS18	Compone la subunidad ribosomal 40S	HM565969	FW: TGGCTACCCAAGACAATAAAG RV: TTCAGCCTTCCAGTCCATCAC	133	77
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	Glucólisis	HM565966	FW: CGCCAAGAAGGTGATCATTTTC RV: CAGGAGGCGTTCGAGATGAC	115	65
Poliubiquitina	UBI	Proteasoma	HM565968	FW: CTGACCGGCAAGACGATTACG RV: GCCCTCTTGTCTGAATCTTC	84	82
ARN ribosomal 18S	18S	Compone la subunidad ribosomal 40S	ND ^c	FW: TCGAAGGCGATCAGATACCG RV: TCTGGTTTCCCGGAAGCTG	105	55

^a Tamaño del amplicón; ^b Eficiencia de PCR media calculada por LinReg; ^c Secuencia no determinada

4.3.1. Análisis de la estabilidad de la expresión de los genes candidatos

Se realizó un análisis de la estabilidad de la expresión de los 7 genes candidatos, empleando los oligonucleótidos diseñados en base a las secuencias de *D. kuscheli*, mediante RT-qPCR. El análisis de expresión de cada gen fue llevado a cabo con el juego completo de muestras de ADNc (4 insectos infectivos y 4 insectos sanos) y en una sola corrida para evitar variabilidad metodológica. En todos los experimentos se realizaron tres réplicas técnicas por cada muestra. Los datos crudos obtenidos de cada corrida de RT-qPCR fueron procesados con el software LinReg, que realiza una corrección de línea de base, para obtener los valores Ct. Finalmente, estos valores fueron empleados para el análisis de estabilidad por medio de tres métodos diferentes usando las herramientas geNorm (Vandesompele y col., 2002), Normfinder (Andersen y col., 2004) y Bestkeeper (Pfaffl y col., 2004).

GeNorm es una aplicación desarrollada en Visual Basic para Microsoft Excel, que sitúa a los genes en estudio dentro de un ranking de estabilidad de acuerdo a su valor M calculado en base a su variación pareada promedio contra los demás genes estudiados (Vandesompele y col., 2002). De

acuerdo a la clasificación generada por geNorm, el gen con menor variabilidad de expresión es ACT ($M=0,4738$) seguido por UBI, GAPDH, 18s y RPS18 con coeficientes M similares. Por otro lado, tanto EF1a como TUB fueron detectados como los más inestables, con valores M mayores a 1,2. (Figura 1.3A). A continuación, la aplicación excluye escalonadamente al gen menos estable (con mayor M) y recalcula el ranking de estabilidad para los genes que quedan. A partir de este análisis, geNorm detectó que el par de genes más estable es ACT/GAPDH (Figura 1.3D), los cuales habían ocupado el primer y tercer puesto en el ranking general. Partiendo de estos dos genes, el programa finalmente computa un factor de normalización (NF) conjunto y estudia la variación pareada (V) que sufre este índice al ir introduciendo escalonadamente otro gen (el de menor valor M entre los restantes) a su cálculo. Este análisis mostró que la inclusión de un tercer gen no resulta en un valor NF más confiable y que V sólo alcanza el valor generalmente aceptado como límite (0,15) (Hu y col., 2009; Tong y col., 2009; Vandesompele y col., 2002) al agregar los dos genes menos estables (Figura 1.3E). En conjunto, los dos últimos análisis indicaron que sólo son necesarios los dos genes más estables para una normalización confiable.

La aplicación Normfinder, también desarrollada en Visual Basic para Microsoft Excel, analiza la estabilidad de la expresión de los genes empleando un modelo matemático que se centra en la variación entre y dentro de los grupos (Andersen y col., 2004). De esta manera, esta herramienta colocó a UBI como el gen más estable con un índice de estabilidad de 0,1754, seguido por 18S, ACT y RPS18 (Figura 1.3B). Esto concuerda con los resultados de geNorm, que situó a UBI como el segundo gen más estable luego de ACT. Sin embargo, Normfinder identificó a GAPDH (tercer gen más estable según geNorm) como el gen más inestablemente expresado. Esta diferencia probablemente refleja los diferentes procesamientos estadísticos y supuestos propios de cada herramienta, y sugiere que es altamente recomendable realizar más de un análisis estadístico de la estabilidad de expresión de los posibles genes de referencia.

Finalmente, Bestkeeper es una herramienta de Excel que estudia la variabilidad de expresión de los genes calculando el desvío estándar (SD) y el coeficiente de varianza (CV) de los valores de Ct para cada gen, y luego realiza comparaciones pareadas para estudiar la correlación que existe entre los genes y con el índice Bestkeeper calculado en base a todos los datos en conjunto (Pfaffl y col., 2004). Nuevamente, UBI fue considerado el gen menos variable presentando un $SD=0,31$, seguido por 18S con $SD=0,39$. Los genes más variables fueron TUB, EF1A y GAPDH (Figura 1.3C). Consistentemente, la comparación pareada entre los genes y el índice Bestkeeper mostró que UBI y 18S presentan mejor correlación, con $R>0,89$ y $p=0,003$ (Figura 1.3C). De todas maneras, es importante notar que, según Bestkeeper, ninguno de los genes estudiados puede ser considerado inconsistente ya que todos presentan valores de SD menores a 1 (Pfaffl y col., 2004).

Los métodos Normfinder y Bestkeeper arrojaron resultados comparables, seleccionando a UBI y 18S como los dos genes más establemente expresados y a GAPDH como el menos estable (Figura 1.3B y 1.3C), mientras que el ranking generado por geNorm fue distinto al posicionar a GAPDH como el tercer gen más estable (Figura 1.3A). Si excluimos este punto conflictivo del análisis, se puede observar que las tres herramientas concordaron en separar claramente a los 7 genes candidatos en dos grupos definidos de acuerdo a su estabilidad de expresión: un grupo de alta estabilidad que incluye a UBI, ACTY, 18S y RPS18, y un segundo grupo de genes de expresión inestable compuesto por EF1A y TUB (Figura 1.3A, 1.3B y 1.3C). En resumen, los tres métodos coinciden en indicar que UBI

es un gen confiable y apropiado para utilizar como referencia al cuantificar los niveles de ARN en delfácidos infectados con MRCV por RT-qPCR. Además sugieren que, si es necesario el empleo de más de un gen para la normalización, 18S y ACT son los más convenientes como segunda elección.

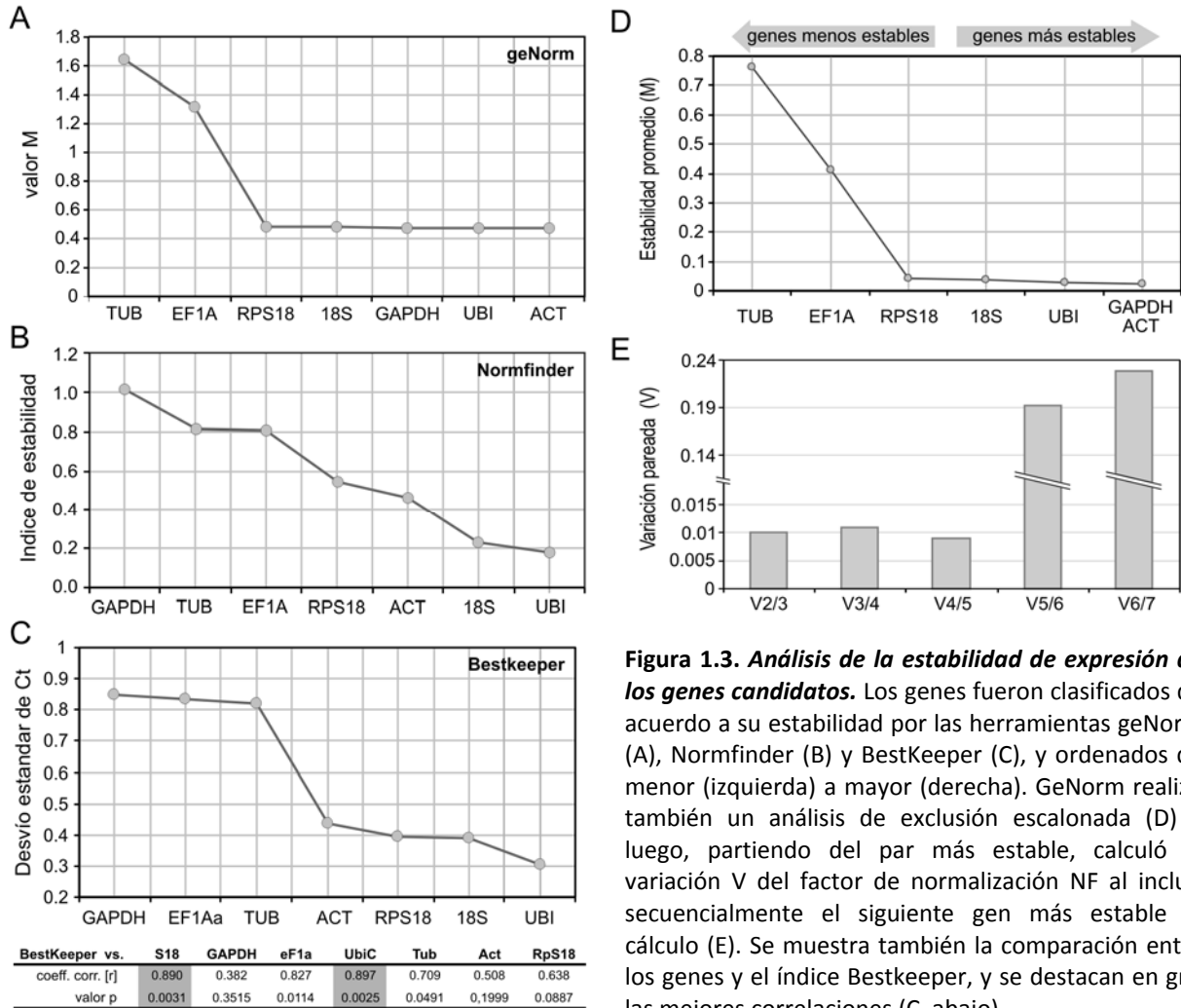


Figura 1.3. Análisis de la estabilidad de expresión de los genes candidatos. Los genes fueron clasificados de acuerdo a su estabilidad por las herramientas geNorm (A), Normfinder (B) y BestKeeper (C), y ordenados de menor (izquierda) a mayor (derecha). GeNorm realizó también un análisis de exclusión escalonada (D) y luego, partiendo del par más estable, calculó la variación V del factor de normalización NF al incluir secuencialmente el siguiente gen más estable al cálculo (E). Se muestra también la comparación entre los genes y el índice Bestkeeper, y se destacan en gris las mejores correlaciones (C, abajo).

4.3.2. Determinación del perfil de expresión de los genes candidato estudiados

Posteriormente, se compararon los conjuntos de valores Ct obtenidos para cada uno de los diferentes genes. Estos valores se distribuyeron en un rango de Ct de 15 a 34 (Figura 1.4A), en donde el menor Ct (mayor expresión) corresponde al gen 18S y el mayor valor pertenece a GAPDH. El bajo Ct del ARN ribosomal 18S es esperado por su gran abundancia en las células. El hecho de que ACT mostrara el segundo Ct más bajo es también esperado, ya que normalmente se detectan altos niveles de ARNm de este gen (Noda y col., 2008).

Es importante notar que los genes detectados como más estables (UBI, 18S, ACT y RPS18) cubrieron un amplio rango de Cts (15-28), lo cual es conveniente dado que es preferible el uso de controles internos con un Ct cercano al del gen en estudio (Horner, 2003).

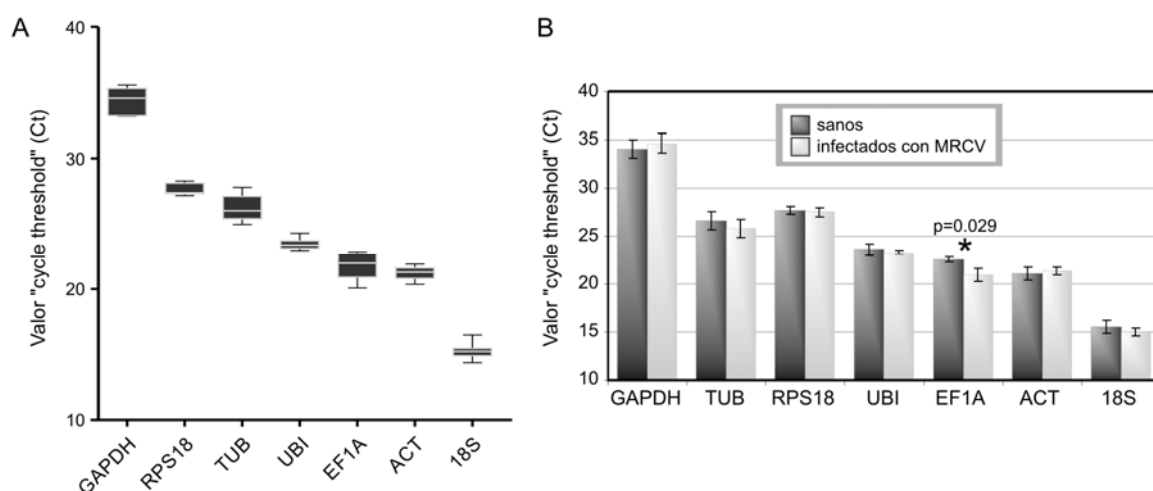


Figura 1.4. Análisis de los niveles de expresión de los genes candidatos. **A.** Abundancia de la expresión de los genes en estudio expresada como valores de “cycle threshold” (Ct) y representada en un diagrama de caja y bigotes. Los bigotes representan los valores máximos y mínimos. Los genes están ordenados de menor (mayor Ct, izquierda) a mayor abundancia (menor Ct, derecha). **B.** Comparación de los niveles de expresión de los genes candidatos en delfácidos sanos versus infectados con MRCV. La significancia de las diferencias entre tratamientos fue evaluada estadísticamente usando el test T de Mann-Whitney.

Finalmente, debido a que se ha observado que la expresión de genes considerados de mantenimiento se ve en algunos casos alterada con una infección viral (Brault y col., 2010; Zhang y col., 2010), se analizó si la infección por MRCV altera la expresión de alguno de los 7 genes candidatos de mantenimiento estudiados. Los valores Ct promedio de cada gen fueron comparados entre insectos sanos e infectados con MRCV. Se detectó que el valor Ct de EF1A es significativamente menor ($p < 0,05$) en delfácidos infectados (Figura 1.4B), lo que indica que la infección provocó un aumento en la expresión de dicho gen. Esto podría explicar la inestabilidad que mostró este gen en los análisis previos (Figura 1.3) y concuerda con un trabajo reciente que reportó que la expresión de EF1A se ve aumentada 97,8 veces en delfácidos *Laodelphax striatellus* infectados con *Rice stunt virus* (RSV) (Zhang y col., 2010). Sería interesante extender este estudio de expresión a un mayor número de genes de *D. kuscheli*, incluyendo genes involucrados en los mecanismos antivirales de la respuesta innata y del ARN de interferencia. Este conocimiento seguramente contribuirá al entendimiento del mecanismo que subyace durante la persistencia de MRCV en el insecto vector sin causar una reducción en el “fitness” del individuo (Arneodo y col., 2002a).

CAPÍTULO II

2. Objetivos

Objetivo General

Determinación del rol que cumplen las proteínas de MRCV durante la infección del delfácido vector.

Objetivos Particulares

- a)** Análisis de la localización subcelular de las proteínas de MRCV en células de insecto por inmunofluorescencia.
- b)** Desarrollo de un sistema versátil que permita el estudio de la localización subcelular de proteínas de interés en células vivas de insecto.
- c)** Análisis de la localización subcelular de las proteínas de MRCV fusionadas a proteínas fluorescentes en células vivas de insecto.
- d)** Análisis de la colocalización subcelular entre las proteínas de MRCV.
- e)** Análisis del mecanismo de expresión de P5-2.

3. Métodos

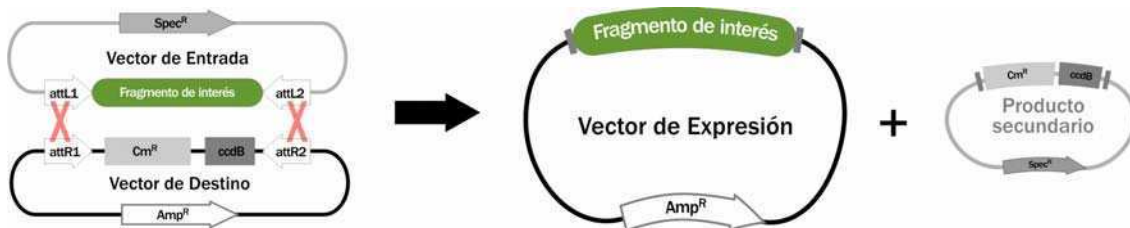
3.1. Técnicas clásicas de biología molecular

Las técnicas de extracción de ADN plasmídico, digestión con enzimas de restricción, llenado de extremos protruyentes, defosforilación y ligación de ADN, obtención de células *E. coli* químicamente competentes o electrocompetentes y su transformación, electroforesis de ADN en geles de agarosa y de PCR se realizaron según protocolos clásicos (Ausubel, 1999; Sambrook y Russell, 2001). Todas las enzimas de restricción y modificantes fueron obtenidas de New England Biolabs a menos que se indique lo contrario, y se utilizaron según las especificaciones del fabricante. Los reactivos y enzimas para PCR fueron obtenidos en Invitrogen. La purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen, Alemania) y las purificaciones de ADN plasmídico de alta calidad para secuenciación se realizaron con columnas del kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania).

Para el clonado de vectores por métodos tradicionales se emplearon las cepas de *E. coli* DH5 α químicamente competentes o XLI blue electrocompetentes, según el caso. Todos los cultivos bacterianos fueron realizados en medio "lysogeny broth" (LB) líquido (Bertani, 1951) adicionado con el antibiótico de selección adecuado (ampicilina 100 mg/lt, cloramfenicol 25 mg/lt, kanamicina 50 mg/lt ó spectinomicina 100 mg/lt). El medio LB sólido se preparó agregando agar (1,5 g/100 ml).

3.2. Sistema de clonado Gateway

El sistema de clonado mediante la tecnología Gateway (Invitrogen, E.E.U.U.) se basa en la recombinación sitio específica LR del bacteriófago lambda (λ) según el esquema:



En este sistema, attL y attR son sitios de recombinación, Cm^R es un gen de resistencia a cloranfenicol, ccdB es el gen de la proteína CcdB que inhibe el crecimiento de *E. coli* por interferencia con la ADN girasa, Amp^R es un gen de resistencia a ampicilina y Spec^R es un gen de resistencia a spectinomicina (estas últimas dos resistencias varían dependiendo del par de vectores de Entrada/Destino que se usen). Mediante este procedimiento, cualquier segmento de ADN clonado en un vector de **entrada** puede ser transferido de forma rápida y sencilla a uno o más vectores de **destino** mediante recombinación homóloga entre los sitios attL y attR por acción de las enzimas integrasa (Int), factor de Integración del hospedante (IHF) y escisionasa (Xis). Luego de la reacción, se transforman células de *E. coli* DH5 α (o equivalentes) y se seleccionan las bacterias resistentes al antibiótico cuyo gen de resistencia se encuentra en

el vector de destino (Ampicilina en este caso). De esta manera, se obtienen clones que llevan el vector de **expresión** con el fragmento de interés integrado de manera precisa en el esqueleto del vector de destino (las bacterias transformadas con el vector de destino original no crecen debido a la presencia del gen *ccdB*, las transformadas con el vector de entrada no crecen debido a la falta de resistencia al antibiótico empleado y las transformadas con el producto residual de la recombinación no crecen por los dos motivos anteriores). Dado que el proceso de recombinación es sumamente preciso, es posible utilizar este sistema para construir fusiones de proteínas siempre que se tenga en cuenta el marco de lectura resultante luego de la recombinación.

Para emplear este sistema de clonado, los vectores de destino fueron propagados en bacterias *E. coli* de la cepa DB3.1, las cuales son resistentes a los efectos de la proteína CcdB, y los vectores de entrada fueron construidos amplificando el fragmento de interés por PCR y clonándolo entre los sitios attL1 y attL2 del vector pCR8/TOPO/GW (Invitrogen, E.E.U.U.) que lleva el gen de resistencia a spectinomicina.

Antes de realizar las reacciones, se simuló las recombinaciones *in silico* con el software Vector NTI 9 Advance (Invitrogen, E.E.U.U.) para comprobar que los productos a obtener y sus marcos de lectura resultantes fueran los deseados. A continuación, se llevaron a cabo las reacciones de recombinación mezclando 5-10 ng del vector de destino, 20-50 ng del vector de entrada de interés, 1 µl del reactivo LR Clonase II (Invitrogen, E.E.U.U.) y completando con buffer TE (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5) hasta un volumen final de 7 µl. Luego de incubar a 25 °C por 5-12 horas, se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5α con 2 µl de la reacción de recombinación. Los clones de interés fueron seleccionados con ampicilina debido a que todos los vectores de destino utilizados en este trabajo contienen el gen de resistencia a ese antibiótico.

3.3. Construcción de los vectores utilizados

3.3.1. Vectores de expresión en insectos de las proteínas de MRCV

Para obtener los vectores de expresión de las proteínas de MRCV en células Sf9, se recombinaron mediante el sistema Gateway los ORFs que codifican para las proteínas P3, P4, P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P8, P9-1, P9-2 y P10 (sin su codón de terminación), contenidos en una colección de vectores de entrada (Mongelli, 2010), en el vector de destino pIB-V5/His-DEST (Invitrogen, E.E.U.U.). De esta manera se obtuvieron 11 vectores de expresión de dichas proteínas de MRCV fusionadas al epítipo V5/His por el extremo carboxilo terminal bajo el control del promotor OpIE2 de actividad constitutiva en diferentes células de insecto (Lee y col., 2008; Pfeifer y col., 1997). La construcción del vector de expresión conteniendo al segmento S5 bicistrónico se realizó insertando un fragmento con el segundo ORF sin codón de terminación, obtenido por digestión del vector pIB-P5-2 con *NsiI* y *XbaI*, en el vector pIB-P5-1 digerido con las mismas enzimas.

3.3.2. Vectores de destino para obtener fusiones fluorescentes

Las secuencias codificantes de eGFP, eYFP, eCFP fueron amplificadas de los vectores pEGFP, pEYFP and pECFP (Clontech, E.E.U.U.), respectivamente, usando los oligonucleótidos GFPH-F (5'- AAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3') y GFPH-s/stop-R (5'- AAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG-3') para excluir el codón de terminación y agregar sitios de restricción *HindIII* en los bordes del amplicón, o con los oligonucleótidos GFPX-s/atg-F (5'- TCTAGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3') y GFPX-R (5'- TCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3') para excluir el codón ATG de iniciación y agregar sitios de restricción *XbaI* a ambos lados del amplicón. De manera similar, el ORF que codifica para la proteína roja fluorescente mCherry fue amplificado del vector pRBCherry (Baltanás y col., resultados no publicados) usando el par de iniciadores mCherryH-F (5'- AAGCTTATGGTTAGTAAAGGAGAAG-3') y mCherryH-s/stop-R (5'- AAGCTTTCTAGATCCGGTGGATCCCC-3') para obtener una secuencia bordeada por sitios *HindIII* y sin codón de terminación, y con el par mCherryX-s/atg-F (5'- TCTAGAGTTAGTAAAGGAGAAG-3') y mCherryX-R (5'-TCTAGATTACCTGGATCCGGTGGATCCCC-3') para excluir el codón ATG de iniciación y agregar sitios *XbaI* en ambos extremos.

Todas las secuencias amplificadas fueron clonadas en el vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, E.E.U.U.) y los vectores resultantes fueron denominados pTg-eGFPH, pTg-eYFP, pTg-eCFP y pTg-mCherryH para las secuencias con sitios *HindIII*, y pTg-eGFPX, pTg-eYFPX, pTg-eCFPX y pTg-mCherryX para las secuencias conteniendo sitios *XbaI*. Luego, los primeros cuatro vectores fueron digeridos con *HindIII* y los cuatro últimos con *XbaI*, y los insertos obtenidos fueron subclonados en el vector pIB-V5/His-DEST (Invitrogen, E.E.U.U.) tratado con *HindIII* o con *XbaI*, respectivamente. Los vectores de destino Gateway resultantes, denominados pIB-GW, pIB-YW, pIB-CW, pIB-RW, pIB-WG, pIB-WY, pIB-WC y pIB-WR, fueron secuenciados automáticamente en el Servicio de Secuenciación y Genotipificación del CICV (INTA-Castelar) para corroborar el correcto ensamblaje de los marcos de lectura.

3.3.3. Vectores de expresión de marcadores fluorescentes de referencia

Para la construcción de algunos de los marcadores fluorescentes de organelas, las secuencias codificantes (sin el codón de terminación) de los genes LMNA (NM_005572), KDELR1 (NM_006801), TGOLN2 (NM_006464), Tor1aip1 (NM_145092), Pxmp2 (NM_031587), y PLA2G15 (NM_012320) contenidas en vectores de entrada (Simpson y col., 2000) fueron recombinadas en algunos de los vectores de destino diseñados para fusiones carboxi terminales (pIB-WC, pIB-WG, pIB-WY y pIB-WR).

Para la construcción del resto de los marcadores fluorescentes, las secuencias de los genes de la actina y la α -1-tubulina (sin el codón ATG de iniciación), y del receptor de la hormona diurética (sin el codón de terminación), de *Spodoptera frugiperda* fueron amplificadas por RT-PCR de ADNc sintetizado con la enzima Superscript III (Invitrogen, E.E.U.U.) a partir de ARN total de células Sf9 extraído con el kit RNAqueous (Ambion, E.E.U.U.). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos Sf.Act-s/atg-F (5'-TGCGACGACGATGTTGCTG-3') y Sf.Act-R (5'-TTAGAAGCACTTGC GG TGG-3') en el caso de la actina, Sf.Tub-s/atg-F (5'-CGTGAGTGCATCTCAGTAC-3') y Sf.Tub-R (5'-TTAGTATTCCTCTGCTCC-3') en el caso de la α -

tubulina, y Sf.Dhr-s/atg-F (5'-TGCGACGACGATGTTGCTG-3') y Sf.Dhr-R (5'-TTAGAAGCACTTGCGGTGG-3') para el receptor de la hormona diurética, diseñados en base a secuencias de *Spodoptera exigua* (en el caso de actina y α -tubulina) y *Spodoptera frugiperda* (en el caso del receptor de la hormona diurética) depositadas en el GenBank (actina: AY507963; α -tubulina: EU100017; receptor de la hormona diurética: FJ374694). Para la construcción del marcador de retículo endoplasmático, se amplificó un gen sintético rojo fluorescente dirigido al retículo endoplasmático a partir del vector pBin-ER-rb (Nelson y col., 2007) usando los iniciadores ER-mCherry-FW (5'-ATGAAGGTACAGGAGGGTTTG-3') y ER-mCherry-RV (5'-TTACAGCTCGTCTTTAGATCTC-3'). Los cuatro genes amplificados fueron clonados en el vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, E.E.U.U.) y secuenciados automáticamente en el Servicio de Secuenciación y Genotipificación del CICV (INTA-Castelar), y los vectores de entrada resultantes fueron empleados para recombinar con vectores de destino adecuados para fusiones fluorescentes amino terminales (para el caso de la actina y α -1-tubulina), carboxi terminales (para el receptor de la hormona diurética) o con el vector pIB/V5-His-DEST (Invitrogen) para el marcador de retículo endoplasmático.

3.3.4. Vectores de expresión de proteínas de MRCV fusionadas a proteínas fluorescentes.

La construcción de las fusiones fluorescentes con las proteínas de MRCV se realizó utilizando la colección de vectores de entrada conteniendo las secuencias codificantes de las proteínas P3, P4, P5-1, P5-2, P6, P7-1, p7-2, P8, P9-1, P9-2 y P10 sin su codón de iniciación o sin su codón de terminación (Mongelli, 2010), para recombinar con algunos de los vectores de destino construidos (ver sección 3.3.2) y obtener fusiones por el extremo amino terminal o carboxilo terminal, respectivamente. Por ejemplo, el vector de entrada de P9-1 sin el codón de iniciación se utilizó para obtener las cuatro posibles fusiones fluorescentes por el extremo amino terminal recombinando con los vectores pIB-GW, pIB-YW, pIB-CW y pIB-RW, y el vector de entrada de P9-1 sin el codón de terminación se utilizó para construir las cuatro posibles fusiones carboxilo terminales recombinando con los vectores pIB-WG, pIB-WY, pIB-WC y pIB-WR.

3.3.5. Vectores de expresión en bacterias

Para la expresión de proteínas en *E. coli* se utilizó el vector pRSET (Invitrogen, E.E.U.U.) que permite la expresión, por medio del promotor T7 inducible indirectamente por IPTG, de proteínas fusionadas al péptido 6xHis/Xpress por el extremo amino terminal. Dicho péptido contiene una región de seis histidinas que facilita la purificación de la proteína recombinantes por cromatografía de afinidad a agarosa Ni-NTA, seguida por el epítopo Xpress (Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Leu).

Para la obtención del vector pRSET-5.1, la secuencia codificante para P5-1 sin el codón ATG de iniciación se escindió del vector pTopo-S5.1-S/ATG-AS (Mongelli, 2010) con la enzima *EcoRI* y se subclonó en el vector pRSETb cortado previamente la misma enzima de restricción. El vector pRSET-5.2 se construyó con la secuencia codificante para P5-2 sin el codón ATG de iniciación obtenida del vector pTopo-S5.2-S/ATG (Mongelli, 2010) por digestión con la enzima

EcoRI y subclonada en el vector pRSETc tratado con la misma enzima. El correcto ensablaje de los vectores se corroboró por secuenciación automática en el Servicio de Secuenciación y Genotipificación del CICV (INTA-Castelar).

3.4. Cultivo y transfección de células Sf9

Se sembraron células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (IPLBSF21-AE aislamiento clonal 9) en placas de 6 pocillos o en placas de cultivo de 35 mm con fondo de vidrio (MatTek Corporation, E.E.U.U.) usando medio Sf900 II SFM (Invitrogen, E.E.U.U.) suplementado con suero fetal bovino al 2% (GIBCO, E.E.U.U.) e incubadas a 27 °C hasta una confluencia del 60-70%. Las células fueron entonces transfectadas con 1 µg de plásmido purificado con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania) usando el reactivo de transfección Cellfectina (Invitrogen, E.E.U.U.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez transfectadas, las células fueron incubadas a 27 °C hasta su utilización.

3.5. Localización subcelular por inmunofluorescencia

Para los experimentos de inmunofluorescencia, las células fueron sembradas y transfectadas en placas de 6 pocillos conteniendo cubreobjetos estériles previamente tratados con HCl 1M para mejorar la adherencia de las células. Luego de 72 horas de transfectadas, las células adheridas al cubreobjeto fueron lavadas con buffer PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, pH 6,2), fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS por 15 minutos, lavadas dos veces con PBS-T (PBS suplementado con Tween al 0,05%) y permeabilizadas con Triton X-100 al 0,2% en PBS por 30 minutos. Las células permeabilizadas fueron lavadas dos veces con PBS-T e incubadas con "Roche Blocking Reagent" (Roche, Francia) al 1% en PBS durante 1 hora. Luego, se retiró el medio y se incubó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-V5 conjugado al fluoróforo FITC (Invitrogen, E.E.U.U.) diluido 1/500 en solución de bloqueo. Al cabo de 90 minutos, se lavó dos veces con PBS-T y se tiñeron los núcleos con 1 µg/ml de yoduro de propidio durante 1 minuto. Finalmente, las células fueron lavadas primero con PBS-T y luego con agua bidestilada, montadas en medio ProLong Gold antifade (Invitrogen, E.E.U.U.) y curadas a 4 °C en oscuridad por 24 horas hasta su visualización en un microscopio de fluorescencia confocal Nikon EZ-C1 (Nikon, Japón).

3.6. Localización subcelular en células vivas

Para los experimentos de localización subcelular en células Sf9 vivas, las mismas fueron sembradas y transfectadas en placas de cultivo de 35 mm de diámetro con fondo de vidrio (MatTek Corporation, E.E.U.U.). A las 72 horas postransfección, el medio de cultivo fue remplazado por PBS (pH 6,2) y las células fueron observadas en un microscopio confocal láser espectral Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems GmbH, Alemania) con un objetivo de inmersión en agua 63X (HCX PL APO CS 63.0x1.20 WATER UV). Se utilizaron las líneas de 458 nm, 488 nm y 514 nm del láser del Argón para excitar a CFP, GFP y YFP, respectivamente, y la línea de 543 nm del láser de HeNe para excitar a mCherry. El escaneo se realizó en modo secuencial para minimizar el solapamiento de espectros de emisión, y la fluorescencia fue detectada con los

siguientes parámetros de PMT: 465-505 nm para CFP, 498-540 nm para GFP, 525-600 nm para YFP y 610-670 nm para mCherry. El poder de los láseres, la ganancia de los detectores, la velocidad de escaneo y el aumento fueron ajustados individualmente en cada adquisición para optimizar el contraste y la resolución de las imágenes.

La cuantificación de la colocalización se realizó con el módulo de colocalización del software Leica LAS AF, el cual crea un gráfico de dispersión con la distribución de la intensidad y grado de colocalización de ambos fluoróforos.

3.7. Expresión y purificación de proteínas en bacterias

Los vectores pRSET-P5-1 y pRSET-P5-2 fueron introducidos en la cepa de *E. coli* BL21 pLys y luego se realizaron ensayos de expresión de las proteínas. Se partió de cultivos líquidos saturados, se realizó una dilución 1/100 que se dejó crecer a 37°C hasta una DO_{600} de 0,6. A continuación se agregaron diferentes concentraciones de IPTG para inducir la expresión y se incubó a la temperatura y tiempo indicados para cada caso. Se mantuvo un cultivo paralelo sin tratar con IPTG como control de la inducción. Posteriormente, los cultivos fueron fraccionados y centrifugados durante 10 minutos a 5000 rpm, y los pellets resultantes fueron empleados para evaluar diferentes métodos de extracción y solubilización de las proteínas recombinantes.

Para la extracción de proteínas solubles y nativas, se resuspendió el pellet en 1/10 volúmenes (con respecto al volumen de cultivo centrifugado) de buffer TE (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8) y se agregó Tritón X-100 y lisozima a una concentración final de 0,01 / y 100 µg/ml, respectivamente. Se incubó a 30°C por 15 minutos, se sonicó en tres intervalos de 20 segundos usando un sonicador Branson Sonifier 250 (Branson Instruments Co., E.E.U.U.) y se centrifugó por 15 minutos a 12000 g y 4 °C. El sobrenadante fue recuperado, mezclado con ¼ volúmenes de buffer de carga de proteínas 4X (TRIS-HCl pH 6,8 200 mM, SDS 8 / , glicerol 50 / , azul de bromo fenol 0,4 / , 2-mercaptoetanol 4 /), hervido por 2 minutos y guardado hasta su utilización.

Para la extracción en condiciones desnaturalizantes, se resuspendió el pellet en 1/10 volúmenes (con respecto al volumen de cultivo centrifugado) de buffer GA-UREA (TRIS-HCl 70 mM pH 8,2; NaCl 100 mM; Urea 8M). Se sonicó en tres intervalos de 20 segundos usando un sonicador Branson Sonifier 250 (Branson Instruments Co., E.E.U.U.) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 12000 g y 4 °C, se recuperó el sobrenadante, se agregó ¼ volúmenes de buffer de carga 4X, se hirvió por 2 minutos y se guardó hasta su utilización.

Para visualizar la presencia de las proteínas recombinantes, las fracciones previamente obtenidas se sembraron en un gel de poliacrilamida (acrilamida 10 /) y separaron por SDS-PAGE. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie (azul de Coomassie 0,5 / , ácido acético 10 / y etanol 30 /) o transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond N (Ge Healthcare, Reino Unido) para detectar las proteínas recombinantes por "Western blot" usando un anticuerpo primario anti-Xpress (Invitrogen, E.E.U.U.) y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina. Para el revelado se equilibró la membrana en buffer fosfatasa (TRIS-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5

mM) y luego se incubó con los sustratos BCIP y NBT (Promega, E.E.U.U.) en buffer fosfatasa a una concentración final de 0,56 mM y 0,45 mM, respectivamente.

Finalmente, las fracciones conteniendo las proteínas recombinantes solubilizadas fueron utilizadas para realizar ensayos de purificación por cromatografía de afinidad con agarosa Ni-NTA (QIAGEN, Alemania) según las especificaciones del fabricante.

Para la expresión y purificación de P5-1 y P5-2 en gran escala, se partió de un volumen de cultivo de 100 ml y se siguió el protocolo de expresión y purificación que dio mejores resultados para cada proteína en particular.

3.8. Inmunización y obtención de un antisuero anti-P5-2

Para preparar el material de inmunización de conejos para el desarrollo del antisuero policlonal contra P5-2, las fracciones conteniendo la proteína purificada fueron separadas por SDS-PAGE y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond N (Ge Healthcare, Reino Unido). Las membranas fueron teñidas con solución rojo Ponceau (rojo Ponceau 0,1 / p/v, ácido acético 5 / v/v) y guardadas. Finalmente, las zonas de las membranas conteniendo la proteína recombinante fueron recortadas y enviadas a la empresa Pan American Vet labs (<http://www.pavlab.com>) donde se utilizaron para la inmunización de 2 conejos, empleando 100 ng de proteína pura en una inyección inicial y en cada uno de los cuatro “boosters” posteriores (500 ng totales). Los sueros obtenidos de los conejos inmunizados fue alicuotados y guardado a -20 °C.

4. Resultados y discusión

Como se mencionó, el análisis del genoma de MRCV revela la presencia de 13 ORFs. A través de estudios bioinformáticos y experimentales de las proteínas estructurales de MRCV se propuso que P1 es la polimerasa viral, P3 es la proteína mayoritaria del núcleo viral, P4 es la espícula B y una potencial guanilil transferasa, P8 posee un motivo de unión a nucleótidos y podría tener actividad helicasa, y P10 es la proteína mayoritaria de la cápside externa (Distéfano, 2004; Distéfano y col., 2002; Distéfano y col., 2003; Distéfano y col., 2005; Distéfano y col., 2009; Guzmán y col., 2007; Nibert y Kim, 2004; Supyani y col., 2007). Por otro lado, las proteínas no estructurales no presentan homología de secuencia apreciable con ninguna proteína de función conocida fuera del género *Fijivirus*. Al momento de iniciar los experimentos presentados en este apartado existían estudios demostrando que las proteínas P9-1 de MRCV y de RBSDV se localizan en viroplasmos durante la infección de plantas e insectos hospedantes (Guzmán, 2005; Isogai y col., 1998a) y que P7-1 de RBSDV se localiza en arreglos tubulares citoplasmáticos identificados por inmunomicroscopía electrónica sobre cortes de células infectadas de arroz y del insecto vector *Laodelphax striatellus* (Isogai y col., 1998a).

Es importante considerar que los eventos que conducen al desarrollo de una enfermedad no ocurren como procesos aislados sino que se establecen interacciones complejas a nivel molecular entre las proteínas y el ARN del patógeno y del hospedante. Estos eventos están además finamente regulados y generalmente ocurren en sitios subcelulares específicos, en asociación con estructuras celulares particulares. En este sentido, el estudio de la distribución subcelular dentro de las células suele ser una forma rápida y efectiva para deducir características funcionales de las proteínas virales (Broering y col., 2004; Gonzalez y col., 1998; Gonzalez y col., 2000; Mena y col., 2006; Wei y col., 2006a; Wei y col., 2006c). Por lo tanto, se decidió investigar la posible función de las proteínas de MRCV durante la replicación persistente y propagativa en el delfácido vector mediante la localización subcelular de las mismas, expresadas en células de insecto en cultivo. Actualmente no existen cultivos celulares de insectos pertenecientes a la familia *Delphacidae* (chicharritas), por lo que se decidió utilizar las células Sf9 de *Spodoptera frugiperda*, un insecto no hospedante perteneciente al orden *Lepidoptera*.

4.1. Estudio funcional de las proteínas de MRCV mediante su localización subcelular en células de insecto

4.1.1. Análisis de la localización subcelular de las proteínas de MRCV por inmunofluorescencia

Se partió de una colección de vectores pCR8/TOPO/GW conteniendo los ORFs que codifican para las proteínas P4, P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P8, P9-1, P9-2 y P10 sin su codón de terminación. Se excluyó del estudio a las proteínas P1 y P2 debido a la dificultad para clonar sus respectivos ORFs (Mongelli, 2010). Mediante la transferencia al vector pIB-V5/His-DEST por recombinación a través del sistema Gateway, se obtuvieron 11 vectores de expresión de las diferentes proteínas de MRCV fusionadas al epitope V5/His por el extremo carboxilo terminal, bajo el control del promotor OpIE2

de actividad constitutiva en diferentes células de insecto (Lee y col., 2008; Pfeifer y col., 1997). Estos vectores fueron purificados por columna de sílica y empleados para transfectar transitoriamente células Sf9. Se utilizó el vector pIB/V5-His-GW/lacZ, aquí denominado pIBg-LacZ, como control positivo de expresión y localización. Las células transfectadas fueron incubadas por 72 horas a 27 °C, luego de lo cual se realizaron inmunofluorescencias empleando un anticuerpo monoclonal anti-V5 conjugado a FITC. Se estudió la distribución subcelular de las proteínas de MRCV utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TS100 y un microscopio confocal Nikon C1 (Nikon, Japón).

Se determinó la localización subcelular de P6, P7-1 y P9-1 mientras que no se logró detectar expresión del resto de las proteínas. Es importante notar que el nivel de expresión de la proteína P9-1 fue excepcionalmente alto comparado con el de P6, el de P7-1 e incluso con el de la proteína control β -glucuronidasa.

La **proteína P6** (peso molecular estimado de 95,2 kDa para la fusión a V5/His) se observó distribuida en el citoplasma de las células transfectadas. Sin embargo, dicha distribución fue completamente irregular mostrando conexiones que atraviesan el núcleo (Figura 2.1B), a diferencia de las células control que expresan β -glucuronidasa homogéneamente en el citoplasma y poseen núcleos grandes, centrales y esféricos (Figura 2.1A). Teniendo en cuenta que se detectan algunas formas filamentosas en su distribución subcelular, que mediante análisis bioinformático se detecta un extenso motivo “coiled coil” entre los aminoácidos 550 y 690 aproximadamente y que al realizar un modelado por homología en el servidor Phyre 0.2 (Kelley y Sternberg, 2009) se predice una estructura tridimensional filamentososa, la proteína P6 podría estar involucrada en la formación de las fibrillas que se observan en el viroplasma durante la infección viral.

La **proteína P7-1** (peso molecular estimado de 46,8kDa para la fusión a V5/His) se observó distribuida homogéneamente tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células transfectadas (Figura 2.1C), lo que sugiere que esta proteína es capaz de ingresar y/o egresar (ya que la intensidad de fluorescencia es igual en ambos compartimentos) del núcleo celular. Si bien esta distribución podría deberse a un transporte activo, no fue posible detectar señales conocidas de importación y/o exportación nuclear por métodos bioinformáticos. Alternativamente, dado que se ha observado que el límite de exclusión molecular del poro nuclear es de aproximadamente 40 kDa (Davis, 1995), la proteína (en forma monomérica) podría ingresar y egresar del núcleo celular libremente. En cualquiera de los dos casos, la capacidad de ingresar al núcleo sugiere que P7-1 podría influir, directa o indirectamente, en la expresión génica de las células hospedantes durante la infección de MRCV. A pesar de que la proteína P7-1 de RBSDV fue inmunodetectada en estructuras tubulares citoplasmáticas, en nuestro caso no se la observó formando parte de estructuras de este tipo al expresar a MRCV P7-1 fusionada a V5/His en células de insecto. Es probable que, a diferencia de lo que se ha observado para RDV (Wei y col., 2006a), el establecimiento de dichas estructuras sea un proceso complejo que involucra más de una proteína viral y/o celular.

Al inmunodetectar la proteína recombinante P7-1/V5 por “Western blot” (Figura 2.1C) fue posible observar una banda tenue del tamaño esperado (flecha) y un banda intensa adicional de mayor peso molecular aparente (punto). Esto sugiere que la forma predominante de P7-1 posee alguna modificación postraducciona que altera la movilidad de la proteína en aproximadamente 3-4 kDa. Una alteración similar fue reportada al inmunodetectar la proteína P7-1 del RBSDV en extractos de

insecto vector infectado pero no en extractos de arroz infectado, sugiriendo que dicha modificación es llevada a cabo en el insecto exclusivamente (Isogai y col., 1998a). Es interesante notar que un aumento de peso molecular de estas características suele observarse en proteínas glicosiladas y que muchas proteínas nucleares y citoplasmáticas, incluyendo factores de transcripción, son blanco de glicosilaciones O-GlcNAc que influyen en la regulación de su actividad y transporte núcleo-citoplasmático (Ozcan y col., 2010). Teniendo en cuenta lo expuesto y que es posible predecir sitios de glicosilación O-GlcNAc mediante el servidor YinOYang 1.2 (Gupta y Brunak, 2002) en la secuencia de P7-1, será necesario confirmar si esta proteína es glicosilada mediante ensayos bioquímicos. Esta confirmación, junto con la determinación de si P7-1 es capaz de unir ADN de doble cadena, reforzaría el papel de esta proteína como regulador de la expresión génica, y abriría el camino a investigar qué efecto tiene su presencia en el transcriptoma de las células.

La **proteína P9-1** (peso molecular estimado de 44,3 kDa para la fusión a V5/His) fue capaz de formar numerosas y conspicuas estructuras esféricas en el citoplasma de las células transfectadas. El tamaño de estas inclusiones fue variable, llegando a medir hasta aproximadamente 2 μm de diámetro en algunos casos (Figura 2.1D). Esta característica se observa en proteínas de otros miembros de la familia *Reoviridae* que conforman el componente mayoritario de los viroplasmata (Broering y col., 2002; Fabbretti y col., 1999; Thomas y col., 1990; Wei y col., 2006c). Adicionalmente, se examinó la morfología de las inclusiones formadas por P9-1 por microscopía electrónica de transferencia realizando inmunomarcación con oro sobre cortes de las células transfectadas (Figura 2.1E), observándose que dichas estructuras eran similares a las descritas en células infectadas de insectos y plantas (Arneodo, 2003; Arneodo y col., 2002b). Estos resultados sugieren, por lo tanto, que P9-1 sería un componente importante del viroplasma, probablemente formando una matriz proteica de anclaje para el desarrollo de dichos complejos replicativos. Esto está de acuerdo con un trabajo reciente en el cual se propuso que la proteína P9-1 de RBSDV, la cual presenta 64,5% de identidad con P9-1 de MRCV (Guzmán y col., 2007), es la proteína mayoritaria de viroplasma y que es capaz de auto interactuar, formar dímeros y establecer inclusiones en el citoplasma de protoplastos de *Arabidopsis* al ser fusionada a GFP (Zhang y col., 2008a). Por otro lado, la inmunodetección de la proteína recombinante por “Western blot” se observó una banda intensa del peso molecular esperado y una banda más tenue de mayor peso molecular aparente (Figura 2.1D). Este resultado será discutido en mayor profundidad en la sección 4.4 del capítulo III.

No se logró detectar señal con el resto de las proteínas, probablemente debido a que sus niveles de expresión no fueron lo suficientemente altos para la sensibilidad de la técnica. La dificultad para expresar algunas proteínas de MRCV ya ha sido notada en otros sistemas como bacterias y plantas (Distéfano, 2004; Guzmán, 2005; Mongelli, 2010), y podría implicar una posible toxicidad celular de las proteínas o una pobre traducción de los ARNm recombinantes debido a la estructura secundaria del ARN u otro motivo. Por otro lado, el hecho de que P6, P7-1 y P9-1 hayan mostrado mayores niveles de expresión (lo cual reflejaría menor toxicidad, o mayor estabilidad o traducibilidad del ARNm) podría implicar que estas proteínas cumplen funciones determinantes en etapas tempranas de la replicación viral durante la infección del insecto vector con MRCV. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los ARN que actúan como mensajeros durante la infección viral contienen extremos 5' y 3' UTR (y regiones intergénicas) que no están presentes en las versiones recombinantes y que podrían contener elementos reguladores de la traducción, y que los ARNm recombinantes contienen

una cola de poliadeninas que no está presente en los mensajeros virales producidos durante la replicación. Dado que la cinética de expresión de las proteínas virales es un factor determinante en el éxito de la infección, estudiar los mecanismos responsables de esta regulación brindará información importante acerca de la estrategia replicativa de los *Fijivirus*.

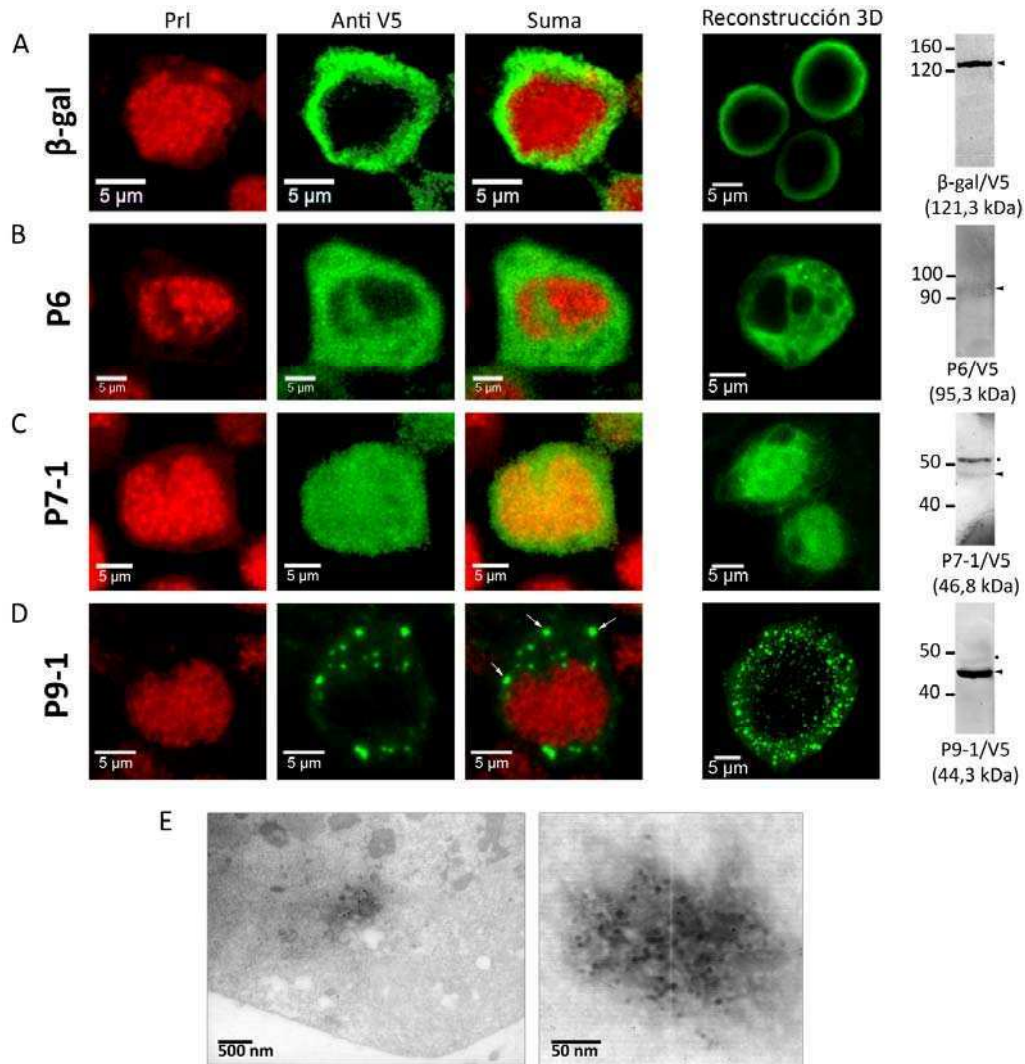


Figura 2.1. Localización subcelular de las proteínas de MRCV en células Sf9. Las proteínas β -galactosidasa (A, control), P6 (B), P7-1 (C) y P9-1 (D) fueron fusionadas al epítopo V5/His y expresadas en células Sf9 para luego analizar su localización subcelular mediante inmunofluorescencia directa con un anticuerpo anti-V5 conjugado a FITC. En cada caso se muestra de izquierda a derecha: la tinción del núcleo celular con yoduro de propidio (PrI), la localización de la proteína en estudio (Anti-V5), la superposición de las dos imágenes anteriores (suma), una convolución a partir de varias secciones de una célula expresando la proteína en estudio (reconstrucción 3D) y la inmunodetección por “Western blot” de la proteína en un extracto de células transfectadas utilizando un anticuerpo anti-V5. A la derecha de cada “Western blot” se indica con una flecha la posición de la proteína recombinante y con un punto las bandas de peso molecular mayor al esperado. En (E) se realizó una inmunomarcación con oro de P9-1/V5 en secciones de células Sf9 transfectadas y luego se observó al microscopio electrónico de transferencia.

Debido a la imposibilidad para estudiar la localización subcelular de la mayoría de las proteínas de MRCV mediante inmunofluorescencia, se optó por cambiar de estrategia y estudiar su localización subcelular *in vivo* expresándolas como fusión a proteínas fluorescentes.

4.1.2. Diseño y construcción de un juego de vectores para estudios de localización subcelular en células vivas de insecto

La localización de proteínas fluorescentes en células vivas presenta ciertas ventajas frente a otro tipo de técnicas. En primer lugar, no requiere de ninguna manipulación previa de las células a ser examinadas, por lo que se evita todo tipo de artefacto o problema causado por la fijación de las muestras. Además, permite detectar el tiempo postransfección en el cual se observa mayor nivel de expresión de la proteína estudiada sin la necesidad de destruir la muestra. Por otro lado, con este tipo de estudios se puede observar la velocidad de movimiento de las proteínas, lo cual muchas veces contribuye a definir en qué organela se localizan.

Por las razones expuestas, se decidió proseguir con el estudio de la localización subcelular de las proteínas de MRCV en células vivas mediante fusión a proteínas fluorescentes. Lamentablemente, no existían vectores disponibles para realizar este tipo de experimentos en células Sf9, por lo que se decidió construir una serie de vectores de destino (compatibles con la tecnología de clonado GATEWAY) para la expresión de fusiones fluorescentes en células Sf9. Partiendo del vector pIB-V5/His-DEST como esqueleto, se insertaron las secuencias codificantes de las proteínas GFP, YFP, CFP o mCherry, río arriba o río abajo del casete GATEWAY en el marco de lectura adecuado para obtener fusiones amino o carboxilo terminales a la proteína de interés luego de recombinar con el vector de entrada. Los cuatro vectores diseñados para fusiones amino terminales fueron llamados pIB-GW, pIB-CW, pIB-YW y pIB-RW, donde las letras G, C, Y y R corresponden a GFP, CFP, YFP y mCherry, respectivamente y la letra W indica la posición del módulo GATEWAY (en donde quedará situada finalmente la proteína de interés luego de recombinar) con respecto a la proteína fluorescente. Siguiendo el mismo criterio, los vectores diseñados para realizar fusiones carboxilo terminales fueron nombrados pIB-WG, pIB-WY, pIB-WC y pIB-WR. En la Figura 2.2 se muestra un esquema de los 8 vectores resultantes, cuyo correcto ensamblaje fue confirmado mediante secuenciación automática.

A continuación se corroboró la correcta funcionalidad de los 8 vectores de destino empleando a la proteína MRCV P9-1. Se seleccionó esta proteína debido a que mostró buenos niveles de expresión en los ensayos previos de inmunofluorescencia. Se obtuvieron mediante recombinación las 8 combinaciones fluorescentes de P9-1, que se expresaron en células Sf9 para luego analizar su localización subcelular por microscopía confocal de fluorescencia. Adicionalmente se coexpresaron fusiones fluorescentes a LMNA1 (ver más adelante) para evidenciar la posición del núcleo celular.

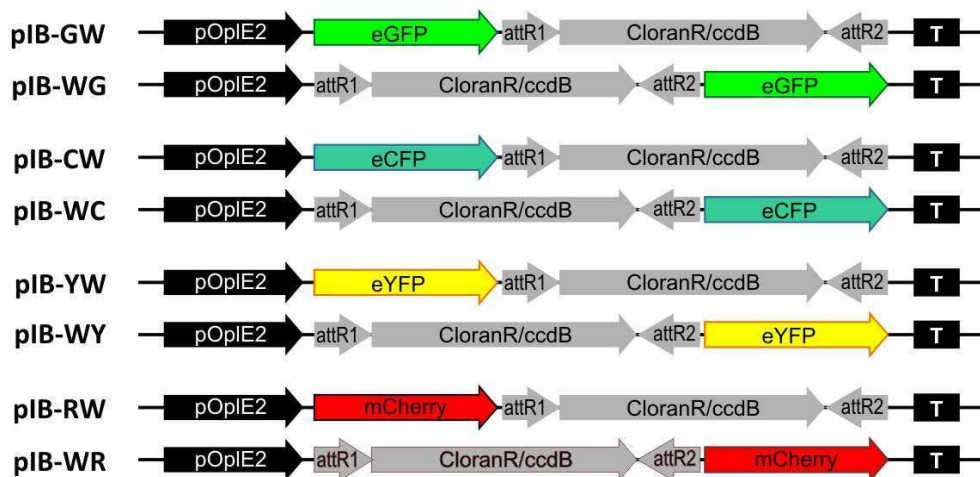


Figura 2.2. Esquema de los vectores de expresión de fusiones fluorescentes construidos. Los bloques negros representan al promotor temprano 2 del virus OpNPV (pOplE2) y al terminador conteniendo la señal de poliadenilación OpIE (T); los bloques grises corresponden a componentes del módulo de recombinación Gateway; en color se señala la posición del gen que codifica para la proteína fluorescente correspondiente a cada vector particular.

Como se muestra en la Figura 2.3, los vectores fueron capaces de expresar todas las variantes fluorescentes de P9-1, cuya distribución subcelular fue, a excepción de las fusiones a mCherry, similar a la observada previamente (Figura 2.1D). Esto será discutido en mayor profundidad más adelante en la sección 4.1.3. Ninguna de las dos fusiones a mCherry se acumularon en inclusiones conspicuas sino que mostraron baja expresión y una distribución citoplasmática irregular (Figura 2.3), comportamiento que podría deberse a la combinación de los altos niveles de acumulación de P9-1 (hecho observado en todas las demás construcciones) y la citotoxicidad que frecuentemente muestran tanto mCherry como otras variantes derivadas de DsRed (Strack y col., 2009). Sin embargo, dado que la fusión LMNA1:mCherry de localización nuclear también mostró altos niveles de expresión, el efecto citotóxico propuesto probablemente dependa de la compartimentalización de cada proteína en particular. Estos resultados evidencian la importancia de emplear más de una variante fluorescente para estudiar la localización subcelular de una proteína.

En resumen, los vectores construidos permiten la expresión de una proteína de interés fusionada a GFP, CFP, YFP o mCherry, ya sea por su extremo amino o carboxilo terminal, bajo el control del promotor fuerte y constitutivo OpIE2 que es funcional en diferentes tipos de células de insecto (Lee y col., 2008; Pfeifer y col., 1997).

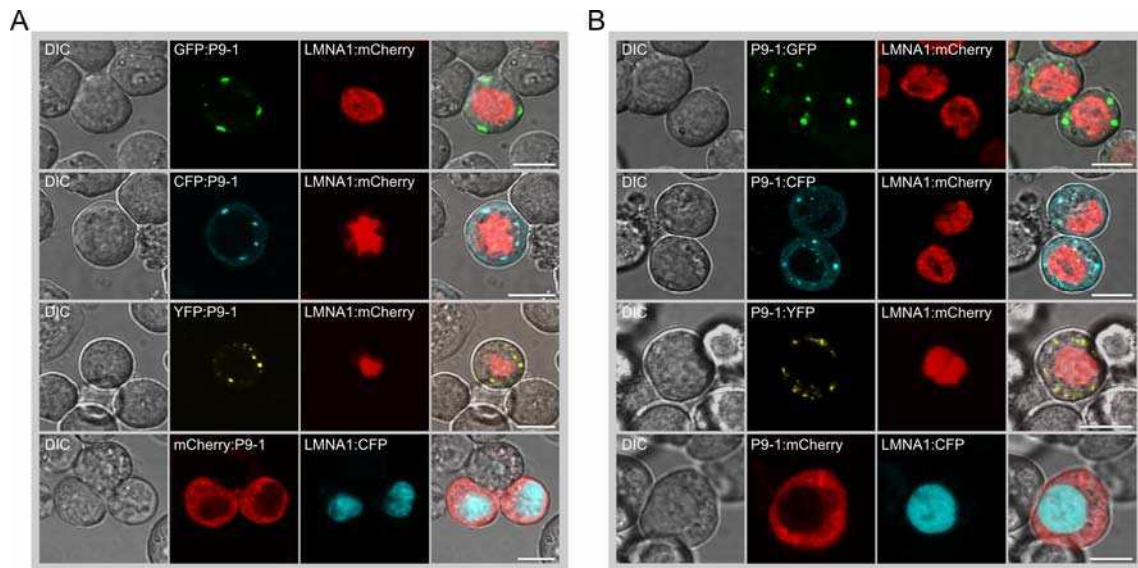


Figura 2.3. Análisis de la funcionalidad de los vectores construidos. Los vectores de destino pIB-GW, pIB-CW, pIB-YW y pIB-RW fueron empleados para obtener fusiones fluorescentes amino terminales de P9-1 (A), y los vectores pIB-WG, pIB-WY, pIB-WC y pIB-WR se utilizaron para construir fusiones fluorescentes carboxilo terminales de P9-1 (B). Las ocho fusiones resultantes fueron expresadas en células Sf9 y su distribución fue examinada por microscopía confocal. Se coexpresaron fusiones fluorescentes de la lámina nuclear (LMNA1) como marcadores de núcleo. Las imágenes fueron tomadas en modo de contraste DIC y fluorescencia, y luego superpuestas (última columna a la derecha). Las barras blancas corresponden a 10 μ m.

En muchas ocasiones, para determinar la localización subcelular de las proteínas en estudio de forma certera, es necesario contar con marcadores de los distintos compartimientos subcelulares que sirvan como referencia. El uso de tinturas de organelas fluorescentes es común en experimentos en los cuales las muestras están o serán fijadas por algún procedimiento químico, mientras que para experimentos con células vivas el uso de proteínas fluorescentes de localización conocida es un procedimiento más adecuado. Consecuentemente, es importante contar con una diversidad de marcadores fluorescentes dirigidos a las organelas y estructuras celulares más comunes, cuyos espectros de fluorescencia no se superpongan excesivamente con el de la proteína en estudio. Por ello, se decidió construir un juego de marcadores fluorescentes de referencia mediante la introducción de genes que codifican para proteínas de localización subcelular conocida en algunos de los vectores de destino obtenidos previamente. Se partió de 6 vectores de entrada gentilmente cedidos por el Dr. Stefan Wiemann (Simpson y col., 2000) que contienen marcos abiertos de lectura que codifican para proteínas de localización conocida, 3 vectores de entrada que contienen las secuencias codificantes de los genes de actina, α -1-tubulina y el receptor de hormona diurética de *Spodoptera frugiperda*, y un vector de entrada conteniendo un gen sintético que codifica para una proteína quimérica que consiste en el péptido señal del gen WAK2 de *Arabidopsis thaliana*, la proteína fluorescente mCherry y una señal KDEL de retención en el RE. Los ORFs de los genes de actina, α -1-tubulina y receptor de hormona diurética fueron amplificados a partir de ADNc de *S. frugiperda* y clonados en el vector de entrada, y finalmente secuenciados para confirmar su identidad. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos Genbank. Todos los marcadores construidos y su localización subcelular se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Proteínas celulares de distribución conocida empleadas en la construcción de marcadores fluorescentes de referencia para experimentos de localización subcelular.

Símbolo	Nombre del gen	Origen	Localización	Acceso
LMNA	Lámina A/C	<i>Homo sapiens</i>	Núcleo	NM_005572
TGOLN2	Proteína de la red trans Golgi 2	<i>Homo sapiens</i>	Aparato de Golgi	NM_006464
PLA2G15	Fosfolipasa A2	<i>Homo sapiens</i>	Lisosomas	NM_012320
KDEL1	Receptor de retención KDEL en el retículo endoplasmático 1	<i>Homo sapiens</i>	Sistema de secreción	NM_006801
Pxmp2	Proteína de membrana peroxisomal 2	<i>Rattus norvegicus</i>	Peroxisomas	NM_031587
TOR1AIP1	Proteína de interacción a la torsina A 1	<i>Rattus norvegicus</i>	Envoltura nuclear	NM_145092
ER-mCherry	Péptido señal del gen WAK2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> / proteína fluorescente mCherry / señal KDEL de retención en R.E.		Retículo endoplasmático	(Nelson y col., 2007)
Act	Actina	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Citoesqueleto de actina	HQ008727
TubA1	α -1-Tubulina	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Citoesqueleto de tubulina	HQ008728
Dhr	Receptor de la hormona diurética	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Membrana plasmática	HQ008729

Todos estos vectores de entrada conteniendo genes que codifican para proteínas de localización conocida fueron recombinados con los vectores de destino adecuados para obtener fusiones fluorescentes, las cuales fueron expresadas en células Sf9 para estudiar su localización subcelular *in vivo* por microscopía confocal. Se observó que todos los marcadores se expresaron en altos niveles y que, a pesar de que algunos de ellos no fueron construidos con proteínas de insecto, su distribución en células Sf9 transfectadas coincidió con la esperada (Figura 2.4A). Sin embargo, la fusión fluorescente de tubulina no se observó distribuida en los clásicos microtúbulos filamentosos sino que se localizó homogéneamente en el citoplasma de la célula y ocasionalmente con una intensa acumulación en la zona perinuclear (Figura 2.4A), lo que concuerda con su función en el mantenimiento de la estructura y movilidad del retículo endoplasmático (Vedrenne y Hauri, 2006). Dado que este tipo de fusiones a tubulina ya han sido utilizadas para estudiar la cinética microtubular en diversos tipos de células (Kimble y col., 2000; Rogers y col., 2002; Rusan y col., 2001), la distribución observada podría reflejar la distribución real de la proteína y no se debería una imposibilidad de polimerizar debido a la fusión de la proteína fluorescente.

Para demostrar la utilidad de los vectores construidos en experimentos de marcación múltiple, se coexpresaron combinaciones de marcadores de organela fusionados a diferentes proteínas fluorescentes y se analizó su localización subcelular. Empleando parámetros adecuados al adquirir las imágenes con un microscopio de fluorescencia confocal espectral (por ejemplo: rangos de λ para detección de fluorescencia, escaneo secuencial, potencia de láseres, velocidad de escaneo,

separación de espectros post adquisición, etc.) fue posible detectar hasta 3 fluoróforos diferentes simultáneamente en la misma muestra (Figura 2.4B).

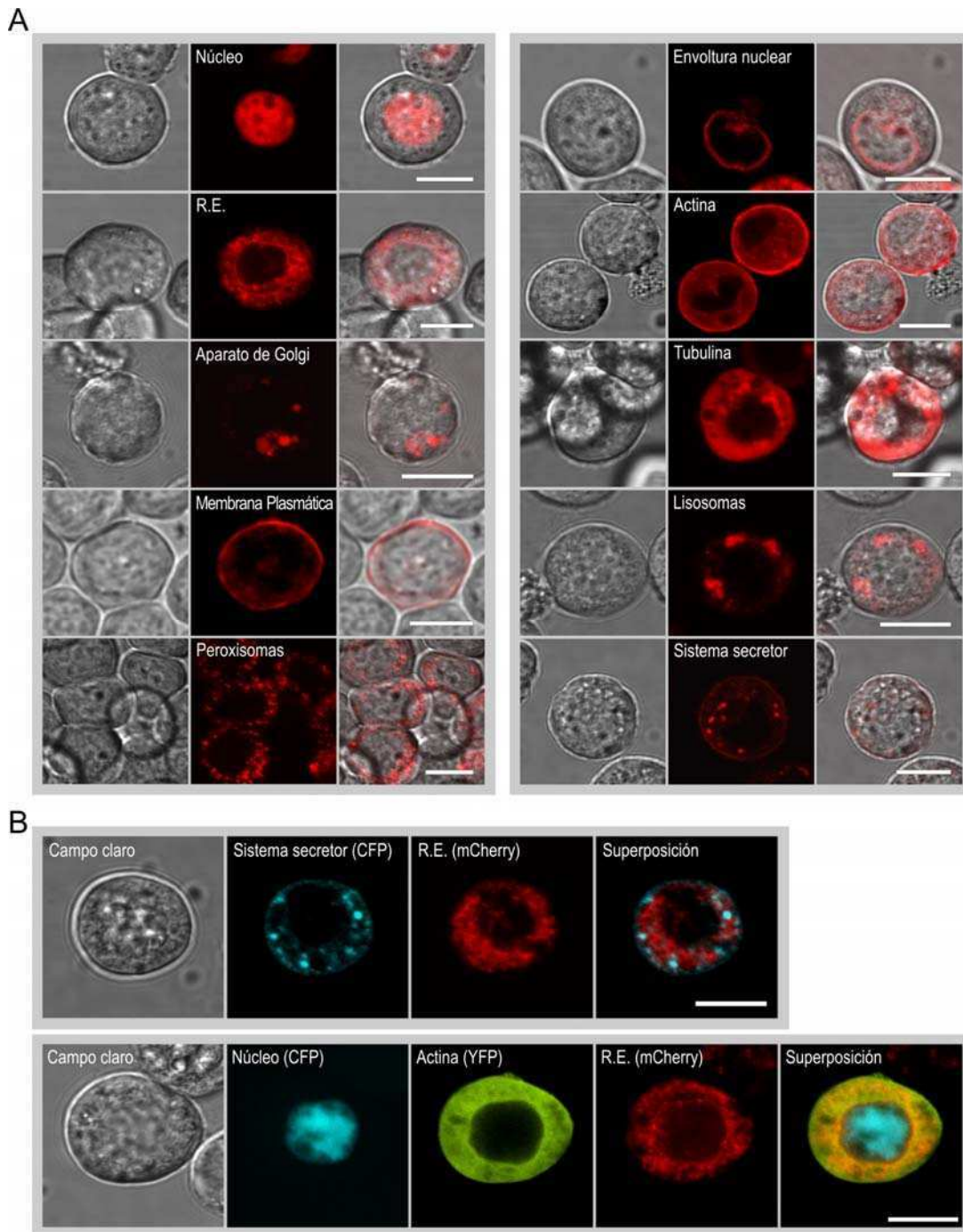


Figura 2.4. Localización subcelular de los marcadores de organelas fluorescentes obtenidos. Se construyeron fusiones fluorescentes de proteínas dirigidas a diferentes organelas y/o estructuras celulares (ver Tabla 2.1) que fueron expresadas en células Sf9 y su distribución fue examinada por microscopía confocal (A). Las imágenes fueron tomadas en modo de contraste DIC (izquierda) y fluorescencia (rojo), y luego superpuestas (derecha). Mediante la coexpresión de diferentes marcadores, se analizó la utilidad de los cuatro fluoróforos en experimentos de marcado múltiple (B). Todas las barras blancas corresponden a 10 μm .

En resumen, los resultados demuestran que el juego de vectores construidos y los marcadores fluorescentes dirigidos a núcleo, aparato de Golgi, lisosomas, sistema secretor, peroxisomas, envoltura nuclear, retículo endoplasmático, membrana plasmática, citoesqueleto de tubulina y citoesqueleto de actina, constituyen una herramienta versátil y apropiada para determinar la localización subcelular de una proteína incógnita mediante experimentos de colocalización con múltiples fluoróforos.

4.1.3. Análisis de la localización subcelular de las proteínas de MRCV en células vivas

Se utilizó el set de vectores de destino construidos (Figura 2.2) para recombinar con diversos vectores de entrada conteniendo los marcos abiertos de lectura, sin codón de iniciación (para el caso de las fusiones amino terminales) o sin codón de terminación (para el caso de las fusiones carboxi terminales), de las proteínas P3, P4, P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P8, P9-1, P9-2 y P10 de MRCV (Mongelli, 2010). De esta forma se obtuvieron fusiones fluorescentes de estas proteínas que fueron expresadas en células Sf9 para estudiar su localización subcelular.

P3 es la proteína mayoritaria del “core” viral (Distéfano, 2004; Distéfano y col., 2003; Distéfano y col., 2009) y es codificada por el segmento S3 de MRCV. Al expresar la fusión P3:GFP en células de insecto se observó que ésta se localiza en el citoplasma y más intensamente en el núcleo celular. Esto sugiere que la proteína P3 podría ser capaz de entrar activamente al núcleo celular. Un comportamiento similar ha sido observado en proteínas de cápside interna de otros virus (Anzai y Ozaki, 1969; Suzuki y col., 2005; Weigand y col., 2010; Westaway y col., 1997; Young y col., 1987). Es interesante notar que P3 posee un extremo amino terminal rico en residuos básicos que podría estar involucrado en su ingreso al núcleo. Sin embargo, dado que los niveles de expresión de esta fusión fueron extremadamente bajos y se la observó en muy pocas células, los resultados podrían ser producto de construcciones truncadas. Los bajos niveles de expresión impidieron la detección de esta proteína de fusión por “Western blot”. Por otro lado, la fusión GFP:P3 no pudo ser obtenida dado que no se cuenta un vector de entrada adecuado.

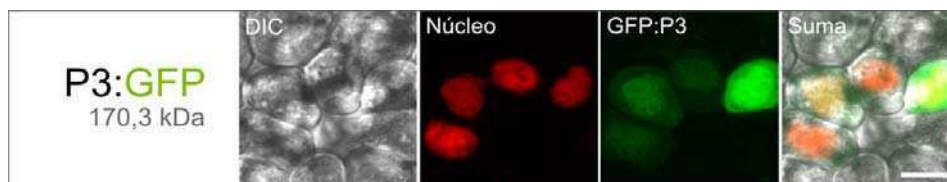


Figura 2.5. Localización subcelular de la proteína MRCV P3. Se expresó la fusión fluorescente P3:GFP en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopía confocal. Se muestra de izquierda a derecha: la muestra bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de núcleo, la fusión fluorescente estudiada y la superposición de las tres imágenes (suma). Las barras blancas corresponden a 10 μm .

P4 es una proteína estructural codificada por el segmento S4 que ha sido inmunolocalizada en los vértices de viriones semipurificados de MRCV. Adicionalmente, por experimentos de “far western blot” se determinó que interactúa con ella misma y con la proteína del “core” P3, lo que ha llevado a

proponer que P4 es la espícula B (Distéfano, 2004). Esto es reforzado por la presencia de un motivo A/VX₂HX₈HY(F/L)VF conservado entre espículas B con actividad guanilil transferasas de los reovirus con torretas (Mongelli, 2010). Al estudiar su localización subcelular, se observó que tanto GFP:P4 como P4:GFP se localizan en el citoplasma y el núcleo de las células transfectadas (Figura 2.6). La intensidad de fluorescencia fue ligeramente mayor en el núcleo celular, sugiriendo que P4 contiene una señal de localización nuclear que no fue posible detectar bioinformáticamente. No se pudo descartar que la fluorescencia nuclear se deba a la presencia de productos de degradación de las fusiones debido a que la detección de estas fusiones fluorescentes por “Western blot” con un antisuero comercial anti-GFP no fue lo suficientemente sensible para el nivel de expresión de las mismas. Finalmente, es interesante destacar que se detectaron con frecuencia cúmulos citoplasmáticos aislados que probablemente se deban a una fuerte capacidad de auto interacción de P4, ya que las proteínas de espícula B de los reovirus con torretas forman pentámeros (Reinisch y col., 2000) y es factible que P4 también lo haga.

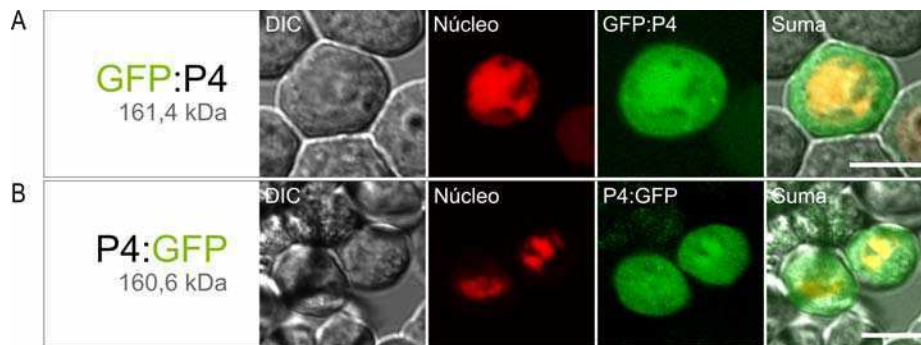


Figura 2.6. Localización subcelular de la proteína MRCV P4. Se expresaron las fusiones fluorescentes GFP:P4 (A) y P4:GFP (B) en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopía confocal. Se muestra de izquierda a derecha: la muestra bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de núcleo, la fusión fluorescente estudiada y la superposición de las tres imágenes (suma). Las barras blancas corresponden a 10 μ m.

P5-1 es una proteína no estructural codificada por el primer ORF del segmento S5. Al analizar su secuencia aminoacídica se detecta la presencia del tripéptido TKF en el extremo carboxilo terminal que podría funcionar como una señal no canónica de importación a peroxisomas (Mongelli, 2010) y que además ha sido reportado como un motivo de interacción a proteínas con dominio PDZ (Harris y col., 2001; Hegedus y col., 2003; Li y col., 2010). Resultados previos de nuestro grupo revelaron que una fusión GFP:P5-1 expresada en células de epidermis de cebolla se distribuye formando estructuras punteadas y que al eliminar la señal TKF de la fusión este patrón se pierde, lo que implica que dicho motivo es funcional y responsable del algún tipo de direccionamiento subcelular (Mongelli, 2010). En nuestro caso, al expresar las fusiones GFP:P5-1 y P5-1:GFP en células de insecto se observó que se localizan en el citoplasma (Figura 2.7). Sin embargo, al igual que lo observado en células de cebolla, GFP:P5-1 mostró un patrón granuloso fino que no colocalizó con peroxisomas (Figura 2.7A). Esto sugiere que P5-1 interacciona con algún componente celular desconocido y que el extremo carboxilo terminal es necesario para dicha interacción ya que al bloquear dicho extremo con GFP la localización subcelular granulosa se pierde (Figura 2.7B). Para determinar si el motivo TKF carboxilo

terminal es responsable del patrón diferencial, se analizó la localización subcelular de una versión mutante de delección de P5-1 que carece de los últimos tres amino ácidos de la proteína (P5-1 Δ TKF). Al expresar la fusión fluorescente GFP:P5-1 Δ TKF en células de insecto, se observó una distribución citoplasmática completamente homogénea (Figura 2.7C) que indica que el motivo TKF es necesario para la localización observada con GFP:P5-1. Este resultado sugiere que el motivo TKF es funcional en células de insecto y que la distribución de GFP:P5-1 podría deberse a la interacción con proteínas celulares con dominios PDZ. Las proteínas PDZ participan en mecanismos de señalización intracelular y transporte diferencial de proteínas a membrana plasmática en células polarizadas (Hung y Sheng, 2002; Muth y Caplan, 2003; Roh y Margolis, 2003), y se ha demostrado que algunas proteínas de virus de animales interfieren con dichos mecanismos a través de la interacción con proteínas PDZ celulares (Watson y col., 2003). Por ejemplo, recientemente se determinó que el motivo carboxilo terminal de unión a dominios PDZ presente en la proteína NS1 del virus de la influenza es un importante determinante de la patogenicidad del virus y de la especificidad del hospedante, y que además es capaz de inhibir la respuesta de inmunidad innata del hospedante (Kim y Samal, 2010; Liu y col., 2010; Soubies y col., 2010). Por lo tanto, es interesante proponer una función similar para el motivo TKF presente en P5-1 que permitiría al virus evadir el sistema de inmunidad del insecto vector. Alternativamente, esta señal podría permitir al virus explotar el sistema de transporte a la membrana plasmática (en células polarizadas de los epitelios del insecto y/o en células no polarizadas del insecto y de la planta) para su replicación y movimiento por los distintos tejidos.

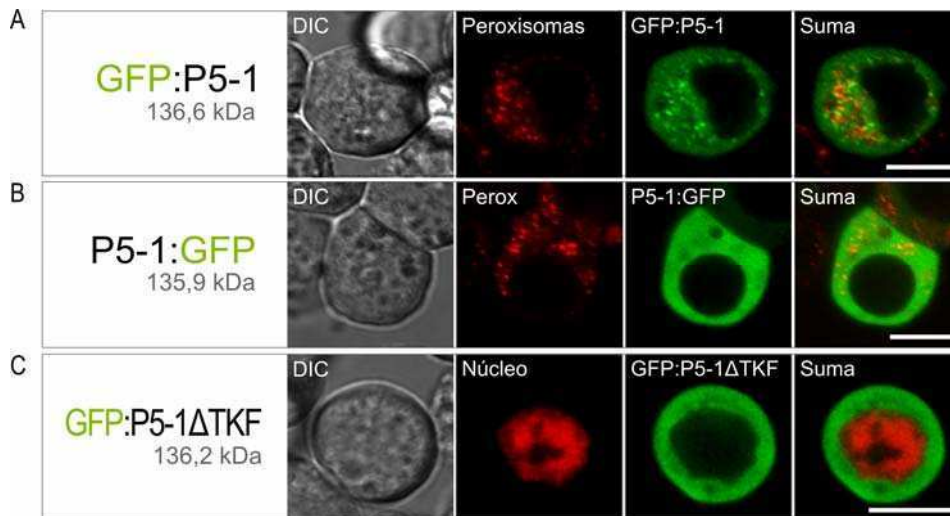


Figura 2.7. Localización subcelular de la proteína MRCV P5-1. Se expresaron las fusiones fluorescentes GFP:P5-1 (A), P5-1:GFP (B) y la mutante de delección GFP:P5-1 Δ TKF (C) en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopia confocal. Se muestra de izquierda a derecha: la muestra bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de organela empleado, la fusión fluorescente estudiada y la superposición de las dos imágenes anteriores (suma). Las barras blancas corresponden a 10 μ m.

P5-2 es una proteína no estructural codificada por el segundo ORF del segmento S5. El análisis bioinformático de las secuencias disponibles de segmentos S5 de *Fijivirus* sugiere que el segundo ORF de dicho segmento es codificante y que se inicia a 365 nucleótidos antes del final del primer ORF. Esto implica que P5-2 (de 255 aa de longitud) sería funcional durante la infección viral y se traduciría

por un mecanismo inusual, a pesar de que no existen evidencias experimentales de su expresión (Firth y Atkins, 2009). Se determinó que la fusión GFP:P5-2 expresada en células de insecto se distribuye en el núcleo celular, colocalizando con el marcador LMNA1:mCherry (Figura 2.8A). Esto sugiere la presencia de una señal de localización nuclear en la proteína P5-2 de MRCV. Si bien no fue posible detectar ninguna señal de este tipo mediante un análisis bioinformático, la proteína posee una cola carboxilo terminal (de 15 aa aproximadamente) rica en aminoácidos básicos que podría funcionar como señal de importación nuclear (Kosugi y col., 2009a). De acuerdo con esto, la fusión P5-2:GFP que posee dicho extremo bloqueado se distribuye homogéneamente en citoplasma y núcleo, lo que podría deberse a un transporte nuclear menos eficiente (Figura 2.8B).

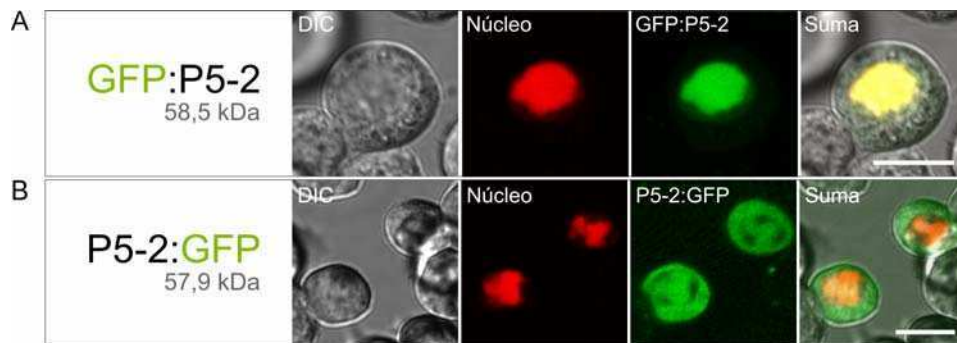


Figura 2.8. Localización subcelular de la proteína MRCV P5-2. Se expresaron las fusiones fluorescentes GFP:P5-2 y P5-2:GFP en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopia confocal. Se muestra de izquierda a derecha: la muestra bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de núcleo, la fusión fluorescente estudiada y la superposición de las imágenes anteriores (suma). Las barras blancas corresponden a 10 μ m.

Será necesaria la delección de la cola carboxilo terminal de P5-2 para confirmar su funcionalidad como señal de importación nuclear. Por otro lado, la importación de muchas proteínas al núcleo celular suele estar regulada por el estado de fosforilación de la misma (Jans, 1995). Esto es interesante dado que P5-2 presenta una serina entre los residuos básicos del extremo carboxilo (amino ácido 249) y una concentración de serinas en una zona proximal al mismo (amino ácidos 202 a 211) en las cuales se predice una alta probabilidad de fosforilación mediante bioinformática empleando los servidores KinasePhos (Huang y col., 2005), pKaPS (Neuberger y col., 2007), GPS 2.1 (Xue y col., 2008) y NetPhos 2.0 (Blom y col., 1999). Adicionalmente, se observó que al expresar transitoriamente a P5-2 en células de plantas y detectarla por “Western blot” se revelan diversas bandas de mayor peso molecular además de la de tamaño esperado que podrían deberse a diferentes estados de fosforilación de la proteína (Mongelli, 2010). Es posible entonces que P5-2 sea blanco de quinasas celulares y que su fosforilación juegue un rol en la regulación de su importación nuclear; esta hipótesis deberá ser investigada en un futuro. Asimismo, sería interesante el estudio de la capacidad de P5-2 para unir ADN de doble cadena ya que esta proteína podría cumplir un papel en la regulación de la expresión génica de la célula hospedante durante la replicación viral.

P6 es una proteína no estructural codificada por el segmento S6. Como se mencionó, presenta un extenso motivo “coiled coil” con cierta similitud a la cola de la miosina o al brazo de las proteínas de

segregación cromosómica (SMC) que sugiere que la estructura tridimensional de P6 sería filamentosa. En la sección 4.1.1 se observó mediante inmunofluorescencia que esta proteína presenta una localización citoplasmática irregular al ser expresada en células Sf9, comportamiento que fue observado nuevamente al expresar la fusión P6:GFP (Figura 2.9B).

Por otro lado, se observó que la fusión GFP:P6 se concentra en grandes estructuras irregulares perinucleares que no colocalizan con el aparato de Golgi, con el retículo endoplásmico ni con el citoesqueleto de actina. Notablemente, se observó que el marcador fluorescente de tubulina colocaliza parcialmente con las estructuras formadas por GFP:P6 (Figura 2.9A), lo que sugiere que P6 es capaz de interactuar y secuestrar a la tubulina, llevándola hacia las estructuras que forma (posiblemente por auto interacción). Por otro lado, es posible que el fenotipo celular alterado observado en las inmunofluorescencias (Figura 2.1B) y al expresar P6:GFP (Figura 2.9B) sea consecuencia de la desorganización del citoesqueleto de tubulina, lo que deberá ser confirmado empleando estabilizadores y desorganizadores del mismo. Estos resultados están reforzados por experimentos recientes que demuestran que P6 es capaz de interactuar con tubulina mediante ensayos de doble híbrido en levaduras (Llauger et al., resultados no publicados).

El movimiento intracelular de los virus generalmente depende de una o más proteínas de movimiento que suelen explotar funcionalmente al retículo endoplasmático, al citoesqueleto de actina y/o a la red de microtúbulos para trasladarse hacia los plasmodesmos de las células infectadas (Nelson y col., 2010; Radtke y col., 2006). Los estudios de movimiento viral en géneros de reovirus que infectan plantas son limitados. Se ha observado que el tratamiento con drogas despolimerizantes de los microtúbulos evita que el fitoreovirus RGDV sea liberado al medio pero no afecta su replicación en células de insecto hospedante en cultivo (Wei y col., 2009). Por otro lado se ha demostrado que la proteína P6 del fitoreovirus RDV y la proteína P6 del orizavirus RRSV son capaces de complementar el movimiento célula a célula de un virus mutante PVX y TMV deficiente en movimiento, respectivamente, y que ambas proteínas se localizan cerca de la pared celular y en los plasmodesmos de células de epidermis de *N. benthamiana*. Esto ha llevado a proponer que estas proteínas serían las responsables del movimiento de RDV y RRSV durante la infección de la planta hospedante (Li y col., 2004; Wu y col., 2010b). A pesar de que la proteína P6 de MRCV no presenta homología apreciable a nivel de secuencia aminoacídica con las proteínas P6 de RDV o de RRSV, es posible hipotetizar que la misma estaría involucrada en el movimiento intracelular de MRCV. En concordancia con esta hipótesis, resultados preliminares de nuestro grupo indican que MRCV P6 podría ser capaz de complementar el movimiento célula a célula de un PVX mutante deficiente en esta función (Mongelli y col., resultados no publicados). En conjunto, las evidencias sugieren que la proteína P6 de MRCV podría jugar un rol en el movimiento (intracelular y de célula a célula) del virus durante la infección de sus hospedantes explotando la red celular de microtúbulos. Por otro lado, la posible estructura filamentosa de la proteína (ver sección 4.1.1) sumada a su capacidad de formar cúmulos proteicos y de interactuar con tubulina, sugieren que P6 podría estar involucrada en la formación del material fibrilar que muchas veces se observa en el citoplasma de células de plantas e insectos infectados (Arneodo y col., 2002b). Estudiar la ultraestructura de las formaciones inducidas por GFP:P6 en células Sf9 mediante microscopía electrónica, así como confirmar y caracterizar su interacción con tubulina, podría revelar nueva información acerca de la proteína y su posible función.

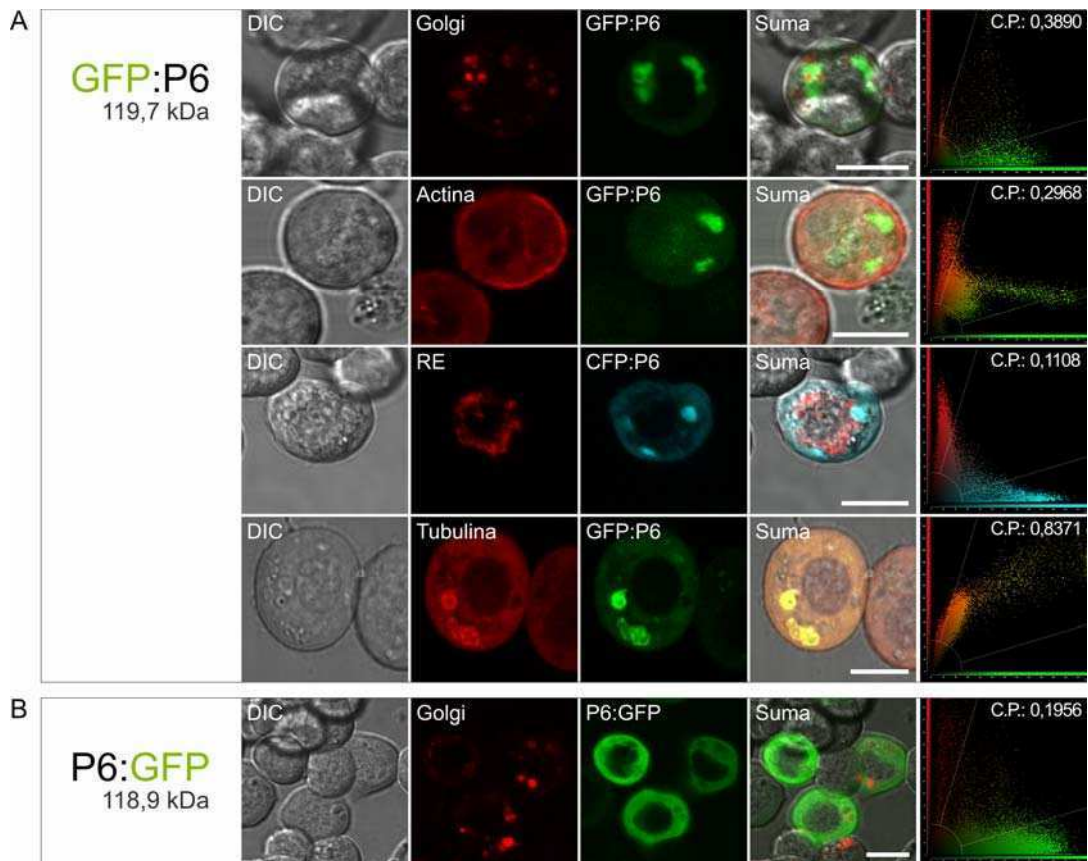


Figura 2.9. Localización subcelular de la proteína MRCV P6. Se expresaron las fusiones fluorescentes GFP:P6, CFP:P6 (A) y P6:GFP (B) en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopía confocal. Se muestra de izquierda a derecha: la muestra bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de referencia que se indica, la fusión fluorescente estudiada, la superposición de todas las imágenes anteriores (suma) y un gráfico de colocalización con el índice de correlación de Pearson (C.P.) indicado en la esquina superior derecha. Las barras blancas corresponden a 10 μm .

P7-1 es una proteína no estructural codificada por el primer ORF del segmento S7. Como la mayoría de las proteínas no estructurales de MRCV, no presenta homología a ninguna proteína de función conocida. Mediante ensayos de inmunofluorescencia se observó que al ser expresada en células de insecto se localiza en el citoplasma y el núcleo (Sección 4.1.1). Como se mencionó, dicha distribución podría deberse tanto a un movimiento pasivo como a un transporte activo bidireccional a través de la envoltura nuclear ya que el tamaño de la proteína (46,8 kDa) está cerca del límite de exclusión del poro nuclear (Davis, 1995). Notablemente, a pesar de que las fusiones fluorescentes GFP:P7-1 (71,2 kDa) y GFP:P7-1 (70,5 kDa) tienen un peso molecular estimado considerablemente mayor, su distribución fue similar a la observada para la proteína P7-1 sin fusionar a GFP (Figura 2.10). Se descartó la posibilidad de que la distribución observada se deba a la presencia de fragmentos parciales de las proteínas, ya que al realizar una inmunodetección de las fusiones por “Western blot” con un anticuerpo anti-GFP se observaron bandas del tamaño esperado para las fusiones completas (Figura 2.10). En resumen, los resultados indican que el movimiento de P7-1 a través de la envoltura nuclear es resultado de un transporte activo que permite que esta proteína o bien ingrese al núcleo de manera restringida (ya que se la detecta por igual en citoplasma y núcleo), o se mueva libremente entre el citoplasma y el núcleo. El mecanismo por el cual esto ocurre es una

incógnita debido a que, como se mencionó en la sección 4.1.1, no se detectan señales localización nuclear en la secuencia aminoacídica de P7-1. Una posibilidad es que los numerosos residuos básicos situados en el extremo amino terminal (aminoácidos 1 a 28) de esta proteína estén involucrados en esta característica (Kosugi y col., 2009a), hipótesis que deberá ser investigada en un futuro. Aún más interesante será estudiar si P7-1, al igual que se propuso para P5-2 (ver más arriba), interviene en la regulación transcripcional de genes del hospedante.

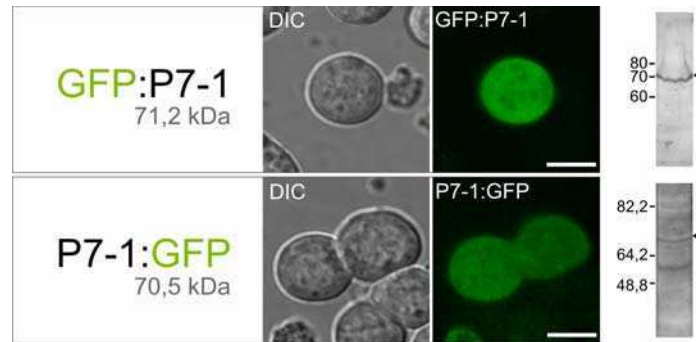


Figura 2.10. Localización subcelular de la proteína MRCV P7-1. Se expresaron las fusiones fluorescentes GFP:P7-1 y P7-1:GFP en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopía confocal. Se muestra de izquierda a derecha: la muestra bajo luz blanca en modo DIC, la fusión fluorescente estudiada y la inmunodetección de la fusión en un extracto de células transfectadas mediante “Western blot” con un anticuerpo anti-GFP. Se señalan con flechas las bandas detectadas. Las barras blancas corresponden a 10 μ m.

P7-2 es una proteína no estructural codificada por el segundo ORF del segmento S7. Resultados de nuestro grupo han mostrado que esta proteína es capaz de disminuir la expresión transiente de genes expresados a partir del promotor 35S en *N. benthamiana* por un mecanismo postranscripcional aún desconocido. Además hemos demostrado que la expresión de esta proteína a partir de un vector basado en el *Potato virus X* aumenta drásticamente los severidad de la infección en *N. benthamiana* mientras que disminuye la acumulación viral. Estas características, nos permitieron postular que esta proteína cumple un rol relevante en la interacción planta-virus (Mongelli, 2010). Su localización subcelular mediante fusión a proteínas fluorescentes expresadas en células de epidermis de hoja de *N. benthamiana* mostró que en este sistema P7-2 se distribuye en el citoplasma, en zonas cercanas el retículo endoplasmático (causando su alteración morfológica) y frecuentemente forma filamentos que sugieren que podría interactuar con el citoesqueleto (Mongelli, 2010). Adicionalmente, al ser expresada células Sf9 a partir de un baculovirus recombinante e inmunodetectada por “Western blot” se observan tres bandas de diferente peso molecular que sugieren que P7-2 es modificada postraduccionalmente (Llauger G., resultados sin publicar). Aquí, al expresar las fusiones GFP:P7-2 y P7-2:GFP en células de insecto se observó que ambas proteínas se localizan en el citoplasma de las células transfectadas, detectándose con frecuencia 2 o 3 cúmulos citoplasmáticos de naturaleza desconocida (Figura 2.11). Ocasionalmente, se encontró a las proteínas de fusión distribuidas en el núcleo (ver fusión P7-2:GFP en la Figura 2.11). Es interesante notar que la expresión de P7-2:GFP fue dificultosa y que las células que expresaron

esta fusión mostraban un fenotipo alterado a la luz blanca, lo que sugiere que P7-2 es citotóxica y que el bloqueo de su extremo amino terminal en la fusión GFP:P7-2 posiblemente mitigue dicho efecto. Esto deberá confirmarse examinando el nivel de muerte celular (programa o no programada) en las células transfectadas con el vector de expresión de P7-2:GFP.

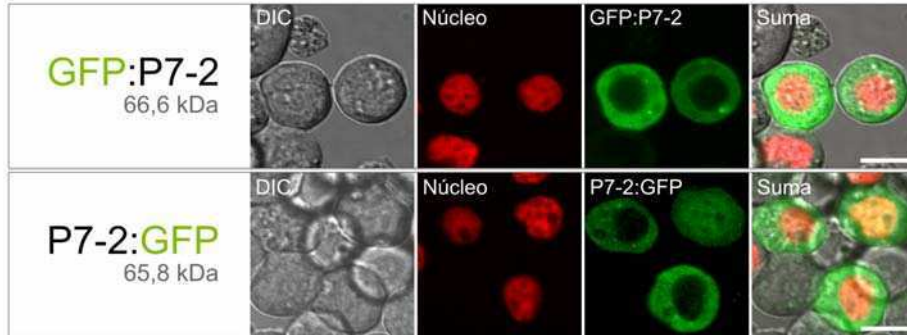


Figura 2.11. Localización subcelular de la proteína MRCV P7-2. Se expresaron las fusiones fluorescentes GFP:P7-2 y P7-2:GFP en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopía confocal. Se muestra de izquierda a derecha: la muestra bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de núcleo, la fusión fluorescente estudiada y la superposición de todas las imágenes anteriores (suma). Las barras blancas corresponden a 10 μm .

P8 es una proteína estructural codificada por el segmento S8. Se ha detectado por medios bioinformáticos que posee un motivo de unión a nucleótidos, conservado entre proteínas de diversos reovirus como por ejemplo la proteína $\mu 2$ de *Orthoreovirus* (Nibert y Kim, 2004). Esto ha llevado a proponer a P8 como una helicasa viral (Distéfano y col., 2002). Por otro lado, se reportó que la proteína P8 del fijivirus RBSDV (que presenta un 53 % de homología a MRCV P8) es una proteína dimérica capaz de ingresar al núcleo de células de insectos y plantas, y actuar como represor transcripcional (Liu y col., 2007a). En nuestro caso, al expresar en células de insecto la fusión P8:GFP se observó que se distribuye homogéneamente en el citoplasma y el núcleo (Figura 2.12), mientras que no se logró detectar expresión de la fusión GFP:P8. Debido al tamaño esperado para P8:GFP (97,2 kDa) es improbable que sea capaz de ingresar al núcleo pasivamente y posiblemente requiera un transporte activo. Si bien los niveles de expresión de esta fusión no son lo suficientemente altos como para comprobar la integridad de la fusión por “Western blot”, es interesante notar que el motivo NKLLKQKIT, presente entre los aminoácidos 34 y 42 de MRCV P8, fue detectado por cNLS Mapper (Kosugi y col., 2009b) como una señal monopartita débil de localización nuclear. La misma podría ser responsable de la localización observada. De acuerdo con esto, se reportó que el dominio responsable de la localización nuclear de la proteína P8 de RBSDV se encuentra en los primeros 40 aminoácidos de la proteína, donde se encuentra una señal NLS similar a la de una nucleoplasmina (Liu y col., 2007a). Las diferencias entre las localizaciones subcelulares de las proteínas P8 de MRCV y RBSDV sugieren una distinta efectividad de sus señales NLS. La obtención de virus quiméricos entre MRCV y RBSDV podría revelar si la importación nuclear de P8 juega un rol en la infectividad de estos virus. Lamentablemente las herramientas necesarias para ello, como las existentes para *Rotavirus*, *Orthoreovirus* y *Orbivirus* (Boyce y col., 2008; Kobayashi y col., 2007; Komoto y col., 2006), aún no han sido desarrolladas para *Fijivirus*. Finalmente, es importante

destacar que la proteína $\mu 2$ de *Orthoreovirus*, que como se mencionó ha sido propuesta como equivalente funcional a P8, muestra una localización subcelular similar a la observada para MRCV P8 (Kobayashi y col., 2009).

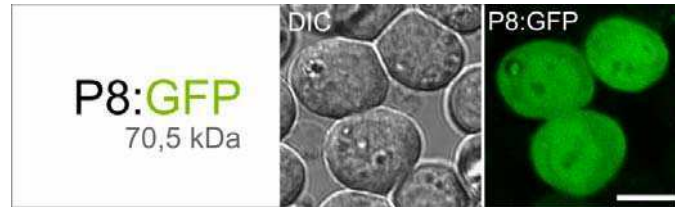


Figura 2.12. Localización subcelular de la proteína MRCV P8. Se expresó la fusión fluorescente P8:GFP en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopía confocal. Izquierda: la muestra bajo luz blanca en modo DIC. Derecha: distribución subcelular de P8:GFP. La barra blanca simboliza 10 μ m.

P9-1 es una proteína no estructural codificada por el primer ORF del segmento S9, que se inmunolocaliza en los viroplasmata que se observan durante la infección de las plantas e insectos hospedantes (Guzmán y col., 2010; Isogai y col., 1998a). Como se observó en la sección 4.1.1, al ser expresada en células de insecto es capaz de establecer numerosas inclusiones citoplasmáticas similares a VIBs (Figura 2.1D). Asimismo, las fusiones fluorescentes de P9-1 fueron capaces de formar numerosas inclusiones citoplasmáticas en las células transfectadas, aunque en ocasiones dichas estructuras fueron más grandes y de forma más irregular que las observadas anteriormente (Figura 2.3 y 2.13). Dadas sus interesantes características se decidió realizar un estudio funcional y bioquímico más profundo sobre P9-1, cuyos resultados se exponen en el Capítulo III.

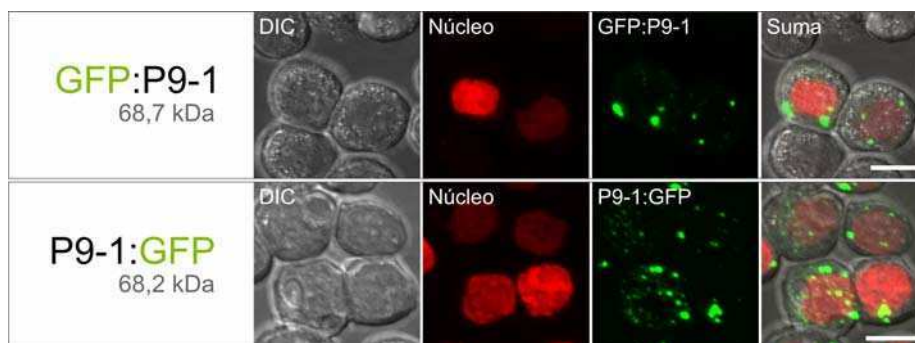


Figura 2.13. Localización subcelular de la proteína MRCV P9-1. Se expresaron las fusiones fluorescentes GFP:P9-1 y P9-1:GFP en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopía confocal. Se muestran, de izquierda a derecha, proyecciones máximas de las muestras bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de núcleo, la fusión fluorescente estudiada y la superposición de todas las imágenes anteriores (suma). Las barras blancas corresponden a 10 μ m.

P9-2 es una proteína no estructural codificada por el segundo ORF del segmento S9. Mediante el análisis bioinformático de su secuencia es posible detectar dos potenciales pasos transmembrana abarcando los aminoácidos 80 a 100 y 110 a 140, aproximadamente. Al expresar la fusión GFP:P9-2

en células de insecto se observó su localización en la membrana plasmática, lo que fue confirmado por tinción con el colorante de membranas fluorescente Dil y concuerda con las predicciones bioinformáticas (Figura 2.14A). Sin embargo, la fusión P9-2:GFP no fue observada en la membrana plasmática, sino colocalizando parcialmente con el marcador de aparato de Golgi (Figura 2.14B). Esto sugiere que la presencia de GFP en el extremo carboxilo terminal de P9-2 bloquea su tránsito normal a la membrana plasmática y provoca su retención en el aparato de Golgi. Debido a que las proteínas de membrana suelen estar glicosiladas se decidió analizar las fusiones de P9-2 por “Western blot”, observando en ambos casos las bandas del peso molecular esperado y otras dos de mayor peso que podrían corresponder a estados glicosilados de P9-2 (Figura 2.14C). Fue posible predecir bioinformáticamente dos potenciales sitios de N-glicosilación en los aminoácidos 161 y 204 de P9-2 empleando el servidor NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Asimismo, es interesante notar la similitud (de tamaño, estructura secundaria y localización) entre P9-2 y las glicoproteínas de membrana NSP4 de *Rotavirus* y Ns3 de *Orbivirus* involucradas en el ensamblado y transporte viral en células de mamífero e insecto, respectivamente (Horie y col., 1997; Roy y Noad, 2006). Estos datos en conjunto sugieren que de P9-2 podría estar siendo glicosilada y esto indicaría que la causa del tráfico alterado de P9-2:GFP no es la falta de glicosilación de la proteína. Es posible que este efecto se deba a una alteración estructural de P9-2 causada por la presencia de GFP.

Una característica notable observada para la fusión GFP:P9-2 es que fue capaz de alterar la morfología de la membrana plasmática de las células, causando la aparición de numerosas protuberancias membranosas que en algunos casos se observaron conectando dos células (Figura 2.14D). Estas estructuras son similares a los denominados nanotubos involucrados en mecanismos celulares de transporte célula a célula o inducidos por virus (Davis y Sowinski, 2008). Por otro lado, este comportamiento se asemeja al de la proteína de membrana Pns10 de RDV que es capaz de formar túbulos en el citoplasma de células de insecto hospedante, que protruyen de la membrana plasmática y que han sido involucrados en el movimiento del virus durante su replicación en el insecto vector (Wei y col., 2006a). Adicionalmente, se observó que las protuberancias inducidas por P9-2 parecen estar compuestas en parte por filamentos de actina (Figura 2.14E), lo que es interesante dado que la funcionalidad de los túbulos formados por Pns10 de RDV depende del citoesqueleto de actina (Wei y col., 2006a).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, nuestros resultados sugieren que P9-2 es una proteína de membrana probablemente involucrada en el movimiento viral entre células durante la replicación de MRCV en los tejidos del delfácido vector. En tal caso, es posible que esta función esté acoplada al movimiento viral intracelular que ha sido relacionado con la proteína P6 (ver más arriba).

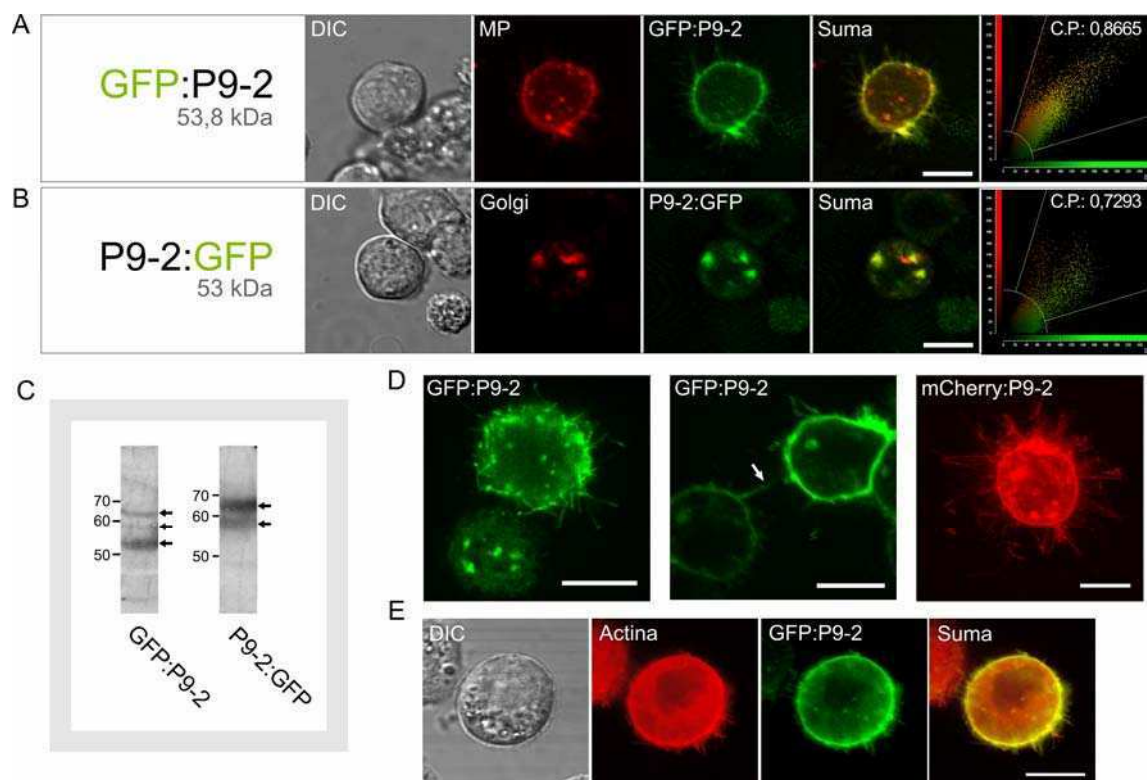


Figura 2.14. Localización subcelular de la proteína MRCV P9-2. (A) y (B) Se expresaron las fusiones fluorescentes GFP:P9-2 (A) y 9-2:GFP (B) en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopía confocal. Se muestra de izquierda a derecha: la muestra bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de referencia indicado, la fusión fluorescente estudiada, la superposición de los fluoróforos (suma) y un gráfico de colocalización con el índice de correlación de Pearson (C.P.) indicado en la esquina superior derecha. La membrana plasmática (MP) fue teñida usando el colorante fluorescente Dil y el aparato de Golgi fue detectado coexpresando la fusión TGOLN2:mCherry. (C) Las proteínas de fusión fueron inmunodetectadas en un extracto de células transfectadas mediante “Western blot” con un anticuerpo anti-GFP. Se señalan con flechas las bandas detectadas. (D) La expresión de fusiones amino terminales a P9-2 indujeron la formación de filamentos en la membrana plasmática similares a filopodios o nanotubos. Se muestra de izquierda a derecha una célula vista en plano cortical superior, dos células aparentemente interconectadas mediante un filamento membranoso (flecha blanca) y una reconstrucción de una célula entera por proyección máxima. (E) Colocalización del citoesqueleto de actina con la fusión GFP:P9-2 que muestra la presencia de la actina en los filopodios. En todos los casos, la barra blanca corresponde a 10 μ m.

P10 es una proteína estructural codificada por el segmento S10. Debido a que presenta una homología del 72,4 / con la proteína P10 de RBSDV, es considerada la proteína mayoritaria de la cápside externa (Distéfano y col., 2005; Isogai y col., 1998a). Estudios bioquímicos sobre P10 de RBSDV han revelado que esta proteína es capaz de auto interactuar por dominios presentes en los primeros 240 aminoácidos, formando trímeros (Liu y col., 2007b). Al analizar la localización subcelular de la fusión P10:GFP expresada en células de insecto se observó que se distribuye homogéneamente en el citoplasma (Figura 2.15B). Por otro lado, la fusión GFP:P10 fue detectada colocalizando con el retículo endoplasmático (Figura 2.15A), lo que implica que esta proteína sería translocada y retenida en este compartimento. Normalmente, la translocación al RE está mediada

por señales hidrofóbicas presentes en las porciones amino terminales de las proteínas (Zimmermann y col., 2010), mientras que la retención es mediada o por la presencia de una señal carboxilo terminal KDEL en proteínas solubles o por motivos di-lisina o di-arginina en el extremo citosólico de proteínas de membrana (Pagny y col., 1999). Mediante bioinformática no fue posible detectar ningún péptido señal de translocación al RE, potenciales pasos transmembrana o señales de retención en el RE en la secuencia de P10. Alternativamente, P10 podría encontrarse anclada a la superficie citosólica de la membrana del RE, posiblemente por medio de la interacción con alguna proteína celular.

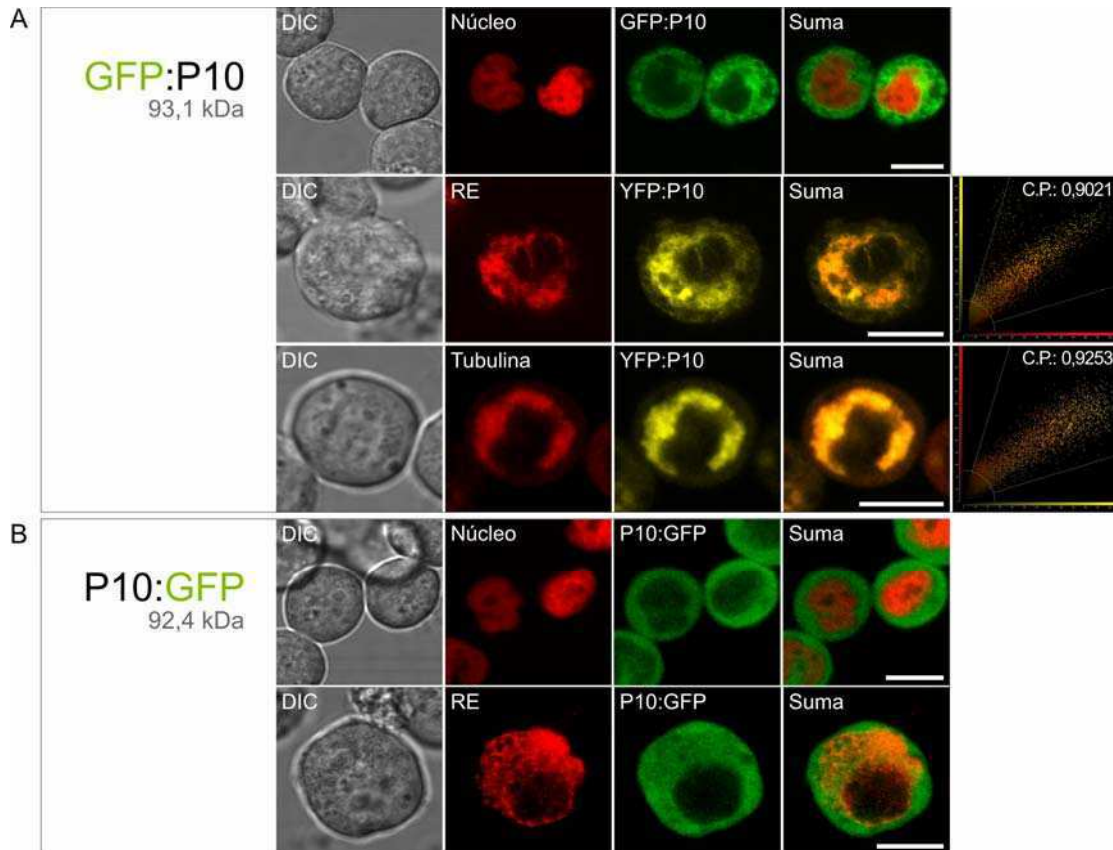


Figura 2.15. Localización subcelular de la proteína MRCV P10. Se expresaron las fusiones fluorescentes GFP:P10, YFP:P10 (A) y P10:GFP (B) en células Sf9 y se determinó su localización subcelular por microscopía confocal. Se muestra de izquierda a derecha: la muestra bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de referencia que se indica, la fusión fluorescente estudiada, la superposición de los fluoróforos (suma) y un gráfico de colocalización con el índice de correlación de Pearson (C.P.) indicado en la esquina superior derecha. Las barras blancas corresponden a 10 μ m.

Notablemente, GFP:P10 fue capaz de colocalizar con el marcador de tubulina y provocar una redistribución de ésta última hacia la zona en donde se ubica el retículo endoplasmático (Figura 2.15A), lo que sugiere que P10 es capaz de interactuar con la tubulina. Esta interacción podría ser la responsable de la localización de P10 en el RE ya que la morfogénesis, función y movilidad de dicha estructura requieren la presencia del citoesqueleto de microtúbulos anclados al sistema de membranas. Esta hipótesis está reforzada por el hecho de que P10:GFP se localiza en el citoplasma y no en el RE (Figura 2.15B), lo que además sugiere que el extremo carboxilo terminal de P10 sería importante para guiar a la proteína al RE posiblemente mediante la interacción con tubulina u otra

proteína celular. Para comenzar a dilucidar este mecanismo se podría determinar si GFP:P10 se encuentra en el lumen del RE o anclado externamente al mismo mediante experimentos sencillos de tratamiento con digitonina y tripsina (Lorenz y col., 2006).

En resumen, se logró determinar la localización subcelular de 11 proteínas del MRCV. Se determinó que P3, P4, P5-2, P7-1 y P8 son capaces de ingresar al núcleo celular. Es posible que alguna de ellas sea capaz de inducir el apagado de la transcripción de genes celulares ya que es un efecto normalmente observado en infecciones virales (Lyles, 2000; Weidman y col., 2003). Sin embargo, es poco probable que el ingreso al núcleo tenga un significado biológico en los cinco casos. Se ha observado que los motivos de unión a ADN y ARN normalmente se solapan con motivos de ingreso al núcleo (Cokol y col., 2000; LaCasse y Lefebvre, 1995) y por lo tanto la localización nuclear de alguna de estas proteínas podría deberse a su capacidad de unión a ácidos nucleicos de doble cadena, una propiedad que es común en diversas proteínas de otros reovirus (Mertens, 2004).

Se determinó que P5-1 es una proteína citoplasmática cuyo motivo TKF carboxilo terminal, que es necesario para la unión a proteínas PDZ en otras proteínas (Kocher y col., 1999; Rossmann y col., 2005), es determinante de una distribución citoplasmática granulosa. P5-1 podría estar interfiriendo con el sistema de señalización mediado por proteínas PDZ o podría explotar el mecanismo de transporte intracelular que involucra a estas proteínas.

Por otro lado, se observó que P6 se encuentra anclada o formando una estructura citoplasmática perinuclear, y que es capaz de asociarse a tubulina. Esto sugiere un posible rol en el movimiento intracelular del virus en la planta.

P9-1 fue capaz de formar cuerpos de inclusión similares a VIBs como muchas proteínas mayoritarias de viroplasma, lo que sugiere que se trataría de una proteína importante para la formación de estas estructuras. Esto fue estudiado con mayor profundidad en el Capítulo III.

Se observó que P9-2 es una proteína de membrana que induce la formación de filopodios y que sufre alteraciones postraduccionales que podrían ser glicosilaciones, sugiriendo una posible función como proteína de movimiento intercelular en insectos.

Finalmente, se observó que P10 se localiza en el retículo endoplasmático por algún mecanismo desconocido. Es interesante notar que la proteína trimérica de cápside externa VP7 de *Rotavirus* es translocada (mediante un péptido señal) y retenida (mediante los residuos amino terminales 30 a 111) en el RE (Maass y Atkinson, 1994; Stirzaker y col., 1987), lo que concuerda con el rol de proteína de cápside externa asignado a P10 previamente (Distéfano y col., 2005) y sugiere que MRCV explota el sistema membranoso de secreción para su morfogénesis y/o transporte. Adicionalmente, dado que P10 fue capaz de colocalizar con tubulina, es factible proponer que esta proteína sería en parte responsable de la formación de las estructuras tubulares que se observan en células infectadas con *Fijivirus*.

La vasta información generada mediante estos experimentos constituye un importante punto de partida para un estudio más profundo de cada proteína por separado (el capítulo III es un ejemplo de ello). Sin embargo, el máximo potencial de estas técnicas no ha sido explotado y queda aún mucho

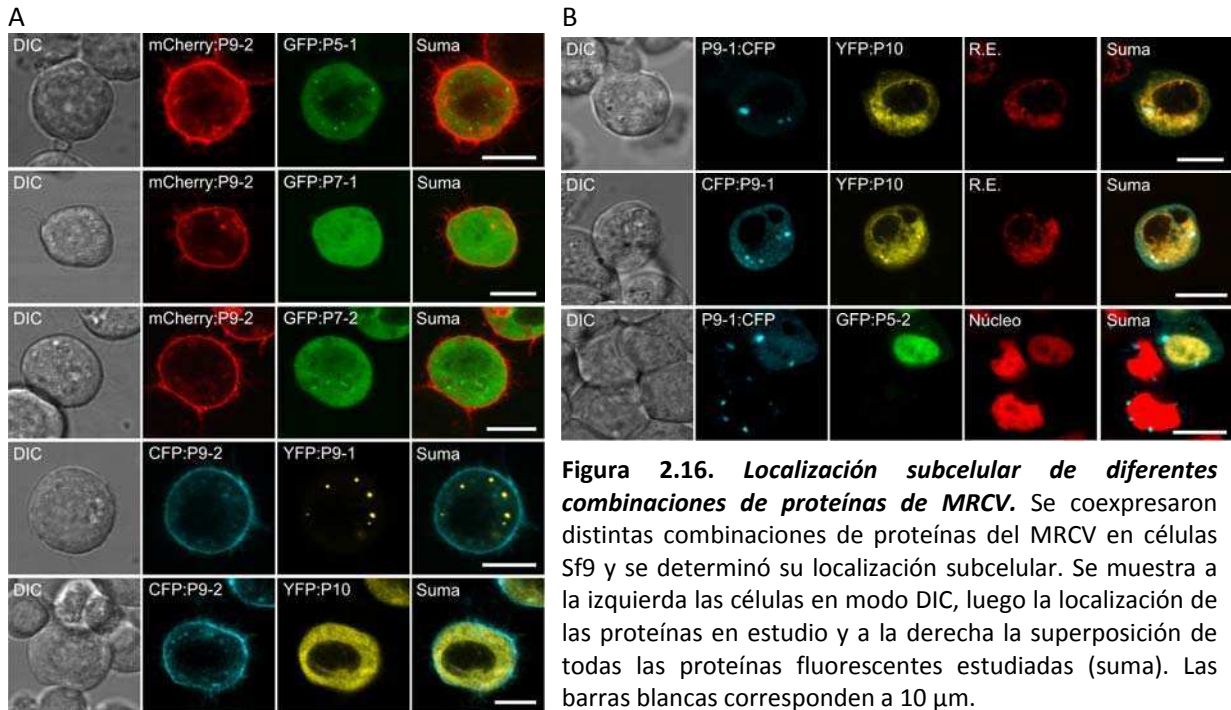
trabajo por realizar que seguramente revelará nuevas características funcionales de las proteínas de MRCV. Asimismo, el uso del sistema de células de insecto no hospedante que se empleó por falta de cultivos celulares de delfácidos produjo buenos resultados como sistema biológico de reemplazo para el estudio de las proteínas de Fijivirus. Sin embargo, el futuro avance en el conocimiento integral de la infección por estos virus a nivel celular y molecular será dificultoso si no se logra desarrollar un sistema más adecuado en el cual poder estudiar su ciclo replicativo.

4.1.4. Análisis de la colocalización subcelular de diferentes proteínas de MRCV en células vivas

Teniendo en cuenta que en el caso de existir una interacción entre dos proteínas que muestran diferente localización subcelular es posible que la distribución de una o ambas se vea alterada, se decidió detectar posibles interacciones entre las proteínas de MRCV mediante colocalización. Se seleccionaron y coexpresaron diferentes combinaciones de proteínas del MRCV en células Sf9 y se analizó la localización subcelular de ambas proteínas en simultáneo.

En primer lugar, y dado que P9-2 había mostrado una distribución subcelular interesante, se seleccionaron combinaciones de esta proteína con algunas de las otras proteínas de MRCV (P5-1, P7-1, P7-2, P9-1 y P10) para realizar experimentos de colocalización. En ninguno de los casos se detectó colocalización o alteración de la distribución subcelular de las proteínas, sino que se observó la misma localización que presenta cada una de estas proteínas al expresarse independientemente (Figura 2.16A). Si bien esto indicaría que las proteínas combinadas no son capaces de interactuar, no debe descartarse la posibilidad de que la/las fusiones fluorescentes en sus extremos interfieran con la posible interacción. Por otro lado, es interesante notar que la proteína no estructural de membrana NSP4 de *Rotavirus*, que está involucrada en la morfogénesis y egreso viral y presenta un tamaño similar a P9-2, es capaz de interactuar con las proteínas VP4 y VP6 que conforman la espícula y la cápside intermedia del virión, respectivamente (Hyser y col., 2008; Meyer y col., 1989). Por lo tanto, si P9-2 cumpliera un rol similar en la morfogénesis y/o movimiento del MRCV través de la membrana plasmática de las células de insecto, sería esperable que fuera capaz de interactuar con alguna de las proteínas estructurales del virión. A pesar de que P9-2 no fue capaz de colocalizar con la proteína de cápside externa P10 (Figura 2.16A), es posible que sí lo haga con la proteína P3 de cápside interna o con P2 o P4, las posibles proteínas de las espículas A y B, respectivamente (Distéfano, 2004). Se disponen de fusiones fluorescentes para P3 y P4 que se podrán emplear en futuros experimentos de colocalización con P9-2.

Paralelamente, basándonos en resultados preliminares de interacción evaluada por el método del Doble Híbrido en levaduras obtenidos por nuestro grupo (Llauger y col., resultados no publicados), se colocalizaron las combinaciones P9-1 + P5-2 y P9-1 + P10. Nuevamente, no se logró observar colocalización entre las proteínas analizadas (Figura 2.16B), lo que sugiere que las mismas no son capaces de interactuar en las condiciones evaluadas.



Debido a que tanto la proteína P6 como P10 habían demostrado colocalizar parcial o totalmente con tubulina (Figuras 2.9A y 2.15A), se decidió coexpresarlas y estudiar su localización subcelular. Se observó que ambas proteínas colocalizan completamente con una distribución que recuerda al retículo endoplasmático pero con alteraciones morfológicas (Figura 2.17A). Asimismo, al realizar experimentos de localización múltiple ambas fueron capaces de colocalizar con tubulina en dicha estructura (Figura 2.17B). Sin embargo, no se logró observar colocalización cuando se coexpresó una fusión carboxilo terminal de P6 con una fusión amino terminal de P10 (Figura 2.17C), sugiriendo que el extremo carboxilo terminal de P6 es requerido para su colocalización con P10. Si bien se podría argumentar que la colocalización entre P6 y P10 es consecuencia de la unión a la tubulina por parte de ambas proteínas, la colocalización entre P6 y tubulina es sólo parcial en ausencia de P10 (Figura 2.9A) pero completa en su presencia (Figura 2.17A), lo que sugiere que P6 y P10 serían capaces de interactuar directamente y que sería necesario que el extremo carboxilo terminal de P6 esté libre para llevar a cabo dicha interacción.

A continuación, se realizaron coexpresiones con fusiones fluorescentes de P9-1 y P6. Ambas proteínas expresadas individualmente son capaces de formar cúmulos proteicos, aunque de diferentes características: P9-1 forma cuerpos de inclusión conspicuos esparcidos en el citoplasma (Figura 2.1D y 2.13), mientras que P6 es capaz de formar un gran cúmulo perinuclear cuando hay una fusión presente en su extremo amino terminal (Figura 2.9A) aunque no cuando la fusión es carboxilo terminal (Figura 2.9B). Al expresar una fusión amino terminal de P9-1 junto con una fusión carboxilo terminal de P6 se observó una colocalización parcial (Figura 2.17D), mientras que una fusión carboxilo terminal de P9-1 no fue capaz de colocalizar con la misma fusión de P6 (Figura 2.17E). Esto sugiere que P9-1 es capaz de interactuar con P6 (o con un mismo componente celular), posiblemente mediante su extremo carboxilo terminal, reclutándola a los cuerpos de inclusión formados por la primera. Es interesante notar que este resultado implica que P6 podría cumplir algún rol en la

formación y/o función de los viroplasmos. Adicionalmente, la presencia de P6 en los viroplasmos podría mediar la asociación de estas estructuras con el citoesqueleto de tubulina, lo cual ha sido establecido para reovirus de animales (Cabral-Romero y Padilla-Noriega, 2006; Eaton y col., 1987; Parker y col., 2002). Futuros estudios de la capacidad de colocación entre una fusión amino terminal de P6 y fusiones de P9-1 podrían contribuir a elucidar la dinámica de asociación entre ambas proteínas así como los dominios necesarios para que esto ocurra. Asimismo, se espera poder confirmar la interacción directa entre ambas proteínas mediante ensayos de coimmunoprecipitación con diferentes fusiones de las mismas expresadas en células Sf9.

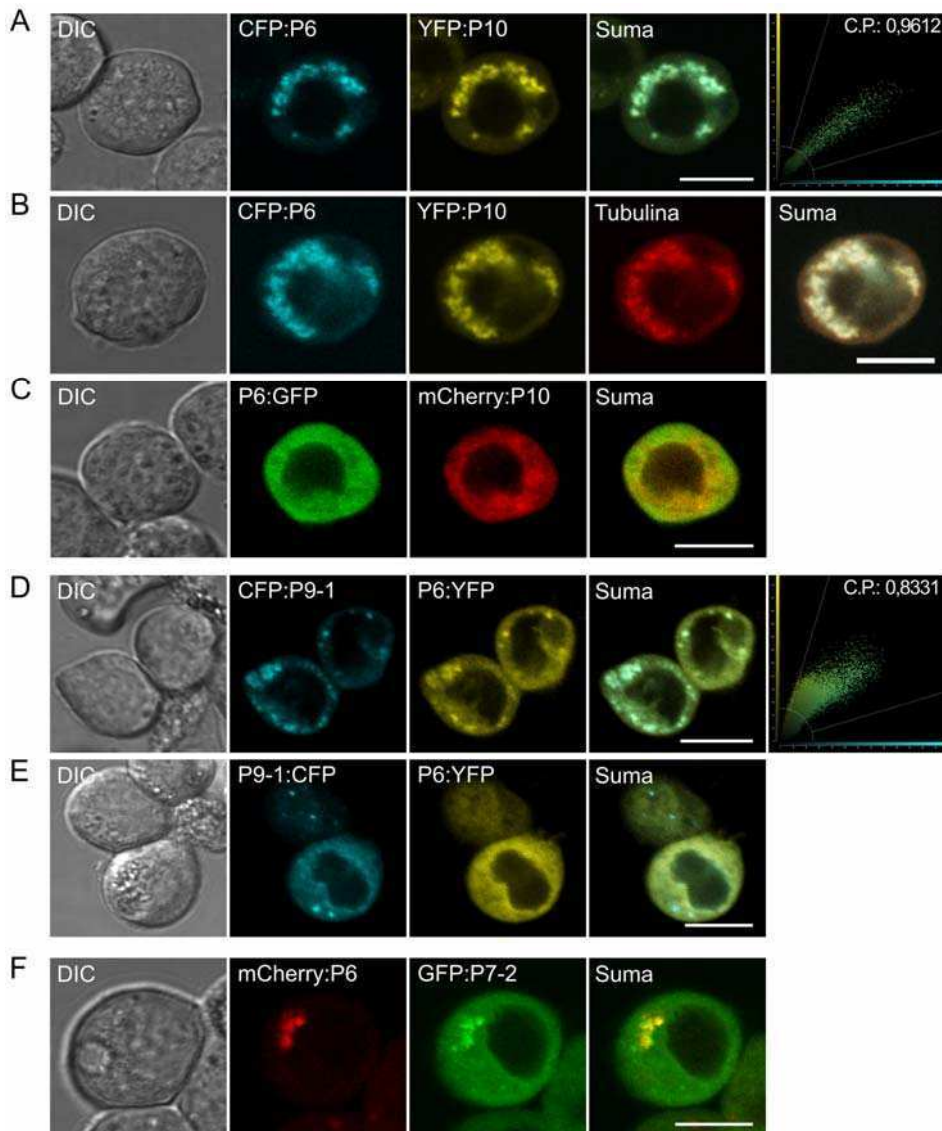


Figura 2.17. Colocalización de diferentes proteínas de MRCV. Se expresaron las combinaciones de proteínas P6 + P10 (A, B y C), P6 + P9-1 (D y E) y P6 + P7-2 (F) en células Sf9 y se determinó su localización subcelular. Se muestra de izquierda a derecha: las células con luz blanca en modo DIC, la localización de las proteínas en estudio, la superposición de todas las proteínas fluorescentes estudiadas (suma) y en el caso de colocación se detalla un gráfico con el índice de correlación de Pearson (C.P.) indicado en la esquina superior derecha. Las barras blancas corresponden a 10 μ m.

Finalmente, al coexpresar fusiones fluorescentes de P6 y P7-2 se detectó que P7-2 es reclutada parcialmente a los cúmulos perinucleares formados por P6 (Comparar Figura 2.11 con Figura 2.17F), lo que sugiere una asociación, directa o indirecta, entre ambas proteínas. Dado que P6 es un posible componente del viroplasma (ver párrafo anterior), P7-2 podría ser reclutada al viroplasma mediante la interacción con P6. Este resultado deberá ser confirmado en futuros experimentos con diferentes fusiones de ambas proteínas.

Es preciso estudiar más en profundidad las combinaciones capaces de colocalizar así como también confirmar las posibles interacciones mediante experimentos de FRET y/o otro tipo de técnicas como la coimmunoprecipitación. Si bien la colocalización de proteínas demostró ser una forma rápida y sencilla de detectar interacciones entre proteínas, las combinaciones evaluadas en estos experimentos son sólo unas pocas con respecto a la cantidad de combinaciones posibles entre las fusiones fluorescentes de las proteínas de MRCV disponibles. La continuación de este trabajo aportará más datos acerca de las interacciones que ocurren entre las proteínas del MRCV, lo que permitiría conectar funcionalmente a las mismas durante el ciclo infectivo.

4.2. Estudio del mecanismo de expresión de P5-2

Como se mencionó en la Introducción, el segmento S5 de MRCV contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF) parcialmente solapados (Figura 2.21A). A pesar de que se desconoce si el segundo ORF es traducido durante la infección, estudios bioinformáticos sugieren que el mismo es codificante. Asimismo, se ha propuesto que los mecanismos más probables de traducción del segundo ORF son a) el ingreso interno del ribosoma por medio de un IRES (sitio interno de entrada del ribosoma), b) la ocurrencia de un salto de marco de lectura o “frameshift” desde el primer ORF que conduciría a la síntesis de una proteína de fusión codificada por los dos ORFs o c) el desvío (“shunting”) del ribosoma que conduciría a comenzar la traducción en el codón ATG de inicio del segundo ORF (Firth y Atkins, 2009). Las proteínas P5-1 y P5-2 poseen un peso molecular estimado de 107 kDa y 29 kDa, respectivamente, mientras que una proteína generada por fusión de ambos ORFs tendría un peso molecular aproximado de 115 kDa. Para abordar experimentalmente el problema se decidió producir antiseros contra las proteínas P5-1 y P5-2 expresadas en bacterias y purificadas.

Se partió de vectores pRSET de expresión en bacterias que contienen los ORFs que codifican para las proteínas P5-1 o P5-2, fusionados en su extremo 5' a una secuencia nucleotídica que codifica para una cola de polihistidinas que facilitan su posterior purificación. Los pesos moleculares teóricos de las proteínas P5-1 y P5-2 recombinantes son de 111,7 kDa y 34,5 kDa, respectivamente. Se utilizaron los vectores descritos para transformar la cepa BL21 pLys de *E. coli* y ensayar diferentes condiciones de extracción y solubilización de las proteínas recombinantes.

Se observaron buenos niveles de acumulación de P5-1 recombinante a una temperatura de crecimiento de 37 °C e induciendo la expresión con 0,1 mM de IPTG durante 4 horas (Figura 2.18A), mientras que P5-2 se expresó abundantemente al inducir con 0,4 mM de IPTG y crecer a 37°C durante 3 horas (Figura 2.18B). Sin embargo, ninguna de las dos proteínas recombinantes logró ser recuperada de forma soluble, sino que se las detectó en la fracción insoluble conformando cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión lograron ser solubilizados con buffer GA-UREA 8M, obteniendo en ambos casos buenos rendimientos de proteína soluble y no nativa (Figura 2.18A y B). En el caso de P5-1 fue necesaria la separación de las proteínas solubles (TRIS-HCl pH 8 50 mM, EDTA 2 mM, Tritón

X-100 0,1 / , lisozima 100 µg/ml) antes de solubilizar del pellet la proteína recombinante formando cuerpos de inclusión; en cambio, la proteína P5-2 logró ser solubilizada con el tratado directo del pellet bacteriano con GA-UREA.

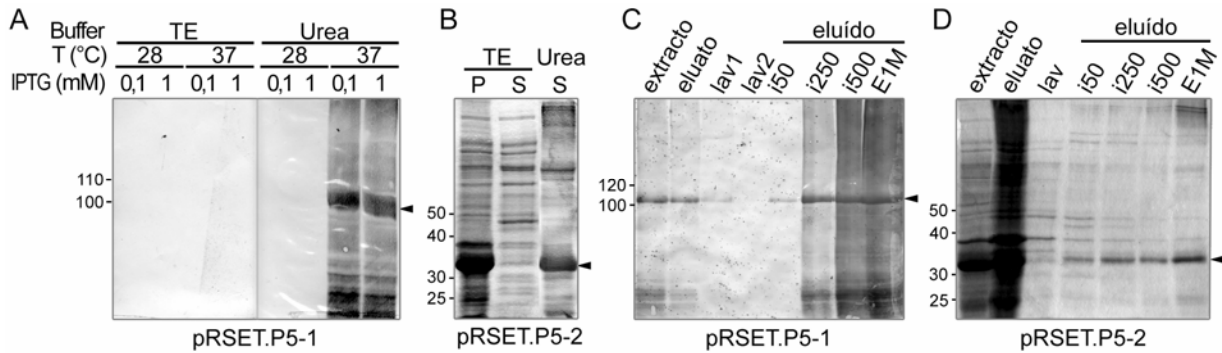


Figura 2.18. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes P5-1 y P5-2. (A) Se indujo la expresión de la proteína recombinante P5-1 (111,7 kDa) en *E. coli* con diferentes concentraciones de IPTG (0,1 y 1 mM) y a distintas temperaturas de crecimiento (28 y 37 °C) para luego realizar ensayos de solubilización en condiciones nativas (TE) o desnaturizantes (Urea). (B) Se sometió un extracto de *E. coli* expresando la proteína recombinante P5-2 (34,5 kDa) a solubilización en condiciones nativas (TE) o desnaturizantes (Urea) y luego se detectó la presencia de dicha proteína en el pellet (P) y sobrenadante (S) resultantes de cada tratamiento. (C) y (D) Se realizaron ensayos de purificación por cromatografía de afinidad con agarosa Ni-NTA de las proteínas recombinantes P5-1 y P5-2 solubilizadas. Se pasó por la columna cada fracción (extracto), se recuperaron las proteínas no adheridas a la columna (eluato), se lavó la columna (lav) y se eluyó con concentraciones crecientes de imidazol (i50, i250 e i500, que corresponden a una concentración de imidazol de 50, 250 y 500 mM) y finalmente con EDTA 1 M (E1M). La detección de P5-1 se realizó mediante SDS-PAGE seguida de “Western blot” con un anticuerpo anti-Xpress, mientras que P5-2 se detectó por tinción con azul de Coomassie. En todos los casos se indica a la izquierda la posición de estándares de peso molecular y con una flecha la posición de la proteína recombinante.

Posteriormente se procedió a la expresión y extracción de las proteínas recombinantes utilizando el procedimiento optimizado para cada caso pero en mayor escala, a partir de cultivos bacterianos de 100 ml. Se separó una muestra de cada extracto obtenido, con las cuales se realizaron ensayos de purificación en pequeña escala por cromatografía de afinidad a columnas de agarosa Ni-NTA. Para eluir las proteínas, se utilizó buffer GA-UREA con concentraciones crecientes de imidazol y con EDTA 1M para la elusión final. En ambos casos se observó que 250 mM de imidazol es una concentración apropiada para eluir las proteínas recombinantes (Figura 2.18 C y D). Utilizando las condiciones ajustadas en los ensayos de purificación, se procedió a purificar las proteínas recombinantes en gran escala a partir de los extractos obtenidos previamente. Las proteínas purificadas fueron cuantificadas comparándolas con patrones de BSA de concentración conocida.

Para preparar el material de inmunización de conejos, las fracciones conteniendo las proteínas purificadas por cromatografía se separaron en un gel de poliacrilamida, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se tiñeron con rojo Ponceau para revelar la posición de las proteínas recombinantes en la membrana. Este material se guardó hasta la inmunización de conejos.

Debido a que se logró obtener un mejor rendimiento de purificación con la proteína P5-2, se decidió proceder en primera instancia a la inmunización de conejos con esta proteína solamente. Para ello se recortó la zona de las membranas conteniendo la proteína P5-2 recombinante y se enviaron al servicio de la empresa Pan American Vet labs para la inmunización de 2 conejos, empleando 100 ng de proteína pura en una inyección inicial y en cada uno de los cuatro “boosters” posteriores (500 ng totales).

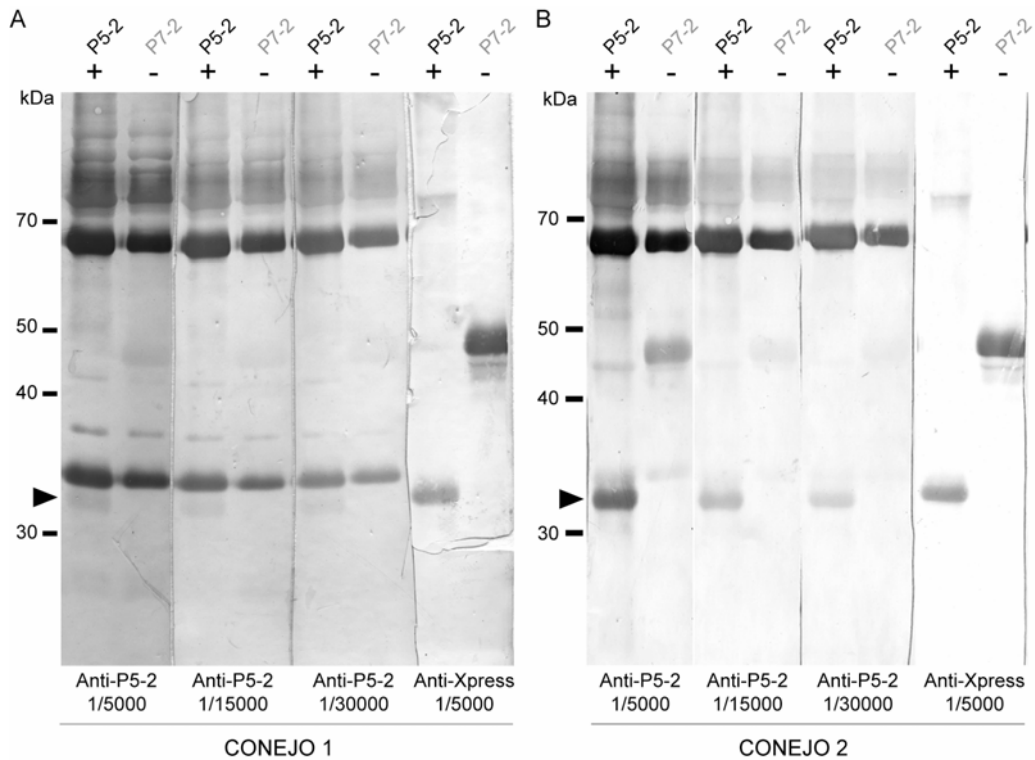


Figura 2.19. Ensayo de los antiseros policlonales contra P5-2. Los antiseros obtenidos por inmunización de dos conejos (conejos 1 y 2) fueron empleados para realizar ensayos de inmunodetección de la proteína recombinante P5-2. Se separó un extracto de *E. coli* que expresa P5-2 por SDS-PAGE y se inmunodetectaron las proteínas recombinantes por “Western blot” con diferentes diluciones de los sueros anti-P5-2. Como control negativo, el mismo procedimiento fue llevado a cabo con un extracto de *E. coli* que expresa una P7-2 recombinante. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-Xpress como control positivo para revelar la posición de las proteínas recombinantes. Se indica con una flecha la posición de la proteína P5-2 recombinante.

A continuación se evaluaron diferentes diluciones de los antiseros en su capacidad de detectar la proteína recombinante P5-2 con la cual se inmunizó. Para ello, se realizó un “Western blot” sobre extractos proteicos de bacterias que expresan la proteína recombinante P5-2, o P7-2 (43 kDa aproximadamente) como control negativo, empleando diluciones 1/5000, 1/15000 y 1/30000 de los antiseros de ambos conejos y revelando con un anticuerpo anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina. Como control positivo se realizó una inmunodetección de las proteínas recombinantes P5-2 y P7-2 presentes en los extractos empleando el anticuerpo comercial Anti-Xpress. Se observó que aunque el antisuero resultante de la inmunización del conejo número 1 fue capaz de detectar la proteína recombinante P5-2, lo hizo con muy baja afinidad y especificidad aparente, detectando

inespecíficamente numerosas proteínas bacterianas (Figura 2.19A). Por otro lado, el antisuero proveniente de la inmunización del conejo 2 logró detectar la proteína recombinante P5-2 con mayor afinidad, aunque también se observó un alto grado de inespecificidad. Este suero también fue capaz de inmunodetectar a la proteína recombinante P7-2 probablemente debido a una reacción contra la cola de polihistidinas y/o el epítipo Xpress, secuencia también presente en la proteína recombinante P5-2 (Figura 2.19B). Esto fue inesperado ya que la cola de histidinas no suele ser inmunogénica. Se decidió continuar utilizando solamente el antisuero del conejo 2 por su mejor afinidad por la proteína P5-2.

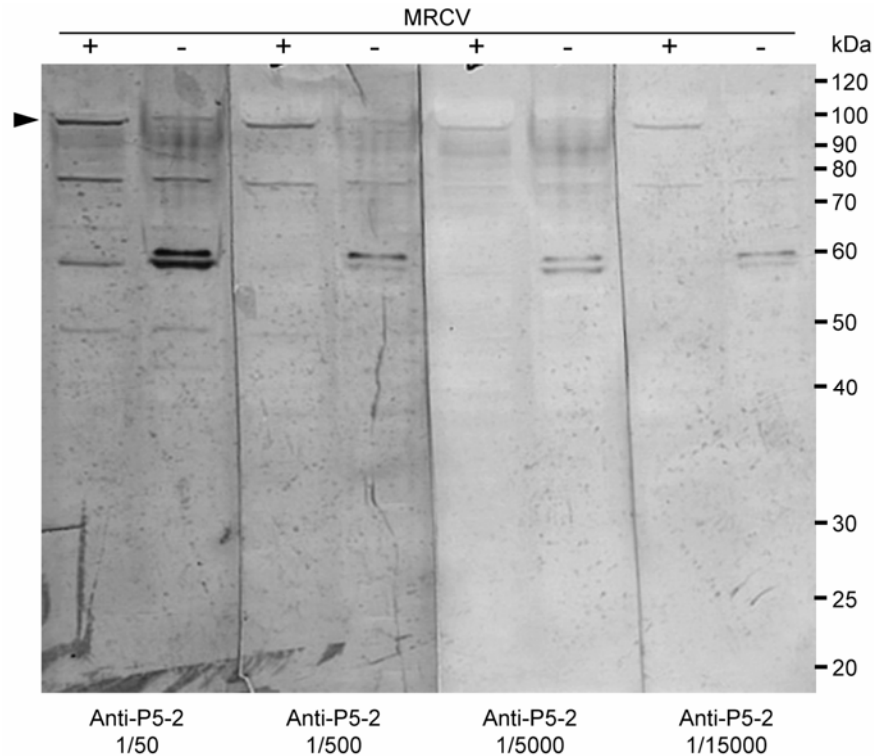


Figura 2.20. Inmunodetección de P5-2 en plantas infectadas con MRCV. Se realizaron inmunodetecciones de P5-2 (28,9 kDa) mediante “Western blot” en extractos crudos de maíz infectado (+) o no (-) con MRCV, utilizando diferentes diluciones del suero anti-P5-2 del conejo 2. Se indica con una flecha una banda de aproximadamente 100 kDa detectada diferencialmente en el extracto de maíz infectado con MRCV.

No se logró observar ninguna banda diferencial en el peso esperado para la proteína P5-2 (28,9 kDa) en los extractos de planta infectada con MRCV. Sin embargo, además de la presencia de bandas inespecíficas en ambos extractos, se detectó una banda de aproximadamente 100 kDa presente en los extractos de plantas infectadas con MRCV que podría corresponder a la proteína de fusión que hipotéticamente se generaría por “frameshift” entre los dos ORF (Figura 2.20). Dicha banda fue detectada por todas las diluciones del antisuero, y su detección no disminuyó proporcionalmente al diluir el antisuero (como sí sucedió con las demás bandas) lo cual sugiere que podría tratarse de una reacción específica. Debido a que el suero detecta bandas inespecíficas, se planea a futuro purificar

el suero utilizando una columna de afinidad en base a P5-2. Para construir dicha columna, se utilizará proteína P5-2 recombinante expresada en bacterias y purificada para conjugar a una resina de sefarosa 4B CNBr-activada. Con el antisuero purificado, se intentará nuevamente inmunodetectar la proteína P5-2 en extractos de maíz infectados con MRCV. Si se obtienen buenos resultados, se procederá a realizar también inmunomicroscopía electrónica en hojas de maíz infectado con MRCV para analizar la distribución de P5-2 durante la infección. Una vez que se obtengan buenos resultados con el suero purificado de P5-2, se continuará desarrollando el suero anti-P5-1.

En segundo lugar, y dado los resultados no concluyentes obtenidos con el suero policlonal anti-P5-2 desarrollado, se decidió cambiar de estrategia por una más simple. Para ello, se construyó un vector que expresa el segmento bicistrónico recombinante conteniendo una versión de P5-2 fusionada a un epítopo V5-His por el extremo carboxilo terminal. La construcción fue secuenciada para controlar su correcto ensamblaje. De esta manera, al expresar esta construcción en células de insecto e inmunodetectar la versión recombinante de P5-2 mediante un antisuero contra el epítopo V5-His, el tamaño de la proteína detectada indicaría si P5-2 es expresada independientemente de P5-1 mediante un IRES ubicado río arriba del segundo ORF (Figura 2.21B) o si forma parte de una proteína de fusión traducida por un mecanismo de “frameshift” (Figura 2.21C).

Se expresó transitoriamente la construcción recombinante en células Sf9, luego de 72 h se realizó un extracto de proteínas totales y se inmunodetectó mediante “Western blot” utilizando un antisuero comercial contra el epítopo V5-His. No fue posible detectar ninguna banda que contuviera el epítopo utilizado (resultados no mostrados).

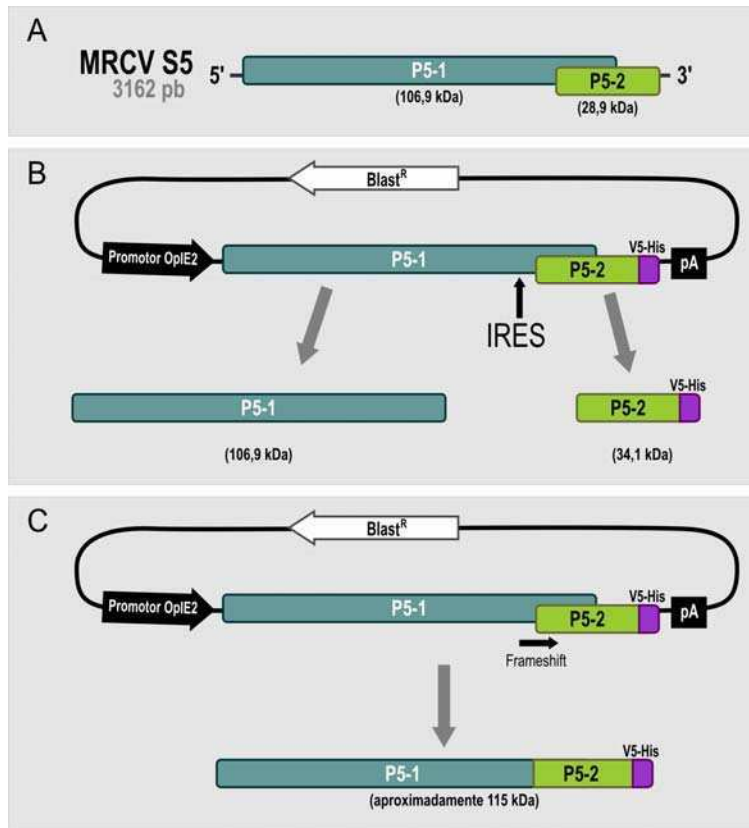


Figura 2.21. Vector recombinante para estudiar la expresión in vivo del segundo ORF del segmento S5. **A:** Esquema del segmento genómico S5 completo (3162 pb). **B y C:** Se desarrolló un vector recombinante con una porción del segmento S5, que contiene a los dos ORF superpuestos en diferentes marcos de lectura, al cual se le fusionó un epítopo V5-His en el extremo 3' en marco con el segundo ORF del segmento. La estrategia fue diseñada para poder diferenciar si la traducción del segundo ORF se realiza a través de un IRES interno presente en el segmento (**B**) o si ocurre un evento de salto de la polimerasa o "frameshift" desde el marco de lectura del primer ORF hacia el marco de lectura del segundo ORF produciendo una proteína de fusión (**C**). Se indican los pesos aproximados esperados para las proteínas recombinantes en cada uno de los dos casos.

Ya que la falta de detección de la proteína recombinante puede deberse a bajos niveles de expresión resultantes de una baja eficiencia de transfección, se optó por obtener una línea establemente transformada con el vector empleando el antibiótico blasticidina como agente de selección. Paralelamente, se utilizó el vector pIB-P5-2 para obtener una línea establemente transformada que expresa la proteína P5-2/V5 para ser utilizada como control de comparación si el segundo ORF del segmento S5 es expresado independientemente (Figura 2.21B). Asimismo, se utilizó el vector de expresión de la fusión fluorescente GFP:P9-2 como control positivo, ya que su expresión puede observarse al microscopio y por "Western blot" mediante anticuerpos comerciales contra GFP. Luego, se amplificaron las líneas obtenidas y se intentó inmunodetectar las proteínas recombinantes mediante "Western blot" utilizando un antisuero comercial contra el epítopo V5/His (o GFP en el caso del control positivo). Tampoco fue posible detectar bandas en los extractos proteicos de la línea establemente transformada. Incluso, aprovechando la presencia de la cola de histidinas, se intentó concentrar la proteína recombinante presente en los extractos obtenidos por ambas estrategias mediante cromatografía de afinidad con agarosa Ni-NTA. Nuevamente, no se logró detectar presencia alguna de proteína recombinante en las fracciones eluidas de la resina.

La imposibilidad de detectar proteína recombinante al transfectar (transitoriamente y establemente) el vector en células Sf9 probablemente sea causa de una muy baja expresión de la misma. Si bien la estrategia podría ser efectiva para determinar el mecanismo de expresión de P5-2, es necesario elevar los niveles de expresión de la construcción recombinante.

CAPÍTULO III

2. Objetivos

Objetivo General

Definir el rol funcional de la proteína P9-1 de MRCV durante la infección.

Objetivos Particulares

- a)** Expresión en bacterias y purificación de una versión recombinante de P9-1 en forma nativa.
- b)** Analizar la capacidad de auto interacción de P9-1.
- c)** Analizar la afinidad de P9-1 recombinante por ácidos nucleicos de cadena simple.
- d)** Analizar la capacidad de P9-1 recombinante de hidrolizar de ATP.
- e)** Delimitar la ubicación de dominios de P9-1 importantes para la formación de estructuras similares a VIBs en células de insecto.

3. Métodos

3.1. Construcción de vectores

Las especificaciones de las técnicas comunes de biología molecular y el sistema de clonado Gateway fueron detalladas en las secciones 3.1 y 3.2 del Capítulo II.

El vector pRSET-9.1, para expresión de P9-1 en *E. coli*, fue construido aislando la secuencia codificante de la proteína P9-1 sin el codón de iniciación a partir del vector pGemT-S9.1 (Mongelli, 2010) usando las enzimas *Pst*I, Klenow y *Nco*I, sucesivamente, e introduciendo el fragmento obtenido en el vector pRSETa tratado sucesivamente con *Hind*III, Klenow y *Nco*I. Para corroborar el correcto ensamblaje del marco de lectura, el vector construido fue secuenciado automáticamente en el Servicio de Secuenciación y Genotipificación del CICV, INTA-Castelar.

Para la construcción de las mutantes por delección de P9-1, se amplificaron por PCR fragmentos parciales de la secuencia codificante de dicha proteína usando los pares de oligonucleótidos pS9.1-up-s/atg (5' GCAGACCTAGAACGGAGAAC 3') y pS9.1ΔC-R-c/stop (5' TCAACGAACGATTTTTGCTGGTAAC 3'), pS9.1-up (5' AATGGCAGACCTAGAACGGA 3') y pS9.1ΔC-R (5' ACGAACGATTTTTGCTGGTAAC 3'), pS9.1ΔN-F (5' GTTCGTGAACTACCATTATTG 3') y pS9.1-low (5' TCAGAGTCACATAAAATAGAC 3'), y pS9.1ΔN-F-c/atg (5' ATGGTTCGTGAACTACCATTATTG 3') y pS9.1-low-s/stop (5' AACGTCTAATTTCAAGAAGA 3'). Las secuencias amplificadas fueron clonadas en el vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, E.E.U.U.) para obtener los vectores de entrada pTg-P9-1ΔC s/ATG, pTg-P9-1ΔC s/STOP, pTg-P9-1ΔN s/ATG y pTg-P9-1ΔN s/STOP, respectivamente.

Luego, se recombinaron pTg-P9-1ΔC s/STOP y pTg-P9-1ΔN s/STOP con el vector de destino pIB-V5/His-DEST (Invitrogen, E.E.U.U.) para obtener los plásmidos pIB-P9-1ΔC y pIB-P9-1ΔN, y con el vector de destino pIB-WG (ver sección 4.1.2 del Capítulo II) para obtener los plásmidos pIB-P9-1ΔC-G y pIB-P9-1ΔN-G. De la misma manera, pTg-P9-1ΔC s/ATG y pTg-P9-1ΔN s/ATG fueron utilizados para recombinar con el vector de destino pIB-GW (ver sección 4.1.2 del Capítulo II), obteniendo los plásmidos pIB-G-P9-1ΔC y pIB-G-P9-1ΔN.

3.2. Expresión de P9-1 recombinante en bacterias y purificación

El vector pRSET-P9-1 fue introducido en las cepas de *E. coli* BL21, BL21 pLys y BL21 pG-KJE8, y los clones obtenidos se utilizaron en las posteriores ensayos de expresión que se realizaron de manera similar a lo detallado en la sección 3.6 de Capítulo II.

La expresión y extracción de la proteína P9-1 recombinante nativa a gran escala se realizó partiendo de un volumen de cultivo de 200 ml inoculado con 10 ml de un cultivo saturado de *E. coli* BL21 pLys transformada con pRSET-P9-1. Se dejó crecer a 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 0,6, se agregó IPTG a una concentración final de 0,1 mM para inducir la expresión y se dejó creciendo a 28 °C durante toda la noche. Luego, el cultivo fue centrifugado en frío durante 15 minutos a 4000 g y el pellet resultante fue resuspendido en 20 ml de buffer TE (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8). Para lisar las bacterias se agregó 2 ml de Tritón X-100 0,1% , y lisozima a una concentración final de 100 μg/ml, se incubó a 30 °C por 15 minutos y luego se sonicó en

tres intervalos de 20 segundos usando un sonicador Branson Sonifier 250 (Branson Instruments Co., E.E.U.U.). Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 12000 g en frío y el sobrenadante fue recuperado.

Para purificar la proteína recombinante, se fraccionó el extracto mediante precipitación con sulfato de amonio a 4 °C. Se realizó una primera precipitación con sulfato de amonio al 20% para insolubilizar los restos celulares contaminantes y el sobrenadante se sometió a una segunda precipitación con sulfato de amonio al 60% para concentrar las proteínas totales en el pellet. Luego de resuspender las proteínas, se desaló y realizó un cambio de buffer por filtración molecular con Sephadex G-25 (Sigma Chemical Co., E.E.U.U.), recuperando las proteínas en buffer TE pH=8. A continuación, se fraccionó por cromatografía de intercambio aniónico con resina DEAE Sephacel (GE Healthcare, Reino Unido) eluyendo con concentraciones crecientes de NaCl. La fracción eluída con 500 mM NaCl (conteniendo la proteína MRCV P9-1) fue nuevamente desalada por filtración molecular para evitar que la elevada concentración de NaCl interfiera con el siguiente paso. Finalmente, se realizó una cromatografía de afinidad en columna con agarosa Ni-NTA (QIAGEN, Alemania), lavando con 5 volúmenes de TRIS-HCl 50 mM (pH 8) y eluyendo con imidazol 250 mM. La proteína P9-1 purificada fue concentrada por ultrafiltración con un cartucho Centriplus YM-30 (Amicon, E.E.U.U.), fraccionada y guardada en agua a -20 °C.

En los ensayos de multimerización, la proteína purificada se diluyó ¼ en buffer de carga de proteínas 4X (TRIS-HCl 200 mM (pH 6,8), SDS 8% , glicerol 50% , azul de bromo fenol 0,4%) con o sin 2-mercaptoetanol al 2% , se separó por SDS-PAGE y se reveló por “Western blot” como se explicó más arriba.

3.3. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

La sonda de ARN de 209 nucleótidos de longitud, de secuencia idéntica a la porción que va de la posición 1595 a 1798 de la hebra sentido del segmento S10 de MRCV (GenBank: AY607586), fue sintetizada por transcripción *in vitro* con el kit SP6 MEGAScript (Ambion, E.E.U.U.) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El templado para la síntesis del ARN fue un producto de PCR amplificado a partir de ADNc del segmento S10 de MRCV previamente clonado (Distéfano y col., 2005), y purificado usando el kit Illustra™ Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido), usando los oligonucleótidos 3'S10-RV (5'-GACAATATCTGCATTTCCCCTAGCC -3') y SP6-3'S10-FW (5'-ATTTAGGTGACACTATAGATAGGCTTACTAAAAGTATAC -3'; promotor SP6 subrayado). Se agregó 500 ng de este templado, 1 µl de [α -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, New England Nuclear, E.E.U.U.) y 2 U/µl de RNaseOUT (Invitrogen, E.E.U.U.) a la reacción y se incubó toda la noche a 37°C. El ARN sintetizado fue separado de los nucleótidos no incorporados usando columnas Micro Bio-Spin™ columns (BioRad, E.E.U.U.) y posteriormente purificado por extracción con fenol-cloroformo seguida de precipitación con isopropanol. Como sonda de ADN se utilizó un oligonucleótido de 30 nucleótidos de longitud de secuencia no relacionada (empleado para amplificar una región genómica de girasol) conjugado al fluoróforo HEX en su extremo 5' (Alpha DNA, E.E.U.U.).

Para los ensayos de EMSA con ARN, se incubaron 0,1 nmoles de la sonda radiactiva de ARN con diferentes concentraciones de P9-1 recombinante purificada en buffer de reacción (TRIS-HCl 10 mM (pH 7,5), KCl 50 mM, glicerol 10 / , DTT 1 mM, 2 U/μl de RNaseOUT) en un volumen final de 20 μl. Se dejó reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente, se mezcló con buffer de carga y se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida (acrilamida 5 /) TRIS-borato EDTA (TBE) a 150 V. Finalmente se transfirió a un papel de filtro y se visualizó por autoradiografía (Typhoon Imaging Scanner, GE Healthcare, Reino Unido).

Los experimentos de EMSA con ADN se realizaron de manera similar, pero en presencia de 6 μmoles de la sonda fluorescente. Luego de la electroforesis, el gel fue escaneado para revelar la posición de la sonda empleando el láser y filtros de fluorescencia adecuados (Typhoon Imaging Scanner, GE Healthcare, Reino Unido). Posteriormente el gel fue teñido con azul de Coomassie, transferido a papel de filtro, deshidratado durante dos horas a 80 °C sobre papel Whatman 3MM en una secadora Bio-Rad 543 y fotografiado.

3.4. Ensayos de hidrólisis de ATP

Para los ensayos semicuantitativos de medición de la actividad ATPasa, se mezcló 1 μg de P9-1 recombinante purificada con 2 mCi de [α-32P]ATP (3000 Ci/mmol, New England Nuclear, E.E.U.U.) en 20 mM TRIS-HCl (pH 8) en un volumen final de 10 μl. Luego de incubar 1 h a 37°C, las reacciones fueron desproteinizadas mediante extracción con fenol:cloroformo. Se sembraron 2 μl de la fase superior acuosa en placas TLC de PEI-Celulosa (Merck, Alemania), y los productos de reacción fueron separados desarrollando con una fase móvil ascendente (ácido fórmico 1 M, LiCl 0,5 M). Una vez finalizada la corrida, las placas se dejaron secar y se revelaron por autoradiografía (Typhoon Imaging Scanner, Amersham, Reino Unido). Se utilizó como control positivo 1 U de fosfatasa alcalina intestinal de cabra (CIP, Promega, E.E.U.U.) y como control negativo 1 μg de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma Chemical Co., E.E.U.U.). En los ensayos con cationes divalentes, se agregó MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂ o ZnCl₂ hasta una concentración final de 10 mM.

La cuantificación de la actividad ATPasa se realizó a temperatura ambiente siguiendo la liberación de [γ-32P]Pi del [γ-32P]ATP (3000 Ci/mmol, New England Nuclear, E.E.U.U.) de acuerdo a un protocolo previamente descrito (Schwarzbaum y col., 1995). Los ensayos se llevaron a cabo en buffer de reacción (imidazol 20 mM, KCl 100 mM, MnCl₂ 100 μM, EGTA 100 μM, pH 7,5) conteniendo 100 μM ATP y 0,15 μg/μl de P9-1 recombinante purificada, en un volumen final de 100 μl. Se incubó la misma reacción pero sin agregado de proteína como control de hidrólisis espontánea de ATP.

Los datos experimentales obtenidos se utilizaron para ajustar la siguiente ecuación por regresión no lineal:

$$Y = Y_0 + A(1 - e^{-kt})$$

Donde “Y” y “Y₀” son valores de Pi libre a cualquier tiempo (t) y a tiempo t = 0, respectivamente; “A” representa el valor máximo para el aumento de Y en el tiempo, y “k” es una constante cinética. Los parámetros con mejor ajuste obtenidos de la regresión fueron

usado para calcular la tasa inicial de actividad ATPasa (denominada V_i) como $k \cdot A$ (la primer derivada de la ecuación detallada, cuando t tiende a 0).

3.5. Localización subcelular y microscopía de fluorescencia

El manejo de células Sf9, transfección y estudios de localización subcelular por inmunofluorescencia y en células vivas, se llevó a cabo como se detalló en las secciones 3.4, 3.5 y 3.6 del Capítulo II.

3.6. Análisis de interacción por Transferencia de Energía de Resonancia Föster (FRET).

Los vectores para expresar las fusiones fluorescentes CFP:P9-1 y P9-1:YFP utilizadas para realizar el FRET se construyeron como se detalló en la sección 3.3.4 del Capítulo II. La expresión de CFP y YFP se realizó utilizando los vectores pIB-CW y pIB-YW, respectivamente (ver sección 3.3.2 del Capítulo II).

Los cálculos de FRET se realizaron por el método de Emisión Sensibilizada del Aceptor empleando el plugin FRET Analyzer del software ImageJ (Hachet-Haas y col., 2006). Todas las imágenes fueron adquiridas usando parámetros del microscopio idénticos (Zoom, potencia del láser, ganancia del detector, velocidad de escaneo, ventanas de detección) y los cálculos se realizaron ajustando la región de interés (ROI) a las células estudiadas. La corrección de solapamiento de espectros o “bleed-through” se realizó usando imágenes de células expresando sólo el donador (CFP) y sólo el aceptor (YFP).

4. Resultados y discusión

Los viroplasmos o cuerpos de inclusión virales (VIBs) son estructuras citoplasmáticas que se observan durante la replicación de virus pertenecientes a la familia *Reoviridae*. La composición y dinámica de la formación de viroplasmos han sido estudiadas en detalle en reovirus animales pertenecientes a los géneros *Rotavirus*, *Orbivirus* y *Orthoreovirus*, lo que ha aportado enormemente al conocimiento de los pasos claves en la infección viral (Becker y col., 2001; Brookes y col., 1993; Gonzalez y col., 2000; Wei y col., 2006c). Se ha determinado que la matriz proteica que sirve como andamiaje para los viroplasmos está compuesta por sólo una o dos proteínas no estructurales que son capaces de formar cuerpos de inclusión similares a VIBs cuando son sobreexpresadas a partir de un transgén en células en cultivo. En el caso de los *Orbivirus* y *Orthoreovirus* tales estructuras pueden ser formadas por una única proteína: NS2 y μ NS, respectivamente (Broering y col., 2002; Thomas y col., 1990). En *Rotavirus* se requiere la presencia simultánea de las proteínas NSP2 y NSP5 y su interacción, para observar la formación de estructuras similares a VIBs (Fabbretti y col., 1999). Comparativamente, se conoce mucho menos en los géneros de reovirus capaces de infectar plantas y que son transmitidos propagativamente por insectos. Dentro de éste grupo de reovirus, el género *Phytoreovirus* es el más profundamente estudiado en parte gracias a la disponibilidad de células de insecto hospedante en cultivo en las cuales estos virus replican. Así, se determinó que la proteína Pns12 de RDV nuclea la formación de los viroplasmos y, al igual que en reovirus animales, es capaz de formar estructuras similares a VIBs al ser expresada individualmente (Wei y col., 2006c). En el caso del género *Fijivirus*, que ha sido pobremente estudiado, se ha observado que las proteínas P9-1 de MRCV y RBSDV inmunolocalizan en viroplasmos de insectos y plantas infectados (Guzmán y col., 2010; Isogai y col., 1998a).

Como se mostró en la sección 4.1 del Capítulo II y se resume en la Figura 3.1, la proteína P9-1 de MRCV expresada en células de insecto es capaz de establecer cuerpos de inclusión citoplasmáticos similares a VIBs (Figura 3.1A y C). De acuerdo con esto, Zhang y col. (2008) demostraron recientemente que la proteína P9-1 de RBSDV es capaz de formar estructuras similares a VIBs al ser expresada como fusión a GFP en protoplastos de *Arabidopsis*. Estos resultados sugieren que la proteína P9-1 de *Fijivirus* sería un componente principal de los viroplasmos formados durante la infección. Por lo tanto, se decidió investigar más profundamente las propiedades funcionales y bioquímicas de la proteína P9-1 de MRCV para establecer si comparte otras características con proteínas mayoritarias de viroplasma de reovirus animales.

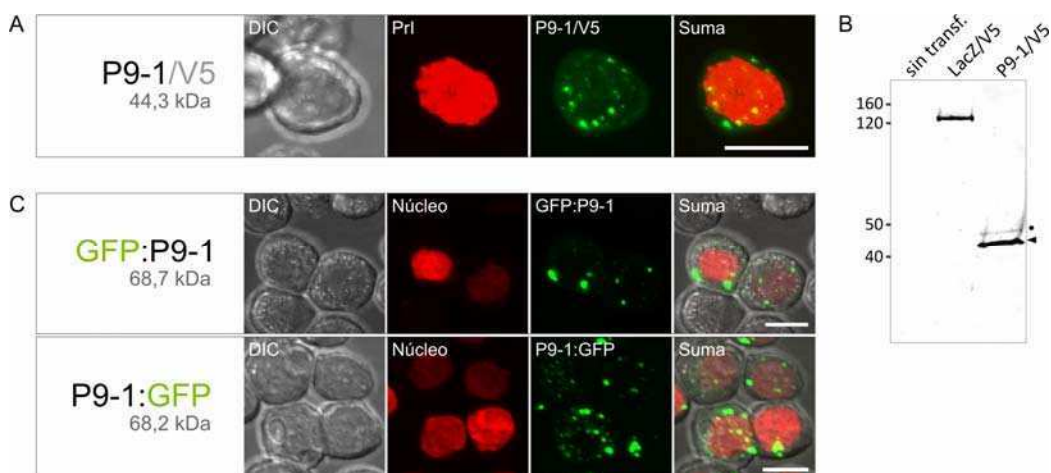


Figura 3.1. Localización subcelular de la proteína P9-1. (A) Localización subcelular de la proteína P9-1 fusionada al epítipo V5 (P9-1/V5) y revelada por inmunofluorescencia sobre células cuyos núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (PrI). (B) Detección de la proteína P9-1/v5 (44,3 kDa) expresada en células Sf9 por “Western blot” con un anticuerpo Anti-V5. Se expresó LacZ/V5 como control positivo, o células no transfectadas (sin transf.) como control negativo. Se señala con una flecha la posición de la proteína esperada y con un punto una variante de mayor peso molecular (C) P9-1 fue fusionada a GFP por ambos extremos (P9-1:GFP y GFP:P9-1) y colocalizada con el marcador de núcleo LMNA1:mCherry. En (A) y (C) se muestran, de izquierda a derecha, proyecciones máximas de las muestras bajo luz blanca en modo DIC, el marcador de núcleo, la fusión fluorescente estudiada y la superposición de todas las imágenes anteriores (suma). Las barras blancas corresponden a 10 μ m.

4.1. Expresión y purificación de P9-1 en bacterias

Se construyó el vector pRSET-P9-1 para expresar una versión recombinante de P9-1 fusionada a en su extremo 5' a una cola de polihistidinas y al epítipo Xpress (6xHis/Xpress) en *E. coli*. Para optimizar las condiciones de expresión se evaluaron diferentes cepas de bacterias, concentraciones de inductor, temperaturas y tiempos de inducción. Las cepas bacterianas evaluadas fueron la BL21 (comunmente utilizada para sobreexpresión inducible de proteínas debido a que expresa la ARN polimerasa del fago T7, el represor lacI^q y posee versiones defectivas de las proteasas *lon* y *ompT*) (Studier y Moffatt, 1986), BL21 pLys (cepa BL21 transformada con el plasmido pLysS que codifica para la lisozima del fago T7 que inhibe a la polimerasa T7) y BL21 pG-KJE8 (cepa BL21 que contiene el plásmido pG-KJE8 que codifica para diversas chaperonas que auxilian el plegamiento protéico). Se determinó que empleando la cepa BL21 pLys (Figura 3.2A) e induciendo la expresión con 0,1 mM de IPTG a 28 °C durante toda la noche, se obtienen altos niveles de expresión de la proteína P9-1 recombinante en forma nativa (Figura 3.2B). Posteriormente se realizó un ensayo de purificación por cromatografía de afinidad empleando una resina de agarosa Ni-NTA, con el objetivo de confirmar la presencia del epítipo 6xHis/Xpress y determinar la concentración de imidazol adecuada para eluir la proteína recombinante. Se observó que la mayor proporción de P9-1 recombinante eluye con imidazol 250 mM (Figura 3.2C).

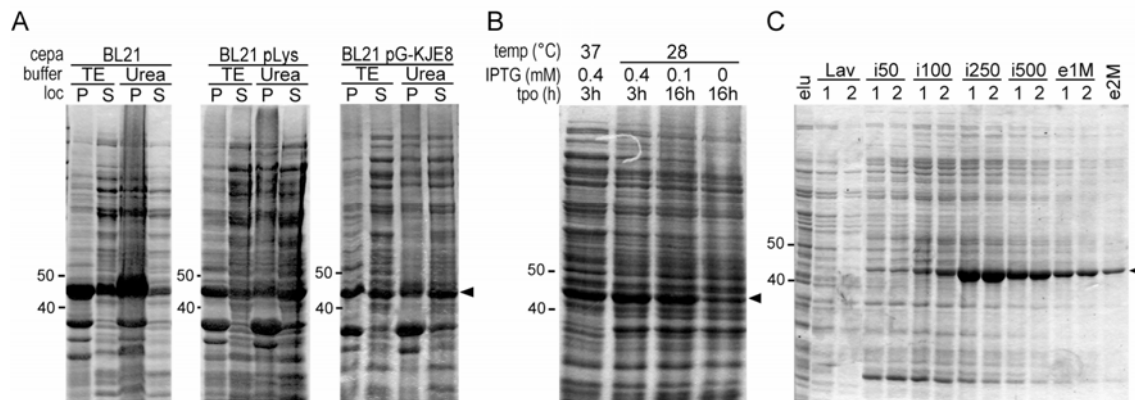


Figura 3.2. Ensayos de expresión en bacterias y purificación de la proteína recombinante P9-1. (A) Se introdujo el vector pRSET-P9-1 en tres cepas diferentes de *E. coli*, se indujo la expresión de la proteína recombinante P9-1 (44,9 kDa), se extrajeron las proteínas totales de las bacterias solubilizando en condiciones nativas (TE) o desnaturalizantes (Urea) y luego se detectó la presencia de P9-1 (flecha) en los pellets (P) y sobrenadantes (S) resultantes de cada tratamiento. (B) Se analizó la expresión de P9-1 en BL21 pLys induciendo con diferentes concentraciones de IPTG, temperaturas de crecimiento (temp) y tiempos de inducción (tpo), según se indica en la figura. Luego se detectó la presencia de P9-1 (flecha) en el sobrenadante de un extracto nativo. (C) Se realizó un ensayo de purificación de P9-1 recombinante (flecha) expresada en BL21 pLys (inducción con 0,1 mM de IPTG y durante 16h a 28 °C) mediante cromatografía de afinidad con agarosa Ni-NTA. Se muestran las proteínas no adheridas a la columna (elu) y las fracciones resultantes del lavado (lav) y del eluido con imidazol 50 mM (i50), 100 mM (i100), 250 mM (i250), 500 mM (i500), y con EDTA 1M (E1M) y EDTA 2M (E2M). En todos los casos se indica la posición de marcadores de peso molecular a la izquierda.

A continuación, se realizó una expresión y extracción de P9-1 recombinante a gran escala utilizando las condiciones óptimas determinadas previamente. Debido a que se detectaron bandas espúreas en las fracciones eluidas durante el ensayo de purificación (Figura 3.2C), se decidió utilizar un protocolo de purificación más exhaustivo. En primer lugar, se limpió y concentró el extracto proteico conteniendo la proteína recombinante por precipitación con sulfato de amonio. Posteriormente, el concentrado fue fraccionado por cromatografía de intercambio aniónico y luego se sometió la fracción conteniendo a P9-1 a una cromatografía de afinidad con agarosa Ni-NTA (Figura 3.3A). Finalmente, la proteína recombinante P9-1 pura fue concentrada por ultrafiltración y cuantificada por comparación con patrones de BSA de concentración conocida y mediante el método de Bradford (Figura 3.3B). No se pudo lograr una concentración mayor a 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ya que la proteína precipitaba en el filtro del cartucho de ultrafiltración. Esto podría deberse a que el medio utilizado (agua bidestilada pH=7,5) no es el adecuado para P9-1, lo que hace necesario ensayar diferentes condiciones de almacenamiento para futuros experimentos.

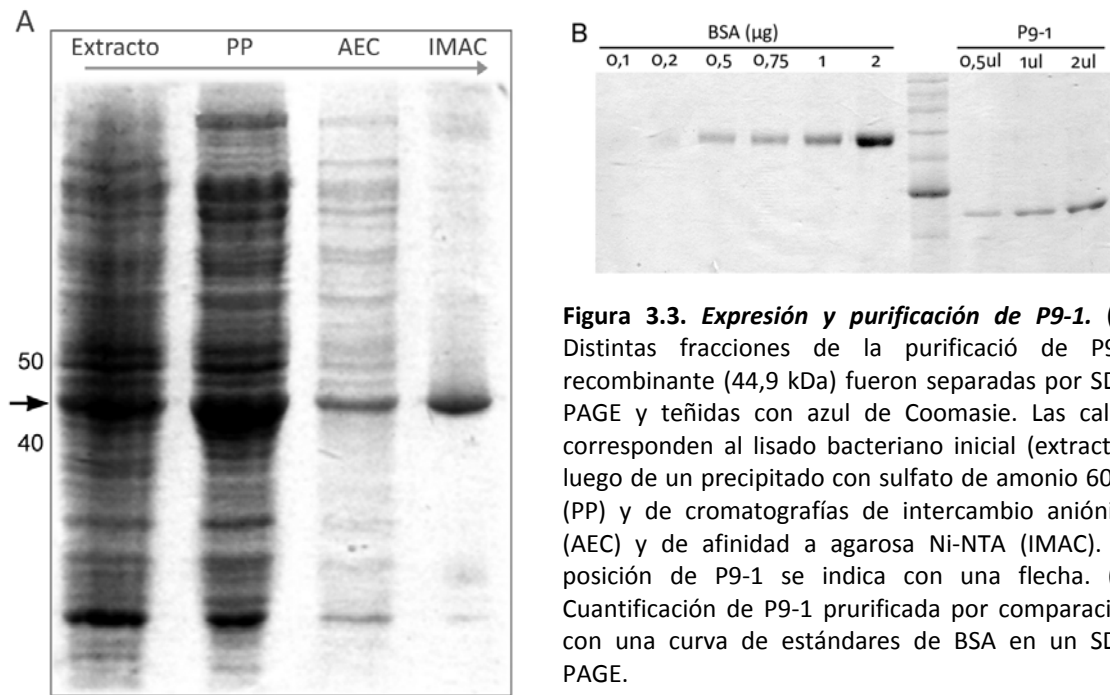


Figura 3.3. Expresión y purificación de P9-1. (A) Distintas fracciones de la purificación de P9-1 recombinante (44,9 kDa) fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. Las calles corresponden al lisado bacteriano inicial (extracto), luego de un precipitado con sulfato de amonio 60% (PP) y de cromatografías de intercambio aniónico (AEC) y de afinidad a agarosa Ni-NTA (IMAC). La posición de P9-1 se indica con una flecha. (B) Cuantificación de P9-1 purificada por comparación con una curva de estándares de BSA en un SDS-PAGE.

4.2. P9-1 autointeractúa *in vivo*, asociándose en complejos de alto peso molecular

Las proteínas mayoritarias del viroplasma son capaces de formar una matriz proteica que nuclea las fábricas virales donde ocurre la replicación y ensamblado. Para llevar adelante esta función es fundamental que estas proteínas sean capaces de autoasociarse formando multímeros. Efectivamente, mediante cristalografía de rayos X se ha determinado que la proteína NSP2 de Rotavirus forma octaméros (Schuck y col., 2001) y se ha propuesto un modelo decamérico para la proteína BTV NS2 (Mumtsidu y col., 2007). También ha sido demostrada la formación de homo oligómeros por la proteína μ NS de *Orthoreovirus* (Brandariz-Nunez y col., 2010). Por lo tanto, si la proteína P9-1 de MRCV es el componente mayoritario de viroplasmata, es altamente probable que posea la capacidad de multimerizar.

Para determinar si las bandas de alto peso molecular observadas al expresar la proteína P9-1 en bacterias eran resultado de una agregación inespecífica o de formas homomultiméricas, se realizó un tratamiento con 2-mercaptoetanol, un fuerte agente reductor que rompe los puentes disulfuro que suelen mantener la estructura tridimensional de las proteínas (Stryer, 1995), tomando la precaución de no hervir la muestra para evitar la agregación por desnaturalización. Por medio de "Western blot", se observó que el tratamiento con este compuesto reductor al 2% provoca la desaparición de las bandas de alto peso molecular y el aumento de concentración de la forma monomérica de P9-1 recombinante, algo que no ocurrió con la proteína no relacionada MSA-2c que se empleó como control negativo (Figura 3.4A). Estos resultados indican que la proteína P9-1 es capaz de autoasociarse formando complejos estables de alto peso molecular dependientes de la presencia de puentes disulfuro.

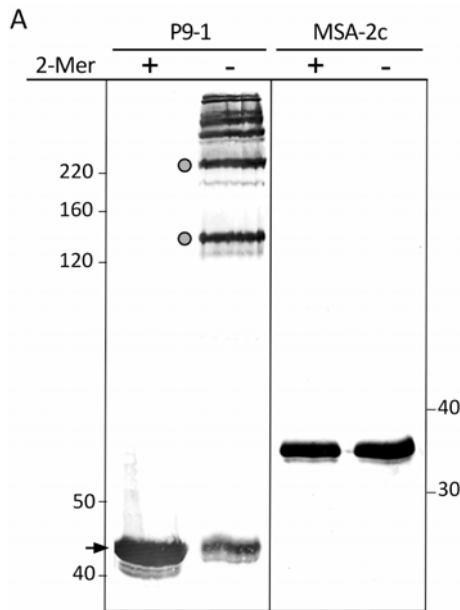
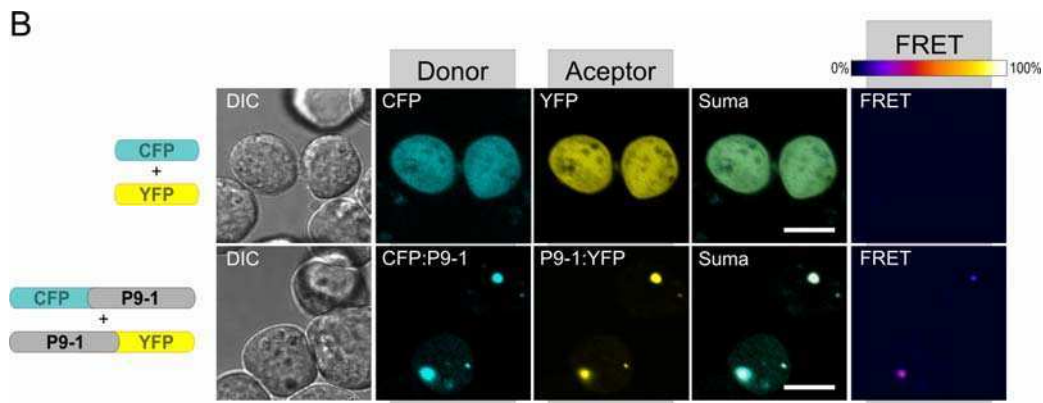


Figura 3.4. P9-1 se asocia en complejos de alto peso molecular y autointeracciona *in vivo* para formar cuerpos de inclusión. (A) La proteína P9-1 recombinante purificada y tratada o no con el agente reductor 2-mercaptoetanol al 2%, fue separada por SDS-PAGE seguido de “Western blot”. La proteína recombinante MSA-2c de *Babesia bovis* expresada en *E. coli* y purificada fue sometida al mismo procedimiento como control negativo. La detección de la proteína se realizó con el anticuerpo Anti-Xpress. La forma monomérica de P9-1 (44,5 kDa) se señala con una flecha y el posible trímero (133,5 kDa) y pentámero (222,5 kDa) se indican con círculos grises. (B) Se analizó la autointeracción de P9-1 *in vivo* mediante la técnica de FRET coexpresando las fusiones fluorescentes CFP:P9-1 y P9-1:YFP en células Sf9. Se coexpresaron las proteínas CFP y YFP como control negativo de interacción. El cálculo de FRET se realizó mediante el método de “Emisión Sensibilizada del Aceptor”. Las barras blancas corresponden a 10 μ m.



Fue frecuente la aparición de bandas de degradación tanto en extractos como en fracciones de purificación, lo que indica que la proteína recombinante es inestable. Debido a esto, fue dificultoso determinar si las bandas de alto peso molecular corresponden a diferentes formas multiméricas de P9-1 recombinante, aunque se observó un posible comportamiento trimérico (Figura 3.4A). Esto no concuerda con lo que se ha reportado para la proteína P9-1 de RBSDV (que muestra 63,7% de identidad con MRCV P9-1 a nivel aminoacídico), la cual sólo es capaz de dimerizar al ser expresada en bacterias (Zhang y col., 2008a).

Es posible que esta característica de P9-1 sea importante para la formación de estructuras similares a VIBs en células de insecto. Se decidió confirmar esta hipótesis analizando la autointeracción de P9-1 *in vivo* mediante experimentos de Transferencia de Energía de Resonancia Föster (FRET). Para ello, se coexpresaron las fusiones fluorescentes CFP:P9-1 y P9-1:YFP, o el par CFP/YFP como control negativo, en células Sf9 y se analizó su capacidad de FRET mediante el método de Emisión Sensibilizada del Aceptor empleando el plugin FRET Analyzer del software ImageJ (Hachet-Haas y col., 2006). El par CFP:P9-1/P9-1:YFP mostró capacidad de transferencia de energía localizada en los cuerpos de inclusión compuestos por ambas fusiones fluorescentes (Figura 3.4B). Esto indica que P9-1 autointeractúa fuertemente en estas

estructuras, reafirmando que la formación de las mismas depende de dicha capacidad de autointeracción.

Adicionalmente, nuestro grupo ha determinado mediante experimentos de doble híbrido en levaduras que la coexpresión de fusiones de P9-1 al dominio AD de activación (AD:P9-1) y al dominio DB de unión a ADN (DB:P9-1) del factor de transcripción GAL4 induce el crecimiento de las levaduras en medio selectivo, indicando que P9-1 es capaz de auto interactuar eficientemente para restaurar la función de dicho factor de transcripción (Maroniche y col., 2010). Asimismo, en un ensayo cuantitativo se demostró que P9-1 logra restaurar intensamente la actividad del gen reportero, lo que sugiere que la proteína auto interactúa muy fuertemente incluso en comparación con la proteína dimérica P19 del *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) empleada como control positivo (Llauger et al., resultados no publicados).

En resumen, los resultados sugieren que la fuerte auto interacción de P9-1 es requerida para la formación de estructuras similares a VIBs que se observan al expresar esta proteína en células de insecto. Consecuentemente, la formación de viroplasmos durante la infección de los *Fijivirus* podría ser iniciada por P9-1 al establecer una matriz proteica. La comprensión del comportamiento de autointeracción para formar estructuras macromoleculares que muestra P9-1 no sólo aporta al entendimiento de la replicación y ensamblado viral, sino que también tiene obvias implicancias biotecnológicas (presentación de antígenos, vehículos para la entrega de drogas, etc.). Será interesante estudiar este proceso en mayor profundidad mediante el ajuste de las técnicas aquí realizadas, en complementación con nuevos acercamientos como por ejemplo ensayos de dispersión de luz, microscopía electrónica de alta resolución, cristalografía de rayos X y/o resonancia magnética nuclear (RMN).

4.3. P9-1 une ácidos nucleicos de cadena simple

Los viroplasmos son zonas de replicación y ensamblado viral, donde se acumula el ARN recientemente sintetizado (Antczak y Joklik, 1992; Aponte y col., 1996; Kar y col., 2007). Consecuentemente, se ha demostrado que varias proteínas que forman estas estructuras son capaces de unir ARN de cadena simple (Huisman y col., 1987; Mattion y col., 1992; Richardson y Furuichi, 1985; Vende y col., 2002). Se decidió investigar si P9-1 comparte esta característica, lo que reforzaría su papel como componente principal de los viroplasmos.

Se realizó un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) empleando una sonda de ARN de cadena simple de 209 nucleótidos correspondientes al extremo 3' del segmento 10 de MRCV. Se incubó la sonda con concentraciones crecientes de P9-1 y se separó por electroforesis nativa. Se observó la alteración de la movilidad de la sonda de manera dependiente de la concentración de P9-1 (Figura 3.5A), lo que indica que esta proteína es capaz de interactuar con el ARN de cadena simple.

Para estudiar si P9-1 tiene además capacidad de unión a ADN de simple cadena, se realizó EMSA utilizando una sonda fluorescente de ADN de cadena simple de secuencia no relacionada a MRCV. Nuevamente, la movilidad de la sonda fue alterada por la presencia de P9-1 de forma dependiente de la concentración (Figura 3.5C). El gel fue posteriormente teñido con azul de Coomassie (Figura 3.5D), revelando que la sonda con diferente movilidad colocaliza

con P9-1 (Figura 3.5B). Este efecto no fue observado al reemplazar P9-1 por BSA, confirmando que la interacción no es un artefacto de la técnica. De manera interesante, el agregado de 2-mercaptoetanol a la reacción produjo un cambio de movilidad y de afinidad en el complejo P9-1/sonda, probablemente debido a la alteración del estado de asociación y/o estructural de P9-1.

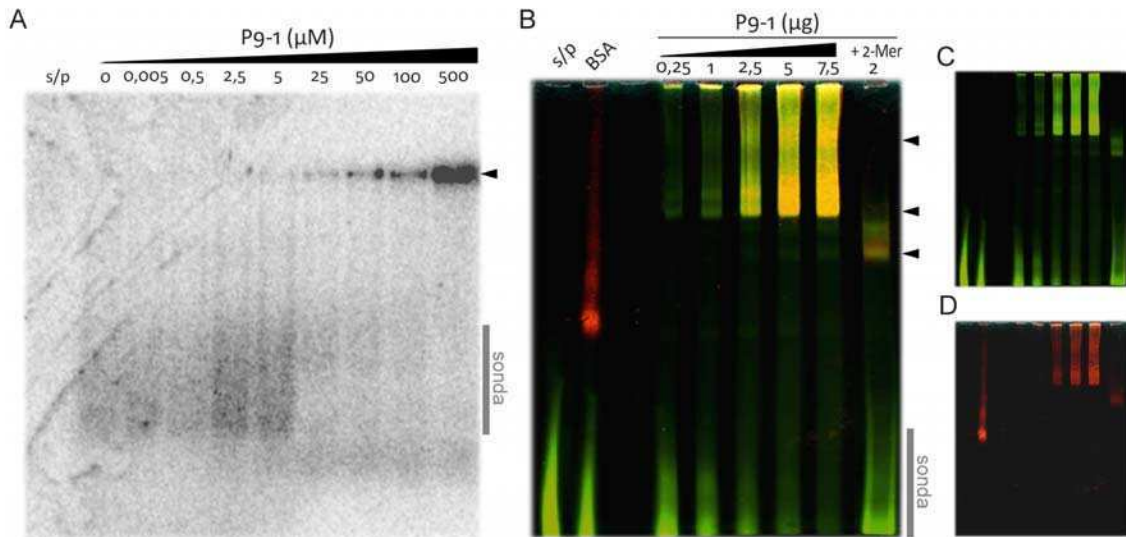


Figura 3.5. P9-1 se une inespecíficamente a ácidos nucleicos de simple cadena. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) por P9-1 utilizando una sonda radiactiva de ARN de 209 nucleótidos correspondiente al extremo 3' del segmento S10 de MRCV (A) o un oligonucleótido de ADN conjugado a un fluoróforo en su extremo 5' (B). En el segundo caso, luego del revelado de la sonda fluorescente (en verde, C) se tiñeron las proteínas totales con azul de coomasie (en rojo, D) para determinar la colocalización de P9-1 y la sonda como coloración amarilla luego de superponer ambas imágenes (B). Se señala con una barra gris la posición de la sonda y con flechas la banda correspondiente a la sonda que sufrió el cambio de movilidad debido a la interacción con P9-1. s/p: sin proteína.

En resumen, los ensayos indican que P9-1 posee la capacidad de unión a ácidos nucleicos de cadena simple, inespecíficamente de la secuencia nucleotídica. También indican que la afinidad de la proteína por estas moléculas es mayor al encontrarse estructuralmente intacta (nativa y/o auto asociada en multímeros), ya que la unión es menos intensa al alterar la estructura terciaria y/o cuaternaria de la proteína mediante la ruptura de los puentes disulfuro. Las bandas de P9-1 con diferente movilidad en el gel nativo podrían corresponder a formas multiméricas, a diversos estados estructurales de la proteína con diferente electromovilidad o a una combinación de ambas situaciones. Este efecto no fue observado en los experimentos con ARN, quizás debido a la baja concentración o al diferente tamaño de la sonda. Si bien estos ensayos muestran que no hay especificidad de secuencia en la unión de P9-1 a los ácidos nucleicos, no excluyen la posibilidad de que la proteína posea mayor afinidad por determinada secuencia o estructura secundaria del ARN, como lo hace la proteína NS2 de *Orbivirus* (Lymperopoulos y col., 2003). Futuros ensayos de competencia con ácidos nucleicos de cadena simple ó doble con diferentes secuencias nucleotídicas permitirán analizar este

fenómeno con mayor profundidad. Asimismo, sería interesante estudiar si P9-1 muestra actividad de desplazamiento de doble hebra ya que es una característica que ha sido demostrada en otras proteínas de viroplasma (Gillian y col., 2000; Taraporewala y col., 2001; Taraporewala y Patton, 2001).

4.4. P9-1 posee actividad ATPasa

Estudios bioquímicos han evidenciado que la capacidad de hidrolizar fosfatos de nucleótidos podría ser otra característica común de las proteínas mayoritarias de viroplasmas. En *Rotavirus*, se ha demostrado que NSP2 posee actividad NTPasa, RTPasa y NDP kinasa, que NSP5 es una ATPasa y que ambas proteínas muestran actividad autoquinasa *in vitro* (Bar-Magen y col., 2007; Kumar y col., 2007; Taraporewala y col., 1999; Vasquez-Del Carpio y col., 2006). Por otro lado, la proteína NS2 de *Orbivirus* posee actividad nucleotidil fosfatasa ya que es capaz de hidrolizar los tres fosfatos de los nucleótidos (Horscroft y Roy, 2000). Si bien en *Orthoreovirus* este tipo de características no se ha detectado en las proteínas no estructurales mayoritarias de viroplasma σ NS y μ NS, se demostró que la proteína estructural μ 2, que está íntimamente relacionada con la formación y funcionamiento de viroplasmas durante la infección, posee actividad NTPasa y RTPasa (Gillian y col., 2000; Kim y col., 2004; Noble y Nibert, 1997). Por lo expuesto se decidió, por lo tanto, estudiar si P9-1 presenta actividad ATPasa mediante ensayos bioquímicos.

En primer lugar se utilizó un método que permite detectar los productos resultantes de la desfosforilación secuencial de ATP semicuantitativamente. Para ello se incubó la proteína P9-1 recombinante purificada con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en diferentes condiciones y luego se separaron los productos de reacción mediante cromatografía en capa delgada (TLC). La concentración y posición del ATP y de los productos de su desfosforilación se determinó mediante la detección de la radiactividad de la placa de TLC por autoradiografía. Se observó que P9-1 es capaz de hidrolizar el ATP en AMP (Figura 3.6A, calle 2), y que dicha actividad se incrementa a más del doble en presencia de 2-mercaptoetanol al 1/ quizás debida a una estabilización de la estructura proteica o a que P9-1 presenta mayor actividad ATPasa en forma monomérica que al estar autoasociada en complejos multiméricos (Figura 3.6A, calle 3). Por otro lado, no fue sorprendente observar que la actividad ATPasa de P9-1 muestra un profundo incremento proporcional a la concentración de KCl en el medio (Figura 3.6A, calles 4-6) ya que es bien conocido el efecto positivo no específico que tienen los cationes univalentes, en particular el potasio, en la actividad enzimática de muchas proteínas (Evans y Sorger, 1966). La fosfatasa intestinal de cabra (CIP) usada como control positivo logró convertir el ATP en AMP + Pi completamente, liberando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{Pi}$, y la seroalbúmina bovina (BSA) empleada como control negativo no produjo ningún cambio en la concentración de ATP (Figura 3.6A, calles 7 y 8).

Posteriormente, se procedió a profundizar el estudio examinando la cinética de esta función enzimática. Se cuantificó la actividad ATPasa de P9-1 midiendo la acumulación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ liberado a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ luego de diferentes tiempos de reacción. Se determinó que, en un medio de reacción conteniendo KCl 100 mM, MnCl_2 100 μM , ATP 100 μM y 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de P9-1, el contenido de Pi aumentó no linealmente en el tiempo con una cinética que corresponde a una actividad ATPasa (tasa inicial de producción de Pi) de 3,402 nmol•mg-

1•min-1. \pm 0.461 (n=6) (Figura 3.6B). Como es esperado, la hidrólisis de ATP en ausencia de proteína fue despreciable. P9-1 fue capaz de hidrolizar sólo el 9/ del ATP total, lo que sugiere la presencia de un efecto inhibitorio o inestabilidad de la proteína en las condiciones del experimento.

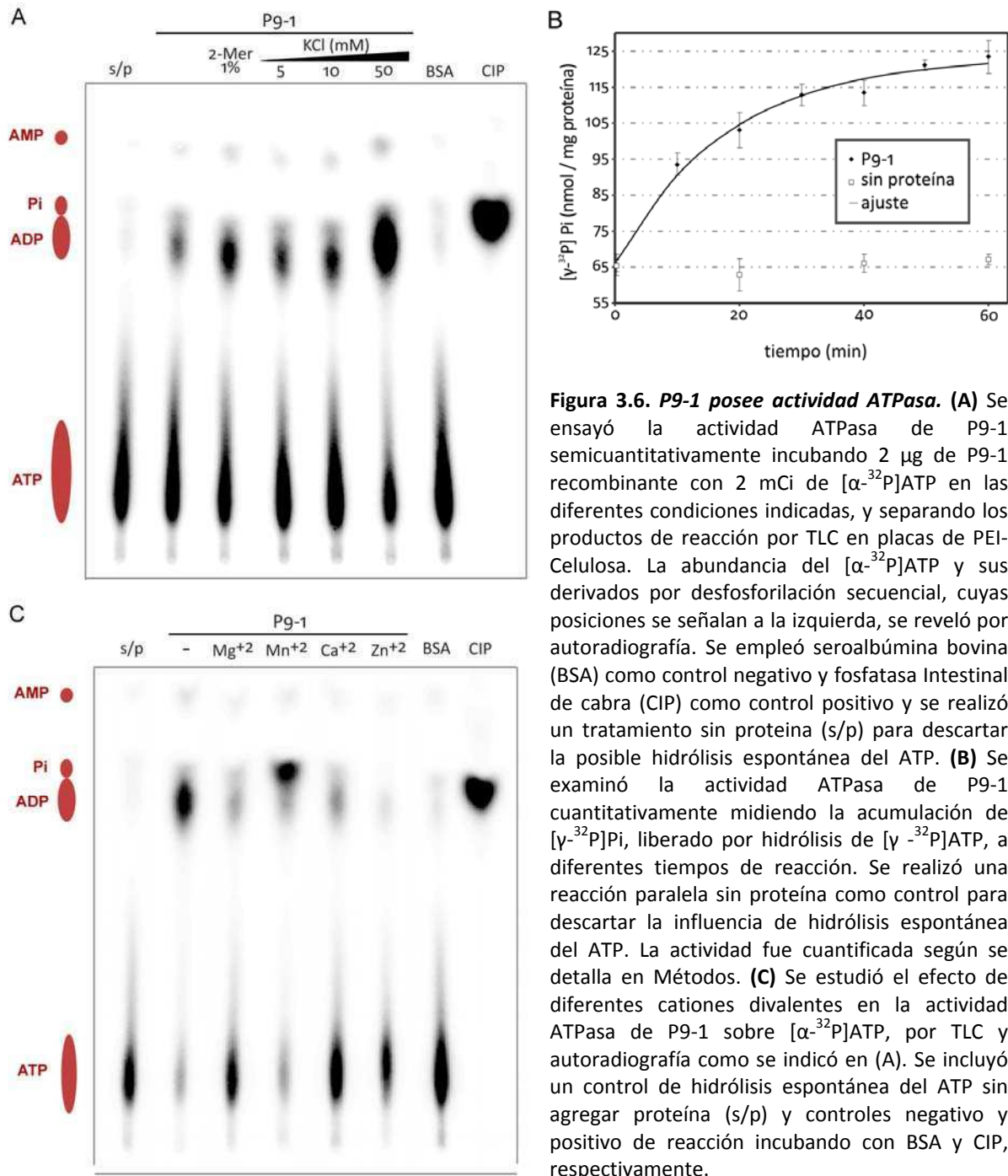


Figura 3.6. P9-1 posee actividad ATPasa. (A) Se ensayó la actividad ATPasa de P9-1 semicuantitativamente incubando 2 μ g de P9-1 recombinante con 2 mCi de [α - 32 P]ATP en las diferentes condiciones indicadas, y separando los productos de reacción por TLC en placas de PEI-Celulosa. La abundancia del [α - 32 P]ATP y sus derivados por desfosforilación secuencial, cuyas posiciones se señalan a la izquierda, se reveló por autoradiografía. Se empleó seroalbúmina bovina (BSA) como control negativo y fosfatasa Intestinal de cabra (CIP) como control positivo y se realizó un tratamiento sin proteína (s/p) para descartar la posible hidrólisis espontánea del ATP. (B) Se examinó la actividad ATPasa de P9-1 cuantitativamente midiendo la acumulación de [γ - 32 P]Pi, liberado por hidrólisis de [γ - 32 P]ATP, a diferentes tiempos de reacción. Se realizó una reacción paralela sin proteína como control para descartar la influencia de hidrólisis espontánea del ATP. La actividad fue cuantificada según se detalla en Métodos. (C) Se estudió el efecto de diferentes cationes divalentes en la actividad ATPasa de P9-1 sobre [α - 32 P]ATP, por TLC y autoradiografía como se indicó en (A). Se incluyó un control de hidrólisis espontánea del ATP sin agregar proteína (s/p) y controles negativo y positivo de reacción incubando con BSA y CIP, respectivamente.

Finalmente, se investigó el efecto de diversos cationes divalentes en la actividad de P9-1 ya que estos compuestos que suelen actuar como cofactores de ATPasas y otras enzimas. Sorprendentemente, los cationes divalentes Mg²⁺, Ca²⁺ y Zn²⁺ (en una concentración final de 10 mM) no solo no tuvieron un efecto positivo en la actividad ATPasa de P9-1, sino que su

presencia fue inhibitoria (Figura 3.6C, calles 3, 5 y 6). El efecto negativo que pueden provocar las altas concentraciones de Mg^{2+} en la actividad de algunas enzimas ha sido notado (Cho y col., 2001; Fagan y Racker, 1977) y podría explicar los resultados obtenidos. Por otro lado, la presencia de Mn^{2+} en la reacción indujo un notable cambio de actividad en P9-1: se observó la acumulación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ en lugar de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ (Figura 3.6C, calle 4). Esto indica que P9-1 fue capaz de hidrolizar los tres fostatos del ATP, y sugiere que la proteína posee actividad nucleotidil fosfatasa en estas condiciones. Será necesario profundizar el estudio bioquímico de P9-1 para establecer inequívocamente que tipo de actividad presenta. Asimismo, se deberán emplear rangos de concentración fisiológicos para estudiar el efecto de las condiciones salinas, cationes divalentes, pH y temperatura en la actividad fosfatasa de P9-1 sobre los diferentes nucleósidos (ATP, CTP, GTP y UTP).

Los resultados en conjunto demuestran que P9-1 posee actividad ATPasa inducida por KCl y sugieren que esta proteína podría ser capaz de funcionar como nucleotidil fosfatasa en presencia de $MnCl_2$, aunque las condiciones optimas para esta función enzimática deberán ser estudiadas en mayor profundidad.

La implicancia biológica de este tipo de actividad bioquímica en P9-1 es una incógnita y deberá ser investigada. Se ha observado que las proteínas mayoritarias de viroplasma NS2 de *Orbivirus*, NSP2 y NSP5 de *Rotavirus* y Pns12 de *Phytoreovirus* son fosforiladas (Afrikanova y col., 1996; Devaney y col., 1988; Suzuki y col., 1999; Taraporewala y col., 1999). Si bien NSP2 y NSP5 son capaces de autofosforilarse *in vitro* mediante sus respectivas actividades NTPasa y ATPasa (Afrikanova y col., 1996; Taraporewala y col., 1999), la actividad nucleotidil fosfatasa de NS2 no parece influir en su estado de fosforilación (Taraporewala y col., 2001), mientras que no se ha estudiado si Pns12 presenta este tipo de actividad enzimática. Si bien el estado de fosforilación de P9-1 de *Fijivirus* no ha sido estudiado, hemos observado que al inmunodetectar por "Western blot" a la proteína P9-1 de MRCV expresada transitoriamente en células Sf9 se observa una banda intensa del peso molecular esperado y una banda adicional tenue de mayor peso molecular (Figura 3.1B). Este mismo patrón se observa al detectar la proteína en un extracto de insectos *D. kuscheli* infectados con MRCV (Guzmán y col., 2010), lo que sugiere que P9-1 sufre algún tipo de procesamiento postraduccional durante la infección del insecto (y probablemente de la planta también). Será interesante investigar si dicha banda corresponde a un estado hiperfosforilado de P9-1, y cómo se relaciona esto con su actividad ATPasa. Asimismo, la fosforilación también podría influir en otras características como la formación de inclusiones citoplasmáticas, como ya se ha observado para NS2 de *Orbivirus* (Modrof y col., 2005).

4.5. La segunda mitad de P9-1 es indispensable para la formación de VIBs

Cuando se realiza un alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de diferentes proteínas P9-1 de *Fijivirus* se observa una zona de baja identidad y con diversos saltos, localizada entre los aminoácidos 130 y 168 de P9-1 de MRCV, que podría representar un sector

interdominios (Figura 3.7). Basados en esta información, se resolvió fragmentar la proteína P9-1 de MRCV en dos partes para comenzar a delimitar los dominios funcionales de la misma.

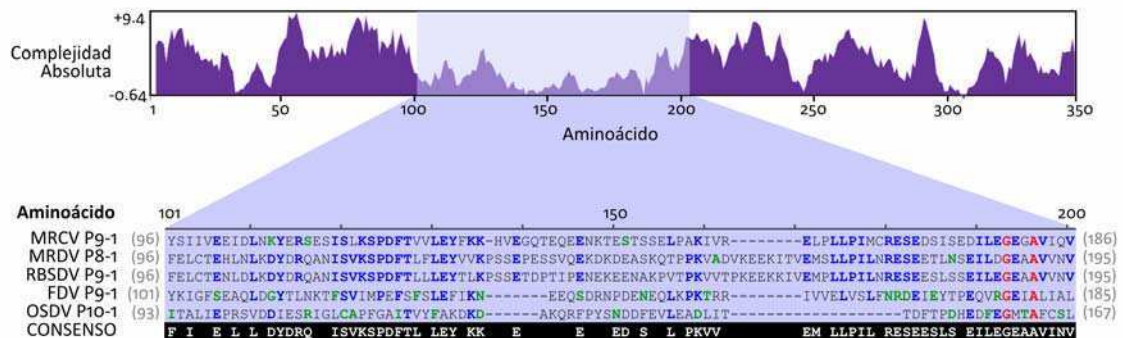


Figura 3.7. Alineamiento múltiple de proteínas homólogas a P9-1 de diferentes Fijivirus. Se analizó la complejidad absoluta (arriba) de un alineamiento múltiple entre MRCV P9-1 y las proteínas homólogas de otros fijivirus (abajo) con una ventana de 5 amino ácidos, empleando el software Vector NTI 9. Se marcan en rojo los residuos idénticos, en verde los débilmente conservados y en azul los conservativos. Los números en gris denotan la posición amino acídica de las secuencias dentro de la secuencia completa de la proteína correspondiente. Se pintó en negro la secuencia consenso.

Se obtuvieron dos proteínas mutantes por delección: P9-1ΔC, que consiste en los primeros 156 amino ácidos de la proteína completa, y P9-1ΔN que abarca los últimos 183 amino ácidos de la proteína completa (Figura 3.8A). Se utilizó ambos fragmentos de P9-1 para investigar su localización subcelular mediante inmunofluorescencia y en células vivas como fusión a GFP.

Al expresar P9-1ΔC/V5 (23,5 kDa) y analizar su distribución subcelular mediante inmunofluorescencia, se determinó que esta proteína se localiza homogéneamente en citoplasma y núcleo. Este tipo de localización es característica de proteínas citoplasmáticas pequeñas que difunden a través de la envoltura nuclear e ingresan al núcleo libremente (por ej. GFP), lo que indica que P9-1ΔC no es capaz de auto asociarse en estructuras similares a VIBs (Figura 3.8B). Por el contrario, P9-1ΔN (26,5 kDa) se localizó solamente en el citoplasma de las células transfectadas y frecuentemente formando inclusiones similares, aunque en menor número, a las observadas con la proteína P9-1 completa (Figura 3.8C). Esto sugiere que esta proteína alberga un dominio indispensable para la formación de estructuras similares a viroplasmos en la porción comprendida entre los aminoácidos 155 a 337.

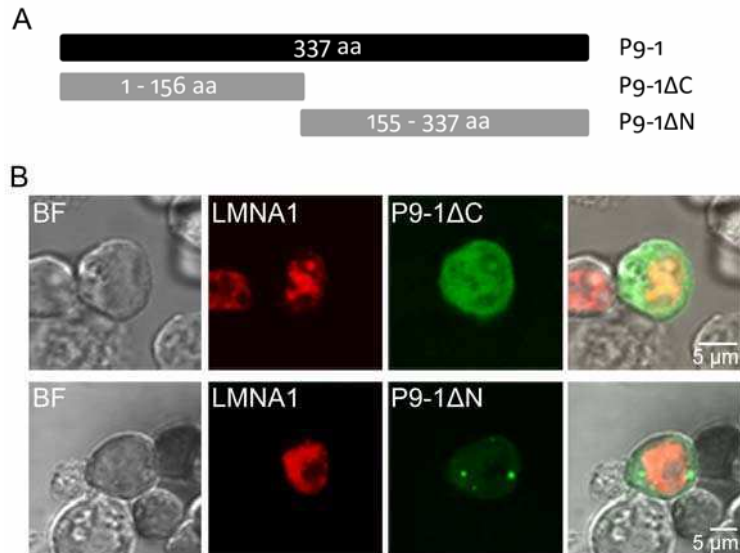


Figura 3.8. Localización subcelular por inmunofluorescencia de las versiones mutantes de P9-1. Se realizaron deleciones sobre P9-1, obteniendo las proteínas mutantes P9-1ΔC y P9-1ΔN (**A**). Se las fusionó al epítipo V5/His y se estudió su distribución subcelular mediante inmunofluorescencia (**B**). Se adquirieron imágenes en campo claro (BF) y se detectó la fluorescencia del anticuerpo conjugado a FITC y de la fusión fluorescente LMNA1:mCherry que fue coexpresada como marcador de núcleo.

Se obtuvieron resultados similares al fusionar las proteínas delecionadas a GFP por ambos extremos y observar su distribución en células vivas. Las fusiones fluorescentes GFP:P9-1ΔC (47,9 kDa) y P9-1ΔC:GFP (47,1 kDa) se localizaron en citoplasma y más débilmente en núcleo, indicando que P9-1ΔC logra moverse, aunque limitadamente, a través de la envoltura nuclear (Figura 3.9A). Esto no solo corrobora que P9-1ΔC no es capaz de formar inclusiones, sino que además sugiere que la proteína no es capaz de auto interactuar ya que el movimiento a través de la envoltura nuclear no podría observarse para las formas dimericas de las fusiones fluorescentes (94 kDa aproximadamente). Por otro lado, las fusiones GFP:P9-1ΔN (50,9 kDa) y P9-1ΔN:GFP (50,2 kDa) se distribuyeron solamente en el citoplasma celular y fueron capaces de formar numerosas inclusiones (Figura 3.9B), como había sido observado con esta porción de P9-1 en los experimentos de inmunofluorescencia.

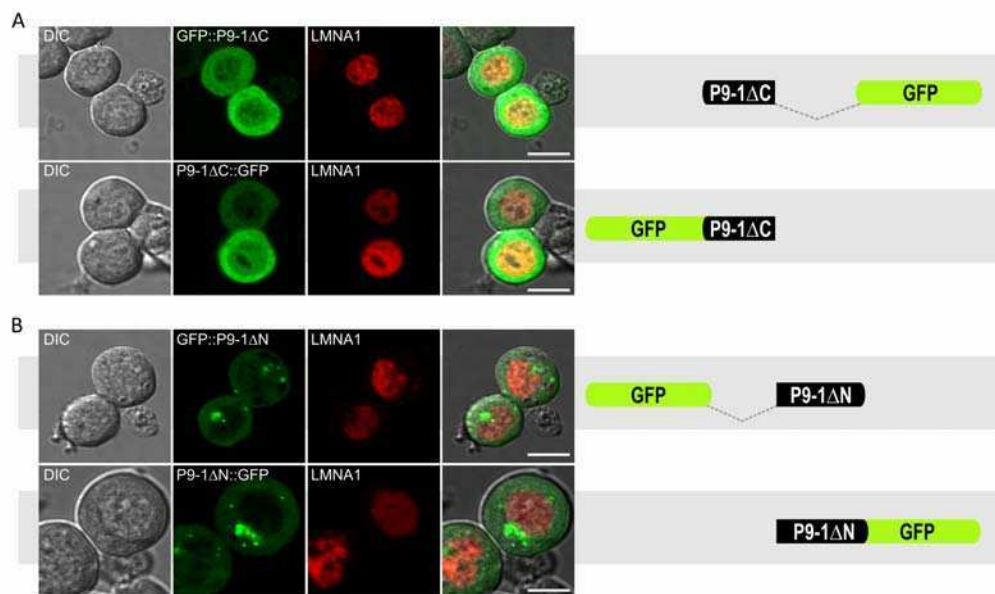


Figura 3.9. Localización subcelular en células Sf9 vivas de las versiones deletadas de P9-1. Fusiones de las mutantes P9-1ΔC (A) y P9-1ΔN (B) a GFP, tanto por el extremo amino terminal como por el carboxi terminal (ver esquema a la derecha), fueron expresadas en células Sf9 y observadas por microscopía confocal de fluorescencia. Se controló el buen estado general de las células mediante luz blanca en modo DIC, y se visualizaron los núcleos por coexpresión del marcador LMNA:mCherry. Las barras blancas corresponden a una longitud de 5 μm.

En resumen, los resultados indican que los elementos localizados en la primera mitad de P9-1 no son suficientes para la autointeracción y el establecimiento de inclusiones citoplasmáticas, mientras que su segunda mitad contiene dominios esenciales que son necesarios para la autoasociación de esta proteína en estructuras citoplasmáticas similares a VIBs. Sin embargo, a pesar de que la porción incluida en P9-1ΔC no parece ser crítica para la formación de la matriz viroplasmática, seguramente sea necesaria para una correcta y completa funcionalidad de estas estructuras. En concordancia con nuestros resultados, se ha demostrado que la zona carboxiterminal de la proteínas μ NS *Orthoreovirus* (Broering y col., 2005) y NS2 de *Orbivirus* (Kar y col., 2007) contiene dominios importantes para la formación de estructuras similares a VIBs. Esto refuerza la idea de una conservación funcional y posiblemente estructural entre las proteínas mayoritarias de viroplasma de la familia *Reoviridae*. Será interesante estudiar en un futuro si las mutantes P9-1ΔC o P9-1ΔN poseen la capacidad de unión a ácidos nucleicos de cadena simple y/o la actividad ATPasa que presenta la proteína P9-1 completa, y de esta manera delimitar la posición de los dominios críticos para dichas características.

5. CONCLUSIONES

5.1. Establecimiento de un protocolo útil para la cuantificación de ARNm viral o endógeno en *Delphacodes kuscheli* mediante RT-qPCR

Con el objetivo de estudiar las bases moleculares de la interacción entre el MRCV y el insecto vector *Delphacodes kuscheli*, se desarrolló una plataforma útil para la cuantificación del MRCV o ARNm endógenos en delfácidos individuales por medio de RT-qPCR, optimizando tanto los primeros pasos de extracción del material como los controles internos de referencia frente a los cuales normalizar los valores obtenidos. Esta plataforma ciertamente contribuirá al estudio de la correlación que existe entre los niveles de acumulación viral y la transmisión exitosa de MRCV por el vector *Delphacodes kuscheli*. Asimismo, facilitará el estudio de los factores determinantes para la transmisión viral y de los patrones de expresión génica del insecto vector del MRCV, lo que a su vez aportará a la comprensión del patosistema virus-vector y podría impactar en el diseño de nuevas estrategias para el control viral.

5.2. Análisis del posible rol que cumplen las proteínas de MRCV durante la infección del insecto vector

La localización subcelular en células vivas fue una técnica adecuada y potente para explorar la funcionalidad de las proteínas de MRCV en células de insecto en cultivo. Asimismo, al analizar la distribución subcelular de 11 proteínas de MRCV fue posible proponer posibles funciones para muchas de las proteínas de *Fijivirus* que aún no habían sido estudiadas:

- Las proteínas P3, P4, P5-2, P7-1 y P8 fueron capaces de ingresar al núcleo celular, lo que sugiere que podrían jugar un rol en la regulación del transcriptoma de la célula hospedante y/o que poseen capacidad de unión a ADN y ARN de doble cadena;
- P5-1 mostró un patrón citoplasmático rugoso dependiente del motivo TKF carboxilo terminal que podría deberse a una interacción con proteínas PDZ;
- P6 podría estar implicada en el movimiento viral y/o formar parte de los viroplasmata, dado que fue capaz de formar agregados perinucleares que colocalizan parcialmente con tubulina así como colocalizar con P10, P9-1 y P7-2;
- P9-1 fue capaz de formar cuerpos de inclusión similares a VIBs, sugiriendo que esta proteína juega un rol en la formación de los viroplasmata, lo cual fue analizado en profundidad en el Capítulo III;
- P9-2 podría estar implicada en el movimiento intercelular del MRCV en insectos ya que se localiza en filopodios presentes en la membrana plasmática;
- P10 se observó en el retículo endoplasmático y colocalizó con tubulina y P6, sugiriendo que MRCV explota el sistema membranosos de secreción y el citoesqueleto de tubulina para su morfogénesis y/o transporte mediado por P6.

Los resultados presentados constituyen el primer análisis molecular de las características funcionales de las proteínas de MRCV en insectos. Las técnicas y sistemas seleccionados para tal fin fueron adecuados y poderosos, proporcionando una gran cantidad de información novedosa en la cual basarse para futuros experimentos que profundicen la caracterización de cada una de las proteínas.

5.3. Analisis del mecanismo de expresión de P5-2

Con el objetivo de analizar el mecanismo molecular que permite la expresión del segundo ORF del segmento S5 del MRCV, se llevaron adelante dos estrategias experimentales. En primer lugar se produjo un antisuero policlonal contra la proteína P5-2 que fue utilizado para inmunodetectar la misma en extractos de plantas de maíz infectadas con el MRCV. Si bien no se logró detectar una banda del peso esperado para la proteína P5-2 (28,9 kDa) en los extractos de maíz infectado con MRCV, el antisuero reaccionó con una banda que correspondería a una proteína de aproximadamente 100 kDa presente exclusivamente en los extractos de maíz infectado. Sin embargo, las fuertes reacciones inespecíficas contra proteínas de maíz del antisuero policlonal impidieron obtener un resultado concluyente. Por otro lado, se construyó un vector de insectos que expresa un ARNm bicistrónico recombinante codificando para una versión de P5-2 fusionada al epítopo V5/His por el extremo carboxilo terminal. Al tranfectar células Sf9 de forma transitoria y estable con este vector, fue imposible inmunodetectar el producto del segundo ORF.

En conclusión, ninguno de los dos métodos empleados permitió detectar el mecanismo subyacente a la expresión de P5-2. Será necesario mejorar las estrategias aquí seguidas, o cambiar a una estrategia de traducción *in vitro* clásicamente utilizada para detectar productos de traducción de ORFs internos de genomas virales (Marzachi y col., 1996; Schnitzer, 1985; Shmulevitz y col., 2002).

5.4. Caracterización funcional de la proteína P9-1 de MRCV

Debido a su interesante capacidad de formar estructuras citoplasmáticas similares a VIBs al ser expresada en células de insecto, en el Capítulo III se realizó un profundo análisis funcional y bioquímico de P9-1. Los resultados indicaron que P9-1 es capaz de autointeractuar en dichas estructuras y que es capaz de asociarse en complejos de alto peso molecular al ser expresada en bacterias. Asimismo, P9-1 fue capaz de unir ácidos nucleicos de cadena simple de manera inespecífica, y también mostró actividad ATPasa. Estas características de P9-1 son compartidas por proteínas mayoritarias de viroplasma de otros reovirus, lo cual indica que P9-1 es la proteína mayoritaria de viroplasma responsable de iniciar la formación de los mismos al autointeractuar más fuertemente por su región carboxi terminal y formar una matriz proteica (Maroniche y col., 2010).

A modo de resumen, las posibles funciones de las distintas proteínas del MRCV según los antecedentes y los resultados de esta Tesis se resumen en la Tabla D.

Tabla D. Características funcionales asignadas a las proteínas de MRCV.

Proteína	Antecedentes	Resultados de este trabajo	Posibles funciones
P1	Presencia de motivos conservados de ARN Polimerasas ARN dependientes (Distéfano, 2004).		Polimerasa viral
P2	Proteína estructural, posiblemente espícula A (Distéfano, 2004).		Espícula A
P3	Proteína mayoritaria de cápside interna. Interacción con P4 (Distéfano, 2004; Distéfano y col., 2009).	Localización nucleocitoplasmática	Proteína mayoritaria de cápside interna Morfogénesis viral Regulador transcripcional
P4	Proteína estructural. Espícula B y posible guanilil transferasa. Interacción con P3 (Distéfano, 2004; Distéfano y col., 2002; Mongelli, 2010).	Localización nucleocitoplasmática	Proteína de espícula B Regulador transcripcional
P5-1	Localización subcelular particulada en células de cebolla dependiente del motivo TKF carboxilo terminal (Mongelli, 2010).	Localización citoplasmática granulosa dependiente del motivo TKF carboxilo terminal	Unión a proteínas PDZ Inhibidor de la respuesta inmune de insectos Transporte viral hacia la membrana plasmática
P5-2	Modificada postraduccionalmente (Mongelli, 2010).	Localización nuclear	Regulador transcripcional
P6		Localización perinuclear, colocaliza con tubulina, P7-2, P9-1 y P10.	Componente estructural del viroplasma Reclutamiento de proteínas P7-2 y P10 al viroplasma? Movimiento intracelular de los viriones
P7-1	Induce la degradación de ARNm (Mongelli, 2010).	Localización nucleocitoplasmática. Modificada postraduccionalmente.	Regulador transcripcional Regulador de la expresión génica del hospedante.
P7-2	Induce la degradación de ARNm. Determinante de patogenicidad en plantas (Mongelli, 2010).	Localización citoplasmática. Colocaliza con P6.	Regulador transcripcional Regulador de la expresión génica del hospedante.
P8	Motivo de unión a nucleótidos (Distéfano, 2004; Distéfano y col., 2002).	Localización nucleocitoplasmática.	Regulador transcripcional

P9-1	Localizada en viroplasmata (Guzmán y col., 2010).	Localización en cuerpos de inclusión citoplasmáticos. Forma multímeros en bacterias y autointeracciona <i>in vivo</i> por FRET. Unión a ácidos nucleicos de simple cadena. Hidroliza ATP. Su mitad carboxilo terminal forma cuerpos de inclusión (Maroniche y col., 2010). Colocaliza con P6.	Proteína mayoritaria del viroplasma. Recluta a P6 al viroplasma
P9-2		Localización en la membrana plasmática de células con filopodios que contienen actina. Modificada postraduccionalmente.	Movimiento intercelular viral en insectos
P10	Homóloga a la proteína mayoritaria de cápside externa de virus relacionados (Distéfano y col., 2005).	Localización en retículo endoplasmático. Colocalización con tubulina y con P6.	Proteína mayoritaria de cápside externa Morfogénesis viral Involucrada en la formación de túbulos membranosos citoplasmáticos que contienen partículas virales

6. BIBLIOGRAFÍA

- Achon, M.A. y Alonso-Duenas, N., (2009). **Impact of 9 years of Bt-maize cultivation on the distribution of maize viruses.** Transgenic research 18, 387-97.
- Afrikanova, I., Miozzo, M., Giambiagi, S. y Burrone, O., (1996). **Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5.** Journal of General Virology 77, 2059.
- Ammar, E.-D., Tsai, C.-W., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G. y Hogenhout, S.A., (2009). **Cellular and Molecular Aspects of Rhabdovirus Interactions with Insect and Plant Hosts***. Annual Review of Entomology 54, 447-468.
- Ammar el, D. y Hogenhout, S.A., (2008). **A neurotropic route for Maize mosaic virus (Rhabdoviridae) in its planthopper vector Peregrinus maidis.** Virus Res 131, 77-85.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L. y Orntoft, T.F., (2004). **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** Cancer research 64, 5245-50.
- Antczak, J.B. y Joklik, W.K., (1992). **Reovirus genome segment assortment into progeny genomes studied by the use of monoclonal antibodies directed against reovirus proteins.** Virology 187, 760-76.
- Anzai, T. y Ozaki, Y., (1969). **Intranuclear crystal formation of poliovirus: Electron microscopic observations.** Experimental and Molecular Pathology 10, 176-185.
- Aponte, C., Poncet, D. y Cohen, J., (1996). **Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2.** Journal of virology 70, 985-91.
- Arneodo, J., Guzmán, F., Ojeda, S., Ramos, M.L., Laguna, I.G., Conci, L.R. y Truol, G.A., (2005). **Transmisión del Mal de Río Cuarto virus por ninfas de primer y tercer estadio de *Delphacodes kuscheli*.** Pesquisa Agropecuária Brasileira 50, 187-191.
- Arneodo, J.D. (2003). **Caracterización biológica del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) y estudios de variabilidad entre aislamientos,** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Arneodo, J.D., Guzman, F.A., Conci, L.R., Laguna, I.G. y Truol, G.A., (2002a). **Transmission features of Mal de Río Cuarto virus in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*.** Ann. appl. Biol. 141, 195-200.
- Arneodo, J.D., Lorenzo, E., Laguna, I.G., Abdala, G. y Truol, G.A., (2002b). **Cytopathological characterization of Mal de Río Cuarto virus in corn, wheat and barley.** Fitopatol. Bras 27, 298-302.
- Ausubel, F.M., (1999). **Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology,** 4th ed. Wiley, New York.
- Avila, A. (2005). **Incidencia del Mal de Río Cuarto (MRCV), sus vectores y hospedantes alternativos según diferentes unidades fisiográficas del Centro de Argentina,** Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Bar-Magen, T., Spencer, E. y Patton, J., (2007). **An ATPase activity associated with the rotavirus phosphoprotein NSP5.** Virology 369, 389-399.
- Bassi, M. y Favali, M.A., (1972). **Electron microscopy of maize rough dwarf virus assembly sites in maize. Cytochemical and autoradiographic observations.** J Gen Virol 16, 153-60.

- Becker, M.M., Goral, M.I., Hazelton, P.R., Baer, G.S., Rodgers, S.E., Brown, E.G., Coombs, K.M. y Dermody, T.S., (2001). **Reovirus sigmaNS protein is required for nucleation of viral assembly complexes and formation of viral inclusions.** Journal of virology 75, 1459-75.
- Bertani, G., (1951). **Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli.** J Bacteriol 62, 293-300.
- Bisanti, M., Ganassi, S. y Mandrioli, M., (2009). **Comparative analysis of various fixative solutions on insect preservation for molecular studies.** Entomologia Experimentalis et Applicata 130, 290-296.
- Blom, N., Gammeltoft, S. y Brunak, S., (1999). **Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites.** J Mol Biol 294, 1351-62.
- Bonamico, N., Arroyo, A., Borghi, L., Di Renzo, M., Ibáñez, M., Díaz, D.G. y Salerno, J.C. (2006). **Identificación de SSR asociados con tolerancia a Mal de Río Cuarto mediante análisis discriminante,** XXXV Congreso Argentino de Genética, San Luis, Argentina.
- Bonamico, N., Di Renzo, M., Díaz, D. y Salerno, J.C. (2005). **Identificación de microsatélites asociados al carácter tolerancia al “Mal de Río Cuarto” en líneas endocriadas recombinantes de Zea mays L.,** XXXIV Congreso Argentino de Genética, Trelew, Chubut, Argentina.
- Bosque-Pérez, N.A., (2000). **Eight decades of maize streak virus research.** Virus research 71, 107-121.
- Bower, N. y Johnston, I., (2009). **Selection of reference genes for expression studies with fish myogenic cell cultures.** BMC Molecular Biology 10, 80.
- Boyce, M., Celma, C. y Roy, P., (2008). **Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts.** Journal of virology 82, 8339.
- Brandariz-Nunez, A., Menaya-Vargas, R., Benavente, J. y Martinez-Costas, J., (2010). **Avian Reovirus {micro} NS Protein Forms Homo-Oligomeric Inclusions in a Microtubule-Independent Fashion, Which Involves Specific Regions of Its C-Terminal Domain.** Journal of virology 84, 4289.
- Brault, V., Tanguy, S., Reinbold, C., Le Trionnaire, G., Arneodo, J., Jaubert-Possamai, S., Guernec, G. y Tagu, D., (2010). **Transcriptomic analysis of intestinal genes following acquisition of pea enation mosaic virus by the pea aphid Acyrthosiphon pisum.** J Gen Virol 91, 802-8.
- Brenndörfer, M. y Boshart, M., (2010). **Selection of reference genes for mRNA quantification in Trypanosoma brucei.** Molecular and Biochemical Parasitology 172, 52-55.
- Broering, T., Kim, J., Miller, C., Piggott, C., Dinoso, J., Nibert, M. y Parker, J., (2004). **Reovirus Nonstructural Protein {micro} NS Recruits Viral Core Surface Proteins and Entering Core Particles to Factory-Like Inclusions.** Journal of virology 78, 1882.
- Broering, T.J., Arnold, M.M., Miller, C.L., Hurt, J.A., Joyce, P.L. y Nibert, M.L., (2005). **Carboxyl-proximal regions of reovirus nonstructural protein muNS necessary and sufficient for forming factory-like inclusions.** Journal of virology 79, 6194-206.
- Broering, T.J., Parker, J.S., Joyce, P.L., Kim, J. y Nibert, M.L., (2002). **Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells.** Journal of virology 76, 8285-97.

- Brookes, S.M., Hyatt, A.D. y Eaton, B.T., (1993). **Characterization of virus inclusion bodies in bluetongue virus-infected cells.** J Gen Virol 74 (Pt 3), 525-30.
- Cabral-Romero, C. y Padilla-Noriega, L., (2006). **Association of rotavirus viroplasm with microtubules through NSP2 and NSP5.** Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 101, 603-11.
- Cao, X., Zhou, P., Zhang, X., Zhu, S., Zhong, X., Xiao, Q., Ding, B. y Li, Y., (2005). **Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus.** Journal of virology 79, 13018-27.
- Clark, M.F. y Adams, A.N., (1977). **Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses.** J Gen Virol 34, 475-83.
- Kokol, M., Nair, R. y Rost, B., (2000). **Finding nuclear localization signals.** EMBO reports 1, 411-415.
- Conci, L.R., Valdivia, M.B. y Nome, S.F., (1992). **Prospección del virus del enanismo rugoso del maíz (MRDV, "Mal de Río IV") en malezas hospedantes mediante la técnica de ELISA y de IEM.** . Fitopatología 27, 26-32.
- Conti, M. (1984). **Epidemiology and vectors of plant reo-like viruses.** In: Harris, K.F. (Ed), Current Topics in Vector Research, Praeger Publishers, New York.
- Contin, R., Arnoldi, F., Campagna, M. y Burrone, O.R., (2010). **Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins.** J Gen Virol 91, 1782-1793.
- Chaogang, S., Jianhua, W., Guoying, Z., Gang, S., Baozhen, P. y col., (2003). **Ectopic expression of the spike protein of Rice Ragged Stunt Oryzavirus in transgenic rice plants inhibits transmission of the virus to insects.** Molecular Breeding 11, 295-301.
- Cho, K.-H., Sakong, J. y Kim, Y.-K., (2001). **Inhibition of microsomal ATPases by high concentration of Mg²⁺ in tracheal epithelial cells.** Life Sciences 69, 2875-2886.
- Chwetzoff, S. y Trugnan, G. (2006). **Rotavirus Assembly: An Alternative Model That Utilizes an Atypical Trafficking Pathway.** In: Roy, P. (Ed), Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis, Springer Berlin Heidelberg, pp. 245-261.
- Dagoberto, E., Remes Lenicov, A.M.d., Teson, A. y Paradell, S., (1985). **Avena Sativa L, hospedante preferencial del transmisor del "Mal de Río Cuarto", Delphacodes kuscheli Fennah (Homoptera; Delphacidae).** Neotrópica 31, 82.
- Davis, D. y Sowinski, S., (2008). **Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells.** Nature Reviews Molecular Cell Biology 9, 431-436.
- Davis, L., (1995). **The nuclear pore complex.** Annual review of biochemistry 64, 865-896.
- del Vas, M., Distefano, A.J., Conci, L.R., Munoz Hidalgo, M., Lewi, D.M. y Hopp, H.E. (2003). **Construcción genética quimérica, vector que la contiene y método para conferir, a una planta, resistencia al virus del Mal de Río IV.**, Boletín de Patentes No 154 Argentina.
- Devaney, M., Kendall, J. y Grubman, M., (1988). **Characterization of a nonstructural phosphoprotein of two orbiviruses.** Virus research 11, 151-164.
- Distéfano, A.J. (2004). **Caracterización molecular del Mal de Río Cuarto virus (MRCV) del maíz: estudio de los segmentos genómicos S1-S6, S8 y S10 y de las proteínas codificadas por los mismos.**, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Distéfano, A.J., Conci, L.R., Munoz Hidalgo, M., Guzmán, F.A., Hopp, H.E. y del Vas, M., (2002). **Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of Mal de Río Cuarto virus (MRCV):**

- evidence that the virus should be a separate Fijivirus species.** Archives of virology 147, 1699-709.
- Distéfano, A.J., Conci, L.R., Munoz Hidalgo, M., Guzmán, F.A., Hopp, H.E. y del Vas, M., (2003). **Sequence and phylogenetic analysis of genome segments S1, S2, S3 and S6 of Mal de Rio Cuarto virus, a newly accepted Fijivirus species.** Virus Res 92, 113-21.
- Distéfano, A.J., Hopp, H.E. y del Vas, M., (2005). **Sequence analysis of genome segments S5 and S10 of Mal de Rio Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae).** Archives of virology 150, 1241-8.
- Distéfano, A.J., Maldonado, S., Hopp, H.E. y del Vas, M., (2009). **Mal de Rio Cuarto virus (MRCV) genomic segment S3 codes for the major core capsid protein.** Virus Genes 38, 455-60.
- Dovas, C.I., Eythymiou, K. y Katis, N.I., (2004). **First report on Maize rough dwarf virus (MRCV) on maize crops in Greece.** Plant Pathology 53, 238.
- Eaton, B.T., Hyatt, A.D. y White, J.R., (1987). **Association of bluetongue virus with the cytoskeleton.** Virology 157, 107-16.
- Evans, H. y Sorger, G., (1966). **Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations.** Annual review of plant physiology 17, 47-76.
- Exposito-Rodriguez, M., Borges, A., Borges-Perez, A. y Perez, J., (2008). **Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process.** BMC Plant Biology 8, 131.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. y Burrone, O.R., (1999). **Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo.** J Gen Virol 80 (Pt 2), 333-9.
- Fagan, J. y Racker, E., (1977). **Reversible inhibition of (Na⁺, K⁺)-dependent ATPase by Mg²⁺ ion, adenosine triphosphate, and K⁺.** Biochemistry 16, 152-158.
- Favali, M.A., Bassi, M. y Appiano, A., (1974). **Synthesis and migration of maize rough dwarf virus in the host cell: an autoradiographic study.** J Gen Virol 24, 563-5.
- Firth, A.E. y Atkins, J.F., (2009). **Analysis of the coding potential of the partially overlapping 3' ORF in segment 5 of the plant fijiviruses.** Virol J 6, 32.
- Fragkoudis, R., Chi, Y., Siu, R.W., Barry, G., Attarzadeh-Yazdi, G., Merits, A., Nash, A.A., Fazakerley, J.K. y Kohl, A., (2008). **Semliki Forest virus strongly reduces mosquito host defence signaling.** Insect Mol Biol 17, 647-56.
- Francki, R.I. y Grivell, C.J., (1972). **Occurrence of similar particles in Fiji disease virus-infected sugar cane and insect vector cells.** Virology 48, 305-7.
- Fukatsu, T., (1999). **Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis.** Molecular Ecology 8, 1935-1945.
- Gamez, R. y Leon, P. (1988). **Maize rayado fino and related viruses.** In: Koenig, R. (Ed), The Plant Viruses, Plenum Press, New York, pp. 213-33.
- Giannotti, J. y Milne, R.G., (1977). **Pangola stunt virus in thin sections and in negative stain.** Virology 80, 347-55.
- Gillian, A.L., Schmechel, S.C., Livny, J., Schiff, L.A. y Nibert, M.L., (2000). **Reovirus protein sigmaNS binds in multiple copies to single-stranded RNA and shares properties with single-stranded DNA binding proteins.** Journal of virology 74, 5939-48.
- Giménez Pecci, M.P., Carloni, E.J., Virla, E.G., Díaz, C.G., Maggio, M.E. y Laguna, I.G. (2008a). **Incidencia del corn stunt y del mal de Río Cuarto en cultivos de maíz en el norte**

- argentino durante 2006/07**, 1° Congreso Argentino de Fitopatología., Ciudad de Córdoba, Córdoba. 28-30 de mayo, pp. Libro de Resúmenes: 320.
- Giménez Pecci, M.P., Laguna, I.G., Dagoberto, E., Truol, G.A.R.P., P. E., Conci, L.R., Ferrer, F. y Ornaghi, J.A., (1997). **Cebada (*Hordeum vulgare* L.) , un nuevo hospedante natural del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) en Argentina**. VI Congreso Nacional de Maíz., Vol. Tomo I, II-32.
- Giménez Pecci, M.P., Laguna, I.G., García, A. y Carpane, P.D., (2008b). **Bandas extragenómicas en el perfil electroforético del dsRNA de Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae)**. Revista Argentina de Microbiología 40, 108.
- Giménez Pecci, M.P., S.F., N. y Milne, R.G. (1986). **Purificación y obtención de antisuero de las partículas del virus causal del mal de Río IV**, II Congreso Argentino de Virología, Córdoba, Argentina., pp. 23.
- Giorda, L., Ornaghi, J.A., Boito, G. y March, G.J., (1993). **Identificación del vector del virus causal del Mal de Río Cuarto en sorgo y estudios poblacionales de delfácidos**. Workshop Mal de Río Cuarto del Maíz, 49-50.
- Glaser, R.L. y Meola, M.A., (2010). **The Native *Wolbachia* Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection**. PLoS One 5, e11977.
- Gonzalez, R., Torres-Vega, M., Lopez, S. y Arias, C., (1998). **In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins**. Archives of virology 143, 981-996.
- Gonzalez, R.A., Espinosa, R., Romero, P., Lopez, S. y Arias, C.F., (2000). **Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells**. Archives of virology 145, 1963-73.
- Guglielmi, K.M., Johnson, E.M., Stehle, T. y Dermody, T.S. (2006). **Attachment and Cell Entry of Mammalian Orthoreovirus**. In: Roy, P. (Ed), Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis, Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-38.
- Guoying, Z., Xiongbín, L.U., Huijuan, L.U., Juanli, L.E.I., Shengxiang, C. y Zuxun, G., (1999). **Rice Ragged Stunt Oryzavirus: role of the viral spike protein in transmission by the insect vector**. Annals of Applied Biology 135, 573-578.
- Gupta, R. y Brunak, S., (2002). **Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function**. Pac Symp Biocomput, 310-22.
- Gutierrez, M., Isa, P., Sanchez-San Martin, C., Perez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F. y Lopez, S., (2010). **Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis**. J. Virol. 84, 9161-9169.
- Guzmán, F.A. (2005). **Caracterización molecular y funcional de un segmento bicistrónico del genoma del virus “Mal de Río Cuarto”**. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Guzmán, F.A., Arneodo, J.D., Pons, A.B., Truol, G.A., Luque, A.V. y Conci, L.R., (2010). **Immunodetection and subcellular localization of Mal de Río Cuarto virus P9-1 protein in infected plant and insect host cells**. Virus Genes 41, 111-7.
- Guzmán, F.A., Distéfano, A.J., Arneodo, J.D., Hopp, H.E., Lenardon, S.L., Del Vas, M. y Conci, L.R., (2007). **Sequencing of the bicistronic genome segments S7 and S9 of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) completes the genome of this virus**. Archives of virology 152, 565-73.

- Hachet-Haas, M., Converset, N., Marchal, O., Matthes, H., Gioria, S., Galzi, J.L. y Lecat, S., (2006). **FRET and colocalization analyzer--a method to validate measurements of sensitized emission FRET acquired by confocal microscopy and available as an ImageJ Plug-in.** *Microsc Res Tech* 69, 941-56.
- Hagiwara, K., Minobe, Y., Nozu, Y., Hibino, H., Kimura, I. y Omura, T., (1986). **Component Proteins and Structure of Rice Ragged Stunt Virus.** *J Gen Virol* 67, 1711-1715.
- Harris, M.J., Kuwano, M., Webb, M. y Board, P.G., (2001). **Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT).** *J Biol Chem* 276, 20876-81.
- Hegedus, T., Sessler, T., Scott, R., Thelin, W., Bakos, E. y col., (2003). **C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins.** *Biochem Biophys Res Commun* 302, 454-61.
- Horie, Y., Nakagomi, T., Oseto, M., Masamune, O. y Nakagomi, O., (1997). **Conserved structural features of nonstructural glycoprotein NSP4 between group A and group C rotaviruses.** *Archives of virology* 142, 1865-1872.
- Hornáková, D., Matoušková, P., Kindl, J., Valterová, I. y Pichová, I., (2010). **Selection of reference genes for real-time polymerase chain reaction analysis in tissues from *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum* of different ages.** *Analytical Biochemistry* 397, 118-120.
- Horner, R.M. (2003). **The Use of Internal Controls for Relative and Competitive Quantitative RT-PCR.** In: Dieffenbach-Dveksler (Ed), *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, pp. 167-185.
- Horscroft, N.J. y Roy, P., (2000). **NTP binding and phosphohydrolase activity associated with purified bluetongue virus non-structural protein NS2.** *J Gen Virol* 81, 1961-5.
- Hu, R., Fan, C., Li, H., Zhang, Q. y Fu, Y.F., (2009). **Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR.** *BMC Mol Biol* 10, 93.
- Huang, H.D., Lee, T.Y., Tzeng, S.W. y Horng, J.T., (2005). **KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites.** *Nucleic acids research* 33, W226-9.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. y Zumla, A., (2005). **Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations.** *Genes Immun* 6, 279-284.
- Hughes, G.L., Allsopp, P.G., Brumbley, S.M., Johnson, K.N. y O'Neill, S.L., (2008). **In vitro rearing of *Perkinsiella saccharicida* and the use of leaf segments to assay Fiji disease virus transmission.** *Phytopathology* 98, 810-4.
- Huisman, H., van Dijk, A. y Bauskin, A., (1987). **In vitro phosphorylation and purification of a nonstructural protein of bluetongue virus with affinity for single-stranded RNA.** *Journal of virology* 61, 3589.
- Hung, A.Y. y Sheng, M., (2002). **PDZ domains: structural modules for protein complex assembly.** *J Biol Chem* 277, 5699-702.
- Hutchinson, P.B. y Francki, R.I.B. (1973). **Sugarcane Fiji disease virus.** In: A. J. Gibbs, B.D.H.a.A.F.M. (Ed), *Descriptions of Plant Viruses, Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol.*, Kew, Surrey, UK, pp. 3.
- Hyser, J.M., Zeng, C.Q.Y., Beharry, Z., Palzkill, T. y Estes, M.K., (2008). **Epitope mapping and use of epitope-specific antisera to characterize the VP5* binding site in rotavirus SA11 NSP4.** *Virology* 373, 211-228.

- Isogai, M., Uyeda, I. y Lee, B.C., (1998a). **Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10.** J Gen Virol 79 (Pt 6), 1487-94.
- Isogai, M., Uyeda, I. y Lindsten, K., (1998b). **Taxonomic characteristics of fijiviruses based on nucleotide sequences of the oat sterile dwarf virus genome.** J Gen Virol 79 (Pt 6), 1479-85.
- Jackson, A.O., Dietzgen, R.G., Goodin, M.M., Bragg, J.N. y Deng, M., (2005). **Biology of Plant Rhabdoviruses.** Annual Review of Phytopathology 43, 623-660.
- Jans, D.A., (1995). **The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation.** Biochem J 311 (Pt 3), 705-16.
- Jarosova, J. y Kundu, J., (2010). **Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR.** BMC Plant Biology 10, 146.
- Jiang, J., Ridley, A.W., Tang, H., Croft, B.J. y Johnson, K.N., (2008). **Genetic variability of genome segments 3 and 9 of Fiji disease virus field isolates.** Archives of virology 153, 839-48.
- Kar, A.K., Bhattacharya, B. y Roy, P., (2007). **Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly.** BMC Mol Biol 8, 4.
- Kelley, L.A. y Sternberg, M.J.E., (2009). **Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.** Nat. Protocols 4, 363-371.
- Kim, J., Parker, J., Murray, K. y Nibert, M., (2004). **Nucleoside and RNA triphosphatase activities of orthoreovirus transcriptase cofactor 2.** Journal of Biological Chemistry 279, 4394.
- Kim, S.H. y Samal, S.K., (2010). **Inhibition of host innate immune responses and pathogenicity of recombinant Newcastle disease viruses expressing NS1 genes of influenza A viruses.** J Gen Virol 91, 1996-2001.
- Kimble, M., Kuzmiak, C., McGovern, K.N. y de Hostos, E.L., (2000). **Microtubule organization and the effects of GFP-tubulin expression in dictyostelium discoideum.** Cell Motil Cytoskeleton 47, 48-62.
- Klein, M. (1967). **Studies on the rough dwarf virus disease of maize.,** Hebrew University Jerusalem. Israel., pp. 138.
- Klein, M. y Harpaz, I., (1970). **Heat suppression of plant-virus propagation in the insect vector's body.** Virology 41, 72-76.
- Kobayashi, T., Antar, A., Boehme, K., Danthi, P., Eby, E. y Guglielmi, K., (2007). **A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses.** Cell host & microbe 1, 147-157.
- Kobayashi, T., Ooms, L.S., Chappell, J.D. y Dermody, T.S., (2009). **Identification of Functional Domains in Reovirus Replication Proteins {micro}NS and {micro}2.** J. Virol. 83, 2892-2906.
- Kocher, O., Comella, N., Gilchrist, A., Pal, R., Tognazzi, K., Brown, L. y Knoll, J., (1999). **PDZK1, a novel PDZ domain-containing protein up-regulated in carcinomas and mapped to chromosome 1q21, interacts with cMOAT (MRP2), the multidrug resistance-associated protein.** Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 79, 1161.
- Komoto, S., Sasaki, J. y Taniguchi, K., (2006). **Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 4646.

- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. y Yanagawa, H., (2009a). **Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha**. *J Biol Chem* 284, 478-85.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. y Yanagawa, H., (2009b). **Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 10171.
- Kumar, M., Jayaram, H., Vasquez-Del Carpio, R., Jiang, X., Taraporewala, Z., Jacobson, R., Patton, J. y Prasad, B., (2007). **Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity**. *Journal of virology* 81, 12272.
- LaCasse, E.C. y Lefebvre, Y.A., (1995). **Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins**. *Nucleic acids research* 23, 1647-1656.
- Laguna, I.G., Ávila, A.O., Delfino, M.A., Garay, J. y Fiorona, M. (2003). **Incidencia del Mal de Río Cuarto virus en tres unidades fisiográficas diferentes del centro de Argentina**, XXXVI Congreso Brasileiro de Fitopatología, Uberlandia. MG. Brasil. 3-8 de agosto.
- Laguna, I.G., Giménez Pecci, M.P., Herrera, P.S., Rodríguez Pardina, P.E., Virla, E.G. y Ávila, E. (1999). **Prospección del virus del Mal de Río Cuarto en Argentina**. . In: *Fitopatología*, A.L.d. (Ed), XI Congreso Latinoamericano de Fitopatología., Sao Pedro. Brasil.
- Laguna, I.G., Remes Lenicov, A.M.d., Virla, E., Avila, A., Giménez Pecci, M.P., Herrera, P., Garay, J., Ploper, D. y Mariani, R., (2002). **Difusión del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz, su vector, delfácidos asociados y huéspedes alternativos en la Argentina**. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 61, 87-97.
- Lee, J.M., Takahashi, M., Mon, H., Mitsunobu, H., Koga, K., Kawaguchi, Y., Nakajima, Y. y Kusakabe, T., (2008). **Construction of gene expression systems in insect cell lines using promoters from the silkworm, Bombyx mori**. *J Biotechnol* 133, 9-17.
- Lenardón, S.L., March, G.J., Nome, S.F. y Ornaghi, J.A., (1998). **Recent outbreak of Mal de Río Cuarto virus on corn in Argentina**. *Plant Disease* 82, 448.
- Lenardon, S.L., March, G.J., Ornaghi, J.A. y Beviacqua, J.E. (1985). **Virosis del maíz en Argentina**, Jornada de actualización técnica., Northrup King Semillas, Chacabuco, Buenos Aires, Argentina.
- Li, M., Wang, W., Soroka, C.J., Mennone, A., Harry, K., Weinman, E.J. y Boyer, J.L., (2010). **NHERF-1 binds to Mrp2 and regulates hepatic Mrp2 expression and function**. *J Biol Chem* 285, 19299-307.
- Li, Y., Bao, Y.M., Wei, C.H., Kang, Z.S., Zhong, Y.W.y col., (2004). **Rice dwarf phyto-reovirus segment S6-encoded nonstructural protein has a cell-to-cell movement function**. *Journal of virology* 78, 5382-9.
- Li, Z., Upadhyaya, N.M., Kositratana, W., Gibbs, A.J. y Waterhouse, P.M., (1996). **Genome segment 5 of rice ragged stunt virus encodes a virion protein**. *J Gen Virol* 77 (Pt 12), 3155-60.
- Ling, K.C., Tiongco, E.R. y Aguiro, V.M., (1978). **Rice ragged stunt, a new virus disease**. *Plant Disease Reporter* 62, 701-705.
- Liu, H., Golebiewski, L., Dow, E.C., Krug, R.M., Javier, R.T. y Rice, A.P., (2010). **The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble**. *Journal of virology* 84, 11164-74.

- Liu, H., Wei, C., Zhong, Y. y Li, Y., (2007a). **Rice black-streaked dwarf virus minor core protein P8 is a nuclear dimeric protein and represses transcription in tobacco protoplasts.** FEBS Lett 581, 2534-40.
- Liu, H., Wei, C., Zhong, Y. y Li, Y., (2007b). **Rice black-streaked dwarf virus outer capsid protein P10 has self-interactions and forms oligomeric complexes in solution.** Virus Res 127, 34-42.
- Lord, J.C., Hartzer, K., Toutges, M. y Oppert, B., (2010). **Evaluation of quantitative PCR reference genes for gene expression studies in Tribolium castaneum after fungal challenge.** Journal of microbiological methods 80, 219-21.
- Lorenz, H., Hailey, D.W. y Lippincott-Schwartz, J., (2006). **Fluorescence protease protection of GFP chimeras to reveal protein topology and subcellular localization.** Nat Meth 3, 205-210.
- Lucas, W.J., (2006). **Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes.** Virology 344, 169-84.
- Luisoni, E., Lovisolò, O., Kitagawa, Y. y Shikata, E., (1973). **Serological relationship between maize rough dwarf virus and rice black-streaked dwarf virus.** Virology 52, 281-3.
- Lyles, D.S., (2000). **Cytopathogenesis and Inhibition of Host Gene Expression by RNA Viruses.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 709-724.
- Lymperopoulos, K., Wirblich, C., Brierley, I. y Roy, P., (2003). **Sequence specificity in the interaction of Bluetongue virus non-structural protein 2 (NS2) with viral RNA.** Journal of Biological Chemistry 278, 31722.
- Maass, D.R. y Atkinson, P.H. (1994). **Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues,** pp. 366-378.
- Mandrioli, M., Borsatti, F. y Mola, L., (2006). **Factors affecting DNA preservation from museum-collected lepidopteran specimens.** Entomologia Experimentalis et Applicata 120, 239-244.
- Maramokosch, K., (1950). **Influence of temperature on incubation and transmission of the wound-tumor virus.** Phytopathology 40, 1071-1093.
- March, G.J., Balzarini, M., Ornaghi, J.A., Beviacqua, J.E. y Marinelli, A., (1995). **Predictive Model for "Mal de Río Cuarto" Disease Intensity.** Plant Disease 79, 1051-1053.
- March, G.J., Marinelli, A.D., Oddino, C., García, J., Zuza, M. y Giuggia, J. (2008). **Modelo empírico de pérdidas causadas por el Mal de Río Cuarto-2006/07,** 1º Congreso Argentino de Fitopatología, Ciudad de Córdoba. Córdoba. 28-30 de mayo.
- Maroniche, G.A., Mongelli, V.C., Peralta, A.V., Distefano, A.J., Llauger, G., Taboga, O.A., Hopp, E.H. y Del Vas, M., (2010). **Functional and biochemical properties of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) P9-1 viroplasm protein show further similarities to animal reovirus counterparts.** Virus Res 152, 96-103.
- Marzachi, C., Antoniazzi, S., d'Aquilio, M. y Boccardo, G., (1996). **The double-stranded RNA genome of maize rough dwarf Fijivirus contains both mono and dicistronic segments.** Eur J Plant Pathol 102, 601-605.
- Marzachi, C., Boccardo, G. y Nuss, D.L., (1991). **Cloning of the maize rough dwarf virus genome: molecular confirmation of the plant-reovirus classification scheme and identification of two large nonoverlapping coding domains within a single genomic segment.** Virology 180, 518-26.

- Matis, J. y Kudelova, M., (2001). **Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses.** Acta virologica 45, 269-277.
- Matthews, R.E.F., Hull, R. y ScienceDirect (Online service). (2002). **Matthews' plant virology,** Academic Press, San Diego, pp. xx, 1001 p.
- Mattio, M.F., Cassol, A., Remes Lenicov, A.M.d. y Truol, G., (2008). **Tagosodes orizicolus: nuevo vector potencial del Mal de Río Cuarto virus.** Tropical Plant Pathology 33, 237-240.
- Mattion, N.M., Cohen, J., Aponte, C. y Estes, M.K., (1992). **Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34.** Virology 190, 68-83.
- McQualter, R.B., Burns, P., Smith, G.R., Dale, J.L. y Harding, R.M., (2004). **Molecular analysis of Fiji disease virus genome segments 5, 6, 8 and 10.** Archives of virology 149, 713-21.
- McQualter, R.B., Smith, G.R., Dale, J.L. y Harding, R.M., (2003). **Molecular analysis of Fiji disease Fijivirus genome segments 1 and 3.** Virus Genes 26, 283-9.
- Medeiros, R.B., Resende Rde, O. y de Avila, A.C., (2004). **The plant virus Tomato Spotted Wilt Tospovirus activates the immune system of its main insect vector, Frankliniella occidentalis.** Journal of virology 78, 4976-82.
- Mellor, P.S., (2000). **Replication of arboviruses in insect vectors.** J Comp Pathol 123, 231-47.
- Mena, J., Ramírez, O. y Palomares, L., (2006). **Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system.** Journal of biotechnology 122, 443-452.
- Mertens, P., (2004). **The dsRNA viruses.** Virus research 101, 3-13.
- Meyer, J.C., Bergmann, C.C. y Bellamy, A.R., (1989). **Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28.** Virology 171, 98-107.
- Milne, R.G. y Lovisolo, O., (1977). **Maize rough dwarf and related viruses.** Adv Virus Res 21, 267-341.
- Miller, C.L., Arnold, M.M., Broering, T.J., Hastings, C.E. y Nibert, M.L., (2010). **Localization of Mammalian Orthoreovirus Proteins to Cytoplasmic Factory-Like Structures via Nonoverlapping Regions of {micro}NS.** J. Virol. 84, 867-882.
- Miyazaki, N., Hagiwara, K., Wei, T., Chen, H., Nakagawa, A., Xing, L., Cheng, R.H. y Omura, T., (2010). **Outer Capsid P8 Proteins of Phytoreoviruses Mediate Secretion of Assembled Virus-like Particles from Insect Cells.** J Gen Virol.
- Modrof, J., Lympelopoulos, K. y Roy, P., (2005). **Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies.** Journal of virology 79, 10023.
- Mongelli, V.C. (2010). **Caracterización molecular de las proteínas de Mal de Río Cuarto virus (MRCV) en plantas.,** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T.y col., (2009). **A Wolbachia Symbiont in Aedes aegypti Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium.** Cell 139, 1268-1278.
- Mumtsidu, E., Makhov, A.M., Roessle, M., Bathke, A. y Tucker, P.A., (2007). **Structural features of the Bluetongue virus NS2 protein.** J Struct Biol 160, 157-67.
- Muth, T.R. y Caplan, M.J., (2003). **Transport protein trafficking in polarized cells.** Annu Rev Cell Dev Biol 19, 333-66.

- Myles, K.M., Wiley, M.R., Morazzani, E.M. y Adelman, Z.N., (2008). **Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes.** Proc Natl Acad Sci U S A 105, 19938-43.
- Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., Smid, H.M., Goldbach, R. y Peters, D., (1999). **Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus.** J Gen Virol 80 (Pt 2), 507-15.
- Nakagawa, A., Miyazaki, N., Taka, J., Naitow, H., Ogawa, A.y col., (2003). **The atomic structure of rice dwarf virus reveals the self-assembly mechanism of component proteins.** Structure (Camb) 11, 1227-38.
- Nakashima, N., Koizumi, M., Watanabe, H. y Noda, H., (1996). **Complete nucleotide sequence of the *Nilaparvata lugens* reovirus: a putative member of the genus *Fijivirus*.** J Gen Virol 77 (Pt 1), 139-46.
- Nakashima, N. y Noda, H., (1995). **Nonpathogenic *Nilaparvata lugens* reovirus is transmitted to the brown planthopper through rice plant.** Virology 207, 303-7.
- Narayanasamy, P. (2011). **Diagnosis of Viral and Viroid Diseases of Plants,** Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis:, Springer Netherlands, pp. 295-312.
- Nault, L.R. y Ammar, E.D. (1989). **Leafhopper and Planthopper Transmission of Plant Viruses,** pp. 503-529.
- Nelson, B.K., Cai, X. y Nebenführ, A., (2007). **A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants.** The Plant Journal 51, 1126-1136.
- Nelson, R., Schoelz, J. y Harries, P.A., (2010). **Intracellular transport of viruses and their components: Utilizing the cytoskeleton and membrane highways.** Molecular Plant-Microbe Interactions.
- Nelson, R.S. y Citovsky, V., (2005). **Plant Viruses. Invaders of Cells and Pirates of Cellular Pathways.** Plant Physiol. 138, 1809-1814.
- Neuberger, G., Schneider, G. y Eisenhaber, F., (2007). **pKaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model.** Biol Direct 2, 1.
- Nibert, M.L. y Kim, J., (2004). **Conserved sequence motifs for nucleoside triphosphate binding unique to turreted reoviridae members and coltiviruses.** Journal of virology 78, 5528-30.
- Noble, S. y Nibert, M., (1997). **Core protein mu2 is a second determinant of nucleoside triphosphatase activities by reovirus cores.** Journal of virology 71, 7728.
- Noda, H., Kawai, S., Koizumi, Y., Matsui, K., Zhang, Q., Furukawa, S., Shimomura, M. y Mita, K., (2008). **Annotated ESTs from various tissues of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: a genomic resource for studying agricultural pests.** BMC genomics 9, 117.
- Nyström, K., Biller, M., Grahn, A., Lindh, M., Larson, G. y Olofsson, S., (2004). **Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus type 1-infected human diploid cells.** Journal of Virological Methods 118, 83-94.
- Omura, T., Minobe, Y., Kimura, I., Hibino, H., TSUCHIZAKI, T. y Saito, Y., (1983). **Improved purification procedure and RNA segments of rice ragged stunt virus.** Ann. Phytopathol. Soc. Jap 49, 670-675.
- Omura, T. y Yan, J., (1999). **Role of outer capsid proteins in transmission of Phytoreovirus by insect vectors.** Adv Virus Res 54, 15-43.

- Omura, T., Yan, J., Zhong, B., Wada, M., Zhu, Y. y col., (1998). **The P2 protein of rice dwarf phyto-reovirus is required for adsorption of the virus to cells of the insect vector.** Journal of virology 72, 9370-3.
- Ornaghi, J.A., Boito, G., Sanchez, G., March, G.J. y Beviacqua, J.E., (1993). **Studies on the populations of Delphacodes kuscheli Fennah, in different years and agricultural areas.** J. Genet. Breed 47, 277-282.
- Ornaghi, J.A., March, G.J., Boito, G.T., Marinelli, A., Beviacqua, J.E., Giuggia, J. y Lenardon, S.L., (1999). **Infectivity in natural populations of Delphacodes kuscheli, vector of "Mal de Río Cuarto" virus.** . Maydica 44, 219- 223.
- Ozcan, S., Andrali, S.S. y Cantrell, J.E., (2010). **Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification.** Biochimica et biophysica acta 1799, 353-64.
- Pagny, S., Lerouge, P., Faye, L. y Gomord, V. (1999). **Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum,** pp. 157-164.
- Parker, J.S., Broering, T.J., Kim, J., Higgins, D.E. y Nibert, M.L., (2002). **Reovirus core protein mu2 determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules.** Journal of virology 76, 4483-96.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. y Neuvians, T.P., (2004). **Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations.** Biotechnology letters 26, 509-15.
- Pfeifer, T.A., Hegedus, D.D., Grigliatti, T.A. y Theilmann, D.A., (1997). **Baculovirus immediate-early promoter-mediated expression of the Zeocin resistance gene for use as a dominant selectable marker in dipteran and lepidopteran insect cell lines.** Gene 188, 183-90.
- Quicke, D.L.J., Belshaw, R. y Lopez-Vaamonde, C., (1999). **Preservation of hymenopteran specimens for subsequent molecular and morphological study.** Zoologica Scripta 28, 261-267.
- Racine, T., Barry, C., Roy, K., Dawe, S., Shmulevitz, M. y Duncan, R., (2007). **Leaky scanning and scanning-independent ribosome migration on the tricistronic S1 mRNA of avian reovirus.** Journal of Biological Chemistry 282, 25613.
- Radonic, A., Thulke, S., Bae, H.-G., Muller, M., Siegert, W. y Nitsche, A., (2005). **Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections.** Virology Journal 2, 7.
- Radtke, K., Dohner, K. y Sodeik, B., (2006). **Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell.** Cell Microbiol 8, 387-400.
- Reinisch, K., Nibert, M. y Harrison, S., (2000). **Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution.** Nature 404, 960-967.
- Reiss, R., Schwert, D. y Ashworth, A., (1995). **Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses.** Environmental Entomology 24, 716-719.
- Remes Lenicov, A.M.d., Teson, A., Dagoberto, E. y Huguet, N., (1985). **Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto en maíz.** Gac. Agropecuaria 25, 251-258.
- Ren, B., Guo, Y., Gao, F., Zhou, P., Wu, F., Meng, Z., Wei, C. y Li, Y., (2010). **Multiple Functions of Rice Dwarf Phyto-reovirus Pns10 in Suppressing Systemic RNA Silencing.** J. Virol. 84, 12914-12923.

- Richardson, M.A. y Furuichi, Y., (1985). **Synthesis in Escherichia coli of the reovirus nonstructural protein sigma NS.** Journal of virology 56, 527-33.
- Rodriguez Pardina, P., Giménez Pecci, M.P. y Laguna, I.G., (1998). **Wheat: a new natural host for the Mal de Río Cuarto Virus in the endemic disease area, Río Cuarto, Córdoba province, Argentina.** Plant disease 82, 149-152.
- Rodriguez Pardina, P., Laguna, I.G., Dagoberto, E. y Truol, G.A. (1994). **Trigo (Triticum aestivum L.): Hospedante natural del virus causal del "Mal de Río Cuarto" en Argentina.** , III Congreso Nacional de Trigo. Primer Simposio Nacional de Cereales de siembra otoño invernal., Bahia Blanca, Argentina.
- Rogers, S.L., Rogers, G.C., Sharp, D.J. y Vale, R.D., (2002). **Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle.** J Cell Biol 158, 873-84.
- Roh, M.H. y Margolis, B., (2003). **Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization.** Am J Physiol Renal Physiol 285, F377-87.
- Rossmann, H., Jacob, P., Baisch, S., Hassoun, R., Meier, J. y col., (2005). **The CFTR Associated Protein CAP70 Interacts with the Apical Cl-/HCO3- Exchanger DRA in Rabbit Small Intestinal Mucosa.** Biochemistry 44, 4477-4487.
- Rotenberg, D., Krishna Kumar, N.K., Ullman, D.E., Montero-Astúa, M., Willis, D.K., German, T.L. y Whitfield, A.E., (2009). **Variation in Tomato spotted wilt virus Titer in Frankliniella occidentalis and Its Association with Frequency of Transmission.** Phytopathology 99, 404-410.
- Roy, P., (2008). **Functional Mapping of Bluetongue Virus Proteins and Their Interactions with Host Proteins During Virus Replication.** Cell Biochemistry and Biophysics 50, 143-157.
- Roy, P. y Noad, R. (2006). **Bluetongue Virus Assembly and Morphogenesis,** Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis, pp. 87-116.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J. y Moorman, A.F., (2009). **Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data.** Nucleic acids research 37, e45.
- Rusan, N.M., Fagerstrom, C.J., Yvon, A.M. y Wadsworth, P., (2001). **Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin.** Mol Biol Cell 12, 971-80.
- Sambrook, J. y Russell, D.W., (2001). **Molecular cloning : a laboratory manual,** 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez-Vargas, I., Scott, J.C., Poole-Smith, B.K., Franz, A.W., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., Olson, K.E. y Blair, C.D., (2009). **Dengue virus type 2 infections of Aedes aegypti are modulated by the mosquito's RNA interference pathway.** PLoS Pathog 5, e1000299.
- Scharlaken, B., De Graaf, D.C., Memmi, S., Devreese, B., Van Beeumen, J. y Jacobs, F.J., (2007). **Differential protein expression in the honey bee head after a bacterial challenge.** Archives of insect biochemistry and physiology 65, 223-37.
- Schnitzer, T.J., (1985). **Protein coding assignment of the S genes of the avian reovirus S1133.** Virology 141, 167-170.
- Scholthof, H.B., (2005). **Plant virus transport: motions of functional equivalence.** Trends in plant science 10, 376-382.

- Schuck, P., Taraporewala, Z., McPhie, P. y Patton, J.T., (2001). **Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes.** J Biol Chem 276, 9679-87.
- Schwarzbaum, P.J., Kaufman, S.B., Rossi, R.C. y Garrahan, P.J., (1995). **An unexpected effect of ATP on the ratio between activity and phosphoenzyme level of Na⁺/K⁺-ATPase in steady state.** Biochimica et biophysica acta 1233, 33-40.
- Shao, C.G., Lu, H.J., Wu, J.H. y Gong, Z.X., (2004). **Nucleic acid binding activity of pns6 encoded by genome segment 6 of rice ragged stunt oryzavirus.** Acta biochimica et biophysica Sinica 36, 457-66.
- Shikata, E. y Kitagawa, Y., (1977). **Rice black-streaked dwarf virus: its properties, morphology and intracellular localization.** Virology 77, 826-42.
- Shmulevitz, M., Yameen, Z., Dawe, S., Shou, J., O'Hara, D., Holmes, I. y Duncan, R., (2002). **Sequential Partially Overlapping Gene Arrangement in the Tricistronic S1 Genome Segments of Avian Reovirus and Nelson Bay Reovirus: Implications for Translation Initiation.** J. Virol. 76, 609-618.
- Sim, S. y Dimopoulos, G., (2010). **Dengue virus inhibits immune responses in Aedes aegypti cells.** PLoS One 5, e10678.
- Simpson, J.C., Wellenreuther, R., Poustka, A., Pepperkok, R. y Wiemann, S., (2000). **Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing.** EMBO Rep 1, 287-92.
- Sinha, R., (1967). **Response of wound-tumor virus infection in insects to vector age and temperature.** Virology 31, 746.
- Soubies, S.M., Volmer, C., Croville, G., Loupias, J., Peralta, B., Costes, P., Lacroux, C., Guerin, J.L. y Volmer, R., (2010). **Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence.** Journal of virology 84, 6733-47.
- Stirzaker, S.C., Whitfeld, P.L., Christie, D.L., Bellamy, A.R. y Both, G.W. (1987). **Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum,** pp. 2897-2903.
- Strack, R.L., Bhattacharyya, D., Glick, B.S. y Keenan, R.J., (2009). **Noncytotoxic orange and red/green derivatives of DsRed-Express2 for whole-cell labeling.** BMC Biotechnol 9, 32.
- Stryer, L., (1995). **Biochemistry,** 4th ed. W.H. Freeman, New York.
- Studier, F.W. y Moffatt, B.A., (1986). **Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.** Journal of molecular biology 189, 113-130.
- Supyani, S., Hillman, B.I. y Suzuki, N., (2007). **Baculovirus expression of the 11 mycoreovirus-1 genome segments and identification of the guanylyltransferase-encoding segment.** J Gen Virol 88, 342-50.
- Suzuki, N., Hosokawa, D., Matsuura, Y., Kikuchi, A. y Omura, T., (1999). **In vivo and in vitro phosphorylation of rice dwarf phytoevirus Pns12 cytoplasmic nonstructural protein.** Archives of virology 144, 1371-1380.
- Suzuki, N., Kusano, T., Matsuura, Y. y Omura, T., (1996). **Novel NTP binding property of rice dwarf phytoevirus minor core protein P5.** Virology 219, 471-4.
- Suzuki, N., Tanimura, M., Watanabe, Y., Kusano, T., Kitagawa, Y., Suda, N., Kudo, H., Uyeda, I. y Shikata, E., (1992). **Molecular analysis of rice dwarf phytoevirus segment S1: intervirial**

- homology of the putative RNA-dependent RNA polymerase between plant- and animal-infecting reoviruses.** *Virology* 190, 240-7.
- Suzuki, R., Sakamoto, S., Tsutsumi, T., Rikimaru, A., Tanaka, K. y col., (2005). **Molecular Determinants for Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Core Protein.** *J. Virol.* 79, 1271-1281.
- Taraporewala, Z., Chen, D. y Patton, J.T., (1999). **Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity.** *Journal of virology* 73, 9934-43.
- Taraporewala, Z.F., Chen, D. y Patton, J.T., (2001). **Multimers of the bluetongue virus nonstructural protein, NS2, possess nucleotidyl phosphatase activity: similarities between NS2 and rotavirus NSP2.** *Virology* 280, 221-31.
- Taraporewala, Z.F. y Patton, J.T., (2001). **Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2.** *Journal of virology* 75, 4519-27.
- Taraporewala, Z.F. y Patton, J.T., (2004). **Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae.** *Virus Res* 101, 57-66.
- Teixeira, L., Ferreira, Á. y Ashburner, M., (2008). **The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*.** *PLoS Biol* 6, e1000002.
- Thomas, C.P., Booth, T.F. y Roy, P., (1990). **Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species.** *J Gen Virol* 71 (Pt 9), 2073-83.
- Todd, J.C., Ammar, E.-D., Redinbaugh, M.G., Hoy, C. y Hogenhout, S.A., (2010). **Plant Host Range and Leafhopper Transmission of Maize fine streak virus.** *Phytopathology* 100, 1138-1145.
- Tomaru, M., Maruyama, W., Kikuchi, A., Yan, J., Zhu, Y. y col., (1997). **The loss of outer capsid protein P2 results in nontransmissibility by the insect vector of rice dwarf phyto-reovirus.** *Journal of virology* 71, 8019-23.
- Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J. y Zhang, Z., (2009). **Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR.** *BMC Mol Biol* 10, 71.
- Truol, G.A., Usugi, T., Hirao, J., Arneodo, J.D., Giménez Pecci, M.P. y Laguna, I.G., (2001). **Transmisión experimental del virus del mal de Río Cuarto por *Delphacodes kuscheli*.** *Fitopatologia Brasileira* 26, 39-44.
- Upadhyaya, N.M., Ramm, K., Gellatly, J.A., Li, Z., Kositratana, W. y Waterhouse, P.M., (1998). **Rice ragged stunt oryzavirus genome segment S4 could encode an RNA dependent RNA polymerase and a second protein of unknown function.** *Archives of virology* 143, 1815-22.
- Upadhyaya, N.M., Yang, M., Kositratana, W., Ghosh, A. y Waterhouse, P.M., (1995). **Molecular analysis of rice ragged stunt oryzavirus segment 9 and sequence conservation among isolates from Thailand and India.** *Archives of virology* 140, 1945-56.
- Upadhyaya, N.M., Zinkowsky, E., Kositratana, W. y Waterhouse, P.M., (1996). **The M(r) 43K major capsid protein of rice ragged stunt oryzavirus is a post-translationally processed product of a M(r) 67,348 polypeptide encoded by genome segment 8.** *Archives of virology* 141, 1689-701.

- Uyeda, I., Kimura, I. y Shikata, E. (1995a). **Characterization of Genome Structure And Establishment of Vector Cell Lines for Plant Reoviruses.** In: Karl Maramorosch, F.A.M. y Aaron, J.S. (Eds), *Advances in Virus Research*, Academic Press, pp. 249-279.
- Uyeda, I., Suga, H., Lee, S.Y., Yan, J., Hataya, T., Kimura, I. y Shikata, E., (1995b). **Rice ragged stunt Oryzavirus genome segment 9 encodes a 38 600 Mr structural protein.** *J Gen Virol* 76 (Pt 4), 975-8.
- Van Hiel, M.B., Van Wielendaele, P., Temmerman, L., Van Soest, S., Vuerinckx, K., Huybrechts, R., Broeck, J.V. y Simonet, G., (2009). **Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions.** *BMC Mol Biol* 10, 56.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F., (2002). **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome biology* 3, RESEARCH0034.
- Vasquez-Del Carpio, R., Gonzalez-Nilo, F., Riadi, G., Taraporewala, Z. y Patton, J., (2006). **Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities.** *Journal of molecular biology* 362, 539-554.
- Vedrenne, C. y Hauri, H.P., (2006). **Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion.** *Traffic* 7, 639-46.
- Velazquez, P.D., Arneodo, J.D., Guzmán, F.A., Conci, L.R. y Truol, G.A., (2003). **Delphacodes haywardi Muir, a New Natural Vector of Mal de Río Cuarto virus in Argentina.** *J Phytopathol* 151, 669-672.
- Velázquez, P.D., Guzmán, F.A., Conci, L.R., Remes Lenicov, A.M.d. y Truol, G.A., (2006). ***Pyrophagus tigrinus* (Hemiptera: Delphacidae), nuevo vector del Mal de Río Cuarto virus (MRCV, Fijivirus) en condiciones experimentales.** *Agriscientia* 23, 9-14.
- Vende, P., Taraporewala, Z. y Patton, J., (2002). **RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA.** *Journal of virology* 76, 5291.
- Vidano, C., (1970). **Phases of maize rough dwarf virus multiplication in the vector *Laodelphax striatellus* (Fallen).** *Virology* 41, 218-32.
- Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K. y Citovsky, V., (2004). **The Ins and Outs of Nondestructive Cell-to-Cell and Systemic Movement of Plant Viruses.** *Critical Reviews in Plant Sciences* 23, 195 - 250.
- Wang, Z.H., Fang, S.G., Xu, J.L., Sun, L.Y., Li, D.W. y Yu, J.L., (2003). **Sequence analysis of the complete genome of rice black-streaked dwarf virus isolated from maize with rough dwarf disease.** *Virus Genes* 27, 163-8.
- Watson, R.A., Thomas, M., Banks, L. y Roberts, S., (2003). **Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes.** *J Cell Sci* 116, 4925-34.
- Watson, S., Mercier, S., Bye, C., Wilkinson, J., Cunningham, A. y Harman, A., (2007). **Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses.** *Virology Journal* 4, 130.
- Wei, T., Chen, H., Ichiki-Uehara, T., Hibino, H. y Omura, T., (2007). **Entry of Rice dwarf virus into cultured cells of its insect vector involves clathrin-mediated endocytosis.** *Journal of virology* 81, 7811-5.

- Wei, T., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Suzuki, N., Shimizu, T. y col., (2006a). **The spread of Rice dwarf virus among cells of its insect vector exploits virus-induced tubular structures.** Journal of virology 80, 8593.
- Wei, T., Kikuchi, A., Suzuki, N., Shimizu, T., Hagiwara, K., Chen, H. y Omura, T., (2006b). **Pns4 of rice dwarf virus is a phosphoprotein, is localized around the viroplasm matrix, and forms minitubules.** Archives of virology 151, 1701-12.
- Wei, T., Shimizu, T., Hagiwara, K., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Suzuki, N., Chen, H. y Omura, T., (2006c). **Pns12 protein of Rice dwarf virus is essential for formation of viroplasms and nucleation of viral-assembly complexes.** J Gen Virol 87, 429-38.
- Wei, T., Shimizu, T. y Omura, T., (2008). **Endomembranes and myosin mediate assembly into tubules of Pns10 of Rice dwarf virus and intercellular spreading of the virus in cultured insect vector cells.** Virology 372, 349-356.
- Wei, T., Uehara-Ichiki, T., Miyazaki, N., Hibino, H., Iwasaki, K. y Omura, T., (2009). **Association of Rice gall dwarf virus with microtubules is necessary for viral release from cultured insect vector cells.** Journal of virology 83, 10830-5.
- Weidman, M.K., Sharma, R., Raychaudhuri, S., Kundu, P., Tsai, W. y Dasgupta, A., (2003). **The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus.** Virus research 95, 75-85.
- Weigand, K., Knaust, A. y Schaller, H., (2010). **Assembly and export determine the intracellular distribution of hepatitis B virus core protein subunits.** J Gen Virol 91, 59-67.
- Westaway, E.G., Khromykh, A.A., Kenney, M.T., Mackenzie, J.M. y Jones, M.K., (1997). **Proteins C and NS4B of the Flavivirus Kunjin Translocate Independently into the Nucleus.** Virology 234, 31-41.
- Wu, J., Du, Z., Wang, C., Cai, L., Hu, M., Lin, Q., Wu, Z., Li, Y. y Xie, L., (2010a). **Identification of Pns6, a putative movement protein of RRSV, as a silencing suppressor.** Virology Journal 7, 335.
- Wu, Z., Wu, J., Adkins, S., Xie, L. y Li, W., (2010b). **Rice ragged stunt virus segment S6-encoded nonstructural protein Pns6 complements cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus-based chimeric virus.** Virus Res.
- Wu, Z., Wu, J., Adkins, S., Xie, L. y Li, W., (2010c). **Rice ragged stunt virus segment S6-encoded nonstructural protein Pns6 complements cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus-based chimeric virus.** Virus Res 152, 176-179.
- Xu, H., Li, Y., Mao, Z., Wu, Z., Qu, L. y col., (1998). **Rice dwarf phytoevirus segment S11 encodes a nucleic acid binding protein.** Virology 240, 267-72.
- Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L. y Yao, X., (2008). **GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy.** Mol Cell Proteomics 7, 1598-608.
- Yan, J., Tomaru, M., Takahashi, A., Kimura, I., Hibino, H. y Omura, T., (1996). **P2 protein encoded by genome segment S2 of rice dwarf phytoevirus is essential for virus infection.** Virology 224, 539-41.
- Young, P.R., Chanas, A.C., Lee, S.R., Gould, E.A. y Howard, C.R., (1987). **Localization of an Arenavirus Protein in the Nuclei of Infected Cells.** J Gen Virol 68, 2465-2470.
- Zeigler, R. y Morales, F., (1990). **Genetic determination of replication of rice hoja blanca virus within its planthopper vector, Sogatodes oryzzicola.** Phytopathology 80, 559-566.

- Zhang, C., Liu, Y., Liu, L., Lou, Z., Zhang, H., Miao, H., Hu, X., Pang, Y. y Qiu, B., (2008a). **Rice black streaked dwarf virus P9-1, an alpha-helical protein, self-interacts and forms viroplasm in vivo.** J Gen Virol 89, 1770-6.
- Zhang, F., Guo, H., Zheng, H., Zhou, T., Zhou, Y., Wang, S., Fang, R., Qian, W. y Chen, X., (2010). **Massively parallel pyrosequencing-based transcriptome analyses of small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*), a vector insect transmitting rice stripe virus (RSV).** BMC genomics 11, 303.
- Zhang, H.-M., Yang, J., Chen, J.-P. y Adams, M., (2008b). **A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus.** Archives of virology 153, 1893-1898.
- Zhang, H.M., Chen, J.P. y Adams, M.J., (2001a). **Molecular characterisation of segments 1 to 6 of Rice black-streaked dwarf virus from China provides the complete genome.** Archives of virology 146, 2331-9.
- Zhang, H.M., Chen, J.P., Cheng, Y., Lei, J.L. y Xue, Q.Z., (2001b). **Cloning and Sequencing of the Genome Segment S9 of Rice Black-streaked Dwarf Virus.** Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) 33, 467-471.
- Zhang, L., Wang, Z., Wang, X., Li, D., Han, C., Zhai, Y. y Yu, J., (2005). **Two virus-encoded RNA silencing supressors, P14 of Beet necrotic yellow vein virus and S6 of Rice black streak dwarf virus.** Chinese Science Bulletin 50, 305-310.
- Zheng, H., Yu, L., Wei, C., Hu, D., Shen, Y., Chen, Z. y Li, Y., (2000). **Assembly of double-shelled, virus-like particles in transgenic rice plants expressing two major structural proteins of rice dwarf virus.** Journal of virology 74, 9808-10.
- Zhong, B., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Higashi, T., Hagiwara, K. y Omura, T., (2003). **A minor outer capsid protein, P9, of Rice dwarf virus.** Archives of virology 148, 2275-80.
- Zhong, B.X., Shen, Y.W. y Omura, T., (2005). **RNA-binding domain of the key structural protein P7 for the Rice dwarf virus particle assembly.** Acta biochimica et biophysica Sinica 37, 55-60.
- Zhou, F., Wu, G., Deng, W., Pu, Y., Wei, C. y Li, Y., (2007). **Interaction of rice dwarf virus outer capsid P8 protein with rice glycolate oxidase mediates relocalization of P8.** FEBS Lett 581, 34-40.
- Zhu, S., Gao, F., Cao, X., Chen, M., Ye, G., Wei, C. y Li, Y., (2005). **The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms.** Plant Physiol 139, 1935-45.
- Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M. y Helms, V., (2010). **Protein translocation across the ER membrane.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes In Press, Corrected Proof.

APÉNDICE

Secuencias parciales de ARNm de los genes de *Delphacodes kuscheli* secuenciados. En cada secuencia se resalta en gris y subrayado la posición de los oligonucleótidos diseñados y el fragmento amplificado en los experimentos de RT-qPCR.

Dk.Act - Actina [*Delphacodes kuscheli*]

Genbank ID: HM565964

caccagggagtgatggtcggatgggtcagaaggacgctacgtaggtgacgaagcgcagtcaaagagaggtatcctcacctgaag
taccatcgagcacggtatcatcaccaactgggacgacatggagaagatctggcatcacaccttctacaacgagctgcgagttgccc
cgaagagcaccatcctgctgaccgaggctcccctcaacccaaggccaaccgtgagaagatgacacagatcatgtttgagacctc
aacacaccggcatgtacgtgccatccaggctgtgctctccctctacgctccggctgaccaccggtatcgtgctgactctggtgacg
gtgctctcacacagtcacctatgaaggttatgcttgcctcctccatgcatcctccgtctggacttggtgctgacttgaccgactac
ctcatgaagatcctcactgagcgtggttacagcttcacaaccgctgagcgtgaaatcgtcagggacatcaaggagaagcttctgta
cgtcgcctggacttcgaacaggaatggccaccgcccgcctccacctcctggagaagtctacgaactgcctgacggtcaggtga
tcaccatcgtaacgagaggttccgttcccagaagccctgttccagccttctctcgggtatggaatcgtgaggtatccacgagaccgt
gtacaactcatcatgaagtgcgacgtg

Dk.Tub - α -1-tubulina [*Delphacodes kuscheli*]

Genbank ID: HM565965

acaacgaggctatctacgacatctgccgacgtaacttgacatcgagcgcctacctacaccaacctcaaccgtctcattggtcagatcg
tttctccatcactgctccctcagattcgacggcgcctcaacgtggatthaaccgaattccagactaacctgggtccatattcccaggatt
cacttccctctggtcacttacgacccgtcatctcggcggagaaagcctaccacgaacagttgtccgttatggagatcaccaacgcctgt
tttgaaccggccaatcagatggtgaagtgcgacccgaggcatggcaagtacatggcgtgttgcatgctgtaccgaggcgatgctgccc
gaaagacgtgaatgccgctattgcgacgatcaagacgaagagaacgattcagttcgttgactggtgtccgactggattcaaggtggaa
tcaactatcagccaccaaccgttgtccagggggcgacttgccaaagtgcagcgtgccgtgtgcatgttctaacaccactgccatcg
ctgaggcctgggctcgcctcgaccacaagttcgacctcatgtacccaagcgtgcttttgcactggtacgtcggagaggggatggagg
aaggag

Dk.GAPDH - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [*Delphacodes kuscheli*]

Genbank ID: HM565966

tggtcacttgttcaagtacgactctaccaccggacgcttaagggcgaagtgagtgccgaaggaaactgcttgggtgtcaacggcaac
aagatccaggtgttcagcgagcgcgacccgaaggcattccttggggcaaggcggcgcccattacattgtggagtcgaccggtgtgt
caccaccgtcgagaaggcgtcggcccacttgaggggcgcccaagaaggtgatcattcggcgcctcagccgacgcgccatgttc
gtgtcgggtttaaactggaggcctacgacctccttcaaggtcatctcgaacgcctcctgaccaccaactgcctggcgcctcctggcc

aaggtcattcacgacaactttgagatcgtcgaaggcctcatgaccaccgtgcacgccaccaccgccacacagaagactgtcgacggac
cgtctggaagctgtggcgtgacggcggtgctcagcagaacatcattcctcggcgaccggagccgaaggccggcaaggt
cattccgtccctgaacggcaagctgaccggaatggcttccgagtgccagtcaccaat

Dk.eF1 α - Factor de elongación 1- α [*Delphacodes kuscheli*]

Genbank ID: HM565967

ggaaatgggtaagggttcttcaagtacgctgggtgttgacaagctgaaggctgagcgcgagcgtggatcaccatcgacattgccc
tgtggaagttcgaaccgcaagtactacgtcaccatcatcgacccccgggacacagggatttcatcaagaacatgatcaccggaac
gtcacaggccgattgtgctgtgctgattgtcggcgggtaccggtgagttgaggctggatctcgaagaacggccagaccctgagc
acgctctgctccttcaactcggagtcagcagctcatcgtcggagtgacaagatggactccaccgagccacacctacagcgagaa
ccgtttcaggaaatcaagaaggaggtgagcagctacatcaagaagatcggctacaaccggcgacagtggcgtttgtgccatctc
ggctggcacggcgacaacatgctggagcatcggacaagatgcctggttcaaggatggaacattgagcgaaggaggcaaggt
gagggcaagtcctcatcgaggccttgacgccattctgccaccagtcgaccactgacaagccctcaggct
ttgaggctggatctcgaagaac

Dk.UbiC - Poliubiquitina C [*Delphacodes kuscheli*]

Genbank ID: HM565968

gaggtatgcagatcttctcaagacgctgaccggcaagacgattacgttggaggtggagccgtcggacacgattgagaacgtgaaggc
gaagattcaggacaaggagggcatccccctgaccagcagcggctcatcttggcggcaagcagctcaggatggcagaacccttcc
gactaca

DK.RpS18 - Proteína ribosomal S18 [*Delphacodes kuscheli*]

Genbank ID: HM565969

agcgaaggtcatgttcgcatgactgcatcaaaggagttggtcgggtatgcaaacatcgtcctgaaaaaggccgatgtcgacttg
gacaaacgagcgggagaatgctcagaagaagaggtggagaaaattatcaccatcatggctcacccaagacaatacaagatccctgat
tggttttgaacagacagaaagatatccaagacggaaaatactcacagcttacgtcatcaaccttgacagtaaacctcgtgatgacct
ggaaaggctgaagaagatcagagcccaccggtatgctgcactactggggttgagagtgccggtcaacacaccaagaccaccgg
tcgtagaggaagtactgttgggtatcgaaga