



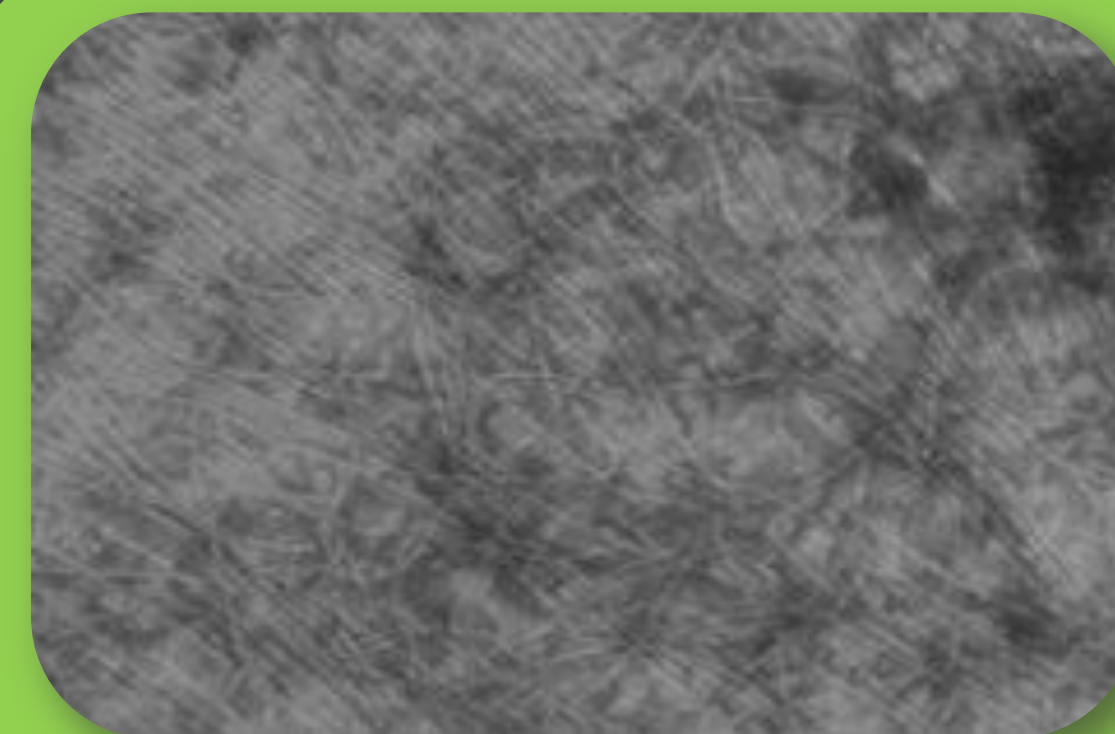
CPep - Interaction



Autores: Jorge Moreno Fernández, Rafael Pérez Martínez y Roberto Sánchez Navarro.
Tutores: Luis Rodríguez-Moreno, José María Caballero Fernández-Rufete, Miguel A. Aranda.

Introducción

- Los virus son estructuras sencillas que codifican un bajo número de proteínas y cuyo movimiento y multiplicación dependen de la interacción con las proteínas del huésped. El conocimiento generado del estudio de estas interacciones permite identificar las proteínas que interactúan con el virus para inhibirlas e impedir la multiplicación y/o movimiento del virus por el huésped.
- El tomate es uno de los cultivos con mayor importancia económica en la Región de Murcia. Hoy en día, uno de los agentes patógenos que más pérdidas económicas produce a los agricultores de tomate es el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV).
- El objetivo de este trabajo ha sido comprobar si una proteína de tomate conocida como Hsp70 interactúa con la proteína de la cápside viral de PepMV, gracias a la técnica de análisis de imagen conocida como ensayo de fluorescencia bimolecular por complementación (BiFC).
- Hemos realizado este trabajo en colaboración con el Grupo de Patología Vegetal del Centro de Biología Aplicada y Edafología del Segura (CEBAS-CSIC).



Métodos: Ensayo BiFC

- Los ensayos de Fluorescencia bimolecular por complementación (BiFC) aprovechan las características de la proteína verde fluorescente (GFP), que tiene la capacidad de emitir luz fluorescente verde al ser excitada con luz ultravioleta. La estructura tubular de la GFP permite su división en dos mitades que pueden fusionarse a dos proteínas de interés. En nuestro caso particular la CP de PepMV y la Hsp70 de tomate, cuya interacción queremos comprobar.
- Las proteínas de fusión a GFP contenidas en un vector de expresión serán expresadas en plantas de *Nicotiana benthamiana*, capaces de sintetizar las proteínas cuya interacción queremos comprobar. Si las proteínas de interés interactúan en la planta, las dos mitades de la GFP se unirán recuperándose la estructura de la proteína y pudiendo emitir fluorescencia verde.
- Para la realización del ensayo BiFC fueron necesarias una serie de técnicas de biología molecular y otros procedimientos:

1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR aprovecha las características de la enzima polimerasa para amplificar las muestras de DNA que codifican ambas proteínas con las que poder trabajar.

2. Electroforesis en gel de agarosa

Esta técnica permite comprobar el correcto funcionamiento de la PCR gracias a la capacidad del DNA de migrar en una matriz al aplicar un campo eléctrico.

3. Transformación y construcción de vectores plasmídicos

Después de recuperar y purificar las bandas de DNA se construyen vectores plasmídicos mediante reacciones de digestión y ligación. Estos se clonan en bacterias de *E. coli*. Para introducir los vectores es necesario desestabilizar la membrana mediante electroporación. Los vectores se recuperan para comprobar que han incorporado el inserto.

4. Agroinfiltración en *N. benthamiana*

Los vectores se clonan en células de *Agrobacterium tumefaciens* que pueden transferir DNA de sus plásmidos a la planta que infectan. Estas bacterias se infiltran en las plantas de *N. benthamiana* para que expresen los genes que codifican las proteínas CP y Hsp70.

5. Observación en el microscopio láser confocal (MLC)

Tres días después de la infiltración se observan muestras de las plantas en el MLC. Si las proteínas interactúan, se observará fluorescencia.



Preparación de la reacción de PCR



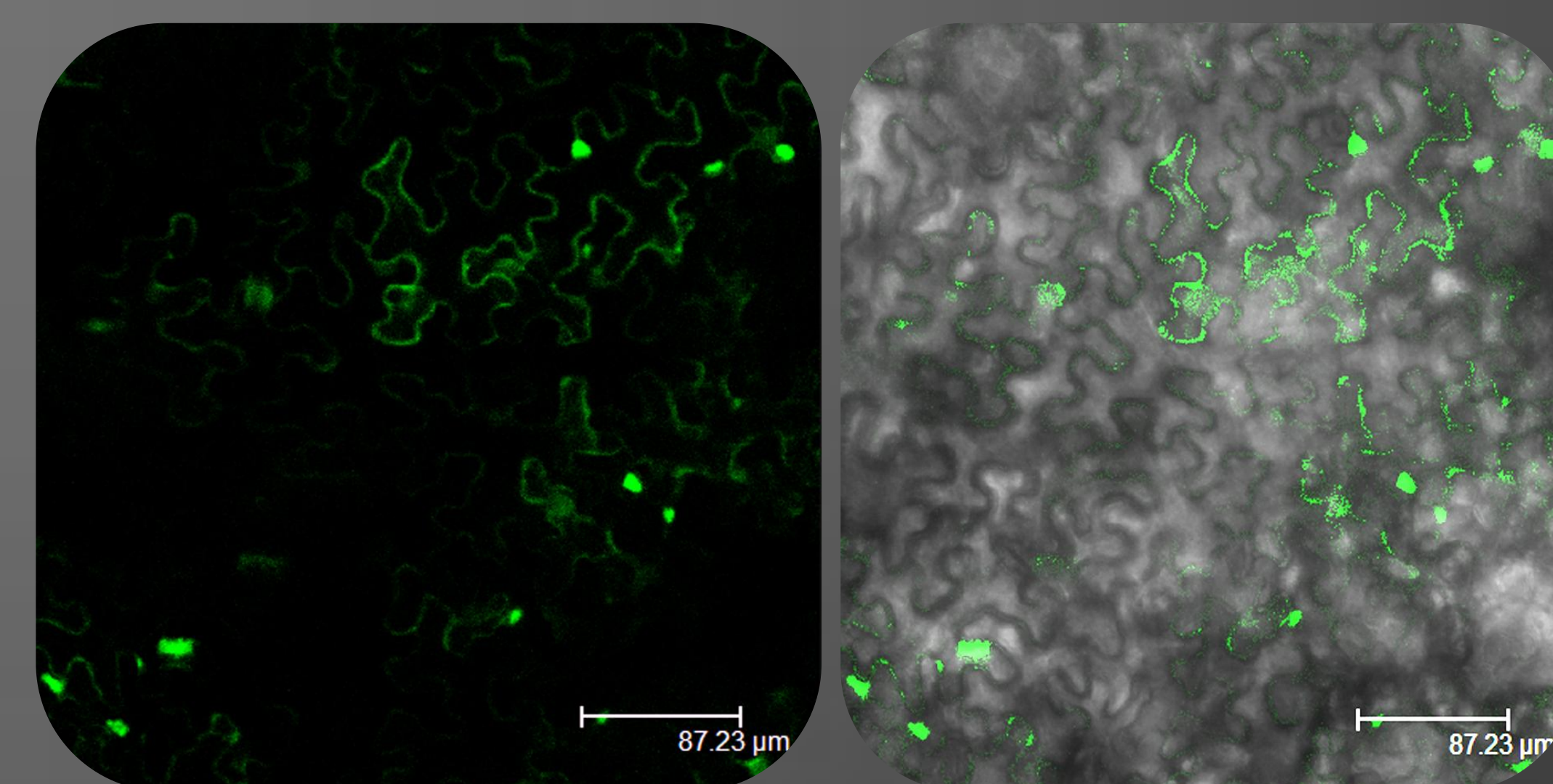
Carga de DNA en gel de agarosa



Agroinfiltración en *N. benthamiana*

Resultados

- Mediante la PCR amplificamos la secuencia de los genes codificantes de la CP y la Hsp70.
- La electroforesis en gel de agarosa nos permitió comprobar que la reacción había ido como se esperaba y los genes replicados eran los correctos.
- Los genes fueron clonados en vectores de expresión y transformados en células de *E. coli*, y posteriormente en células de *A. tumefaciens* con las que infiltramos plantas de *N. benthamiana*.
- Observamos las plantas de *N. benthamiana* con el Microscopio Láser Confocal y apreciamos fluorescencia.
- Concluimos que sí existe interacción física entre la CP de PepMV y la Hsp70 de tomate.



Células de *N. benthamiana* observadas al MLC

Los conocimientos adquiridos sobre esta interacción sugieren que:

- La proteína de la cápside de PepMV precisa de la interacción con la proteína Hsp70 para infectar a la planta.
- Para comprobar si Hsp70 es prescindible o no, habría que silenciar su expresión y analizar si en ausencia de la Hsp70, el virus puede realizar sus funciones de movimiento y/o multiplicación en la planta.



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS