



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería

**Genes involucrados en el control del ciclo celular durante la interacción
Geminivirus-células de mamífero**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ingeniería

Presenta:

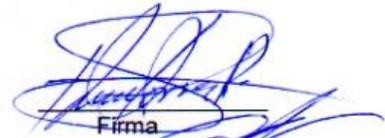
M.C. Ángela María Chapa Oliver

Dirigido por:

Dr. Irineo Torres Pacheco

SINODALES

Dr. Irineo Torres Pacheco
Presidente



Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Secretario



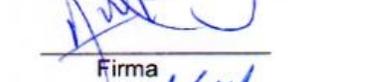
Firma

Dra. Teresa García Gasca
Vocal



Firma

Dr. Andrés Cruz Hernández
Suplente

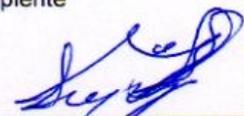


Firma

Dr. Mario González Chavira
Suplente



Firma



Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad



Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio 2014
México

RESUMEN

Los geminivirus son virus de plantas que poseen un genoma pequeño compuesto por una o dos cadenas sencillas de ADN circular. Se replican en el núcleo de la célula y de manera análoga a los virus oncogénicos de mamíferos, dependen de la maquinaria de replicación del hospedero para replicar su genoma. Como consecuencia, los geminivirus remueven el arresto del ciclo celular induciendo la maquinaria de replicación del hospedero. Para ello, la proteína asociada a la replicación (Rep) codificada por el geminivirus, interactúa con la proteína de retinoblastoma alterando el ciclo de división celular en la planta. Además, se encontró que esta proteína por si sola fue capaz de alterar el ciclo celular en levadura. Con base en lo anterior, y debido a que la mayoría de los mecanismos de control del ciclo celular en animales también se encuentran conservados en las plantas, se utilizó el virus del mosaico dorado del Chile (PepGMV) para determinar la red transcriptómica de genes de ciclo celular durante las interacciones *geminivirus*-células de ratón y *SV40*-células de ratón. Se transfectaron células 3T3L1 con el geminivirus PepGMV y con el virus SV40 para posteriormente obtener la expresión diferencial de los genes de ciclo celular. Veintisiete genes se expresaron diferencialmente en las células transfectadas con el PepGMV comparadas con las células control. Veinticinco genes en el caso de las células transfectadas con el virus SV40 y 24 genes en las transfectadas con la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40. Para el caso del geminivirus PepGMV, dentro de los genes que aumentaron su expresión se encuentran genes involucrados en la transición G1/S y en la progresión a la fase S, lo que está relacionado con el establecimiento de un ambiente favorable para la replicación del virus. Estos resultados abren las puertas para más trabajos de investigación sobre las analogías entre los geminivirus y los virus de ADN oncogénicos de mamífero y la manera en que estos interactúan a nivel molecular con su hospedero.

(Palabras clave: geminivirus, retinoblastoma, ciclo celular, oncovirus)

SUMMARY

The geminiviruses are plant viruses which possess a small, circular and, single strand DNA genome. They replicate in the plant cell nucleus and analogous to animal DNA oncoviruses depend on the host replication machinery to amplify their genomes. Consequently, geminiviruses remove the cell-cycle arrest and induce the host replication machinery. To do that, the conserved replication-associated protein (Rep) codified by geminivirus, interacts with retinoblastoma-like proteins altering the cell division cycle in plants. Moreover, it was found that this protein alone altered the cell division cycle in yeast. Therefore, and because the control mechanism of cell cycle in animals also are conserved in plants, the Pepper Golden Mosaic Virus (PepGMV) and its Rep protein were used to determine the cell cycle gene transcriptomic network during *geminivirus*-mammalian cells and SV40-mammalian cells interactions. 3T3L1 fibroblast cells were transfected with geminivirus PepGMV and SV40 virus. Cell cycle differentially expressed genes were obtained. Twenty seven genes were differentially expressed in the PepGMV transfected cells compared with control cells. Twenty five genes in SV40 transfected cells and twenty four genes in cells transfected with PepGMVRepK-pTracer™SV40 construction were differentially expressed. The genes which expression was up-regulated in PepGMV transfected cells are involved in the G1/S transition and in progression through the S phase, which is related to the establishment of a favorable environment for virus replication. These results open the door to continue doing research on analogies between geminivirus and mammalian DNA oncogenic viruses and how they interact, at the molecular level, with their host.

(Key words: geminivirus, retinoblastoma, cell cycle, oncovirus)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el apoyo, mediante la beca para mis estudios de doctorado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, en particular a la Facultad de Ingeniería y al Cuerpo Académico de Ingeniería en Biosistemas por el apoyo brindado para realizar los estudios de doctorado.

ÍNDICE

Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de figuras	vii
Índice de cuadros	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Geminivirus	3
2.2 Organización de su genoma	4
2.3 Proteína iniciadora de la replicación (Rep).....	6
2.3.1 Replicación	7
2.4 Ciclo Celular	10
2.5 Proteína de Retinoblastoma (pRB).....	12
2.6 Oncovirus	15
2.7 Virus de Simio 40 (SV40)	16
2.8 Chile (<i>Capsicum spp</i>)	18
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1 Hipótesis	20
3.2 Objetivo General	20
3.3 Objetivos Específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Virus del Mosaico Dorado del Chile (PepGMV)	21
4.2 Virus de Simio 40 (SV40)	22
4.3 Cepas de microorganismos.....	22
4.4 Línea celular.....	22
4.5 Material vegetal	22
4.6 Crecimiento y mantenimiento del cultivo celular	22
4.7 Elaboración de la construcción para la expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en las células 3T3L1	23

4.7.1	Vector de expresión pTracer™-SV40	23
4.7.2	Oligonucleótidos utilizados	24
4.7.3	Amplificación y clonación del gen de la proteína Rep en el vector pTracer-SV40	24
4.8	Transfección de las células 3T3L1	27
4.9	Expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en las células 3T3L1	28
4.10	Detección del virus PepGMV y SV40 en las células 3T3L1	28
4.11	Expresión de genes de ciclo celular (Arreglos de qPCR).....	28
4.11.1	Síntesis del ADN complementario.....	30
4.11.2	<i>RT² Profiler™ PCR Array Mouse Cell Cycle</i> qPCR	31
4.12	Elaboración de la construcción para la expresión del antígeno T grande del SV40 en plantas de Chile.....	32
4.12.1	Vector de expresión pBI121.	32
4.12.2	Oligonucleótidos utilizados.	33
4.12.3	Eliminación del intrón del antígeno T grande del SV40 mediante ensamble por PCR.	33
4.12.4	Clonación del gen del antígeno T grande completo y sin intrón del SV40 en el vector pBI121.....	36
4.13	Inoculación de las plantas de Chile con el geminivirus PepGMV, el virus SV40 y las construcciones ATgcSV40-pBI121 y ATgsiSV40-pBI121.	38
4.13.1	Detección y movimiento del geminivirus PepGMV y el virus SV40 en las plantas inoculadas.	38
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1	Elaboración de la construcción para la expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en las células de mamífero.....	40
5.1.1	Amplificación y generación de los sitios de restricción.	40
5.1.2	Ligación del inserto en el vector pTracer-SV40.	40
5.2	Transfección de las células 3T3L1 con las construcciones PepGMVRepK- pTracer™SV40 y PepGMVRepATG ⁻ -pTracer™SV40.....	41

5.2.1	Crecimiento de las células 3T3L1 transfectadas con las construcciones PepGMVRepK-pTracer™SV40 y PepGMVRepATG ⁻ -pTracer™SV40.....	44
5.3	Transfección de las células 3T3L1 con el componente A del geminivirus PepGMV, el virus SV40 y el PepGMV Rep ⁻	46
5.3.1	Crecimiento de las células transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV y el virus SV40.	50
5.4	Expresión de genes de ciclo celular en las células 3T3L1 transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV, el virus SV40 y la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40.....	52
5.5	Elaboración de la construcción para la expresión del antígeno T grande del virus SV40 en plantas de chile.	61
5.5.1	Amplificación del antígeno T grande y generación de los sitios de restricción.	62
5.5.2	Eliminación del intrón del antígeno T grande del virus SV40 mediante ensamble por PCR.	62
5.5.3	Obtención de las construcciones ATgsiSV40-pBI121 y ATgcSV40-pBI121	63
5.6	Inoculación de las plantas de chile con el geminivirus PepGMV y el virus SV40.	65
5.6.1	Verificación de la presencia del geminivirus PepGMV y el virus SV40 en las plantas de chile.	68
6.	CONCLUSIONES	72
	LITERATURA CITADA	73
	Anexo 1	81
	Anexo 2	84
	Anexo 3	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Organización del genoma de los 4 géneros de la familia Geminiviridae.	5
Figura 2.2. Organización del genoma del SV40.....	17
Figura 4.1. Construcción dimérica del componente A y B del geminivirus PepGMV.	21
Figura 4.2. Vector pTracer-SV40.....	23
Figura 4.3 Distribución de los genes en el arreglo de qPCR.....	29
Figura 4.4. Vector pBI121	32
Figura 4.5. Ensamble por PCR para remover el intrón del antígeno T grande del SV40.	34
Figura 5.1. Amplificación por PCR del gen de la proteína Rep.	40
Figura 5.2. ADN plasmídico y digestión.	41
Figura 5.3. Mapa de las construcciones para la expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en células de mamífero.....	42
Figura 5.4. Microscopía de fluorescencia de las células transfectadas.....	43
Figura 5.5. RT-PCR de las células transfectadas.....	44
Figura 5.6 Crecimiento de las células 3T3L1 transfectadas con las construcciones PepGMVRepK-pTracer™SV40, PepGMVRepATG ⁻ -pTracer™SV40 y con el vector de expresión pTracer™SV40	45
Figura 5.7. Células transfectadas vistas al microscopio óptico..	47
Figura 5.8. Amplificación por PCR del componente A del PepGMV y el virus SV40 en las células transfectadas..	48
Figura 5.9. RT-PCR de las células transfectadas con el componente A del PepGMV y con el virus SV40	49
Figura 5.10 Crecimiento de de las células 3T3L1 transfectadas con el geminivirus PepGMV, el virus SV40 y el PepGMV Rep ⁻	51
Figura 5.11 Células transfectadas con el componente A del PepGMV, el virus SV40 y la construcción PepGMVRep-.....	52
Figura 5.12. Amplificación por PCR del antígeno T grande.	62

Figura 5.13. Amplificación por PCR del antígeno T grande sin intrón	63
Figura 5.14. Digestión del ADN plasmídico de las clonas obtenidas. a) Antígeno T grande completo.....	64
Figura 5.15. Digestión del ADN plasmídico de las clonas obtenidas de la ligación del vector pBI121 con el antígeno T grande del SV40	65
Figura 5.16. Mapa de las construcciones ATgcSV40-pBI121 y ATgsiSV40-pBI121 para la expresión del antígeno T grande del SV40 en plantas.....	66
Figura 5.17 Plantas inoculadas con el geminivirus PepGMV y el virus SV40 a los 20 dpi.	67
Figura 5.18 Detección del geminivirus PepGMV en plantas de chile (<i>C. annuum</i>) variedad Sonora Anaheim.....	69
Figura 5.19 Detección del virus SV40 en plantas de chile (<i>C. annuum</i>) variedad Sonora Anaheim.....	69
Figura 5.20 Detección del virus SV40 en las plantas chile inoculadas con el SV40 y con la mezcla SV40+PepGMV	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 4.1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y detección mediante PCR del gen de la proteína Rep del geminivirus PepGMV, la detección del componente A del PePGMV y la detección del virus SV40.....	25
Cuadro 4.2. Descripción de los genes incluidos en el arreglo de qPCR.	29
Cuadro 4.3 Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR del gen del antígeno T grande del SV40.....	33
Cuadro 4.4 Tratamientos utilizados en la inoculación de las plantas.	38
Cuadro 5.1 Análisis de varianza del crecimiento celular.	45
Cuadro 5.2 Análisis de varianza del crecimiento celular.	50
Cuadro 5.3 Genes sobre-expresados en las células transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV, el virus SV40 y la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40 comparadas con las células control.	53
Cuadro 5.4 Genes apagados en las células transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV, el virus SV40 y la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40 comparadas con las células control.....	58

1. INTRODUCCIÓN

Los geminivirus son patógenos de plantas. Poseen genomas pequeños, compuestos de una o dos moléculas de ADN circular de cadena sencilla. Se caracterizan por poseer una cápside formada por dos icosaedros incompletos. Los geminivirus constituyen una gran familia dividida en cuatro géneros *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, y *Topocuvirus* basado en las características del genoma, el insecto vector y el hospedero al que infectan.

Los geminivirus se replican en el núcleo de la célula a través de un mecanismo de círculo rodante, y al igual que los virus oncogénicos de mamíferos, como el virus de simio 40 (SV40), los geminivirus dependen de la maquinaria de replicación de la célula que infectan para poder replicar su material genético. Además, se replican en células diferenciadas donde la mayoría de los factores requeridos para la replicación viral están ausentes. Debido a esto, los geminivirus alteran los controles del ciclo celular de una manera muy semejante a como lo hacen sus contrapartes animales (virus de simio 40 (SV40), el adenovirus humano y el papilomavirus), induciendo a la célula a entrar nuevamente al ciclo.

Uno de los principales eventos involucrados en la modificación en el control del ciclo celular del hospedero, es la inactivación de la proteína de retinoblastoma (pRB). Esta proteína regula de manera negativa la transición G1/S en las células, y la inactivación de la misma, es uno de los factores clave para que las células entren de nuevo al ciclo de división celular. Los oncovirus de mamífero como el poliomavirus, adenovirus y papilomavirus, codifican proteínas que interactúan con pRB alterando su función.

El descubrimiento de un homólogo de pRB en las plantas y el hecho de que la proteína de replicación (Rep) de los geminivirus es capaz de interactuar con la pRB humana, sugiere que los geminivirus podrían estar utilizando un

mecanismo similar al de los oncovirus para alterar la regulación del ciclo celular. Adicionalmente, se ha determinado que la proteína Rep del virus del enanismo del trigo (WDV) contiene un motivo de unión a la proteína del retinoblastoma (pRB) y este motivo también está presente en las oncoproteínas de algunos virus animales. Además, se ha encontrado que este motivo está conservado en la proteína Rep de otros geminivirus. Lo anterior sugiere que los geminivirus podrían emplear mecanismos parecidos a los que utilizan los virus oncogénicos de animales para reprogramar el ciclo celular.

Además, la capacidad de alterar el control del ciclo celular en las células que infectan sin que se dé la formación de tumores, resulta interesante, debido a que en la infección que involucra a algunos virus oncogénicos animales ocurre el caso contrario. Estos alteran el ciclo celular provocando una proliferación celular anormal y la subsecuente formación de tumores, mientras que la infección por geminivirus no produce estos resultados en la planta.

Con base en lo anterior, y debido a que la mayoría de los mecanismos de control del ciclo celular en animales también se encuentran conservados en las plantas, se planteó la posibilidad de que un geminivirus, en este caso el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV), es capaz de alterar los controles del ciclo celular en células de mamífero. Esto con la finalidad de identificar los genes que se activan o se reprimen por la presencia del geminivirus y que además estén involucrados en la regulación del ciclo celular y en la replicación del ADN. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue el de determinar la red transcriptómica de genes de ciclo celular durante las interacciones geminivirus-células de mamífero y SV40-células de mamífero. Con base en los resultados obtenidos y para determinar si un virus de mamífero, en este caso el SV40, era capaz de alterar los controles del ciclo celular en las plantas, se clonó el gen del antígeno T grande en el vector de expresión pBI121 y se inocularon plantas de chile (*Capsicum annuum*) con el virus SV40.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Geminivirus

Los geminivirus, llamados así debido a la naturaleza geminada de su cápside, son virus de ADN de cadena sencilla y circular. Su genoma se encuentra empaquetado dentro de partículas gemelas que están formadas por dos poliedros idénticos unidos lateralmente por una de sus caras (Torres-Pacheco et al., 1996a; Krupovic et al., 2009). Pertenecen a la familia *Geminiviridae* e infectan una gran variedad de plantas ocasionando pérdidas considerables en los cultivos alrededor del mundo. La incidencia y severidad de las enfermedades ocasionadas por geminivirus se ha incrementado considerablemente en los últimos 20 años. (Orozco y Hanley-Bowdoin, 1996; Eagle y Hanley-Bowdoin, 1997; Nagar et al., 2002; Hanley-Bowdoin et al., 2013).

Con base en la organización de su genoma (mono ó bipartita), el insecto vector que los transmite y el hospedero al que infectan (mono ó dicotiledóneas) los geminivirus se clasifican en 4 géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus* (Brown, 2008; Yadava et al., 2010). Los nombres de cada uno de estos géneros se derivan de la abreviación del nombre en inglés del organismo tipo (*Maize streak virus* (MSV), *Beet curly top virus* (BCTV), *Tomato pseudo curly top virus* (TPCTV) y *Bean golden mosaic virus* (BGMV), respectivamente) (Jeske, 2009). El primero de los géneros, los *Mastrevirus*, se caracterizan por poseer un genoma monopartita, infectar plantas monocotiledoneas y ser transmitidos por varias especies de chicharritas (*Cicadullina* spp). El virus del estriado del Maíz (MSV) es la especie tipo de este género. Los miembros de los géneros *Curtovirus* y *Topocuvirus* poseen todos sus genes organizados en una única molécula de ADN (monopartitas) e infectan plantas dicotiledóneas. La diferencia entre estos dos géneros reside en el insecto vector, los *Curtovirus* son transmitidos por varias especies de chicharritas mientras que los *Topocuvirus* son transmitidos por mosquitos blancos (*Bemisia tabaci*). El último género, los *Begomovirus*, incluye a la

mayoría de las especies en la familia y es el conjunto más numeroso e importante por su patogenicidad en México. Poseen genomas bipartitas y sus genes se encuentran distribuidos en dos moléculas separadas de ADN denominadas componente A y B respectivamente. Estas moléculas son de cadena sencilla y circular y se necesita de ambas para que se produzca la infección. Los *Begomovirus* son transmitidos exclusivamente por la mosquita blanca (*Bermisia tabaci*) e infectan plantas dicotiledóneas (Torres-Pacheco et al., 1996a; Brown, 2008; Krupovic et al., 2009; Briddon et al., 2010).

2.2 Organización de su genoma

El genoma de todos los geminivirus existe como ADN circular de cadena sencilla (ssDNA), que se empaqueta dentro del virión, y como ADN de cadena doble (dsDNA) (forma replicativa) que es transcrita en el núcleo de las células infectadas (Hanley-Bowdoin et al., 2013).

El genoma de estos virus es pequeño, con un tamaño que va desde los 2.5 a los 3×10^3 nucleótidos y consiste en una (monopartita) o dos (bipartitas) moléculas de ADN. Estas se encuentran organizadas en unidades de transcripción divergentes, es decir, los marcos de lectura están orientados de manera bidireccional y la región intergénica contiene promotores en ambas direcciones (Jeske, 2009). Poseen un reducido número de genes que codifican entre 5 y 7 proteínas, las cuales están involucradas en la replicación, movimiento, transmisión y patogénesis del virus (Hanley-Bowdoin et al., 2013). Los genes responsables del control de la replicación y la transcripción del virus se localizan en el lado izquierdo, y aquellos necesarios para el empaquetamiento se encuentran en el lado derecho (Jeske, 2009) (**Figura 2.1**). Estos genes se encuentran separados por una región intergénica, la cual contiene el origen de replicación del virus. El origen de replicación consiste en una secuencia repetida invertida complementaria, variable en longitud y composición, separada por una secuencia invariable de 9 nucleótidos de longitud (5'-TAATATTAC-3'). Esta secuencia está

presente en el giro estructuralmente conservado y la poseen todos los geminivirus secuenciados hasta ahora (Fontes et al., 1994; Laufs et al., 1995; Gutierrez, 2002).

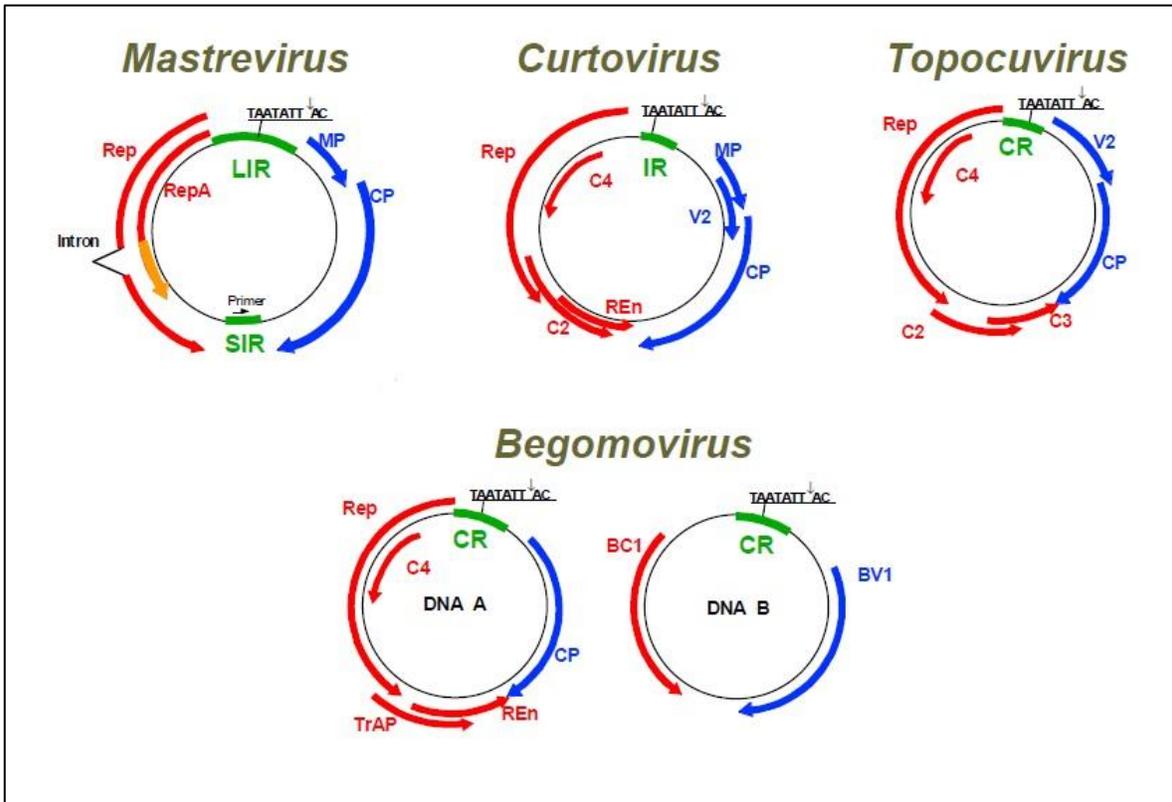


Figura 2.1. Organización del genoma de los 4 géneros de la familia Geminiviridae. RepA, proteína asociada a la replicación; Rep, proteína iniciadora de la replicación; REn, proteína potenciadora de la replicación; TrAP, activador transcripcional; MP, proteína de movimiento; CP, proteína de la cápside; LIR, región intergénica grande; SIR, región intergénica pequeña; IR región intergénica; CR, región común; ↓ origen de replicación (Gutierrez et al., 2004).

Dentro de las proteínas codificadas por el genoma del virus se encuentran las siguientes: proteína de la cápside (Cp), como su nombre lo indica, forma la cápside viral y participa en la transmisión del virus por el vector (Bridson et al., 1990). Las proteínas V1 y V2 funcionan como proteínas anti-defensa cuya función es la de inhibir el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). Adicionalmente a estas proteínas, los Curtovirus y los Bemogomoviros codifican para 3 proteínas adicionales TrAP (proteína activadora de la transcripción), REn (proteína potenciadora de la replicación) y C4. La proteína TrAP, interfiere con el

silenciamiento génico transcripcional (TGS) y con el silenciamiento post-transcripcional (PTGS). En los geminivirus bipartitas, actúa como un factor de transcripción necesario para la expresión del gen de la proteína de la cápside y la proteína transportadora nuclear (NSP). REn (también conocida como C3) está involucrada en la replicación viral y la proteína C4 contrarresta el silenciamiento génico post-transcripcional (Fondong, 2013; Hanley-Bowdoin et al., 2013).

Las proteínas virales son multifuncionales, y algunas de ellas se encuentran altamente conservadas a través de la familia *Geminiviridae*. Tal es el caso de la proteína iniciadora de la replicación (Rep). Esta proteína es llamada RepA y Rep en el caso del género *Mastrevirus* y Rep en el resto de los geminivirus (Argüello-Astorga et al., 1994; Hanley-Bowdoin et al., 2004).

2.3 Proteína iniciadora de la replicación (Rep)

La proteína Rep es codificada por todos los geminivirus y es la única proteína viral necesaria para la replicación del ADN viral. Esta proteína es capaz de unirse al ADN de manera específica y también posee actividad endonucleolítica. Debido a esto, esta proteína cataliza la iniciación y la terminación de la síntesis del ADN (Gutierrez, 2002; Londoño et al., 2010).

Se ha encontrado que la proteína Rep induce la expresión e interactúa con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), el cual es un factor de la ADN polimerasa durante la etapa de replicación y reparación del ADN, en células que no se están dividiendo (Nagar et al., 1995; Castillo et al., 2003). Esto sugiere que la proteína Rep puede provocar el estímulo necesario para inducir el proceso de desdiferenciación. La expresión en plantas transgénicas de las proteínas Rep que poseen un motivo de unión a la proteína de retinoblastoma (pRB), prolongan la proliferación celular e inhiben la diferenciación (Desvoves et al., 2006; Doonan y Sablowski, 2010).

Adicionalmente, Kittelmann et al., (2009) encontraron que la expresión de la proteína Rep del virus africano del mosaico de la cassava (ACMV) en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* provocó una elongación de las células similar a la que se observa durante el ciclo celular. Las células que expresaban la proteína Rep del virus, incrementaron su contenido de ADN, lo que sugiere que esta proteína promueve la reiniciación de la replicación del ADN nuclear. Con esto demostraron que la proteína Rep es el único factor viral necesario para inducir la fase S en la levadura. Xie et al., (1995) utilizando el sistema de doble híbrido, encontraron que la proteína Rep del virus del enanismo del trigo (WDV) contiene un motivo de unión a la proteína del retinoblastoma (pRB) el cual también está presente en las oncoproteínas de algunos virus animales. Este motivo está conservado en otros geminivirus.

2.3.1 Replicación

Los geminivirus se replican originando un gran número de copias y todos emplean las mismas estrategias generales para replicarse y expresar su material genético (Yadava et al., 2010; Hanley-Bowdoin et al., 2013).

El caso de los geminivirus es diferente a la mayoría de los virus fitopatógenos, cuyo genoma es comúnmente ARN. A diferencia de estos virus, los cuales se multiplican en el citoplasma y codifican para su propia replicasa, los geminivirus se replican en el núcleo de la célula. Además, los procesos de replicación y transcripción de su material genético dependen exclusivamente de la maquinaria de replicación (ADN y ARN polimerasas, factores transcripcionales, etc.) de la célula que infectan. Estas características son inusuales entre los virus fitopatógenos. La mayoría de estos virus poseen comúnmente un genoma de ADN, se multiplican en el citoplasma y codifican para su propia replicasa (Hanley-Bowdoin et al., 2004).

La estrategia general empleada por los geminivirus para replicar su material genético es similar a aquella seguida por los fagos de cadena sencilla y los plásmidos. El proceso de replicación se lleva a cabo mediante el mecanismo de círculo rodante el cual se realiza en dos etapas distintas. La primera etapa consiste en la conversión del ADN genómico de cadena sencilla en un intermediario de doble cadena. Este paso se lleva a cabo por la acción de enzimas celulares como la ADN primasa, y las α y δ ADN polimerasas (factores celulares del hospedero). En la segunda etapa se generan nuevos intermediarios de ADN de doble cadena y ADN de cadena sencilla por el mecanismo de círculo rodante (Orozco y Hanley-Bowdoin, 1996; Castellano et al., 1999; Krupovic et al., 2009). El ADN de doble cadena es un templado transcripcionalmente activo, que debido a la actividad de dos promotores divergentes, es transcrito de manera bidireccional (Gutierrez, 2002).

En las plantas, como en todos los eucariontes, las cuatro fases básicas del ciclo celular (G1, S, G2, M) se encuentran conservadas. Durante el desarrollo, las células vegetales salen del ciclo celular y en las plantas maduras la replicación del ADN y las enzimas necesarias para ella, se encuentran confinadas en el tejido meristemático (Oakenfull et al., 2002; Francis, 2007). Por otro lado, los geminivirus se replican en células diferenciadas donde la mayoría de los factores requeridos para la replicación viral están ausentes. Algunos geminivirus han sido encontrados en células maduras de hojas, raíces y tallos. Estas células han salido del ciclo celular y no contienen niveles detectables de las enzimas de replicación que son necesarias para la replicación del virus (Gutierrez, 2002).

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de las cadenas del ADN viral es un proceso que depende de la proteína Rep del virus y de otras enzimas de la célula hospedera que sólo se expresan de forma activa durante la fase S del ciclo. Como consecuencia y para lograr un ambiente adecuado que permita la replicación de su material genético, los geminivirus deben alterar el control del ciclo celular de su hospedero (Orozco et al., 2000; Egelkrout et al., 2001; Nagar et

al., 2002; Wang et al., 2003; Krupovic et al., 2009). Lo anterior sugiere que los geminivirus obtuvieron los mecanismos necesarios para alterar la expresión de los genes que están involucrados en la progresión hacia la fase S y en la transición de la fase G1/S (Gutierrez, 2000a; Hanley-Bowdoin et al., 2004). Se ha encontrado que los intermediarios de ADN de doble cadena producidos durante la replicación del ADN viral, son más abundantes en el núcleo de células que se encuentran en fase S en comparación con los núcleos de otras células que se encuentran en las otras fases del ciclo (Accotto et al., 1993; Hanley-Bowdoin et al., 1999; Hanley-Bowdoin et al., 2004).

En el estudio realizado por Ascencio-Ibañez et al., (2008), utilizando microarreglos, se encontró que durante la infección de plantas de *Arabidopsis thaliana* con el virus del rizado de la hoja de la lechuga (CaLCuV), los genes expresados durante las fases G1 y M fue bajo mientras que el nivel de expresión de los genes relacionados con las fases S y G2 fue alto. La mayor fracción de transcritos cuyo nivel fue elevado fueron aquellos asociados a la fase S mientras que los transcritos que aparecieron en menor cantidad correspondían a aquellos asociados con la fase M. Estos patrones de expresión asimétrica de los genes del ciclo celular sugieren que la infección ocasionada por CaLCuV activa específicamente la fase S e inhibe la fase M, resultando en la inducción de endociclos (Ascencio-Ibañez et al., 2008).

Uno de los principales eventos involucrados en la modificación en el control del ciclo celular del hospedero, parece ser la inactivación de la proteína de retinoblastoma (pRB). Esta proteína regula de manera negativa la transición G1/S en las células. Además, la dependencia en las enzimas del hospedero y la estrategia utilizada durante su replicación, es similar a lo observado durante la replicación en células animales del virus de simio 40 (SV40), el adenovirus humano y el papilomavirus (Nagar et al., 1995; Gutierrez, 2002). Lo anterior sugiere que los geminivirus podrían emplear mecanismos parecidos a los que

utilizan los virus oncogénicos de animales para “reprogramar” el ciclo celular (Torres-Pacheco et al., 1996a).

2.4 Ciclo Celular

El ciclo celular está constituido por una serie ordenada de acontecimientos que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, conteniendo cada una cromosomas idénticos a los de la madre (Lodish et al., 2005). Está dividido en dos etapas conocidas como interfase y fase M (mitosis y meiosis). La interfase a su vez se divide en varias fases conocidas como G₀, G₁, S y G₂. Las fases más importantes son la fase S, donde se lleva a cabo la replicación del ADN, y la fase M donde la célula se divide produciendo dos células hijas. Las fases G₁ y G₂ son fases intermedias. La fase G₁ sigue después de la mitosis y es un periodo de tiempo en el cual la célula es sensible a señales de crecimiento positivas o negativas. En esta fase, la célula se prepara para que el ADN sea duplicado. En la fase G₂, que sucede después de la fase S, la célula se prepara para entrar en mitosis. La fase G₀ representa un estado durante el cual las células, de manera reversible y en respuesta a una elevada densidad celular o a la falta de mitógenos, han salido del ciclo celular (Francis, 2007; Williams y Stoeber, 2012).

La progresión ordenada de eventos durante el ciclo celular, es controlada por la acción de unas proteínas denominadas CDKs (quinasas dependientes de ciclina) y sus reguladores las ciclinas. Las ciclinas son proteínas que se acumulan continuamente a través del ciclo celular y estas se unen a las CDKs y las vuelven activas. Las CDKs solo funcionan cuando se les une una ciclina (Francis, 2007). Así, la ciclina D-CDK4, ciclina D-CDK6 y la ciclina E-CDK2 conducen el paso de la fase G₁ hacia el punto de restricción comprometiendo a la célula a completar el ciclo. La fase S es iniciada por la ciclina A-CDK2, mientras que la progresión a través de la fase G₂ y la entrada a mitosis es iniciada por la ciclina B-CDK1 (Williams y Stoeber, 2012).

La coordinación precisa de las transiciones entre cada una de las fases es crítica para la integridad y supervivencia de la célula. El paso a través de cada una de las fases del ciclo celular así como la transición de una fase a la siguiente, esta monitoreado por puntos de control. Estos puntos controlan que cada evento se lleve a cabo en el orden correcto. Si los mecanismos de control detectan algún error o algún evento quedó incompleto, las rutas de control llevan la señal a los efectores que disparan el arresto del ciclo celular hasta que el problema se resuelva. Dentro de las proteínas efectoras se encuentran los inhibidores de las CDK (CDKIs), los cuales pueden detener de manera reversible la progresión del ciclo. Por ejemplo, el arresto en la fase G1 puede ser inducido a través de la acción de la familia de CDKIs Ink4 (INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) e INK4D (p19)) los cuales inhiben a la CDK4 y CDK6. Alternativamente, también se puede detener en la fase G1 vía la familia de inhibidores Cip/Kip (p21, p27, p57) que suprimen la actividad de la CDK2 (Cho et al., 1998; Williams y Stoeber, 2012).

La pérdida de regulación del motor del ciclo celular conduce a la proliferación celular descontrolada característica de un fenotipo maligno. Los mitógenos retiran el freno a la progresión del ciclo al estimular la actividad de las CDKs que actúan en G1-S. Estas CDKs disparan la fosforilación de las proteínas pRB ocasionando que se rompa la interacción con la familia de factores de transcripción E2F. Generalmente en las células cancerosas el freno mediado por pRB se encuentra dañado, resultando en la expresión de genes de fase G1-S dependientes de E2F aun en la ausencia de mitógenos (Williams y Stoeber, 2012).

Dentro del ciclo celular, existe un punto de decisión en el que la célula elige si continua o no con el ciclo completo. Este punto de decisión, denominado *START* en levadura y punto de restricción en mamíferos, se da en el punto final de la fase G1. Es en este punto en donde la célula decide si avanzar hacia la fase S o detenerse en la fase G1. Una vez superado este punto la célula se compromete, de manera irreversible, a continuar con el ciclo de división (Pardee, 1974; Torres-Pacheco et al., 1996a; Moulager et al., 2010). En plantas y en mamíferos, la

regulación transcripcional de la progresión del ciclo celular durante la fase S, se encuentra bajo el control de los factores de transcripción E2F. Estos a su vez son secuestrados por la proteína de retinoblastoma (Moulager et al., 2010)

2.5 Proteína de Retinoblastoma (pRB)

El control del ciclo celular es un proceso fundamental que gobierna la proliferación celular y la proteína de retinoblastoma (pRB) es un componente crítico de la maquinaria de control del ciclo celular (Knudsen y Knudsen, 2006). El paso a través de la fase G1 del ciclo celular y la transición de la fase G1 a la S involucra la actividad supresora de esta proteína (Miskolczi et al., 2007). La pérdida o inactivación de pRB es uno de los mecanismos principales por los cuales las células de cáncer obtienen una ventaja en su crecimiento durante la tumorigénesis (Knudsen y Knudsen, 2006).

El gen retinoblastoma fue el primero en ser identificado como supresor de tumores y codifica para una proteína de 928 aminoácidos (110-kDa) (Weinberg, 1995; Zhu, 2005; Burkhart et al., 2010). pRB, junto con las proteínas p107 y p130, pertenece a una familia de proteínas cercanamente relacionadas denominadas “proteínas *pocket*”. La similitud en la secuencia entre los miembros de esta familia reside en un dominio (dominio “*pocket*”) el cual está involucrado tanto en la interacción con las oncoproteínas virales como con las proteínas celulares (Du y Pogoriler, 2006; Genovese et al., 2006; Sabelli y Larkins, 2009).

Las proteínas pRB, p107 y p130 son componentes de una ruta que regula las respuestas celulares a una gran variedad de señales. pRB está involucrada en la supresión de tumores, regulación del ciclo celular, diferenciación celular y apoptosis. Estas funciones las lleva a cabo gracias a la interacción con un gran número de proteínas celulares. Actualmente se han reportado más de 100 proteínas que interactúan con pRB entre las cuales se encuentran los factores de transcripción E2F (Mittnacht, 2005; Du y Pogoriler, 2006; Viatur y Sage, 2011).

La interacción de pRB con otras proteínas es regulada por un mecanismo que permite la fosforilación secuencial de pRB por complejos ciclina-CDK (Grafi et al., 1996). Cuando no está fosforilada, pRB se encuentra unida a los factores E2F impidiendo que estos lleven a cabo su función. Debido a esto, ejerce un efecto supresor que ocasiona que las células se detengan en la fase G1 del ciclo celular. Sin embargo, cerca del final de la fase G1 y durante la transición G1-S, pRB es fosforilada por la acción de las quinasas CDK4/CDK6 en conjunto con las ciclinas del tipo D. Lo anterior provoca que pRB pierda la habilidad de interactuar con los factores E2F (Mittnacht, 2005; Khidr y Chen, 2006; Miskolczi et al., 2007). Estos factores regulan un amplio espectro de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, respuesta al daño del ADN, apoptosis, diferenciación, desarrollo, así como otros cuya función se desconoce (Zhu, 2005; Miskolczi et al., 2007). Además, todas las proteínas que se conoce que interactúan con pRB se unen preferentemente a la forma no fosforilada de la proteína (Cam y Dynlacht, 2003; Miskolczi et al., 2007).

Se ha encontrado que las proteínas pRB, p107 y p130 son blancos de las proteínas oncogénicas codificadas por varios virus pequeños de ADN. Entre estas proteínas se encuentran el antígeno T del virus SV40, E1A del adenovirus y E7 del papilomavirus humano. Estas proteínas virales interactúan con la forma no fosforilada de pRB y además contienen un motivo de aminoácidos conservado (LxCxE) que sirve como sitio de unión a esta proteína. Cabe mencionar que este motivo también se ha encontrado en las ciclinas tipo D de plantas así como también en la proteína Rep de los geminivirus (Weinberg, 1995; Grafi et al., 1996; Shepherd et al., 2005). Esta interacción permite desviar la ruta de control normal llevada a cabo por esta proteína ocasionando que las células entren en ciclo de replicación y así llevar a cabo la replicación del ADN viral (Gutierrez, 2000b; Lavia et al., 2003).

El descubrimiento de que la proteína Rep y RepA de algunos geminivirus contiene un motivo LxCxE que interactúa con la proteína pRB humana tanto en

levadura como en pruebas *in vitro*, fue la primera pista de que un mecanismo similar podría ser utilizado por estos virus para inducir un estado celular adecuado para la replicación de su ADN. Al modificar el ciclo celular de la planta vía interacción Rep-pRB, los geminivirus podrían proveer un ambiente favorable para su replicación (Torres-Pacheco et al., 1996a; Kong et al., 2000; Kittelmann et al., 2009).

El motivo LxCxE está conservado en la mayoría de las proteínas RepA de los *Mastrevirus*, el cual está involucrado en la interacción RepA-pRB. Una mutación puntual dentro de este motivo en la proteína RepA reduce significativamente o incluso elimina completamente su capacidad de unión a las proteínas “*pocket*”. Curiosamente, la proteína Rep de los *Begomovirus* carece del motivo LxCxE, y aun así es capaz de unirse a pRB. Se cree que esta unión se lleva a cabo a través de la interacción con regiones α -hélice presentes en la proteína (Xie et al., 1996; Orozco et al., 1997).

El descubrimiento en plantas de un homólogo de la proteína pRB y de otros componentes de la ruta como los factores E2F y las ciclinas de tipo D sugiere que, lejos de estar restringidos al reino animal, al menos algunos de los mecanismos básicos de regulación del ciclo celular se han conservado a través de la evolución (Jager y Murray, 1999; Heuvel y Dyson, 2008). Esto indica que los patrones básicos de control que operan durante la fase G1 del ciclo celular vegetal es similar a los existentes en animales (Oakenfull et al., 2002).

La complejidad de las interacciones celulares entre los geminivirus y su hospedero, en relación con la ruta pRB podría ser comparable con la de los virus de ADN oncogénicos animales. Se requieren de más estudios antes de que se pueda entender completamente, en términos moleculares, la correlación entre la interferencia con la ruta pRB en la planta y la infección por geminivirus. Por otro lado, existe la posibilidad de que otras rutas involucradas en la formación de

tumores en animales por la acción de los oncovirus existan en las plantas y que los geminivirus no sean capaces de alterar e interactuar con ellas.

2.6 Oncovirus

El estudio de los virus de ADN oncogénicos en sistemas animales ha facilitado la identificación y el análisis de la función de rutas celulares clave que se encuentran dañadas durante la carcinogénesis (McLaughlin-Drubin y Munger, 2008). El estudio de estos virus comenzó con la observación de que eran capaces de producir la formación de tumores en una gran variedad de animales. Se encontró que el virus de mono 40 (SV40), contaminante de las células de riñón de los monos Rhesus (*Macaca mulatta*) utilizados para preparar la vacuna contra la polio, era capaz de originar tumores en hámsters recién nacidos y también de transformar células normales (Todaro et al., 1963; Coggin, 1969; Carbone et al., 1997; Carbone et al., 2011). Similarmente, se encontró que el adenovirus humano generaba tumores al ser inyectado en hámsteres recién nacidos (Huebner et al., 1964; DeCaprio, 2009). Estos estudios fomentaron la búsqueda de los mecanismos que permitían a estos virus originar tumores en los modelos experimentales.

Los oncovirus, al igual que los geminivirus, dependen de las enzimas de replicación de su hospedero para replicar su material genético (Kong et al., 2000). Uno de los mecanismos empleados por estos virus para activar los genes del hospedero necesarios para su replicación es a través de la interacción entre las oncoproteínas virales y la proteína de retinoblastoma (Levine, 2009). Se ha encontrado que el antígeno T grande del virus SV40, la proteína EA1 del adenovirus y la proteína E7 del papilomavirus, se unen a pRB mediante la interacción entre motivos y dominios específicos presentes tanto en pRB como en las oncoproteínas (Levine, 2009; Sabelli y Larkins, 2009).

2.7 Virus de Simio 40 (SV40)

El virus de simio 40 (SV40) fue identificado por primera vez en 1960 a partir de cultivos de células de riñón de monos Rhesus. Pertenece a la familia *Polyomaviridae* y es el miembro de esta familia mejor caracterizado (Carbone et al., 2011). El SV40 es un virus pequeño, de aproximadamente 45-50 nm de diámetro. Su genoma consiste en una molécula de ADN circular de doble cadena con un tamaño de 5,243 pb. Codifica para 7 proteínas utilizando marcos de lectura superpuestos. De las 7 proteínas codificadas por el virus, tres son proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3), dos son importantes para el ciclo de vida del virus (antígeno T grande y antígeno t pequeño) y las últimas dos son pequeñas proteínas cuya función se desconoce (agnoproteína y 17kT) (Poulin y DeCaprio, 2006; Carbone et al., 2011). Además, el genoma del virus SV40 contiene dos promotores transcripcionales fuertes, un origen de replicación, varios sitios de *splicing* y una señal de poliadenilación (**Figura 2.2**). Muchos de estos elementos han sido utilizados como herramientas en estudios moleculares y han sido insertados en casi todos los vectores de expresión para células de mamífero (Poulin y DeCaprio, 2006).

Varias cepas del virus SV40 se han aislado a partir tanto de tejidos humanos como de monos. La cepa SV40-776 (silvestre) es la cepa de referencia. Se aisló a partir de una muestra contaminada de la vacuna contra el adenovirus. Otra cepa de importancia es la SV40-B2, también llamada “Baylor”. Esta cepa fue obtenida de la vacuna contra la polio que estaba contaminada con el virus SV40 (Carbone et al., 2011). Las diferencias existentes entre las diferentes cepas son muy pequeñas, indicando que las mutaciones no son toleradas por el pequeño genoma del virus. La mayor parte de estas diferencias fue detectada en la secuencia que codifica para la región variable en el extremo C-terminal del antígeno T grande, dentro de los residuos 622 y 708 (Carbone et al., 2011).

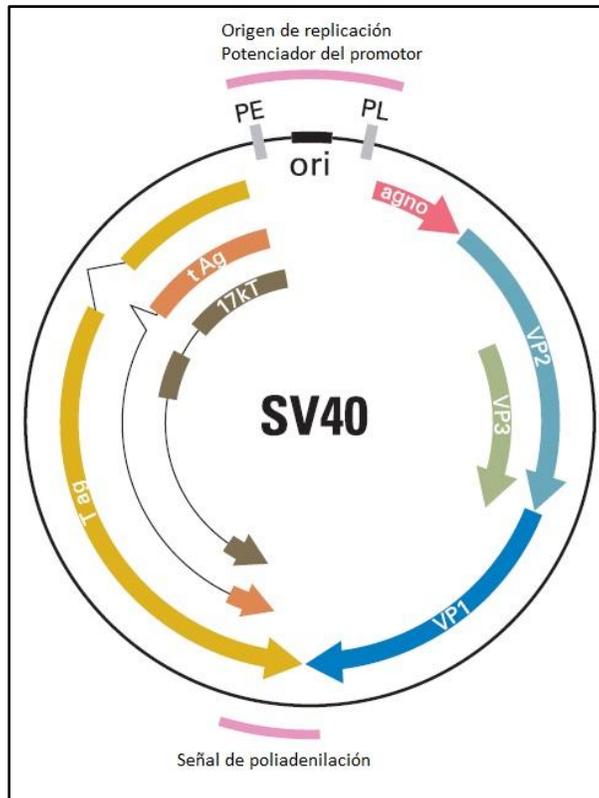


Figura 2.2. Organización del genoma del SV40. PE, promotor temprano; PL promotor tardío; Tag antígeno T grande; t ag, antígeno t pequeño (Poulin y DeCaprio, 2006).

El virus SV40 es incapaz de replicarse en células no permisivas de roedores y hámsteres. Sin embargo, si ocurre la expresión del antígeno T grande lo que da como resultado una transformación morfológica y la inducción de la división celular (Gazdar et al., 2002). El proceso de transformación celular, ocasionado por este virus, depende de la integración del ADN viral en el genoma de la célula hospedera. Esta integración permite una elevada expresión de las principales proteínas oncogénicas, el antígeno T grande y el antígeno t pequeño (Gazdar et al., 2002). El antígeno T grande es una fosfoproteína de aproximadamente 94 kDa. Es una oncoproteína viral multifuncional de 708 aa. Induce la replicación del ADN del virus y junto con el antígeno t pequeño, promueve la progresión del ciclo celular, la entrada a la fase S y la síntesis del ADN en la célula hospedera (Poulin et al., 2004; Carbone et al., 2011). El antígeno

T por si solo puede transformar completamente células en cultivo e inducir tumores en roedores (Poulin et al., 2004).

Las propiedades transformadoras del antígeno T grande se deben a la habilidad que posee de unirse y perturbar la acción de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB. La función de estas proteínas es evitar la formación de tumores controlando la proliferación celular y la apoptosis. Señales celulares como la ausencia de factores de crecimiento, rupturas en la cadena de ADN, activación de oncogenes e hipoxia, pueden activar las rutas supresoras de tumores p53 y pRB. En muchos tumores humanos, se ha encontrado que las proteínas p53 y pRB están ausentes ó se encuentran mutadas debido a alteraciones genéticas, dando como resultado una proliferación celular sin inhibiciones. La inactivación de p53 y pRB es un mecanismo molecular común en el desarrollo de cáncer. En la mayoría de los canceres humanos, estas dos rutas se encuentran dañadas. De manera similar, la inactivación directa de p53 y pRB por la unión con el antígeno T grande ocasiona un crecimiento celular desregulado, resultando en la inmortalización y transformación de algunos tipos celulares (Poulin y DeCaprio, 2006).

Adicionalmente a su función promotora de crecimiento, el antígeno T grande es necesario para la replicación del virus. Se une de manera específica al origen de replicación para así dar inicio a la replicación del ADN viral. Posee actividad helicasa y adenosin trifosfatasa la cuál es necesaria para desdoblarse el ADN y comenzar la replicación del virus. De esta manera, el antígeno T grande provee las funciones esenciales para promover la proliferación celular y la replicación viral (Poulin et al., 2004; Poulin y DeCaprio, 2006).

2.8 Chile (*Capsicum* spp)

Capsicum spp es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia de las solanáceas. El fruto es empleado principalmente como condimento en diversos

platillos gastronómicos, mientras que en la industria se utiliza para la producción de oleorresinas, pigmentos naturales y fármacos (Guzmán-Maldonado et al., 2002).

En México existe una gran diversidad de chiles, tanto cultivados como silvestres; y todos ellos pertenecen a la familia de las Solanáceas y al género *Capsicum*. Las especies cultivadas en México son: *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum annuum*, de las cuales ésta última es la más importante debido a que incluye a la mayor diversidad de chiles como el serrano, el jalapeño, el poblano, el morrón, entre otros (Pozo-Campodónico et al., 1991).

Uno de los principales factores que afecta el rendimiento de este cultivo son las enfermedades causadas por agentes fitopatógenos. Dentro de estas enfermedades, las causadas por geminivirus son las que afectan principalmente los cultivos de chile debido a su rápida distribución por el insecto vector que las transmite. En México, el rizado amarillo del chile fue la primera enfermedad asociada a geminivirus. Esta enfermedad es producida por el virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV) y por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV), ambos pertenecientes al género *Begomovirus*, los cuales causan pérdidas parciales o totales del cultivo (Torres-Pacheco et al., 1996b).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La interacción entre Geminivirus y células de mamífero activa genes relacionados con el control del ciclo celular en ratón.

3.2 Objetivo General

Determinar la red transcriptómica de genes de ciclo celular durante la interacción Geminivirus-células de mamífero y SV40-células de mamífero.

3.3 Objetivos Específicos

1.- Elaborar la construcción genética para la expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en células de mamífero.

2.- Elaborar la construcción genética para la expresión del antígeno T grande del SV40 en plantas de Chile.

3.- Transfectar células de mamífero con la construcción y con los virus PepGMV y SV40.

4.- Inocular plantas de Chile con la construcción y con los virus PepGMV y SV40.

5.- Obtener la expresión de genes de ciclo celular durante las interacciones.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Virus del Mosaico Dorado del Chile (PepGMV)

Se utilizaron los componentes A y B del geminivirus PepGMV (Virus del mosaico dorado del Chile) así como el virus modificado PepGMVRep⁻. Ambos virus fueron proporcionado por el Dr. Rafael Rivera Bustamante profesor investigador del CINVESTAV campus Irapuato. Los componentes del virus se encontraban clonados en el plásmido Bluescript SK (pBS) en construcciones diméricas (**Figura 4.1**).

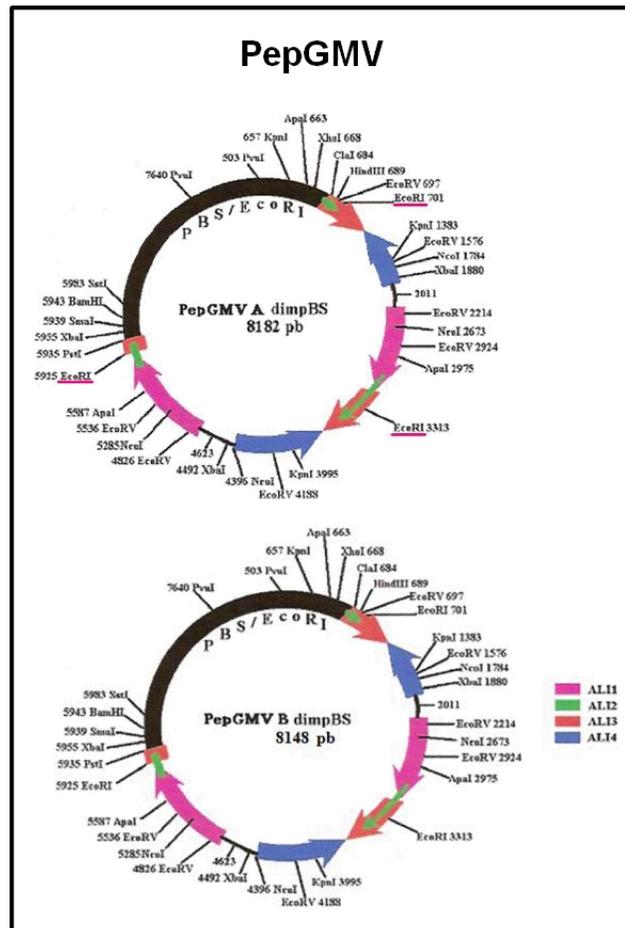


Figura 4.1. Construcción dimérica del componente A y B del geminivirus PepGMV.

4.2 Virus de Simio 40 (SV40)

Se utilizó la clona molecular pUCSV40-B2E (ATCC No. VRMC-3) correspondiente a la cepa Baylor2 del SV40. En esta clona, el genoma completo del virus se encontraba clonado en el sitio EcoR1 del plásmido pUC19.

4.3 Cepas de microorganismos

Se emplearon las cepas de *E. coli* JM109 y OneShot TOP10™ químicamente competentes de la marca Promega® e Invitrogen, respectivamente.

4.4 Línea celular

Como modelo animal se utilizaron fibroblastos de ratón, línea celular 3T3L1 (ATCC número CL-173) proporcionados por la Dra. Teresa García Gasca de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

4.5 Material vegetal

Como material vegetal se emplearon plantas de chile *Capsicum annuum* variedad Sonora Anaheim.

4.6 Crecimiento y mantenimiento del cultivo celular

Los fibroblastos se pusieron a crecer en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, marca Gibco) adicionado con 5% (v/v) de suero de ternera (Biowest). Al medio se le adicionó penicilina (62.1 mg/l), estreptomina (100 mg/l), NaHCO₃ (3.7 g/l), y anfotericina (250 µg/l). Las células se colocaron en placas de 60 mm recubiertas con colágeno Tipo I. Se incubaron en la cámara de crecimiento a una temperatura de 37°C y una atmósfera del 10% de CO₂. El medio

de cultivo se cambio 3 veces por semana y las células se transfirieron al alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia.

4.7 Elaboración de la construcción para la expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en las células 3T3L1

4.7.1 Vector de expresión pTracer™-SV40

Para la expresión de la proteína Rep del geminivirus en las células 3T3L1, se utilizó el vector pTracer™-SV40 de la marca Invitrogen (**Figura 4.2**). Este vector posee el promotor del virus SV40 y el gen de resistencia a Zeocina® así como el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP).

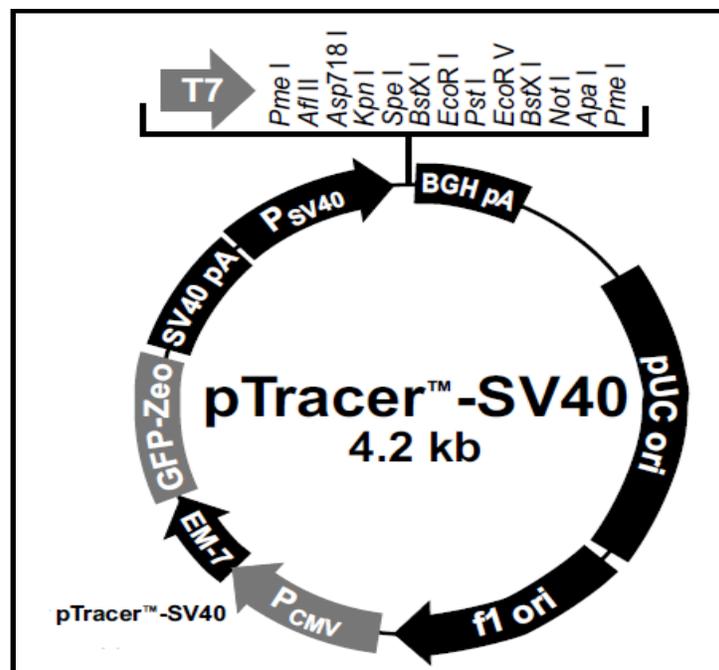


Figura 4.2. Vector pTracer-SV40. PCMV, promotor del citomegalovirus humano; GFP-Zeo, gen de resistencia a Zeocina fusionado con el gen de la proteína verde fluorescente; SV40 pA, potenciador del promotor del virus SV40; PSV40, promotor del virus SV40; BGHpA, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (Invitrogen).

4.7.2 Oligonucleótidos utilizados

La secuencia completa del gen para la proteína Rep se obtuvo de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (GenBank: U57457.1). La amplificación del fragmento correspondiente al marco de lectura del gen que codifica para la proteína Rep se llevó a cabo mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos. A cada uno de estos oligonucleótidos se les adicionó el sitio para la enzima de restricción *SpeI* en el extremo 5' y el sitio para la enzima *KpnI* en el extremo 3'. Adicionalmente y con la finalidad de que la proteína Rep se expresara de manera correcta en las células de mamífero, al oligo antisentido se le adicionó la secuencia de Kozak (GCCACC).

Para contar con un control de expresión negativo, se eliminó el ATG de la secuencia que codifica para la proteína Rep. Para ello, en el oligo sentido se modificaron las bases correspondientes al ATG. Al hacer esto, se logró que la proteína expresada fuera completamente diferente a la proteína Rep original. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en el **Cuadro 4.1**.

4.7.3 Amplificación y clonación del gen de la proteína Rep en el vector pTracer-SV40

La amplificación del inserto correspondiente al marco de lectura abierta del gen que codifica para la proteína Rep se llevó a cabo mediante PCR. La mezcla de reacción se preparó según lo descrito en el anexo 2. Las condiciones de amplificación para el gen de la Rep del PepGMV fueron las siguientes: 95°C por 1 min. /30 ciclos, 95°C por 30 seg., 68°C por 2 min./68°C por 2 min. El producto del PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio. La banda obtenida se purificó utilizando el kit PCR Wizard de Promega (Anexo 2). Posteriormente, el fragmento se ligó en el vector pGem®-Teasy (Promega)

utilizando una relación molar inserto/vector de 3:1. La mezcla de reacción para la ligación fue la siguiente:

Regulador de ligación rápida 2X	5 µl
Vector pGem®-Teasy	1 µl
Producto de PCR	Relación inserto/vector 3:1
ADN ligasa T4	1 µl
Agua	Ajustar a un volumen final de 10 µl

Cuadro 4.1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y detección mediante PCR del gen de la proteína Rep del geminivirus PepGMV, la detección del componente A del PePGMV y la detección del virus SV40.

Nombre	Sentido	Antisentido	Tamaño del fragmento
RepPK	GGTACC <u>ACCATG</u> GCCACTACCACCAAATC*	ACTAG TTTAGCTATCCTGTGCTGTGCT*	1,047 pb
RepPA	GGTACC ACCA ctGC ACTACCACCAAATC*	ACTAG TTTAGCTATCCTGTGCTGTGCT*	1,047 pb
β actina	AGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCC	GGCCACACGCAGCTCATTGTA	106 pb
GAPDH	ATTGTTGCCATCAACGACCCC	CAAGCTTCCCATTCTCGGCC	116 pb
JM23	TGGTGTAGGACTCCAGCAGAGTC		288 pb
JM24	TAGGCCACACCTTGGTGACCAA		
RepPepGMV	CAAAGCTGGTGATCCGAAAACG	GTAAACGAGGATAATGGATAAGG	120 pb
SV40	CAGTGCAGCTTTTTCCTTTGTGGT	AGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTC	120 pb

* El codón de inicio de la traducción está indicado en negritas. Las letras subrayadas corresponden a la secuencia de Kozak. Azul, secuencia de la enzima *SpeI*; verde, enzima *KpnI*.

La reacción se incubó a 4°C por 16 horas. Terminada la reacción, se transformaron células de *E. coli* (JM109 marca Promega) químicamente competentes siguiendo el protocolo descrito en el anexo 2. Las células se sembraron en placas con medio LB (Anexo 1) adicionado con ampicilina (100 µg/ml), X-gal (80 µg/ml) e IPTG (0.5 mM). Se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las colonias que resultaron positivas (color blanco), se pasaron a medio LB

líquido adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C y 220 rpm durante 16 horas.

A las clonas obtenidas se les extrajo el ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina (Anexo 2). Posteriormente, este se cortó con las enzimas *SpeI* y *KpnI* para confirmar la presencia del inserto correspondiente al gen de la proteína Rep. La reacción de digestión se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos (Anexo 2). El inserto liberado se purificó utilizando el *Silica Bead DNA Gel Extraction kit* de Fermentas (Anexo 2). Al mismo tiempo, se cortó el vector de expresión pTracer-SV40 con las enzimas *SpeI* y *KpnI*, se purificó utilizando el kit antes mencionado y se ligó con el fragmento correspondiente a la proteína Rep. La reacción de ligación se preparó de la manera siguiente:

Regulador de la ligasa	4 µl
Relación inserto/vector	5:1
Ligasa T4	0.5 µl
Agua	Ajustar a un volumen de 20 µl

La reacción de ligación se incubó a 15°C por 16 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se transformaron células de *E. coli* (JM109 marca Promega) químicamente competentes siguiendo el protocolo descrito en el anexo 2. Las células se sembraron en placas con medio LB pH 7.5 (Anexo 1) adicionado con Zeocina® (25 µg/ml). Las colonias obtenidas, se pasaron a medio LB líquido adicionado con Zeocina® (40 µg/ml) y se incubaron a 37°C y 220 rpm durante 16 horas. La presencia del inserto se verificó mediante la digestión del ADN plasmídico con las enzimas *SpeI* y *KpnI*. Adicionalmente, se obtuvo la secuencia de la construcción generada para verificar que la secuencia clonada fuera la correcta (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems). De esta manera se obtuvieron las construcciones PepGMVRepK-pTracer™SV40 y PepGMVRepATG-pTracer™SV40.

4.8 Transfección de las células 3T3L1

Las células 3T3L1 fueron transfectadas utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio (Jordan et al., 1996). Para ello, las células en crecimiento exponencial (aproximadamente a un 50% de confluencia) se transfirieron a placas de 60 mm 24 horas antes de la transfección. Se sembraron 400,000 células por placa y se les cambió el medio de cultivo una hora antes de llevar a cabo la transfección.

La formación del co-precipitado ADN-fosfato de calcio se llevo a cabo de la siguiente manera: en un tubo estéril de 5 ml se mezclaron 100 μ l de una solución 2.5M de CaCl_2 con 25 μ g de ADN. La mezcla anterior se llevó a un volumen de 1 ml utilizando regulador TE al 0.1% pH 7.6 (Anexo 1). Un volumen de esta solución (2X Ca/DNA) se combinó con un volumen igual de regulador salino HEPES (HBS) al 2% (Anexo 1). La solución resultante se incubó durante 1 minuto a 25°C. Transcurrido ese tiempo, la solución fue añadida al medio de cultivo. Por cada ml de medio se agregaron 100 μ l de precipitado (400 μ l por placa de 60 mm). Se mezcló el medio moviendo suavemente la placa y posteriormente las células se incubaron durante 6 horas a una temperatura de 37°C y una atmósfera del 10% de CO_2 . Pasadas las 6 horas de incubación, se les cambio el medio de cultivo a las células y se colocaron en la cámara de crecimiento a una temperatura de 37°C y una atmósfera del 10% de CO_2 .

Las células fueron transfectadas con el ADN plasmídico correspondiente al componente A del geminivirus PepGMV, al oncovirus SV40 y las construcciones PepGMV A Rep⁻, PepGMVRepK-pTracerTMSV40 y PepGMVRepATG⁻-pTracerTMSV40.

4.9 Expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en las células 3T3L1

La transfección de las células 3T3L1 con las construcciones PepGMVRepK-pTracer™SV40 y PepGMVRepATG-pTracer™SV40 se verificó mediante la detección de la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando microscopía de fluorescencia. Adicionalmente, la expresión del gen de la proteína Rep se verificó mediante RT-PCR (Anexo 2) a las 48 y 72 h después de la transfección. El ARN total se extrajo utilizando el kit *SV total RNA isolation system* de Promega (Anexo 2). La síntesis de la primera cadena se llevó a cabo mediante el kit *First strand cDNA synthesis* de Fermentas (Anexo 2). La amplificación del ADNc se llevo a cabo utilizando los oligonucleótidos mostrados en el **Cuadro 4.1**. Como control de expresión se emplearon los genes constitutivos gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y β actina.

4.10 Detección del virus PepGMV y SV40 en las células 3T3L1

Para detectar la presencia de los virus en las células, se extrajo el ADN genómico utilizando el procedimiento descrito en el Anexo 2. Posteriormente se detectaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos mostrados en el **Cuadro 4.1**. Para la detección del componente A del geminivirus PepGMV se utilizaron los oligonucleótidos JM23 y JM24 que amplifican un fragmento de 288 pb dentro de la región común del virus (Torres-Pacheco et al., 1996). En el caso del virus SV40, los oligonucleótidos utilizados amplifican una región conservada del antígeno T grande.

4.11 Expresión de genes de ciclo celular (Arreglos de qPCR).

El análisis de la expresión de los genes involucrados en el ciclo celular se llevó a cabo mediante qPCR, utilizando el arreglo *RT² Profiler™ PCR Array Mouse Cell Cycle* (SAbiosciences PAMM-020A). El arreglo incluía 84 genes involucrados en el control del ciclo celular, 5 genes constitutivos (housekeeping), 1 control de

contaminación por ADN genómico, 3 controles de la transcripción reversa y 3 controles positivos para la amplificación. La distribución de cada uno de los genes en el arreglo se muestra en la **Figura 4.3**. La función de cada grupo de los genes analizado, así como el nombre de los mismos se encuentra resumida en el

Cuadro 4.2.

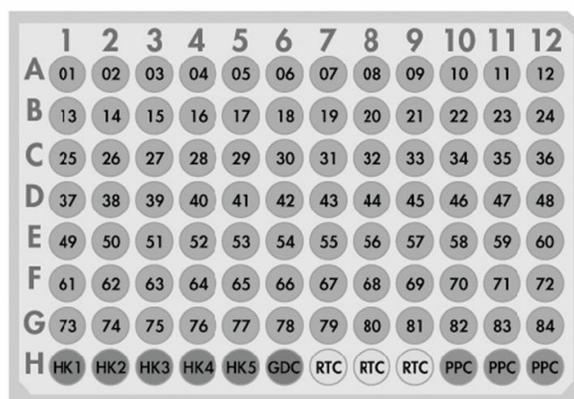


Figura 4.3 Distribución de los genes en el arreglo de qPCR. A01-G84, genes de ciclo celular; HK1-HK2, genes constitutivos (housekeeping); RTC, control de la transcripción reversa; PPC, control positivo de amplificación.

Cuadro 4.2. Descripción de los genes incluidos en el arreglo de qPCR.

Función del grupo de genes	Genes	Número de genes
Fase G1 y transición G1/S.	Camk2a, Camk2b, Gpr132, Itgb1, Mtbp, Myb (C-MYB), Nfatc1, Ppp2r3a, Ppp3ca, Skp2, Taf10, Slfn1.	12
Fase S y replicación de ADN.	Dnajc2 (Zrf2), Mcm2, Mcm3, Mcm4, Mki67, Mre11a, Msh2, PcnA, Rad17, Rad51, Sumo1	11
Fase G2 y transición G2/M.	Dnajc2 (Zrf2), Chek1, Ppm1d..	3
Fase M.	Brca2, Ccna1 (Cyclin A1), Ccnb1, Cdc25a, Cdk2, Nek2, Npm2, Pes1, Prm1, Rad21, Ran, Shc1, Smc1a (Smc111), Stag1, Terf1, Psmg2, Wee1.	17

Continuación Cuadro 4.2

Función del grupo de genes	Genes	Número de genes
Punto de control del ciclo celular y arresto del ciclo.	Ak1, Apbb1, Brca2, Casp3, Cdk5rap1, Cdkn1a, Cdkn1b, Cdkn2a, Chek1, Cks1b, Ddit3 (CHOP), Dst, Gadd45a, Hus1, Inha, Macf1, Mad2l1, Mdm2, Msh2, Notch2, Pkd1, Pmp22, Ppm1d (WIP1), Rad9, Sesn2 (Sestrin 2), Sfn (Stratifin), Slfn1, Smc1a (Smc1l1), Tsg101.	29
Regulación del ciclo celular.	Abl1, Brca2, Ccna1, Ccna2, Ccnb1, Ccnb2, Ccnc, Ccnd1, Ccne1, Ccnf, Cdk4, Cdkn1a, Cks1b, E2f1, E2f2, E2f3, E2f4, Gadd45a, Itgb1, Rad9, Ran, Sfn (Stratifin), Shc1, Skp2, Tfdp1, Psmg2.	26
Regulación negativa del ciclo celular	Apbb1, Atm, Brca1, Casp3, Cdkn2a, Inha, Rbl1, Rbl2, Trp53, Trp63	10

4.11.1 Síntesis del ADN complementario.

Se extrajo el ARN total de las células utilizando el kit *SV total RNA isolation system* de Promega (Anexo 2). La síntesis del ADN complementario se realizó utilizando el kit *RT² First Strand* (SAbiosciences). Se partió de 500 ng de ARN total para un arreglo de 96 pozos. Como primer paso, al ARN se le dio un tratamiento con DNasa para asegurar que no hubiera contaminación de ADN genómico en la muestra. Para ello se preparó la siguiente mezcla:

RNA	500 ng
Buffer GE	2 µl
Agua libre de RNasa	Ajustar a un volumen de 10µl

La mezcla se incubó a 42°C por 5 min y después se pasó a hielo por 1 min. Concluido este tiempo, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

	Para 1 Reacción
Regulador 5X BC3	4 μ l
Control P2	1 μ l
Mezcla de transcriptasa reversa RE3	1 μ l
Agua libre de RNasas	3 μ l
Volumen total	10 μ l

Esta mezcla se adicionó a la mezcla de eliminación del ADN genómico y se incubó en el termociclador durante 5 min a 42°C. La reacción se detuvo calentando la muestra a 95°C por 5 min. Por último, se adicionaron 91 μ l de agua libre de RNasas al producto de la reacción.

4.11.2 *RT² Profiler™ PCR Array Mouse Cell Cycle qPCR*

Una vez sintetizado el ADNc se preparó la mezcla de reacción para el qPCR. Se utilizó la mezcla de reacción RT² SYBR Green Mastermix (SAbiosciences) y se preparó de la manera siguiente:

2x RT ² SYBR Green Mastermix	1350 μ L
AND complementario	120 μ L
Agua libre de RNasas	1248 μ L
Volumen total	2700 μ L

La mezcla de reacción se adicionó al arreglo utilizando una micropipeta multicanal de 200 μ L. Se adicionaron 25 μ L de mezcla de reacción a cada pozo del arreglo cuidando de que no quedaran burbujas dentro del pozo. La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador de la marca BioRad modelo CFX96. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Duración
1	95°C	10 minutos

40	95°C	15 segundos
	Rampa de temperatura 1°C/segundo	
	60°C	1 minuto
1	95°C	10 segundos

Curva de fusión 65°C a 95°C en incrementos de 0.5°C durante 5 segundos.

El nivel de expresión de los genes fue calculado por el método Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software *RT² Profiler PCR Array Data Analysis* versión 3.5 de SABiosciences, basado en el método $\Delta\Delta Ct$. Los datos se normalizaron utilizando los genes constitutivos y se consideraron las secuencias como genes potenciales si el cambio en la expresión fue mayor de 2 veces con respecto al control.

4.12 Elaboración de la construcción para la expresión del antígeno T grande del SV40 en plantas de Chile.

4.12.1 Vector de expresión pBI121.

Para la expresión del antígeno T grande del virus SV40 en las plantas de Chile, se utilizó el vector binario pBI121 el cual posee el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CMV) y el gen neomicina fosfotransferasa II (NPTII) que brinda resistencia a kanamicina (**Figura 4.4**).

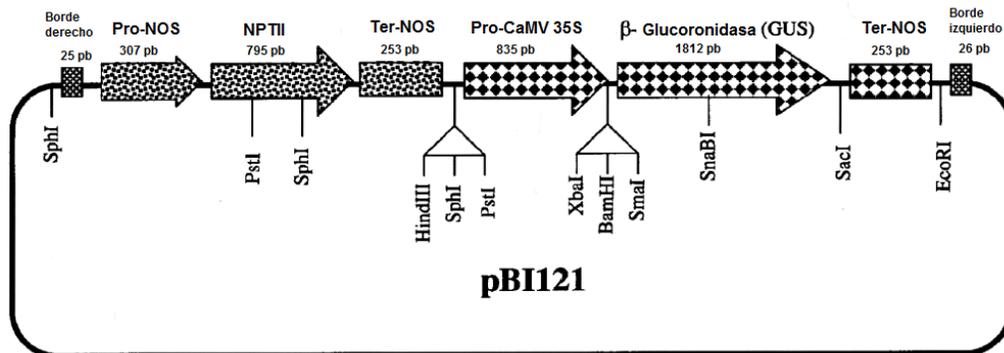


Figura 4.4. Vector pBI121 (Chen et al., 2003)

4.12.2 Oligonucleótidos utilizados.

La secuencia completa del gen para el antígeno T grande se obtuvo de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (GenBank: J02400.1). La amplificación del fragmento correspondiente al marco de lectura del gen se llevó a cabo mediante PCR. Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos (**Cuadro 4.3**). A cada uno de estos oligonucleótidos se les adicionó el sitio para la enzima de restricción *XbaI* en el extremo 5' y el sitio para la enzima *SacI* en el extremo 3'.

Cuadro 4.3 Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR del gen del antígeno T grande del SV40. En azul la secuencia de corte de la enzima *XbaI* y en verde la de *SacI*.

Nombre	Secuencia
AtgSV40F	GAGCTCTTATGTTTCAGGTTTCAGGGG
AtgSV40R	TCTAGAGCAAATATGGATAAAGTTTTAAACA
AtgSV40iF	TCAGTTCCATAGGTTGGAATCTCAGTTGCATCCCAGAAGC
AtgSV40iR	GCTTCTGGGATGCAACTGAGATTCCAACCTATGGAACTGA

4.12.3 Eliminación del intrón del antígeno T grande del SV40 mediante ensamble por PCR.

El gen que codifica para el antígeno T grande posee un intrón de 374 pb de longitud (del nucleótido 4571 al 4918). Para asegurar una correcta expresión de la proteína en las células vegetales, se optó por remover el intrón mediante la técnica de ensamble por PCR. Para ello se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran la región anterior y posterior al intrón y que además tuvieran los sitios para las enzimas de restricción *XbaI* y *SacI* (**Cuadro 4.3**). En la **Figura 4.5** se esquematiza el ensamble por PCR.

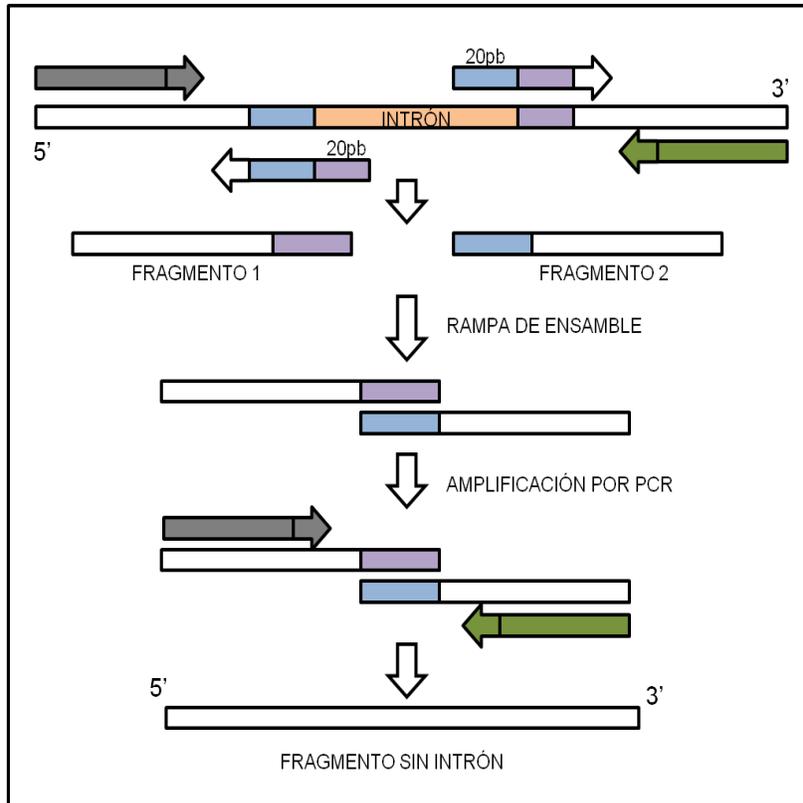


Figura 4.5. Ensamble por PCR para remover el intrón del antígeno T grande del SV40.

Como primer paso se llevó a cabo la amplificación de cada uno de los dos fragmentos mediante PCR. Un fragmento (1889 pb) se amplificó utilizando el par de oligos AtgSV40F y AtgSV40iR y el otro fragmento (245 pb) con el par AtgSV40iF y AtgSV40R. Esta primera amplificación se hizo utilizando la enzima *Pfu* (Fermentas 2.5 u/ μ l) debido a que esta enzima no adiciona adeninas en el extremo 3'. La reacción se preparó de la siguiente manera:

Buffer de enzima 10X con $MgSO_4$	2.5 μ l
dNTP's (10 mM)	0.5 μ l
<i>Pfu</i> ADN polimerasa	0.5 μ l
ADN	100 ng
Agua	a un volumen de 25 μ l

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C/1 min, 30 ciclos 94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/1:30 min y 72°C/2 min. Una vez amplificados, los fragmentos se purificaron utilizando el kit PCR *Wizard* de Promega (Anexo 2), para utilizarlos como molde durante la rampa de ensamble.

La rampa de ensamble se llevó a cabo utilizando la enzima DreamTaq® Polimerasa (Fermentas 5 u/ µl) y la reacción se preparó de la siguiente manera:

Concentración fragmento 1	100 ng
Concentración fragmento 2	100 ng
Buffer enzima	2 µl
Agua	a un volumen de 20 µl

La reacción se sometió a una rampa de temperatura por lo que se programo el termociclador de tal manera que la temperatura fuera disminuyendo desde 95°C hasta 45°C a una velocidad de 1°C/min. Terminada la rampa de temperatura se adicionó lo siguiente a la mezcla de reacción:

dNTP's (10mM)	2.5 µl
Enzima DreamTaq®	0.2 µl
Agua	2.5 µl
Volumen total	5 µl

La reacción se incubó a 72°C por 10 min. Posteriormente, se realizó una amplificación por PCR utilizando como templado 2 µl del producto de la rampa de ensamble y utilizando el par de oligonucleótidos AtgSV40F y AtgSV40R (**Cuadro 4.3**). Para ello nuevamente se utilizó la enzima DreamTaq® Polimerasa (Fermentas 5u/ µl) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C/1 min, 30 ciclos 94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/1 min y 72°C/2 min.

4.12.4 Clonación del gen del antígeno T grande completo y sin intrón del SV40 en el vector pBI121.

La amplificación del marco de lectura abierta del gen que codifica para el antígeno T grande completo se llevo a cabo mediante PCR. La mezcla de reacción se preparó según lo descrito en el anexo 2. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C/1 min, 30 ciclos 94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/1 min y 72°C/2 min. El producto del PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio.

Las bandas correspondientes al antígeno T grande completo y al antígeno T grande sin intrón (producto de la ramba de ensamble), se purificaron utilizando el kit PCR *Wizard* de PROMEGA (Anexo 2). Posteriormente, cada uno de los fragmentos se ligó en el vector pCR[®]4-TOPO[®] de Invitrogen utilizando una relación molar inserto/vector de 3:1. La mezcla de reacción para la ligación fue la siguiente:

Producto de PCR	Relación inserto/vector 3:1
Solución salina	1 µl
Vector TOPO 4.0	1 µl
Agua	Ajustar a un volumen final de 6 µl

La reacción se incubó a 22°C por 30 minutos. Terminada la reacción, se transformaron células de *E. coli* (TOP10[®] marca Invitrogen) químicamente competentes siguiendo el protocolo descrito en el anexo 2. Las células se sembraron en placas con medio LB (Anexo 1) adicionado con ampicilina (100 µg/ml). Se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas se pasaron a medio LB líquido adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C y 220 rpm durante 16 horas.

A las clonas obtenidas se les extrajo el ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina (Anexo 2). Posteriormente, se cortó con las enzimas *XbaI* y *SacI* para confirmar la presencia del inserto correspondiente al antígeno T grande, completo y sin intrón. La reacción de digestión se llevo a cabo a 37°C durante 30 minutos (Anexo 2). El inserto liberado se purifico utilizando el *Silica Bead DNA Gel Extraction kit* de Fermentas (Anexo 2). Al mismo tiempo, se cortó el vector pBI121 con las enzimas *XbaI* y *SacI*, removiendo así el gen reportero GUS. El vector ya cortado se purificó utilizando el kit antes mencionado y se ligó con el fragmento correspondiente al antígeno T grande, completo y sin intrón. La reacción de ligación se preparó de la manera siguiente:

Regulador de la ligasa	4 µl
Relación inserto/vector	5:1
Ligasa T4	0.5 µl
Agua	Ajustar a un volumen de 20 µl

La reacción se incubó a 15°C por 16 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se transformaron células de *E. coli* (JM109 marca Promega) químicamente competentes siguiendo el protocolo descrito en el anexo 2. Las células se sembraron en placas con medio LB (Anexo 1) adicionado con Kanamicina (50 µg/ml). Las colonias obtenidas, se pasaron a medio LB líquido adicionado con Kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C y 220 rpm durante 16 horas. La presencia del inserto se verificó mediante la digestión del ADN plasmídico con las enzimas *XbaI* y *SacI*. Adicionalmente, se obtuvo la secuencia de las construcciones generadas para verificar que la secuencia clonada fuera la correcta (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems). De esta manera se obtuvieron las construcciones ATgcSV40-pBI121 (antígeno T grande completo) y ATgsiSV40-pBI121 (antígeno T grande sin intrón).

4.13 Inoculación de las plantas de chile con el geminivirus PepGMV, el virus SV40 y las construcciones ATgcSV40-pBI121 y ATgsiSV40-pBI121.

Las plantas de chile se inocularon mediante la técnica de biobalística a baja presión. Este procedimiento se llevó a cabo en el CINVESTAV campus Irapuato. Se inocularon plantas con 4 a 6 hojas verdaderas. La preparación y recubrimiento de las partículas de Tungsteno se realizó siguiendo el protocolo descrito en el anexo 2. Las plantas se inocularon en las hojas apicales utilizando 5 µg de ADN por cada 12 disparos y utilizando una presión de 120 psi. Se dio un disparo por planta y se inocularon 5 plantas por cada una de las muestras. Los tratamientos probados se muestran en el **Cuadro 4.4**.

Cuadro 4.4 Tratamientos utilizados en la inoculación de las plantas.

Tratamiento	PepGMV A	PepGMV B	SV40	PepGMV Rep	ATgcSV40	ATgsiSV40
1	X	X				
2	X	X	X			
3		X	X			
4			X			
5		X		X		
6					X	
7						X
Control	Plantas inoculadas con agua					

Se tomó muestra a los 8 y 20 días post inoculación y se extrajo el ADN genómico tanto de las hojas apicales como de las hojas basales. El ADN genómico se extrajo mediante el método de Dellaporta (Anexo 2).

4.13.1 Detección y movimiento del geminivirus PepGMV y el virus SV40 en las plantas inoculadas.

La presencia y movilidad de los virus dentro de la planta se determinó mediante PCR. Para ello, se extrajo el ADN genómico de las plantas inoculadas

con cada uno de los virus mediante el método de Dellaporta (Anexo 2). Posteriormente, se llevo a cabo la detección mediante PCR del virus PepGMV y el virus SV40 en las hojas basales y apicales de las plantas inoculadas. Se utilizaron los oligonucleótidos mostrados en el **Cuadro 4.1**.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Elaboración de la construcción para la expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en las células de mamífero.

5.1.1 Amplificación y generación de los sitios de restricción.

El marco de lectura abierta (ORF) del gen que codifica para la proteína Rep del geminivirus PepGMV, fue amplificado mediante PCR. Lo anterior permitió generar los sitios de restricción para las enzimas *SpeI* en el extremo 5' y *KpnI* en el extremo 3'. En la **Figura 5.1** se muestra el resultado de la amplificación. Se observó una banda de aproximadamente 1,047 pb, carriles 2 y 3, correspondiente al gen de la proteína Rep del PepGMV.

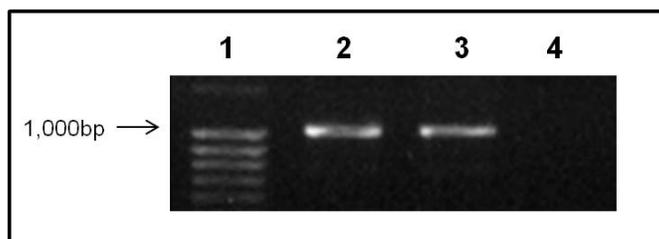


Figura 5.1. Amplificación por PCR del gen de la proteína Rep. Carril 1: Marcador de tamaño molecular; Carril 2: Rep PepGMV; Carril 3: RepPepGMVATG-; Carril 4: Control negativo.

5.1.2 Ligación del inserto en el vector pTracer-SV40.

Se extrajo el ADN plasmídico de las clonas obtenidas a partir de la transformación de las células de *E. coli* con el producto de la ligación (**Figura 5.2**). La ligación se llevó a cabo entre el inserto correspondiente al gen de la proteína Rep y el vector de expresión pTracer-SV40. Posteriormente, se realizó la digestión del ADN plasmídico con las enzimas de restricción *SpeI* y *KpnI* para corroborar que las clonas obtenidas tuvieran realmente en inserto de interés. La **Figura 5.2b** muestra el resultado de la digestión. En ella se observan dos bandas, una

correspondiente al vector pTracer-SV40, de un tamaño de 4.2 kb y una segunda banda de 1,047 pb correspondiente al gen de la proteína Rep.

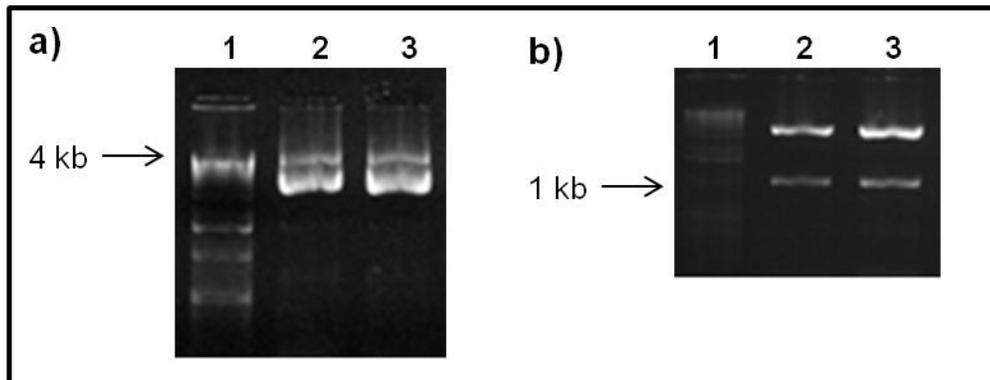


Figura 5.2. ADN plasmídico y digestión. a) ADN plasmídico de las clonas obtenidas. Carriles: 1, marcador de tamaño; 2, PepGMVRepK-pTracer™SV40; 3, PepGMVRepATG--pTracer™SV40.. b) Digestión con las enzimas *SpeI* y *KpnI*. Carriles: 1, marcador de tamaño; 2, PepGMVRepK-pTracer™SV40; 3, PepGMVRepATG--pTracer™SV40.

Los resultados anteriores confirman la ligación del gen de la proteína Rep en el vector de expresión pTracer-SV40, obteniéndose así las siguientes construcciones: PepGMVRepK-pTracer™SV40 y PepGMVRepATG⁻-pTracer™SV40 (**Figura 5.3**). Adicionalmente, se obtuvo la secuencia de cada una de estas construcciones para verificar que la secuencia y la orientación fuera la correcta.

5.2 Transfección de las células 3T3L1 con las construcciones PepGMVRepK-pTracer™SV40 y PepGMVRepATG⁻-pTracer™SV40.

La transfección de las células 3T3L1 se llevó a cabo por el método de precipitación con fosfato de calcio. Como control negativo de la transfección se utilizó agua. La presencia de la construcción en las células transfectadas se verificó mediante la detección de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP).

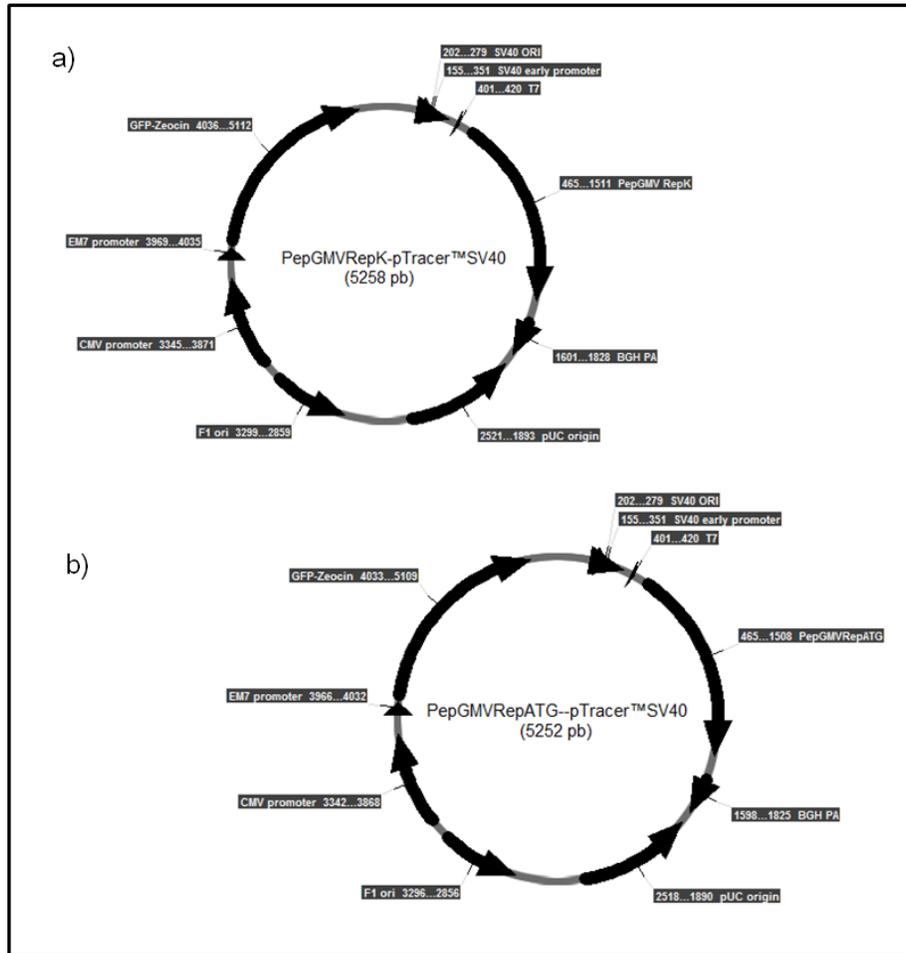


Figura 5.3. Mapa de las construcciones para la expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en células de mamífero. a) PepGMVRepK-pTracer™SV40; b) PepGMVRepATG--pTracer™SV40. Características: Promotor del SV40: Provee una alta expresión del gen de interés. PepGMVRep: Marco de lectura del gen que codifica para la proteína Rep del Geminivirus PepGMV. bGH PA: Sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. ColE1: Origen de replicación en *E. coli*. Permite la replicación del vector en células de *E. coli*. Promotor T7: Permite la secuenciación del inserto. Promotor CMV: Promotor del Citomegalovirus humano. Permite la expresión del gen de resistencia GFP-Zeocina™. Promotor EM7. Permite la expresión del gen de resistencia GFP-Zeocina™ en células de *E. coli*. GFP-Zeocina™: Gen reportero que permite la detección visual de las células transfectadas utilizando microscopía de fluorescencia.

El resultado se muestra en la **Figura 5.4**. Las células transfectadas reaccionaron y fluorescieron, en contraste con las células control en las cuales no se observó fluorescencia (**Figura 5.4b**). Lo anterior indica la presencia de la construcción dentro de las células, y la expresión de la GFP está correlacionada

con la expresión del gen de la proteína Rep. Por lo tanto, el método de transfección fue efectivo y al detectar la GFP, era probable que el gen de la proteína Rep se estuviera transcribiendo. Para corroborar lo anterior, se realizó una reacción de RT-PCR. La **Figura 5.5** muestra el resultado del análisis de las células transfectadas a las 48 y 72 horas después de la transfección. Se utilizó el gen constitutivo de β actina como control de expresión. Se observó una banda correspondiente al gen de la proteína Rep en las células transfectadas con ambas construcciones, PepGMVRepK-pTracer™SV40 y PepGMVRepATG-pTracer™SV40, tanto a las 48 como a las 72 horas después de la transfección. Por el contrario, esta banda no se observó en las células control y tampoco en las células que fueron transfectadas únicamente con el vector pTracer-SV40 (**Figura 5.5**). Indicando que se llevó a cabo la transcripción del gen de la proteína Rep en las células transfectadas y por lo tanto que la construcción estaba funcionando.

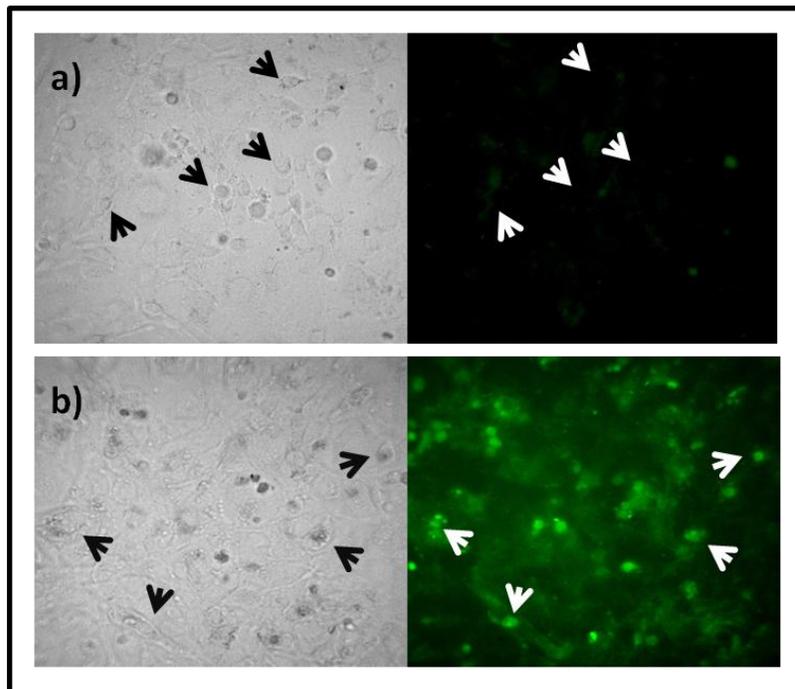


Figura 5.4. Microscopía de fluorescencia de las células transfectadas. a) Células control. b) Células transfectadas con la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40. Izquierda: luz blanca. Derecha: fluorescencia. Las flechas indican la posición de la célula.

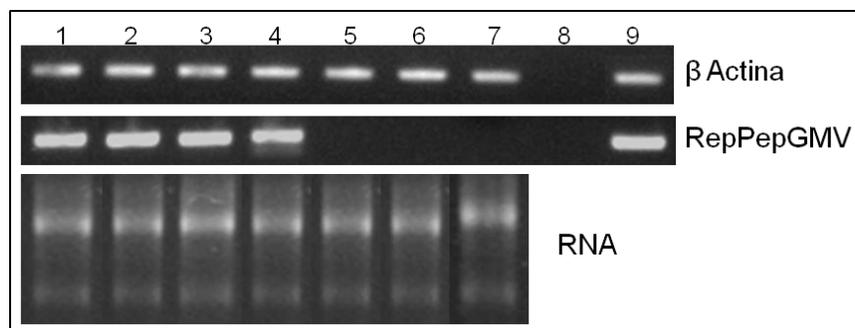


Figura 5.5. RT-PCR de las células transfectadas. Carril: 1 PepGMVRepK-pTracer™SV40 48 hrs; 2, PepGMVRepATG⁻-pTracer™SV40 48 hrs; 3, PepGMVRepK-pTracer™SV40 72 hrs; 4, PepGMVRepATG⁻-pTracer™SV40 72 hrs; 5, vector pTracer-SV40 48 hrs; 6, pTracer-SV40 72 hrs; 7, Células control; 8 Control (-); 9 Control (+).

5.2.1 Crecimiento de las células 3T3L1 transfectadas con las construcciones PepGMVRepK-pTracer™SV40 y PepGMVRepATG⁻-pTracer™SV40.

Con el objetivo de determinar si la expresión del gen de la proteína Rep del geminivirus PepGMV afecta en el crecimiento celular, se realizó el conteo de las células 3T3L1 transfectadas con las construcciones PepGMVRepK-pTracer™SV40 y PepGMVRepATG⁻-pTracer™SV40. El conteo se llevó a cabo utilizando una cámara Neubauer y se realizó a las 48 y 72 hrs después de la transfección. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas entre cada una de las muestras. El análisis se hizo para cada uno de los tiempos, 48 y 72 h respectivamente. El resultado del análisis se muestra en el **Cuadro 5.1**.

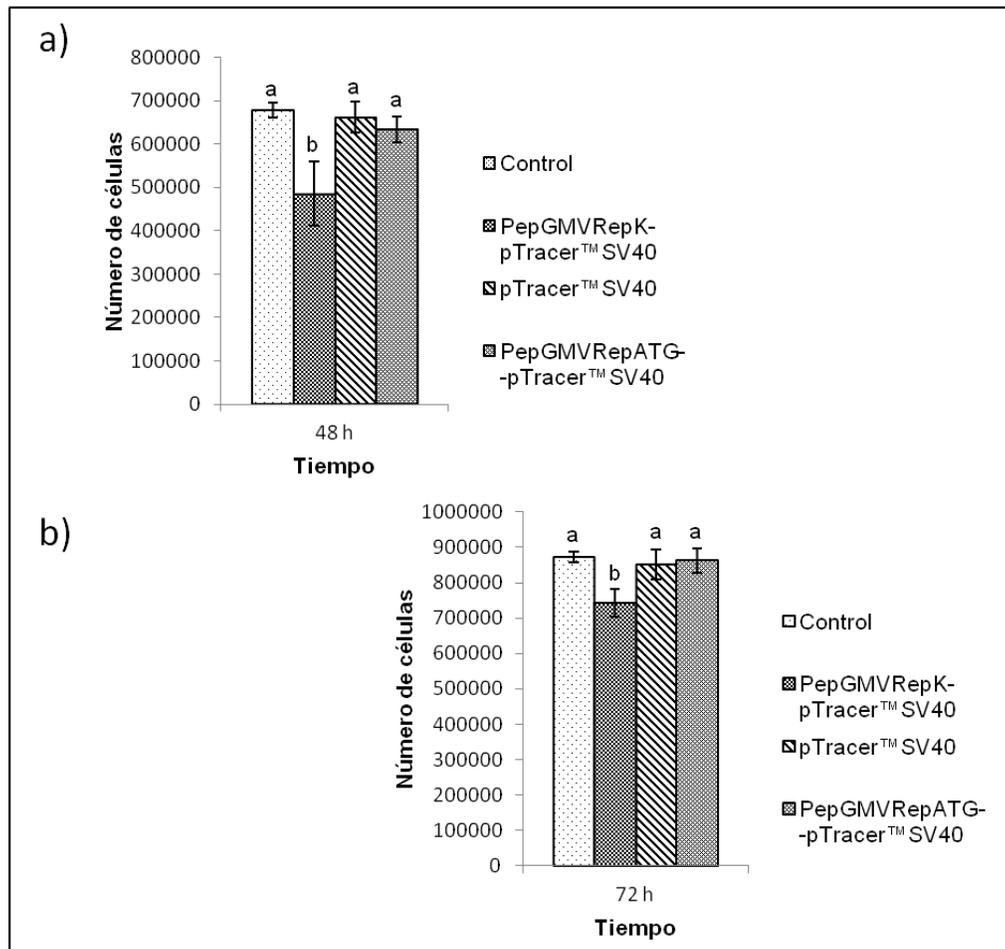
Se encontró que si existían diferencias significativas ($F < 0.05$) entre las muestras. En la **Figura 5.6** se muestra el resultado del conteo, así como el resultado de la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre las células que expresaban el gen de la proteína Rep del geminivirus y las células control. Teniendo las primeras un crecimiento más lento en comparación con las control.

Cuadro 5.1 Análisis de varianza del crecimiento celular.*

Tiempo = 48 h					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Muestra	3	7.05E+10	2.35E+10	11.7742	0.0026
Error	8	1.60E+10	2.00E+09		
C. Total	11	8.65E+10			

Tiempo = 72 h					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Muestra	3	3.33E+10	1.11E+10	9.4732	0.0052
Error	8	9375665496	1.17E+09		
C. Total	11	4.27E+10			

*El análisis se realizó utilizando un valor de $\alpha = 0.05$



*La comparación entre medias se realizó mediante la prueba de Tukey utilizando un valor de $\alpha = 0.05$ para $p < 0.05$. Las muestras con diferente letra mostraron diferencias significativas.

Figura 5.6 Crecimiento de las células 3T3L1 transfectadas con las construcciones PepGMVRepK-pTracer™ SV40, PepGMVRepATG⁻-pTracer™ SV40 y con el vector de expresión pTracer™ SV40.*

En el caso de las células transfectadas únicamente con el vector de expresión pTracerSV40 su crecimiento fue similar al de las células control (**Figura 5.6**). Lo anterior indica que la expresión del gen de la proteína Rep está afectando el crecimiento celular, aun cuando se trata de un gen que viene de un virus que infecta plantas.

En la **Figura 5.7** se muestran las imágenes al microscopio óptico de las células transfectadas, a las 48 y 72 hrs. Se observa que a las 72 h, el crecimiento de las células transfectadas con la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40 es menor en comparación con las células control y con las transfectadas únicamente con el vector de expresión. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en el conteo celular, en el cuál se obtuvo un menor crecimiento en las células que expresaron el gen de la proteína Rep en comparación con las células control y con las que tenían únicamente el vector. Cabe mencionar que las células que expresaron el gen de la proteína Rep no presentaron características morfológicas diferentes, comparadas con las células control (**Figura 5.7**).

5.3 Transfección de las células 3T3L1 con el componente A del geminivirus PepGMV, el virus SV40 y el PepGMV Rep

Con el objetivo de determinar si el geminivirus PepGMV es capaz de replicarse en las células de mamífero y de alterar los controles del ciclo celular de las mismas, el componente A de este virus fue transfectado en las células 3T3L1. Cabe mencionar que se utilizó únicamente el componente A del virus debido principalmente a que es en este componente es donde se localiza el gen que codifica para la proteína Rep. La transfección se llevó a cabo por el método de precipitación con fosfato de calcio y como control negativo de la transfección se utilizó agua. Adicionalmente, las células se transfectaron con el virus SV40 con la finalidad de contar con una referencia en cuanto a efectos causados por un virus que es reconocido por las células y que está reportado que altera los controles del ciclo celular (Cheng et al., 2009). Otro control utilizado fue el componente A del

PepGMV al cual le fue removido el gen que codifica para la proteína Rep. Lo anterior con el propósito de determinar si la proteína Rep es la responsable de los cambios observados o se deben a la acción de los otros genes codificados por el geminivirus.

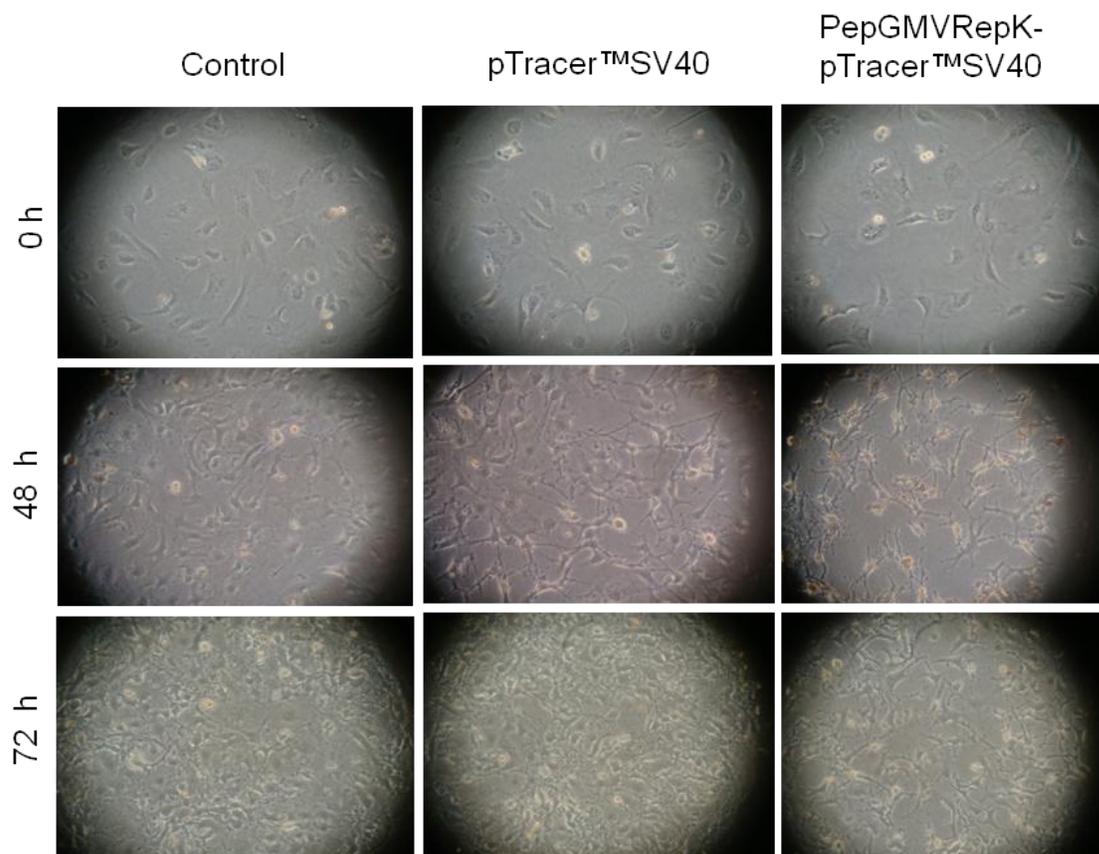


Figura 5.7. Células transfectadas vistas al microscopio óptico. La imagen muestra una zona representativa de toda la caja de cultivo.

Las células se colectaron a las 48 y 72 horas después de la transfección. La presencia del ADN del PepGMV y del SV40 en las células de mamífero, se confirmó mediante PCR. Para ello se extrajo el ADN genómico de las células para posteriormente llevar a cabo una amplificación utilizando los oligonucleótidos para el gen del antígeno T grande y los oligonucleótidos JM23 y JM24 para el caso del geminivirus PepGMV (**Cuadro 4.1**). La **Figura 5.8** muestra la amplificación por PCR del ADN del componente A del PepGMV y del virus SV40 en las células

transfectadas. En las muestras tomadas tanto a las 48 como a las 72 horas se observó una banda de 1,047 pb correspondiente al gen de la proteína Rep. De igual manera se observó una banda de 288 pb correspondiente a la región común del componente A del PepGMV (**Figura 5.8 a y c**). De esta manera se confirmó la presencia del ADN del PepGMV dentro de las células. De igual manera, tanto a las 48 como a las 72 horas se observó una banda de aproximadamente 120 pb correspondiente a una zona dentro de la región conservada de antígeno T grande, indicando así la presencia del virus SV40 dentro de las células (**Figura 5.8 b y d**). Estos resultados indican que ambos virus están dentro de la célula y en el caso del PepGMV, que aún se puede detectar en las células aún a las 72 h después de la transfección.

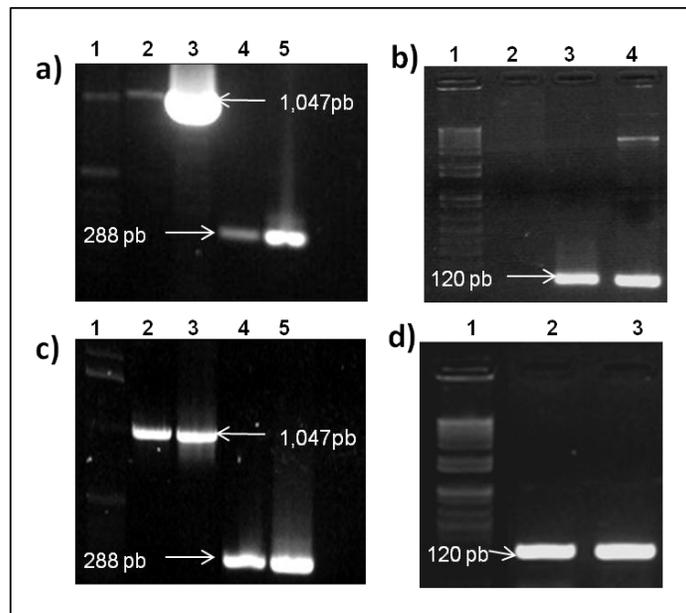


Figura 5.8. Amplificación por PCR del componente A del PepGMV y el virus SV40 en las células transfectadas. a) PepGMV A 48 h después de la transfección. Carriles: 1, marcador de tamaño; 2 Oligos Rep; 3, control positivo oligos Rep; 4, oligos JM23 y JM24; 5, control positivo oligos JM23 y JM24. b) SV40 48 h después de la transfección. Carriles: 1, marcador de tamaño; 2, control negativo; 3, oligos SV40; 4, control positivo. c) PepGMV A 72 horas después de la transfección. Carriles: 1, marcador de tamaño; 2, oligos Rep; 3, control positivo oligos Rep; 4, oligos JM23 y JM24; 5, control positivo oligos JM23 y JM24. d) SV40 72 h después de la transfección. Carriles: 1, marcador de tamaño; 2, oligos SV40; 3, control positivo. Como control positivo se utilizó el ADN plasmídico del componente A del PepGMV y el SV40. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1.2% teñido con Bromuro de Etidio.

Una vez corroborada la presencia de los virus en las células transfectadas, se procedió a verificar la transcripción del gen de la proteína Rep del PepGMV y del antígeno T grande del SV40. Para ello se realizó un RT-PCR empleando los oligonucleótidos para el antígeno T grande, en el caso del virus SV40 y los oligonucleótidos del gen de la proteína Rep para el geminivirus PepGMV (**Cuadro 4.1**). Cabe mencionar que el nivel de transcripción del gen de la proteína Rep fue muy bajo para verlo claramente. Por lo tanto, se realizó una re-amplificación para corroborar la presencia del transcrito (**Figura 5.9**). No siendo el caso para el antígeno T grande del SV40 que en la primera amplificación se detectó el transcrito (**Figura 5.9**). Los resultados anteriores no solo indicaron la presencia de ambos virus dentro de la célula si no también un reconocimiento por parte de la maquinaria celular del componente A del geminivirus PepGMV, lo que permitió la transcripción del gen de la proteína Rep. Lo anterior resulta interesante, debido a que un virus que infecta plantas está siendo reconocido por la maquinaria de una célula de mamífero. Indicando que los procesos a nivel molecular se encuentran conservados en ambos sistemas y que además este modelo puede ser utilizado para estudiar la regulación del ciclo celular a nivel del transcriptoma.

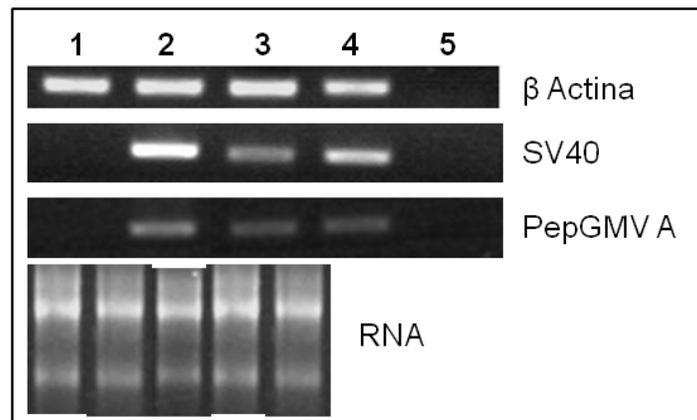


Figura 5.9. RT-PCR de las células transfectadas con el componente A del PepGMV y con el virus SV40. Como control de expresión se utilizó el gen constitutivo de la β Actina. Carriles: 1, Células control; 2, 48 h después de la transfección; 3, 72 h después de la transfección; 4, control positivo; 5, control negativo. Como control negativo se utilizó agua. Como control positivo se utilizó el ADN plasmídico del componente A del PepGMV, del SV40 y el ADN genómico de chile. El tamaño del fragmento esperado para cada uno de los oligos utilizados fue de 120 pb.

5.3.1 Crecimiento de las células transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV y el virus SV40.

Para determinar si la presencia del geminivirus afecta el crecimiento celular, se obtuvo el número de células en cada uno de los tratamientos. Para ello, las células transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV, con el virus SV40 y con la construcción PepGMVRep⁻ se contaron utilizando una cámara Neubauer. El conteo se realizó a las 48 y 72 horas después de la transfección. Con los datos obtenidos, se llevó a cabo un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas entre cada una de las muestras. El análisis se hizo para cada uno de los tiempos, 48 y 72 h respectivamente. El resultado del análisis se muestra en el **Cuadro 5.2**.

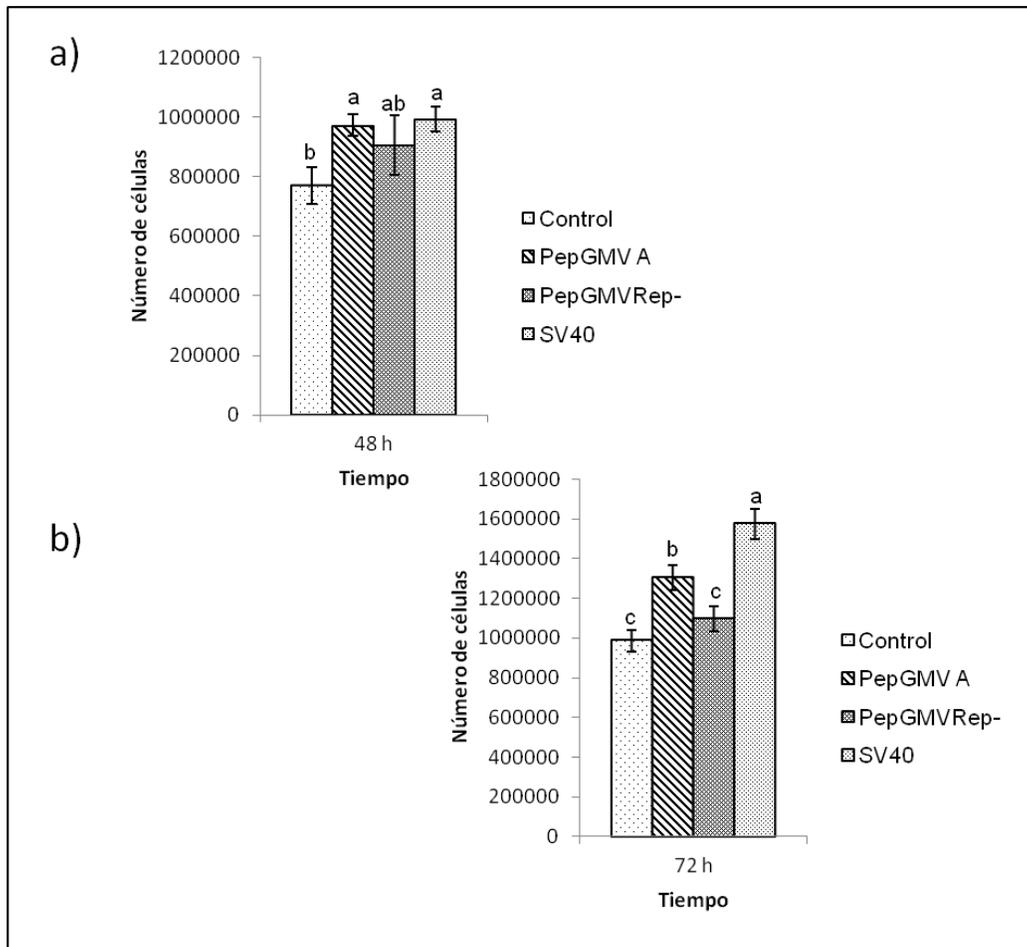
Cuadro 5.2 Análisis de varianza del crecimiento celular.*

Tiempo = 48 h					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Muestra	3	9.09E+10	3.03E+10	7.1925	0.0117
Error	8	3.37E+10	4.21E+09		
C. Total	11	1.25E+11			

Tiempo = 72 h					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Muestra	3	6.03E+11	2.01E+11	48.2812	<.0001
Error	8	3.33E+10	4.16E+09		
C. Total	11	6.36E+11			

El análisis se realizó utilizando un valor de $\alpha = 0.05$

Se encontró que si existían diferencias significativas entre las muestras ($F < 0.05$). En la **Figura 5.10** se muestra el resultado del conteo, así como el resultado de la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre las células transfectadas con el componente A del PepGMV y las células control. Las primeras crecieron más en comparación con las segundas, tanto a las 48 como a las 72 horas, indicando que la presencia del componente A del geminivirus estaba afectando el crecimiento celular.



*La comparación entre medias se realizó mediante la prueba de Tukey utilizando un valor de $\alpha = 0.05$ para $p < 0.05$. Las muestras con diferente letra mostraron diferencias significativas.

Figura 5.10 Crecimiento de de las células 3T3L1 transfectadas con el geminivirus PepGMV, el virus SV40 y el PepGMV Rep-

En la **Figura 5.11** se muestran las imágenes al microscopio óptico de las células transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV, el virus SV40 y el PepGMVRep⁻. Se observa que a las 72 horas, el crecimiento de las células transfectadas con el componente A del PepGMV fue mayor en comparación con las células control, pero menor en comparación con las células transfectadas con el SV40. Sin embargo, a las 48 horas no hubo diferencias significativas en el crecimiento entre las células transfectadas con el componente A del PepGMV y las transfectadas con el SV40.

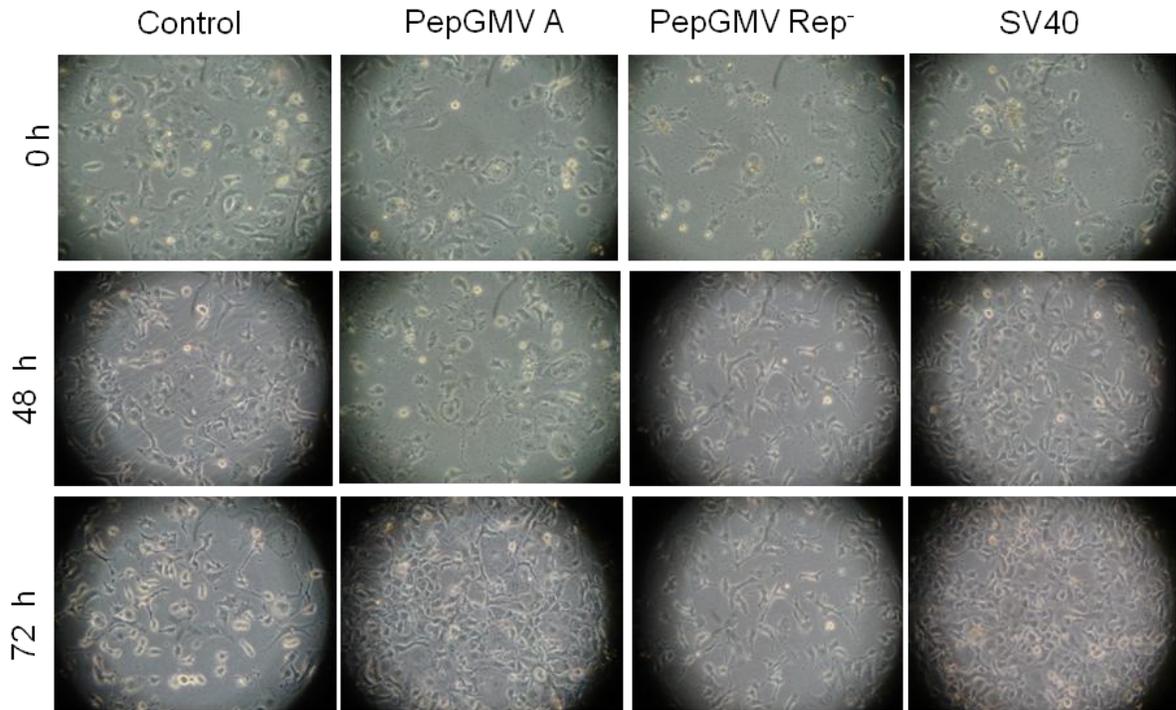


Figura 5.11 Células transfectadas con el componente A del PepGMV, el virus SV40 y la construcción PepGMVRep-

5.4 Expresión de genes de ciclo celular en las células 3T3L1 transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV, el virus SV40 y la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40.

Con base en los resultados obtenidos mediante el RT-PCR de las células transfectadas, se eligió el tiempo de 48 horas para realizar el análisis de expresión de genes de ciclo celular. Esto debido a que en el caso de las células transfectadas con el componente A del PepGMV así como del SV40, la mayor expresión del transcrito tanto de la proteína Rep como del antígeno T grande, se dio a las 48 horas después de la transfección (**Figura 5.9**). Para el caso de las células transfectadas con la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40 se tomó el mismo tiempo para el análisis. Aun cuando no hubo diferencias en el nivel de expresión del gen de la proteína Rep entre las 48 y las 72 horas (**Figura 5.5**).

Para determinar los cambios en la expresión de los genes de ciclo celular en las células 3T3L1 se utilizó el arreglo de qPCR *RT² Profiler™ PCR Array Mouse Cell Cycle* (SAbiosciences PAMM-020A). Veintisiete genes se expresaron diferencialmente en las células transfectadas con el componente A del PepGMV comparadas con las células control. Veinticinco genes en el caso de las células transfectadas con el virus SV40 y 24 genes en las transfectadas con la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40. Los genes que se sobre-expresaron en cada una de las muestras, así como su función, se muestran en el **Cuadro 5.3**. Los genes cuya expresión disminuyó, así como su función, se muestran en el **Cuadro 5.4**.

Cuadro 5.3 Genes sobre-expresados en las células transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV, el virus SV40 y la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40 comparadas con las células control.

Símbolo del gen	Cambio en la expresión			Función biológica	Descripción
	PepGMV A	SV40	PepGMVRepK		
Casp3	2.4794	SC	SC	Regulación negativa del ciclo celular. Apoptosis	Caspasa 3. Codifica para una proteína de la familia de las caspasas. Está involucrado en el proceso de apoptosis. Esta proteína activa a las capsasas 6,7 y 9 y es regulada por las caspasas 8,9 y 10.
Ccnd1	25.6342	18.8305	8.0278	Transición G1/S	Ciclina D1. Forma un complejo y funciona como subunidad reguladora de la CDK4 o CDK6 cuya actividad se requiere para la transición G1/S, interactua con Rb. La expresión de este gen es regulada de manera positiva por Rb.
Ccne1	3.1602	2.558	2.3867	Transición G1/S	CiclinaE1. Esencial para el control del ciclo celular en la transición G1/S. Pertenece a la familia de las ciclinas. Forma un complejo y funciona como una subunidad regulatoria de la CDK2, cuya actividad se requiere para la transición G1/S. La proteína codificada por este gen se acumula en el límite G1/S y se degrada cuando la célula entra en la fase S.

Continúa. Cuadro 5.3

Símbolo del gen	Cambio en la expresión			Función biológica	Descripción
	PepGMV A	SV40	PepGMVRepK		
Cdk2	2.1585	2.0069	SC	Fase G1-S. Transición G1/S	Cinasa dependiente de ciclina 2. Es altamente similar al producto del gen <i>cdc28</i> de <i>S. cerevisiae</i> y el <i>cdc2</i> de <i>S. pombe</i> . Su actividad se restringe a las fases G1-S y es esencial para la transición G1/S. Se une y es regulada por la ciclina A o E, el inhibidor de CDK p21Cip1 y p27Kip1.
Cdk5rap1	9.6465	8.9074	SC	Regulador del ciclo celular	Cinasa dependiente de ciclina 5 subunidad 1. Activa a CDK5 en las neuronas.
Cdkn1a	SC	SC	8.0278	Arresto del ciclo celular	Este gen codifica para un potente inhibidor de las CDKs. La proteína codificada se une e inhibe la actividad del complejo ciclina-CDK2 o CDK4, funcionando como un regulador de la progresión del ciclo celular en la fase G1. Su expresión es controlada por p53. Esta proteína también interactúa con PCNA funcionando como regulador en la replicación del ADN durante la fase S y en la reparación del daño al ADN. Se ha reportado que esta proteína es cortada por CASP-3 lo que lleva a una activación dramática de CDK2 y la ejecución del programa de apoptosis.
Cdkn1b	SC	SC	4.7404	Arresto del ciclo celular	Involucrado en el arresto en G1. Es un inhibidor de la ciclina E y el complejo Ciclina A-CDK2. La proteína codificada se une y previene la activación de los complejos ciclina E-CDK2 o ciclina D-CDK4 controlando la progresión del ciclo celular en la fase G1.
Cdkn2a	20.8215	18.5713	7.0861	Arresto del ciclo celular	El producto de este gen funciona como un inhibidor de la cinasa CDK4. Actúa como estabilizador de la proteína p53 debido a que interactúa y secuestra a la proteína MDM2, responsable de la degradación de p53. Estas funciones regulatorias lo hacen importante en el control de la fase G1 y se sabe que es un importante gen supresor de tumores.
Cks1b	2.7702	SC	3.1275	Regulador del ciclo celular	La proteína CKS1B se une a la subunidad catalítica de las CDKs y es esencial para el desarrollo de su función.

Continúa Cuadro 5.3

Símbolo del gen	Cambio en la expresión			Función biológica	Descripción
	PepGMV A	SV40	PepGMVRepK		
E2f1	6.3203	7.8626	5.1515	Regulador del ciclo celular	La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de factores de transcripción E2F. Los cuales tienen un papel crucial en el control del ciclo celular, en la acción de las proteínas supresoras de tumores y también son blancos de las proteínas transformadoras de algunos virus de ADN. Esta proteína se une preferencialmente a la proteína de retinoblastoma en una manera dependiente del ciclo celular. Puede mediar ambos procesos, proliferación celular y apoptosis dependiente de p53.
E2f4	5.5404	4.0982	5.7557	Regulación del ciclo celular	La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de factores de transcripción E2F. Esta proteína se une a las tres proteínas supresoras de tumores pRB, p107 y p130, pero tiene mayor afinidad por las dos últimas. Juega un papel importante en la supresión de genes relacionados con la proliferación y la mutación de este gen y su incremento en la expresión parece estar asociado con el desarrollo de cáncer.
Itgb1	6.3203	4.4537	2.918	Fase G1-S. Transición G1/S	Las integrinas son proteínas heterodiméricas compuestas de subunidades alfa y beta. Son receptores de membrana involucrados en la adhesión celular y el reconocimiento de procesos como embriogénesis, hemostasis, reparación de tejidos, respuesta inmune y la difusión metastática de las células tumorales.
Mdm2	5.9794	6.0419	5.7958	Regulación negativa de proliferación celular	Este gen codifica para una ubiquitina ligasa E3 localizada en el núcleo. Esta proteína puede promover la formación de tumores al actuar sobre las proteínas supresoras de tumores como p53. Este gen es el mismo transcripcionalmente regulado por p53. Se ha detectado la sobreexpresión de este gen en varios tipos de cáncer.
Ppp3ca	5.6962	4.5789	2.7992	Fase G1-S. Transición G1/S	

Continúa Cuadro 5.3

Símbolo del gen	Cambio en la expresión			Función biológica	Descripción
	PepGMV A	SV40	PepGMVRepK		
Rad21	2.969	2.3867	2.035	Fase M	La proteína codificada por este gen es altamente similar al producto del gen rad21 de <i>S. pombe</i> , gen involucrado en la reparación de los cortes de doble cadena del ADN. Esta proteína se hiperfosforila en la fase M del ciclo celular. Involucrada en el desarrollo de la fase M.
Rad51	SC	SC	2.1214	Fase M	La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia RAD51. Está involucrada en la reparación del ADN y en el proceso de recombinación homóloga. Se ha encontrado que interactúa con BRCA1, BCRA2 y p53.
Rad9	SC	SC	7.7008	Regulación negativa del ciclo celular. Arresto celular.	El producto de este gen es similar al rad19 de <i>S. pombe</i> , una proteína de control del ciclo celular necesaria para el arresto celular y la reparación del daño al ADN. Forma un complejo de control con RAD51 y HUS1.
Rb1	8.8152	4.0982	3.5431	Regulación negativa del ciclo celular. Transición G1/S	(p107). La proteína codificada por este gen es similar en secuencia y función al producto del gen retinoblastoma 1. Es una proteína supresora de tumores que está involucrada en la regulación del ciclo celular. Se encuentra fosforilada durante la transición de la fase S a la M y se desfosforila en la fase G1 de ciclo. Regula la entrada a ciclo celular.
Rb2	5.3517	5.5597	SC	Regulación negativa del ciclo celular. Transición G1/S	(p130) La proteína codificada por este gen es similar en secuencia y función al producto del gen retinoblastoma 1. Regula la entrada al ciclo celular.
Stag1	3.6301	3.3058	SC	Fase M	Este gen es miembro de la familia SCC3 y se expresa en el núcleo. Codifica un componente de la cohesina, un complejo proteico que brinda la cohesión de las cromátidas hermanas. Actúa en la fase M del ciclo celular.

Continúa Cuadro 5.3

Símbolo del gen	Cambio en la expresión			Función biológica	Descripción
	PepGMV A	SV40	PepGMVRepK		
Taf10	2.6574	2.0491	2.0209	Fase S	El producto de este gen está involucrado en la iniciación de la transcripción por parte de la RNA polimerasa. Se ha encontrado que esta proteína se requiere para la activación transcripcional del receptor de estrógeno y para la progresión a través del ciclo celular.
Tfdp1	2.6574	SC	2.0922	Regulador del ciclo celular. Fase G1-S	Este gen codifica para un miembro de la familia de factores de transcripción que se heterodimeriza con las proteínas E2F para incrementar su actividad de unión al ADN y promover la transcripción de los genes regulados por E2F. La proteína codificada por este gen funciona como parte de este complejo para controlar la transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S.
Trp53	3.3636	3.2378	3.6935	Inducción de apoptosis. Regulador negativo del ciclo celular.	Este gen codifica para la proteína p53, la cual responde a una variedad de tipos de estrés regulando genes que inducen el arresto del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del ADN o cambios en el metabolismo. p53 se expresa en niveles bajos en las células normales, y en niveles altos en una variedad de células transformadas. Es una proteína de unión al ADN. Funciona como un supresor de tumores.
Trp63	SC	8.9074	5.7958	Inducción de apoptosis	Este gen codifica para la proteína p63, un miembro de la familia de los factores de transcripción p53 involucrados en la respuesta celular al estrés y al desarrollo. Los miembros de esta familia incluyen a las proteínas p53, p63 y p73. La similitud con p53 hacen que esta proteína sea capaz de transactivar los genes de respuesta a p53, ocasionando el arresto celular y la apoptosis.
Wee1	9.8492	7.4384	6.3864	Fase G2-M	Este gen codifica para una proteína nuclear que cataliza la fosforilación inhibitoria de la tirosina del complejo CDC2/ciclina B cinasa. Coordina la transición entre la replicación de ADN y la mitosis, protejiendo al núcleo de la cinasa CDC2 activa.

SC: sin cambios en la expresión respecto a las células control. La información sobre la descripción de los genes se obtuvo del MGI (Mouse Genomic Information)

Cuadro 5.4 Genes apagados en las células transfectadas con el componente A del geminivirus PepGMV, el virus SV40 y la construcción PepGMVRepK-pTracer™SV40 comparadas con las células control.

Símbolo del gen	Cambio en la expresión			Función biológica	Descripción
	PepGMV A	SV40	PepGMV Rep		
Ccnb2	-5.6178	-5.4831	-4.1267	Regulación del ciclo celular. Fase M	Ciclina B2
Dnajc2	-4.6913	-4.5473	-2.7038	Fase G2 y M	Este gen es miembro de la familia de fosfoproteínas de fase M (MPP). Es una fosfoproteína capaz de formar un complejo heterodimérico que se asocia con los ribosomas, actuando como una chaperona para los péptidos recién sintetizados que van saliendo del ribosoma.
Gadd45a	-3.3173	-3.1492	SC	Arresto celular	Este gen forma parte de un grupo de genes cuya expresión se incrementa después de haber sufrido condiciones de arresto celular estresantes y la acción de agentes que dañan al ADN.
Mki67	-2.3784	-2.6299	SC	Fase S y replicación del ADN	El producto de este gen mantiene la proliferación celular; su expresión ocurre durante la fase G1 tardía. No se detecta en la fase G0.
Pcna	-4.4383	-4.7404	SC	Fase S y replicación del ADN.	La proteína codificada por este gen, está involucrada en el control de la replicación del ADN. Se encuentra en el núcleo y es un cofactor de la ADN polimerasa delta. En respuesta al daño del ADN, esta proteína es ubiquitinizada y está involucrada en la ruta de reparación del ADN dependiente de RAD6.
Ran	-3.2716	-4.0982	-2.2115	Fase M	Proteína nuclear relacionada a ras. Pertenece a la superfamilia RAS la cual es esencial para la translocación del RNA y las proteínas a través del poro nuclear. Esta proteína está involucrada en el control de la síntesis del ADN y la progresión del ciclo celular. Las mutaciones en RAN afectan la síntesis del ADN.

Continuación Cuadro 5.4

Símbolo del gen	Cambio en la expresión			Función biológica	Descripción
	PepGMV A	SV40	PepGMV Rep		
Tsg101	-2.7132	-4.2134	-2.6299	Control del ciclo celular. Arresto celular	La proteína codificada por este gen pertenece a un grupo de homologos aparentemente inactivos de las enzimas ubiquitin-conjugadas. Juega un papel en el crecimiento y la diferenciación celular y actúa como un regulador negativo del crecimiento.

SC: Sin cambio en la expresión con respecto al control. . La información sobre la descripción de los genes se obtuvo del MGI (Mouse Genomic Information)

Los genes cuya expresión se vio modificada por la presencia del geminivirus PepGMV también se vio modificada en las células con el SV40. Salvo los genes CASP3, CKS1B y TFDP1 cuya expresión solo se vio modificada con el PepGMV y TRP63 para el SV40. Sin embargo, el nivel del cambio en la expresión si resultó diferente para algunos genes (**Cuadro 5.3** y **Cuadro 5.4**). Lo anterior indica que el geminivirus PepGMV está alterando la expresión de genes de una manera similar al virus SV40.

En el caso del geminivirus PepGMV, se sobre-expresaron 20 genes y se apagaron 7. Dentro de los genes que aumentaron su expresión (mayor de 2 veces comparados con el control) se encuentran genes involucrados en la transición G1/S y en la progresión a la fase S. Esto está relacionado con el establecimiento de un ambiente favorable para la replicación del virus (Ascencio-Ibáñez et al., 2008). Se ha encontrado que durante la infección por geminivirus en plantas, los genes asociados con el regreso al ciclo celular y las fases G1 tardía, S y G2 se sobre-expresan, mientras aquellos relacionados con la fase G1 temprana y la fase G2 tardía disminuyen su expresión, facilitando la transición hacia la fase S de las células infectadas (Hanley-Bowdoin et al., 2013). Tal es el caso del gen CCND1 (ciclina D1) cuya expresión se vio aumentada y está relacionado con el paso de la fase G1 a la fase S. La proteína codificada por este gen se une a CDK4 formando el complejo CiclinaD1/CDK4 el cual es necesario para que se lleva a cabo la transición G1/S. Este complejo interactúa con la proteína de retinoblastoma (pRB)

fosforilandola, resultando en la liberación de los factores de transcripción E2F (Ewen y Lamb, 2004; Burkhart et al., 2010). Lo anterior se corrobora con el cambio en la expresión del factor E2F1 y E2F4. La sobreexpresión del factor de transcripción E2F1, regula de manera positiva la expresión del gen RB, activando su transcripción (Burkhart et al., 2010). E2F4 regula de manera positiva la expresión de los genes RBL1 (p107) y RBL2 (p130) lo que explica el aumento observado en su expresión (**Cuadro 5.3**) en las células transfectadas con el PepGMV A y el SV40. Se sugiere que aún cuando se tiene reportado que tanto la proteína Rep del geminivirus como el antígeno T grande del SV40 son capaces de unirse a la proteína de retinoblastoma y afectar su función, la transcripción del gen no se ve disminuida debido a la presencia del factor E2F1. Lo anterior resulta interesante debido a que el geminivirus está afectando la expresión de los componentes de la ruta RB/E2F en las células de mamífero. Caso contrario a lo reportado por Ascencio-Ibáñez et al. (2008) en donde la infección por el geminivirus CaLCuV en plantas de *Arabidopsis thaliana* no produjo cambios en la expresión de los componentes de esta ruta.

Como se mencionó anteriormente, uno de los genes cuya expresión se vio modificada únicamente por el PepGMV fue CASP3 (Caspasa 3), el cual está involucrado en el proceso de apoptosis y respuesta a estrés. Indicando que la presencia del geminivirus podría estar encendiendo la ruta de apoptosis. También se vio modificada la expresión del gen CDKN2A el cual es un inhibidor de la ciclina CDK4. Este gen también está involucrado en la ruta de respuesta a estrés, interactúa con MDM2, afectando la expresión de p53, el cual es regulado por este último. La expresión de estos genes también se vio modificada por la presencia del geminivirus, todos aumentaron su expresión con respecto al control. Por lo que la presencia del geminivirus en las células de mamífero está activando tanto genes involucrados en el control del ciclo celular, como también genes involucrados en la respuesta a estrés y reparación del daño al ADN. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ascencio-Ibáñez et al. (2008) en donde la infección por

geminivirus en las plantas activó genes tanto de respuesta a estrés como de respuesta a daño al ADN.

La expresión del gen de la proteína Rep del geminivirus PepGMV alteró el crecimiento de las células de mamífero haciendo que crecieran en menor cantidad con respecto a las células control. Lo anterior sugiere que la proteína Rep está alterando el control del ciclo celular de tal manera que se está produciendo un arresto del ciclo. Esto se corrobora con el aumento en la expresión de los genes involucrados en el arresto al ciclo celular. Tal es el caso de los genes RAD, CDKN1A y CDKN1B, involucrados en el arresto celular y cuyo nivel se vio aumentado por la presencia de la proteína Rep. Cabe señalar que el nivel de expresión de estos genes no se vio modificado en el caso de las células transfectadas con el PepGMV y con el SV40. En estas células sucedió lo contrario, su crecimiento fue mayor que las células control. Lo anterior se correlaciona con el aumento en la expresión de los genes que están involucrados en la progresión hacia la fase M del ciclo celular.

Al observar que el geminivirus PepGMV fue capaz de alterar la expresión de genes involucrados en el ciclo celular en las células de mamífero, y que además la maquinaria de la célula lo reconoció y se llevo a cabo la transcripción del gen para la proteína Rep, surgió la pregunta de si en la planta, el virus SV40 (un virus de mamífero) ocasionaría algo similar. Para ello, se clonó el gen del antígeno T grande en el vector de expresión pBI121 y se inocularon plantas de chile (*Capsicum annuum*) con el virus SV40. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

5.5 Elaboración de la construcción para la expresión del antígeno T grande del virus SV40 en plantas de chile.

5.5.1 Amplificación del antígeno T grande y generación de los sitios de restricción.

El marco de lectura abierta (ORF) del gen del antígeno T grande fue amplificado mediante PCR. Lo anterior permitió generar los sitios de restricción para las enzimas *Xba*I en el extremo 5' y *Sac*I en el extremo 3'. En la **Figura 5.12** se observa una banda de aproximadamente 2,481 pb correspondiente al antígeno T grande completo.

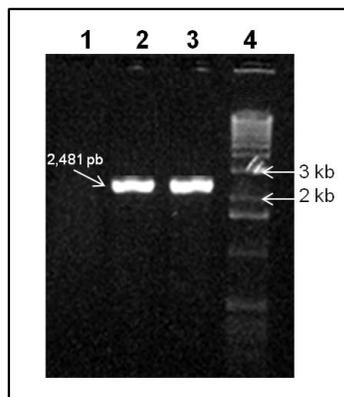


Figura 5.12. Amplificación por PCR del antígeno T grande. Carriles: 1, control negativo; 2-3, antígeno T grande completo; 4, marcador de tamaño.

5.5.2 Eliminación del intrón del antígeno T grande del virus SV40 mediante ensamble por PCR.

Para retirar el intrón del antígeno T grande del virus SV40, se llevó a cabo una rampa de ensamble mediante PCR. La **Figura 5.13a** muestra la amplificación del fragmento anterior y posterior al intrón. En el carril 2 se observó una banda de aproximadamente 1,889 pb la cuál corresponde al fragmento localizado rio arriba del intrón. La banda observada en el carril 3 corresponde al fragmento rio abajo del intrón con un tamaño de aproximadamente 245 pb (**Figura 5.13a**).

Los fragmentos obtenidos se purificaron y posteriormente se utilizaron como molde en la rampa de ensamble. El antígeno T grande completo tiene un

tamaño de 2,481 pb y el tamaño del intrón es de 347 pb, por lo tanto, el tamaño de la banda esperada al remover el intrón es de 2,134 pb. En la **Figura 5.13b** se muestra el producto del ensamble observándose una banda de aproximadamente 2,100 pb (carril 2 y 3). El tamaño de esta banda coincide con el tamaño esperado de la banda correspondiente al antígeno T grande sin intrón. Por lo tanto, esta banda fue cortada y purificada para posteriormente ligarla en el vector de expresión pBI121.

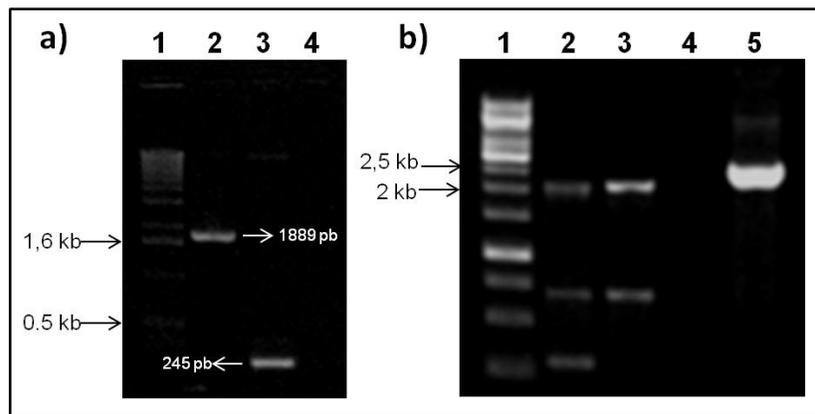


Figura 5.13. Amplificación por PCR del antígeno T grande sin intrón. a) Amplificación por PCR de los fragmentos río arriba y río abajo del intrón. Carriles: 1, marcador de tamaño molecular; 2, fragmento río arriba del intrón; 3, fragmento río abajo del intrón; 4, control negativo. b) Producto de la rampa de ensamble. Carriles: 1, marcador de tamaño molecular; 2-3, rampa de ensamble; 4, control negativo; 5, control positivo.

5.5.3 Obtención de las construcciones ATgsiSV40-pBI121 y ATgcSV40-pBI121

Los fragmentos correspondientes al antígeno T grande completo y al antígeno T grande sin intrón se purificaron y se ligaron en el vector pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen). La **Figura 5.14** muestra la digestión con las enzimas *Xba*I y *Sac*I de las clonas obtenidas de ambas ligaciones. Se observaron dos bandas, la primera correspondiente al vector pCR[®]4-TOPO[®] con un tamaño de 3,956 pb, y la segunda correspondiente al antígeno T grande completo, con un tamaño de 2,481 pb. De igual manera, en la **Figura 5.14** se observan las bandas correspondientes al vector pCR[®]4-TOPO[®] (3,956 pb) y al antígeno T grande sin intrón (2,134 pb). Lo

anterior confirma la ligación del antígeno T grande completo y sin intrón en el vector pCR[®]4-TOPO[®].

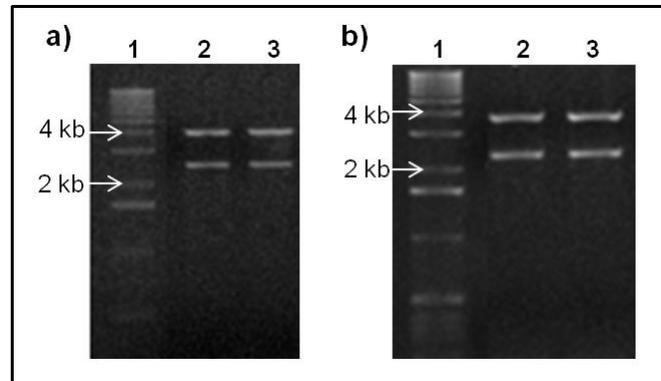


Figura 5.14. Digestión del ADN plasmídico de las clonas obtenidas. a) Antígeno T grande completo. Carriles: 1, marcador de tamaño molecular; 2, clona 11; 3, clona 14. b) Antígeno T grande sin intrón. Carriles: 1, marcador de tamaño molecular; 2, clona 30; 3, clona 34.

Una vez clonados los fragmentos en el vector pCR[®]4-TOPO[®] se procedió a ligarlos en el vector pBI121. Para ello, se cortó cada una de las construcciones obtenidas con las enzimas *SacI* y *XbaI*. Los fragmentos obtenidos, correspondientes al antígeno T grande completo y al antígeno T grande sin intrón, se purificaron y ligaron en el vector de expresión pBI121 previamente cortado con dichas enzimas.

En la **Figura 5.15** se muestra la digestión del ADN plasmídico de las clonas obtenidas a partir de la ligación de los fragmentos correspondientes al antígeno T grande completo (clona 1c) y antígeno T grande sin intrón (clona 1s) con el vector pBI121. Como resultado de la digestión de la clona 1c, se observaron dos bandas, una de aproximadamente 12,950 pb correspondiente al vector pBI121 y otra de aproximadamente 2,481 pb correspondiente al gen del antígeno T grande completo (**Figura 5.15a**). De igual manera, la digestión de la clona 1s produjo dos bandas, una con un tamaño aproximado de 12,950 pb, correspondiente al vector pBI121 y otra de un tamaño de 2,134 pb

correspondiente al antígeno T grande sin intrón (**Figura 5.15b**). De esta manera se confirmó la ligación del gen del antígeno T grande completo y del antígeno T grande sin intrón en el vector de expresión pBI121, obteniéndose las construcciones ATgcSV40-pBI121 y ATgsiSV40-pBI121 respectivamente (**Figura 5.16**).

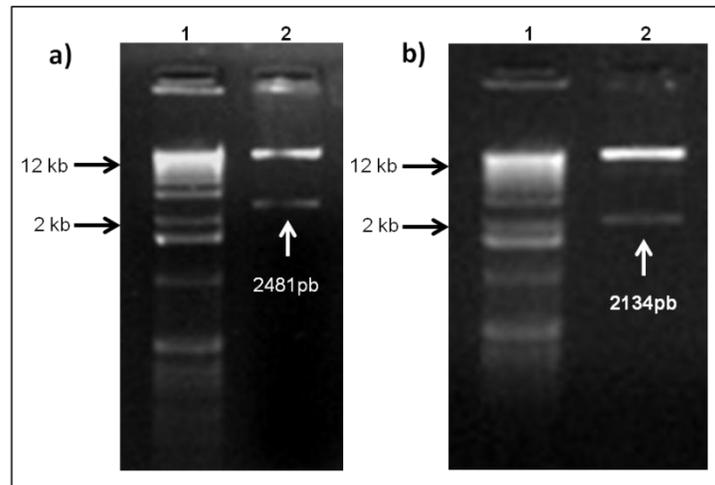


Figura 5.15. Digestión del ADN plasmídico de las clonas obtenidas de la ligación del vector pBI121 con el antígeno T grande del SV40. a) Antígeno T grande completo. Carriles: 1, marcador de tamaño molecular; 2, clona 1c. b) Antígeno T grande sin intrón. Carriles: 1, marcador de tamaño molecular; 2, clona 1s.

5.6 Inoculación de las plantas de chile con el geminivirus PepGMV y el virus SV40.

Con la finalidad de determinar si el virus SV40 era capaz de alterar el control del ciclo celular en las plantas, se inocularon plantas de chile (*Capsicum annum*) variedad sonora Anaheim empleando el método de biobalística de baja presión. Se inocularon plantas de 4 a 6 hojas verdaderas.

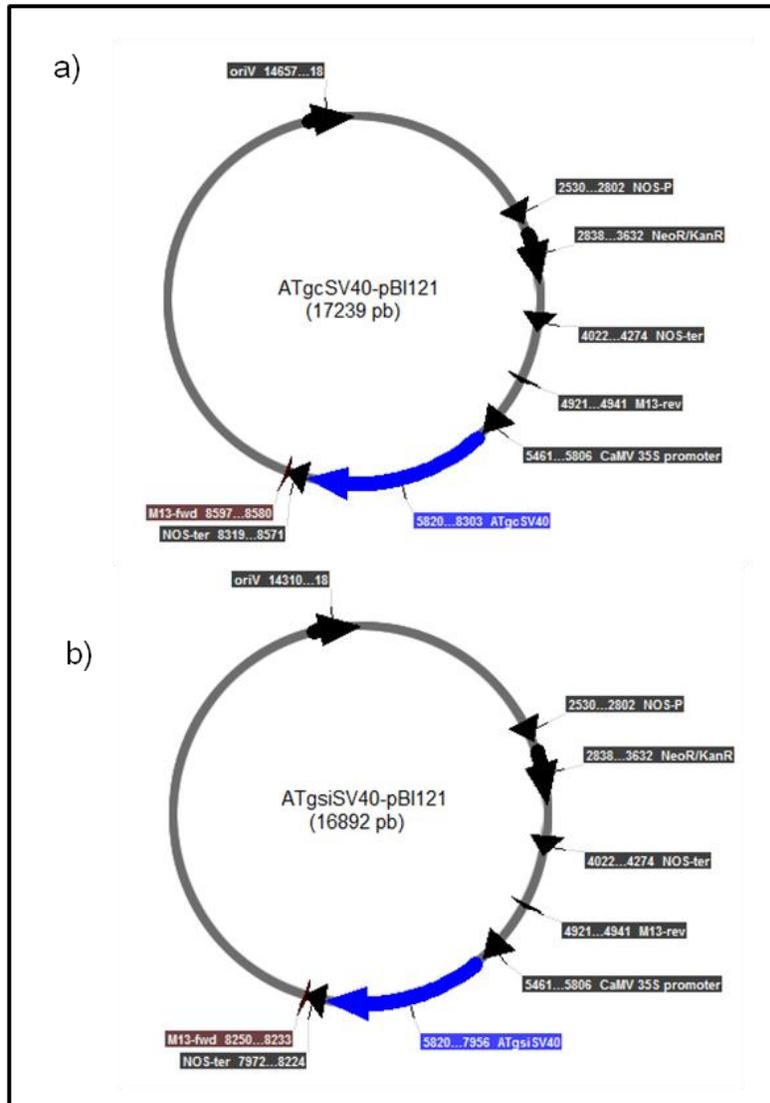


Figura 5.16. Mapa de las construcciones ATgcSV40-pBI121 y ATgsiSV40-pBI121 para la expresión del antígeno T grande del SV40 en plantas. a) ATgcSV40-pBI121; b) ATgsiSV40-pBI121. Características: NOS-ter: Terminador del gen nopalina sintasa y señal de poli A; NOS-P: Promotor del gen nopalina sintasa; NeoR/KanR: Gen de la neomicina fosfotransferasa, confiere resistencia a los antibióticos neomicina y kanamicina; CaMV 35S promoter: Promotor del virus del mosaico de la coliflor. ATgsiSV40: Gen que codifica para el antígeno T grande sin intron del virus de simio 40 (SV40); ATgcSV40: Gen que codifica para el antígeno T grande completo del virus de simio 40 (SV40).

Las plantas se inocularon con el ADN plasmídico correspondiente al geminivirus PepGMV, al virus SV40 y a las construcciones ATgcSV40-pBI121 y ATgsiSV40-pBI121. En la **Figura 5.17** se muestran las plantas inoculadas a los 15

días después de la inoculación. Las plantas inoculadas con las construcciones no mostraron ninguna alteración fenotípica, comparadas con las plantas control.

Se observó además, que las plantas infectadas con el geminivirus PepGMV no desarrollaron síntomas de la enfermedad aun después de 30 días de haber sido inoculadas. Lo anterior se debió principalmente a las condiciones de cultivo, las cuales no fueron las adecuadas para el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, las plantas inoculadas con el virus SV40, SV40 + PepGMV y SV40 + PepGMV B, no mostraron ningún cambio fenotípico, se veían completamente igual a las plantas control (sin inocular). Incluso las plantas inoculadas con el SV40 + PepGMV no mostraron síntomas de la enfermedad ocasionada por el geminivirus (**Figura 5.17**). Debido a los resultados anteriores, se procedió a verificar la presencia de ambos virus en las plantas inoculadas.

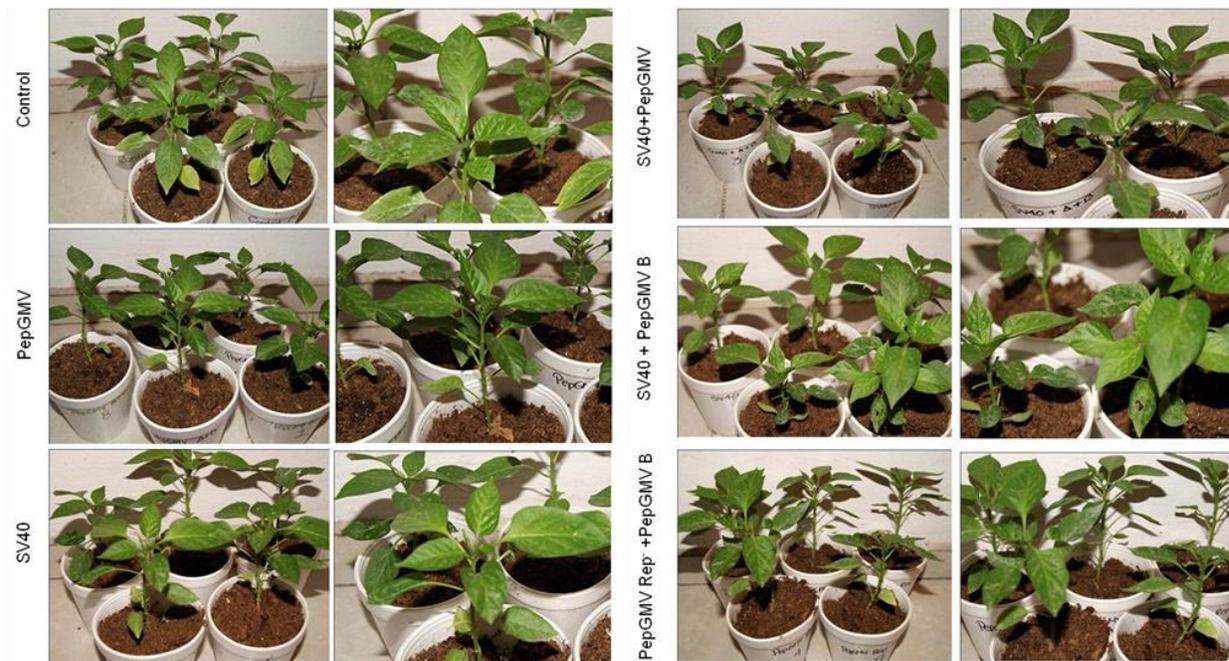


Figura 5.17 Plantas inoculadas con el geminivirus PepGMV y el virus SV40 a los 20 dpi.

5.6.1 Verificación de la presencia del geminivirus PepGMV y el virus SV40 en las plantas de Chile.

Para determinar la presencia y el movimiento de los virus, se tomó muestra de las hojas apicales y basales de cada una de las plantas inoculadas. Las muestras se tomaron a los 8 y 20 días post- inoculación (dpi). Cabe mencionar que a los 20 días únicamente se hizo la detección en hojas nuevas. La detección de ambos virus se hizo mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos JM23 y JM24 para el geminivirus PepGMV y los oligonucleótidos para el antígeno T grande del virus SV40 (**Cuadro 4.1**).

A los 8 dpi, en las plantas inoculadas únicamente con el geminivirus PepGMV, se detectó su presencia tanto en las hojas apicales como en las basales (**Figura 5.18a**). Indicando que el virus si estaba presente en la planta y que además se estaba moviendo. A los 20 dpi, también se detectó la presencia del virus en las hojas nuevas, lo que significa que el virus está presente y que sigue replicándose en la planta (**Figura 5.18b**). Sin embargo, las plantas no presentaron síntomas de la enfermedad incluso a los 30 días post-inoculación. Lo anterior debido principalmente a las condiciones en las que se mantuvo el cultivo, debido a que no eran las más favorables para el desarrollo de la enfermedad.

En las plantas que fueron inoculadas con el virus SV40, con la mezcla SV40+PepGMV y la mezcla SV40+ PepGMV B, se detectó la presencia del virus SV40 tanto a los 8 dpi como a los 20 dpi.

En el caso de las plantas inoculadas con ambos virus (**Figura 5.19**), a los 8 dpi se detectó la presencia de ambos virus tanto en las hojas apicales como en las basales, indicando que tanto el geminivirus PepGMV como el virus SV40 se están moviendo en la planta (**Figura 5.19a**). Para verificar que el resultado no se trataba de una contaminación por el método de inoculación, se realizó la detección de ambos virus en hojas nuevas a los 20 dpi.

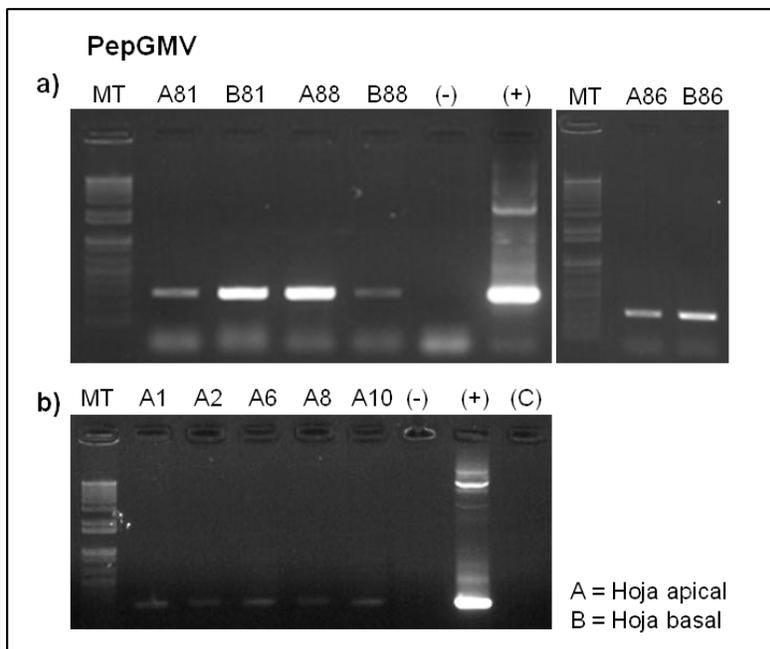


Figura 5.18 Detección del geminivirus PepGMV en plantas de chile (*C. annuum*) variedad Sonora Anaheim. a) 8 dpi; b) 20 dpi. Cada uno de los números indica la planta de la que se tomó la muestra. (-) control negativo de la reacción; (+) control positivo; (c) planta control no inoculada.

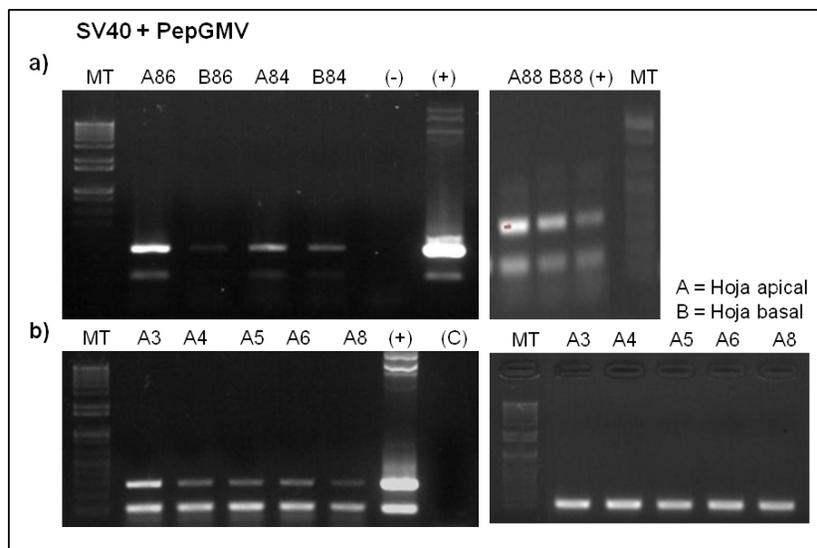


Figura 5.19 Detección del virus SV40 en plantas de chile (*C. annuum*) variedad Sonora Anaheim. a) 8 dpi; b) 20 dpi. En la imagen de la izquierda se muestra la amplificación con los oligonucleótidos para el geminivirus PepGMV y el virus SV40. En la imagen de la derecha se muestra la amplificación empleando los oligonucleótidos para el SV40. Cada uno de los números indica la planta de la que fue tomada la muestra. (-) control negativo de la reacción; (+) control positivo; (c) planta control no inoculada.

Nuevamente ambos virus fueron detectados por lo que estaban presentes en la planta (**Figura 5.19b**). Indicando que de alguna manera la presencia del geminivirus PepGMV podría estar ocasionando la replicación y el movimiento del virus SV40 en la planta.

Con la finalidad de determinar si el componente B del geminivirus PepGMV era el responsable de la presencia del virus SV40 en las hojas basales, se inocularon las plantas con la mezcla SV40+PepGMV B. Adicionalmente, se inocularon plantas únicamente con el virus SV40 para verificar si el virus por si solo era capaz de replicarse y moverse en la planta. Se realizó la detección del virus SV40 a los 8 y a los 20 dpi (**Figura 5.20**).

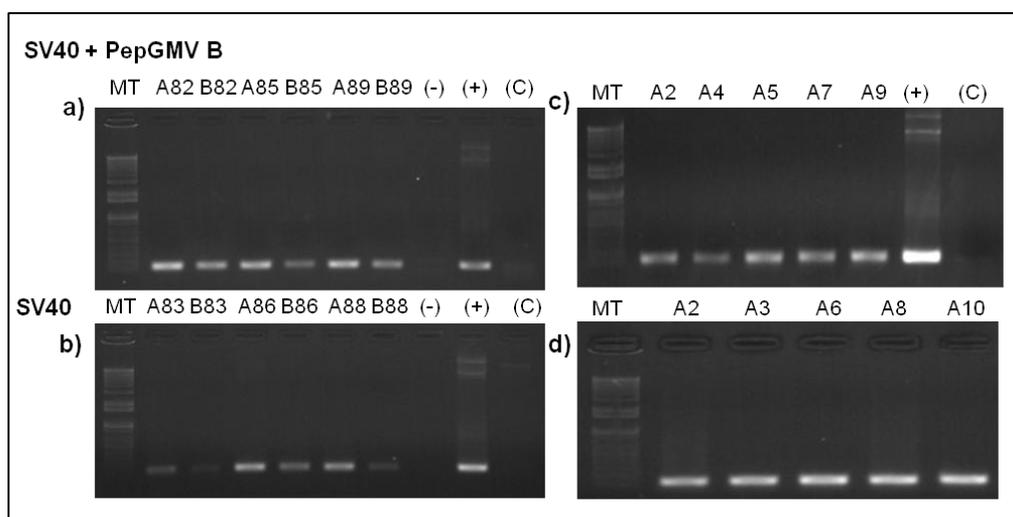


Figura 5.20 Detección del virus SV40 en las plantas chile (*C. annum*) variedad Sonora Anaheim, inoculadas con el virus SV40 y con la mezcla SV40+PepGMV B. a) y b) 8 dpi; c) y d) 20 dpi. Cada uno de los números indica la planta de la que fue tomada la muestra. A= hoja apical; B = hoja basal. (-) control negativo de la reacción; (+) control positivo; (c) planta control no inoculada.

En el caso de la mezcla SV40+PepGMV B a los 8 dpi, se detectó el virus tanto en las hojas apicales como en las basales (**Figura 5.20a**). Lo mismo sucedió para las muestras inoculadas únicamente con el SV40 (**Figura 5.20b y c**) lo que indicaba que el virus estaba presente y se estaba moviendo en la planta. De igual manera, para verificar que el resultado obtenido no se trataba de una

contaminación por el método de inoculación, se realizó la detección del virus a los 20 dpi y en hojas apicales nuevas (**Figura 5.20c y d**). Sorprendentemente a lo esperado, se detectó la presencia del virus SV40 tanto en las plantas inoculadas con la mezcla SV40+PepGMV B como en las que únicamente se inocularon con el SV40. Estos resultados indican que el virus SV40, por sí solo, es capaz de mantenerse en la planta e incluso de moverse. Lo anterior sin ocasionar ningún desarrollo de sintomatología en la planta (**Figura 5.17**).

Los resultados anteriores son interesantes porque abren la puerta a la posibilidad de que las plantas pueden funcionar como reservorios de virus completamente ajenos a ellas. Más aún, se abriría la posibilidad de que un virus de planta logre adaptarse a otro organismo, como por ejemplo un mamífero, y que de alguna manera se vuelva capaz de replicarse y ocasionar enfermedad en el nuevo hospedero. Esto ya se ha visualizado para tratar de explicar el origen del género *Circoviruses*, virus que infectan vertebrados y que son muy parecidos a los geminivirus y nanovirus que infectan plantas (Gibbs y Weiller, 1999). Sin embargo se requieren de más pruebas para corroborar lo antes mencionado.

6. CONCLUSIONES

La construcción PepGMVRepK-pTracerSV40 puede ser utilizada para analizar los efectos que tiene la expresión de la proteína Rep del geminivirus PepGMV en las células de mamífero, debido a que su expresión alteró el crecimiento de las células.

El geminivirus PepGMV fue reconocido por la maquinaria de la célula mamífera y se llevó a cabo la transcripción del gen de la proteína Rep, lo que indica que este modelo puede ser utilizado para estudiar la regulación del ciclo celular a nivel del transcriptoma. Además, con base en los resultados obtenidos, el geminivirus PepGMV alteró la expresión de genes relacionados con la regulación del ciclo celular en las células de ratón. Por lo que se acepta la hipótesis del trabajo en la cual, la interacción entre geminivirus y células de mamífero activa genes relacionados con el control del ciclo celular en ratón.

Adicionalmente, resulta interesante la presencia del virus SV40 en las plantas de Chile, y que este fue capaz de replicarse y moverse en la planta. Estando presente aún en las hojas nuevas. Sin embargo faltan estudios para verificar si realmente las plantas podrían funcionar como reservorios para virus de otras especies y que en un futuro podrían afectarlas.

LITERATURA CITADA

- Accotto G. P., Mullineaux P. M., Brown S. C., Marie D. 1993. Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. *Virology* 195:257-259.
- Ascencio-Ibáñez J. T., Sozzani R., Lee T. J., Chu T. M., Wolfinger R. D., Cella R., Hanley Bowdoin L. 2008. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol.* 148: 436-454.
- Argüello-Astorga G. R., Guevara-González R. G., Herrera-Estrella L. R., Rivera-Bustamante R. F. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology* 203: 90-100.
- Briddon, R. W., Pinner, M. S., Stanley, J. & Markham, P. G. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177: 85–94.
- Briddon R. W., Patil B. L., Bagewadi B., Nawaz-ul-rehman M. S., Fauquet C. M. 2010. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evol. Biol.* 10: 97-114.
- Brown J. K. 2008. Plant resistance to viruses: Geminiviruses. In *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Academic Press 2010. pp 52-58.
- Burkhart D. L., Ngai L. K., Roake C. M., Viatour P., Thangavel C., Ho V. M., Knudsen E. S. 2010. Regulation of RB transcription in vivo by RB family members. *Mol. Cell. Biol.* 30: 1729-1745.
- Cam H., Dynlacht B. D. 2003. Emerging roles for E2F: Beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* 3: 311-316.
- Carbone M, Rizzo P, Pass H. I. 1997. Simian virus 40, poliovaccines and human tumors: a review of recent developments. *Oncogene* 15:1877-1888.
- Carbone M., Gaudino G., Qi F., Yang H. 2011. Simian virus 40 transformation, malignant mesothelioma and brain tumors. *Expert Rev. of Respir. Med.* 5:683-697.

- Castellano M. M., Sanz-Burgos A. P., Gutiérrez C. 1999. Initiation of DNA replication in a eukaryotic rolling-circle replicon: identification of multiple DNA-protein complexes at the geminivirus origin. *J. Mol. Biol.* 290: 639-652.
- Castillo A., Collinet D., Deret S., Kashoggi A., Bejarano E. R. 2003. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). *Virology* 312: 381-394.
- Coggin J. H. 1969. Enhanced virus transformation of hamster embryo cells *in vitro*. *J. Virol.* 3: 458-462.
- Chen P. Y., Wang C. K., Soong S. C., To K. Y. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol. Breeding* 11:287-293.
- Cheng J., DeCaprio J. A., Fluck M.M., Schaffhausen B.S. 2009. Cellular transformation by Simian virus 40 and Murine Polyoma virus T antigens. *Semin. Cancer Biol.* 19: 218-228.
- Cho R. J., Campbell M. J., Winzeler E. A., Steinmetz L., Conway A., Wodicka L., Wolfsberg T. G., Gabrielian A. E., Landsman D., Lockhart D. J., Davis R. W. 1998. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell* 2:65-73.
- DeCaprio J. 2009. How the Rb tumor suppressor structure and function was revealed by the study of Adenovirus and SV40. *Virology* 384:274-284.
- Desvoyes B., Ramirez-Parra E., Xie Q., Chua N. H., Gutierrez C. 2006. Cell type-specific role of the Retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiol.* 140:67-80.
- Doonan J. H., Sablowski R. 2010. Walls around tumours-why plants do not develop cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10: 794-802.
- Du W., Pogoriler J. 2006. Retinoblastoma family genes. *Oncogene* 25:5190-5200.
- Eagle P. A., Hanley-Bowdoin L. 1997. *cis* elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *J. Virol.* 71:6947-6955.

- Egelkrout E. M., Robertson D., Hanley-Bowdoin L. 2001. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* 13:1437-1452.
- Ewen M.E. and Lamb J. 2004. The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. *Trends in Mol. Med.* 10:158-162.
- Fondong V.N. 2013. Geminivirus protein structure and function. *Mol. Plant Pathol.* 14:635-649.
- Fontes E. P., Gladfelter H. J., Schaffer R. L., Petty I. T., Hanley-Bowdoin L. 1994. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* 6: 405-416.
- Francis D. 2007. The plant cell cycle-15 years on. *New Phytol.* 174:261-278.
- Gazdar A. F., Butel J.S., Carbone M. 2002. SV40 and human tumours: myth, association or causality?. *Nat. Rev. Cancer* 2:957-964.
- Genovese C., Trani D., Caputi M., Claudio P. P. 2006. Cell cycle control and beyond: Emerging roles for the retinoblastoma gene family. *Oncogene* 25: 5201-5209.
- Gibbs M. J., and Weiller G. F. 1999. Evidence that a plant virus switched host to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8022-8027.
- Grafi G., Burnett R. J., Helentjaris T., Larkins B. A., DeCaprio J. A., Sellers W. R., Kaelin W. G. Jr. 1996. A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: Involvement in edoreduplication. *Cell Biol.* 93:8692-8967.
- Gutierrez C. 2000a. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* 19: 792-799.
- Gutierrez C. 2000b. Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.* 43: 763-772.
- Gutierrez C. 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60: 219-230.

- Gutierrez C., Ramirez-Parra E., Castellano M. M. Sanz-Burgos A. P., Luque A., Missich R. 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet. Microbiol.* 98:111-119.
- Guzmán-Maldonado S. H., Torres-Pacheco I., González-Chavira M. 2002. Genetic variability and processing effect on nutraceutical factors of jalapeño pepper. 16 th. International Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas, Noviembre. pp. 18.
- Hanley-Bowdoin L., Settlege S. B., Orozco B. M., Nagar S., Robertson D. 1999. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 71-106.
- Hanley-Bowdoin L., Settlege S. B., Robertson D. 2004. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol. Plant Pathol.* 5: 149-156.
- Hanley-Bowdoin L., Bejarano E.R., Robertson D., Mansoon S. 2013. Geminiviruses: master at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:777-789.
- Heuvel S., Dyson N. J. 2008. Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 713-724.
- Huebner J. R., Chanock R. M., Rubin B. A., Casey M. J. 1964. Induction by adenovirus type 7 of tumors in hamsters having the antigenic characteristics of SV40 virus. *Pathology.* 52: 1333-1340.
- Jager S. M., Murray J. A. 1999. Retinoblastoma proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* 41: 295-299.
- Jeske H. 2009. Geminiviruses. In: E.M Villiers and H. zur Hausen (Ed.). *TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens.* *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Springer Verlag Berlin Heidelberg. p185.
- Jordan M., Schallhorn A., Wurm F.M. 1996. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate formation. *Nucl. Acids Res.* 24:598-601.
- Khidr L., Chen P. L. 2006. RB, the conductor that orchestrates life, dead and differentiation. *Oncogene* 25: 5210-5219.

- Kittelmann K., Rau P., Gronenborn B., Jeske H. 2009. Plant geminivirus Rep protein induces rereplication in fission yeast. *J. Virol.* 83: 6769-6778.
- Knudsen E. S., Knudsen K. E. 2006. Retinoblastoma Tumor Suppressor: Where Cancer Meets the Cell Cycle. *Exp. Biol. Med.* 231:1271–1281.
- Kong L. J., Orozco B. M., Roe J. L., Nagar S., Ou S., Feiler H. S., Durfee T., Miller A. B., Gruissenm W., Robertson D., Hanley-Bowdoin L. 2000. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* 19:3485-3495.
- Krupovic M., Ravantti J. J., Bamford D. H. 2009. Geminiviruses: a tale of a plasmid becoming a virus. *BMC Evol. Biol.* 9:112-122.
- Lavia P., Mileo A. M., Giordano A., Paggi M. G. 2003. Emerging roles of DNA tumor viruses in cell proliferation: new insights into genomic instability. *Oncogene* 22: 6508-6516.
- Laufs J., Jupin I., David C., Schumacher S., Heyraud-Nitschke F., Gronenborn B. 1995. Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie*, 77: 765-73.
- Levine A. J. 2009. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* 384: 285-293.
- Londoño A., Riego-Ruiz L., Argüello-Astorga G. R. 2010. DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch. Virol.*, 155: 1033-1046.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. 2005. *Mol. Cell Biol.* Ed. W.H. Freeman and Company. 5th Edition.
- McLaughlin-Drubin M. E., Munger K. 2008. Viruses associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1782: 127-50.

- Miskolczi P., Lendvai A., Horvath G., Pettkó-Szandtner A., Dudits D. 2007. Conserved functions of retinoblastoma proteins: from purple retina to green plant cells. *Plant Sci.* 172: 671-683.
- Mittnacht S. 2005. The retinoblastoma protein: from bench to bedside. *Eur. J. Cell Biol.* 84: 97-107.
- Moulager M., Corellou F., Vergé V., Escande M-L., Bouget F-Y. 2010. Integration of light signals by the retinoblastoma pathway in the control of S phase entry in the picophytoplanktonic cell *Ostreococcus*. *PLoS Genet* 5:e1000957.
- Nagar S., Pedersen T. J., Carrick K.M., Hanley-Bowdoin L., Robertson D. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7: 705-19.
- Nagar S., Bowdoin L. H., Robertson D. 2002. Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell* 14:2995-3007.
- Oakenfull E. A., Riou-Khamlichi C., Murray J. 2002. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 357: 749-756.
- Orozco, B.M., Bowdoin, H.L. 1996. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *J. Virol.* 70:148-158.
- Orozco, B. M., Miller, A. B., Settlage, S. B., Bowdoin, L. H. 1997. Functional domains of a geminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* 15:9840-9846.
- Orozco, B. M., Kong, L. J., Batts, L. A., Elledge, S., Bowdoin, L. H. 2000. The multifunctional character of a geminivirus replication protein is reflected by its complex oligomerization properties. *J. Biol. Chem.* 275:6114-6122.
- Pardee A. B. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71:1286-1290.
- Poulin D. L., Kung A. L., DeCaprio J. A. 2004. p53 targets simian virus 40 large T antigen for acetylation by CBP. *J. Virol.* 78:8245-8253.
- Poulin D. L. and DeCaprio J. A. 2006. Is there a role for SV40 in human cancer? *J. Clin. Oncology* 24:4356-4365.
- Pozo-Campodónico O., Montes H. S., Redondo J. E. 1991. El chile (*Capsicum* spp) en: Avances en el estudio de recursos fitogenéticos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. México. Pags. 217-238.

- Sabelli P. A., Larkins B. A. 2009. Regulation and function of retinoblastoma-related plant genes. *Plant Sci.* 177: 540-548.
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3^{era} Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Shepherd D. N., Martin D. P., McGivern D. R., Boulton M. I., Thomson J. A., Rybicki E. P. 2005. A three-nucleotide mutation altering the Maize streak virus Rep pRBR-interaction motif reduces symptom severity in maize and partially reverts at high frequency without restoring pRBR-Rep binding. *J. Gen. Virol.* 86:803-813.
- Todaro G. J., Green H., Goldberg B. D. 1963. Transformation of properties of an established cell line by SV40 and Polyoma virus. *Pathology* 51:66-73.
- Torres-Pacheco I., Guevara-González R.G., Ruíz-Medrano R., Rivera-Bustamante R.F. 1996a. "Los Geminivirus como Modelos de Estudio del Ciclo Celular y de la Apoptosis en Plantas". *Rev. Mex. Fitopat.* 2:88-96.
- Torres-Pacheco I., Garzón-Tiznado J. A., Brown J. A., Becerra-Flora A., Rivera-Bustamante R. F. 1996b. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.
- Viatour P., Sage J. 2011. Newly identified aspects of tumor suppression by RB. *Disease Models & Mechanisms* 4:581-585.
- Wang H., Hao L., Shung C.-Y., Sunter G., Bisaro D. M. 2003. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 15:3020-3032.
- Weinberg R. A. 1995. The retinoblastoma protein and the cell cycle control. *Cell* 81: 323–330.
- Williams G. H., Stoeber K. 2012. The cell cycle and cancer. *J. Pathol.* 226:352-364.
- Xie Q., Suárez-López P., Gutierrez C. 1995. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J.* 14: 4073-4082.

- Xie,Q., Sanz-Burgos A. P., Hannon G. J., Gutierrez C. 1996. Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15:4900–4908.
- Yadava P., Suyal G., Mukherjee S. K. 2010. Begomovirus DNA replication and pathogenicity. *Curr. Sci.* 98:360-368.
- Zhu L. 2005. Tumour suppressor retinoblastoma protein Rb: a transcriptional regulator. *Eur. J. Cancer* 41: 2415-27.

Anexo 1

SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

- **Medio LB**

Extracto de levadura	5 % p/v
Peptona de caseína	10 % p/v
Cloruro de sodio (NaCl)	10 % p/v

Ajustar el pH a un valor de 7 utilizando NaOH 1N. Para agar LB agregar agar bacteriológico a una concentración de 15 % p/v. Esterilizar a 121°C/15 lb/plg² por 20 min.

- **Medio SOC**

Triptona	2 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucosa	20 mM

Ajustar el pH a un valor de 7 utilizando NaOH 1N. Para agar agregar agar bacteriológico a una concentración de 15 % p/v. Esterilizar a 121°C/15 lb/plg² por 20 min.

- **Regulador TE 0.1 %**

Tris-HCl	1 mM (pH 7.6)
EDTA	0.1 mM (pH 8)

Esterilizar la solución a 121°C/15 lb/plg² por 20 min. Almacenar a temperatura ambiente.

- **Regulador salino HEPES 2% (HBS)**

NaCl	140 mM
Na ₂ HPO ₄	1.5 mM
HEPES	50 mM,

Ajustar a pH 7.05 con NaOH 0.5 N. Esterilizar por filtración (0.22 µm). Almacenar a -20°C.

- **Gel de agarosa al 1.2%**

Agarosa	0.30 g
TAE 1X	25 mL
Bromuro de etidio	0.5 µL

- **TAE 50X**

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 mL

- **Regulador de Dellaporta**

Tris – HCl	pH 8	100 mM
EDTA	pH 8	5 mM
NaCl		50 mM
β mercaptoetanol		10 mM

- **MOPS 10X**

MOPS	41.8 g
Acetato de sodio 3 M	16.6 mL
EDTA 0.5 M pH 8	20 mL

Disolver el MOPS en 800 mL de agua tratada con DEPC, ajustar el pH a un valor de 7 con NaOH 4 N. Adicionar el acetato de sodio, el EDTA y aforar a 1 L con agua destilada tratada con DEPC. Esterilizar por filtración y proteger de la luz.

- **Gel de agarosa desnaturalizante 1.2 % para ARN**

Agarosa	0.36 g
MOPS 10X	3.5 mL
Formaldehído	1.2 mL
Agua destilada tratada con DEPC	24.9 mL

La agarosa se funde con el Agua DEPC. Se deja enfriar un poco antes de adicionar el MOPS y el formaldehído.

Anexo 2 PROTOCOLOS

- **Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001)**

Solución I

50 mM de Glucosa

25 mM de Tris-HCl (pH 8)

10 mM EDTA (pH 8)

La solución se prepara a partir de soluciones stock en lotes de 100 ml. Se esteriliza en autoclave (121°C, 15 lb durante 20 minutos) y se guarda a 4°C.

Solución II

0.2 N NaOH

1% w/v SDS

Se guarda a temperatura ambiente.

Solución III

60 ml de solución 5 M de acetato de potasio

11.5 ml de ácido acético glacial

28.5 ml de agua destilada

1.- Colectar las células centrifugando a 13,000 rpm durante 5 min. Desechar el sobrenadante. Repetir hasta terminar con los 5 ml de cultivo.

2.- Resuspender las células en 100 µl de solución I fría. Se utiliza vortex para resuspender.

3.- Agregar 200 µl de solución II (solución de lisis). Mezclar suavemente invirtiendo el tubo varias veces. No vortex. Dejar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos (No más de 5 min).

- 4.- Adicionar 150 μ l de solución III (solución de neutralización). Mezclar invirtiendo el tubo varias veces. Colocar en hielo de 3 a 5 min.
- 5.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos.
- 6.- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 2 volúmenes de isopropanol (aproximadamente 850 μ l). Dejar a temperatura ambiente por 5 minutos o a -20 °C por 20 minutos.
- 7.- Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos. Desechar el sobrenadante.
- 8.- Agregar 1 ml de etanol al 70%. Mezclar con vortex para lavar la pastilla.
- 9.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos. Retirar el sobrenadante y dejar secar la pastilla por aproximadamente 15 minutos o hasta que ya no quede etanol.
- 10.- Resuspender la pastilla en 10 μ l de agua (se puede resuspender hasta en 50 μ l de agua).

- **Extracción de ADN a partir de células de mamífero (Sambrook y Russell, 2001)**

Solución de lisis

10 mM Tris-HCl (pH 8)

1 mM EDTA (pH 8)

0.1 % SDS

La solución se guarda a 4°C.

Solución de acetato de potasio

60 ml de solución 5 M de acetato de potasio

11.5 ml de ácido acético glacial

28.5 ml de agua destilada

- 1.- Resuspender las células en 20 μ l de agua.
- 2.- Agregar 600 μ l de solución de lisis fría. Homogeneizar la suspensión rápidamente pipeteando arriba y abajo.
- 3.- Incubar la digestión a 55°C por al menos 3 horas, pero no más de 16 horas.

- 4.- Dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y agregar 3 μ l de Dnase-free-Rnase (concentración de 4 mg/ml).
- 5.- Incubar la digestión a 37°C de 15 a 60 minutos.
- 6.- Dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 200 μ l de solución de acetato de potasio. Mezclar con vortex por 20 segundos.
- 7.- Centrifugar a 13,000 rpm y a 4°C durante 3 minutos. Se debe observar un precipitado de proteína en el fondo del tubo. En dado caso de que no se observe dicho precipitado, incubar el lisado por 5 minutos en hielo y volver a centrifugar.
- 8.- Pasar el sobrenadante en un tubo nuevo. Agregar 600 μ l de etanol al 70%. Mezclar por inversión varias veces y centrifugar a 13,000 rpm durante 1 minuto.
- 9.- Retirar el sobrenadante por aspiración y dejar secar la pastilla durante 15 minutos.
- 10.- Resuspender la pastilla en 50 μ l de agua ó regulador TE (pH 7.6). La solubilidad del ADN genómico puede facilitarse si se incuba a temperatura ambiente por 16 horas ó a 65°C durante 1 hora.

- **Purificación de ADN utilizando el Silica Bead DNA gel extraction kit de Fermentas.**

El ADN a purificar se corre en un gel de agarosa al 1%, utilizando TAE 1X como regulador.

- 1.- Cortar la porción de gel en donde se encuentra la banda correspondiente al ADN que se quiere purificar. Se corta lo más pequeño posible para minimizar la cantidad de agarosa. El fragmento de gel se coloca en un tubo eppendorf previamente pesado. El tubo se pesa nuevamente para determinar los miligramos de gel que se tienen.
- 2.- Adicionar el regulador de unión en una proporción de 3:1 (volumen:peso) a la porción de gel obtenida. Incubar la reacción a 55°C por 5 minutos ó hasta que el gel se haya disuelto completamente. Comprobar el color de la solución antes de incubar. Si el color es amarillo, esto indica un pH óptimo para la unión del ADN. Si

el color es violeta o anaranjado, agregar 10 μ l de solución de acetato de sodio 3 M, pH 5.2. El color debe cambiar a amarillo.

3.- Resuspender la silica con vortex. Adicionarla a la mezcla. Para una cantidad de ADN \leq que 2.5 μ g añadir 5 μ l de silica. Para una cantidad de ADN $>$ que 2.5 μ g, agregar 2 μ l de silica.

4.- Incubar la mezcla a 55°C por 5 minutos. Mezclar con vortex cada 2 minutos para mantener la silica resuspendida. Si el volumen de la mezcla es mayor que 1.5 ml ó la cantidad de ADN a purificar es muy grande, se puede incrementar el tiempo de incubación.

5.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 2 minutos. Desechar el sobrenadante.

6.- Adicionar 500 μ l de solución de lavado fría. Resuspender la pastilla con vortex y centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto. Desechar el sobrenadante.

7.- Repetir el paso anterior 2 veces más.

8.- Secar la pastilla de 10 a 15 minutos para evitar la presencia de etanol en la muestra.

9.- Resuspender la pastilla en 10 μ l de agua. Incubar a 55°C por 5 minutos.

10.- Centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto. Recuperar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo. Repetir el procedimiento de elución con otra alícuota de agua.

- **Transformación de células químicamente competentes.**

1.- Descongelar las células en hielo. Agitar suavemente golpeando el tubo ligeramente.

2.- Colocar 50 μ l de células en un tubo eppendorf frío. Lo anterior en caso de que el vial de células contenga más de 50 μ l.

3.- Adicionar el ADN en una concentración de 1 a 50 ng en un volumen que no exceda del 5-10 % del volumen de células usado. Mezclar suavemente con la punta de la pipeta.

4.- Mantener los tubos en hielo por 30 minutos.

5.- Colocar las células a 42°C durante 60 segundos (shock térmico).

6.- Transferir las células a hielo y dejar reposar durante 2 minutos.

- 7.- Adicionar 450 μl de medio SOC precalentado a 37°C.
- 8.- Incubar las células durante 1 hora a 37°C y agitando a una velocidad de aproximadamente 200 rpm.
- 9.- Sembrar las células en las placas. Para cada reacción de transformación, diluir las células en una proporción 1:10 y sembrar 100 μl de esta dilución, así como también de las células sin diluir.
- 10.- Incubar las placas a 37°C de 12 a 16 horas.

- **Digestión con las enzimas *SpeI* y *KpnI* (FastDigest® de FERMENTAS)**

Mezcla de reacción:

ADN	2 μL
FastDigest® Green Buffer	1 μL
Enzima <i>Spe I</i>	0.5 μL
Enzima <i>Kpn I</i>	0.5 μL
Agua de ampolleta estéril	6 μL
Volumen total	10 μL

- **Digestión con las enzimas *XbaI* y *SacI* (FastDigest® de FERMENTAS)**

Mezcla de reacción:

ADN	2 μL
FastDigest® Green Buffer	2 μL
Enzima <i>SacI</i>	1 μL
Enzima <i>XbaI I</i>	1 μL
Agua de ampolleta estéril	14 μL
Volumen total	20 μL

- **Mezcla de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

	Para 1 reacción
Regulador 10X	2.5 µL
MgCl ₂ 50 mM	0.75 µL
Oligo sentido	1 µL
Oligo antisentido	1 µL
dNTP's	0.5 µL
Taq Polimerasa	0.1 µL
Agua de ampolleta estéril	18.5 µL
ADN templado	1 µL
Volumen total de reacción	25 µL

- **Extracción de RNA utilizando el kit SV total RNA Isolation System (Promega)**

a) Extracción a partir de tejido vegetal

- 1.- Moler el tejido en N₂ líquido.
- 2.- Pesar 30 mg (se pueden utilizar de 100-150 mg) y agregar 175 µL de regulador de lisis.
- 3.- Agregar 350 µL de regulador de dilución. Mezclar por inversión y centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min.
- 4.- El sobrenadante se pasa a un tubo nuevo cuidando de no arrastrar el pellet. Se procede al paso 5.

b) Extracción a partir de células de mamífero

- 1.- Se cosechan las células y se les adiciona 175 µL de regulador de lisis. Se mezcla pipeteando arriba y abajo.
- 2.- A los 175 µL de regulador de lisis se le adicionan 350 µL de regulador de dilución. Se mezcla por inversión y se calienta a baño maría a 70°C por 3 min (calentar más de 3 min puede comprometer la integridad del RNA).

3.- Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min a 20-25 °C. El sobrenadante se pasa a un tubo de microcentrífuga nuevo. Se procede al paso 5.

5.- Se agregan 200 µL de etanol al 95% y se mezcla pipeteando de 3 a 4 veces. Se transfiere la mezcla a la columna. Se centrifuga a 13,000 rpm por 1 min.

6.- Se desecha el líquido del tubo recolector y se le adiciona a la columna 600 µL de regulador de lavado. Se centrifuga a 13,000 rpm por 1 min.

8.- Se prepara la siguiente mezcla de incubación con Dnasa para cada extracción:

40 µL de Yellow core buffer

5 µL de 0.09M de MnCl₂

5 µL de DNasa I

9.- Se aplica esta mezcla sobre la membrana y se incuba 15 min a 20-25°C.

10.- Pasado el tiempo de incubación, se adicionan 200 µL de la solución DNasa stop y se centrifuga a 13,000 rpm durante 1 min.

11.- Se agregan 600 µL de la solución de lavado y centrifugar a 13,000 rpm por 1 min. Se vacía el tubo colector y se adicionan 250 µL de solución de lavado y se centrifuga a 13,000 rpm por 2 min.

12.- Se transfiere la columna a un tubo nuevo y se adicionan 100 µL (con 30 µL funciona) de agua libre de nucleasas. Se centrifuga a 13,000 rpm durante 2 min.

13.- El RNA se guarda a -70°C.

- **Extracción de RNA método del TRIZOL**

1.- Pulverizar la muestra en N₂ líquido hasta obtener un polvo fino.

2.- Adicionar 1 ml de TRIZOL®, homogenizar con Vortex hasta que todo quede bien disuelto.

3.- Centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 min. Retirar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo.

4.- Incubar el sobrenadante a temperatura ambiente por 5 min.

- 5.- Añadir 200 μ L de cloroformo, agitar vigorosamente por 15 seg de forma manual e incubar a temperatura ambiente por 3 min.
- 6.- Centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C durante 15 min. Aquí se forman dos fases una de color y la otra cristalina, la fase cristalina se pasa a un tubo nuevo con ayuda de una micropipeta.
- 7.- Agregar 500 μ L de isopropanol e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
- 8.- Centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C por 10 min. Eliminar el sobrenadante.
- 9.- Adicionar a la pastilla 1 mL de etanol al 75 % y centrifugar a 7 500 a 4 °C por 5 min.
- 10.- Desechar el sobrenadante y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.
- 11.- Resuspender la pastilla en aproximadamente 30 μ L de agua de ampolleta estéril tratada con DEPC.

- **RT-PCR (Fermentas)**

- 1.- Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Oligo dT	1 μ L
RNA	5ng - 1 μ g
dNTP's	1 μ L
Agua de ampolleta	Hasta ajustar al volumen final
Volumen final	10 μ L

- 2.- Se calienta la mezcla de reacción a 65 °C durante 5 min y posteriormente se coloca en hielo por al menos 1 min.
- 3.- Estando en hielo, a cada tubo se le agregan los siguientes reactivos en el orden que se muestra:

Regulador RT 10X	2 μ L
MgCl ₂	4 μ L
DTT	2 μ L

RNase OUT 1 μ L

- 4.- Se mezcla perfectamente y se incuba a 25 °C por 2 min.
- 5.- Se le adiciona a cada tubo 1 μ L de enzima Super Script II RT® (50 unidades) y se incuba a 42 °C durante 50 min.
- 6.- Para terminar la reacción se incuba a 70 °C por 15 min. Se enfría en hielo.

- **Wizard PCR Preps DNA purification system.**

Se utiliza para purificar ADN de doble cadena amplificado por PCR.

- 1.- Se separan los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa, preparado con TAE y teñido con bromuro de etidio.
- 2.- Se corta la banda que se desea purificar utilizando una navaja o birturí. La banda debe visualizarse a una mediana-alta longitud de onda de UV y debe cortarse rápido para minimizar la exposición del ADN a la luz UV. La banda debe ser separada en aproximadamente 300 mg o menos de agarosa.
- 3.- Para agarosa que funde a altas temperaturas, primero se le adiciona 1 ml de la resina y se calienta a 65°C por 5 minutos o hasta que toda la agarosa se haya fundido completamente. Para agarosa que funde a bajas temperaturas, primero se calienta a 70°C hasta que la agarosa se funda completamente, y después se le adiciona 1 ml de la resina.
- 4.- Se prepara una columna Wizard por cada producto de PCR a purificar. Se retira el émbolo de la jeringa y se coloca la columna en la punta de la jeringa.
- 5.- Se pipetea la mezcla de resina-ADN al interior de la jeringa. Se inserta el émbolo lentamente y se presiona para hacer pasar la mezcla a través de la columna.
- 6.- Se retira la columna de la jeringa, se remueve el émbolo y se vuelve a colocar la columna. Se añaden 2 ml de isopropanol al 80% a la jeringa y se hacen pasar a través de la columna.
- 7.- Se retira la jeringa y la columna se transfiere a un tubo de microcentrífuga. Se centrifuga la columna a 10000xg para secar la resina.

8.- Se transfiere la columna a un tubo nuevo. Se adicionan 50 μ L de agua ó buffer TE. Esperar 1 min. Centrifugar por 20 segundos a 10000xg para eluir el fragmento. Fragmentos grandes de ADN requieren que el agua ó el buffer SE TE caliente antes de eluir. Para fragmentos de 3kb--65°-80°C para mayores 20kb—80°C.

9.- Para purificar directamente de la mezcla de PCR, se transfiere la reacción de PCR a un tubo de microcentrífuga. Se adicionan 100 μ L del Direct Purification Buffer para 30-100 μ L de reacción de PCR. Mezclar con vortex.

10.- Adicionar 1 mL de resina y mezclar con vortex 3 veces en un periodo de 1 minuto. Se procede al paso 5.

- **Extracción de AND genómico por el método de Dellaporta**

1.- Pesar aproximadamente 100 mg de tejido vegetal.

2.- Pulverizar la muestra en N₂ líquido.

3.- Adicionar 500 μ L de regulador de Dellaporta y homogenizar con Vortex.

4.- Adicionar 25 μ L de SDS al 20 % y resuspender por inmersión.

5.- Incubar la muestra a 65 °C por 20 min.

6.- Agregar 150 μ L de acetato de potasio 5 M y colocar en hielo por 20 min.

7.- Centrifugar a 12 000 rpm durante 10 min, colocar el sobrenadante en un tubo nuevo y agregar un volumen de isopropanol. Dejar reposar en hielo por 10 min.

8.- Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min.

9.- Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 50 μ L de agua de ampollita estéril.

Anexo 3
PUBLICACIONES