

# Estudio de la compartimentalización subcelular en viroides miembros de la familia *Avsunviroidae*

Trabajo Final de Máster.

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de plantas.

Valencia, 2013.

Mayte Castellano Pérez

Directores  
Gustavo Gómez  
Vicente Pallás

Tutor  
M<sup>a</sup> Purificación Lisón

## ÍNDICE

<i>I. Introducción</i> .....	1
<b>1.1 Viroides</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 <i>Características generales</i> .....	1
1.1.2 <i>Localización y replicación de los viroides</i> .....	4
1.1.3 <i>Familia Avsunviroidae</i> .....	7
<b>1.1.3.1. Movimiento intracelular</b> .....	<b>7</b>
1.1.3.1.1. <i>Movimiento del núcleo al cloroplasto</i> .....	7
1.1.3.1.2. <i>Movimiento del citoplasma al núcleo, y del núcleo al cloroplasto</i> .....	9
<i>II. Objetivos</i> .....	10
<i>III. Materiales y Métodos</i> .....	12
<b>3.1. Material vegetal</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2 Recogida de muestras</b> .....	<b>13</b>
<b>3.3 Clonación de los viroides y sus fragmentos</b> .....	<b>13</b>

3.3.1 Amplificación de la secuencia a clonar .....	14
3.3.2 Extracción de la banda de PCR.....	15
3.3.3 Ligación al vector pTZ .....	15
3.3.4 Transformación de las bacterias con el plásmido recombinante .....	16
3.3.5 Selección de clones para secuenciación .....	16
3.3.6 Análisis bioinformáticos .....	17
3.3.7 Liberación de los fragmentos incorporados en el vector pTZ .....	17
3.3.8 Ligación al vector pIVEX2.3.....	18
3.3.9 Selección de clones.....	19
3.3.10 Ligación al vector binario pMOG800.....	19
3.3.11 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	20
<b>3.4 Agroinfiltración.....</b>	<b>21</b>
<b>3.5 Aplicaciones bioinformáticas .....</b>	<b>21</b>
<b>3.6 Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.....</b>	<b>22</b>
3.6.1 Extracción RNA total.....	22
3.6.2 RT-PCR .....	22
3.6.3 Electroforesis en geles de agarosa.....	22
<b>3.7 Preparación y análisis de proteínas.....</b>	<b>22</b>
3.7.1 Preparación de las muestras .....	22
3.7.2 Electroforesis desnaturante de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	23
3.7.3 Análisis serológico de proteínas por Western-blot.....	23
<b>3.8 Extracción de cloroplastos .....</b>	<b>24</b>
<b>IV. Resultados y discusión.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Obtención de las construcciones para su utilización en ensayos de expresión transitoria con <i>A. tumefaciens</i> en <i>N. benthamiana</i> .....</b>	<b>26</b>

<i>4.2. Agroinfiltración en N. benthamiana</i> .....	29
<i>4.3. Análisis de las muestras infiltradas</i> .....	32
4.3.1 Determinación de la acumulación de GFP .....	32
4.3.2 Observación de la presencia de transcritos.....	33
<i>4.4. Estudio de la acumulación de los viroides a nivel subcelular</i> .....	34
<i>4.5. Obtención de clones parciales para la realización de ensayos de expresión transitoria con A.tumefaciens en N.benthamiana</i> .....	38
<i>V. Conclusiones</i> .....	43

## **VI. Bibliografía**

# I. INTRODUCCIÓN.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Viroides

#### 1.1.1 características generales

Los viroides son patógenos exclusivos de plantas compuestos por pequeñas moléculas de RNA de cadena simple, circulares, con un genoma de 246 a 401nt (Flores *et al.*, 2005; Diener, 2003; Tabler y Tsagris, 2004; Daròs *et al.*, 2006; Ding y Itaya, 2007; Gómez y Pallás, 2013). Las moléculas de RNA viroidales se caracterizan por no codificar ninguna proteína y por un alto grado de auto-complementariedad de bases, generalmente con una alta proporción en citosina y guanina, lo que genera una robusta estructura secundaria (Flores *et al.*, 2005).

Su simplicidad molecular y su genoma tan reducido se contrarrestan con su capacidad para interactuar con la maquinaria celular del huésped y así llevar a cabo todas las funciones necesarias de su ciclo infectivo. Los viroides se replican autónomamente parasitando la maquinaria transcripcional de sus huéspedes (Diener, 2001; Flores *et al.*, 2005; Ding, 2009; Gómez *et al.*, 2009; Gómez y Pallás 2013). Al ser RNAs patogénicos que no poseen capacidad codificante, el ciclo de vida de los viroides es estrictamente dependiente de los factores del huésped. Esta característica ha hecho de los viroides un sistema modelo idóneo para analizar diferentes aspectos de la biología del RNA, tales como el conocimiento de la relación entre estructura y función del RNA, el transporte intra-, intercelular y vascular del RNA o las alteraciones transcripcionales mediadas por RNA, entre otros (Flores *et al.*, 2005; Flores *et al.* 2004; Daròs *et al.*, 2006; Ding y Itaya 2007; Tsagris *et al.*, 2008; Gómez y Pallás, 2013).

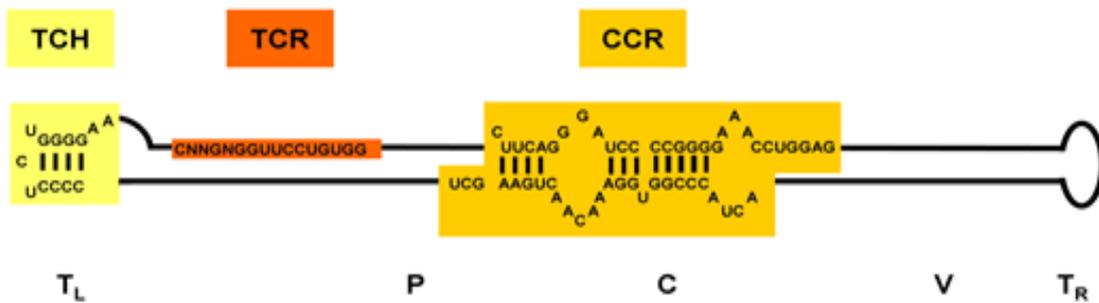
Los viroides se descubrieron y caracterizaron en la primera mitad de la década de los 70 como agentes causales de la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) (Diener 1971) y de la enfermedad de la exocortis de los cítricos (CEVd) (Semancik y Weathers, 1972). Hasta la fecha se han caracterizado molecular y biológicamente 30 especies de viroides y numerosas variantes de secuencia de las mismas (Flores *et al.*, 2005, Tabla 1.1), clasificándolas en dos familias; la familia *Pospiviroidae*, cuya especie tipo es el viroide fusiforme de la patata (PSTVd) (Gross *et al.*, 1978), y la *Avsunviroidae*, cuya especie tipo es el viroide del manchado solar del aguacate (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) (Symons, 1981).

Abreviatura	Especie	Género	Familia	Tamaño (nts)
<b>PSTVd</b>	<b>Viroide del tubérculo fusiforme de la patata</b>	<b><i>Pospiviroid</i></b>	<b><i>Pospiviroidae</i></b>	<b>356,359,360</b>
TCDVd	Viroide del enanismo clorótico del tomate	'	'	360
TMVd	Viroide de la planta macho del tomate	'	'	360
MPVd	Viroide de la papita mejicana	'	'	359-360
CEVd	Viroide de la exocortis de los cítricos	'	'	370-375
CSVd	Viroide del enanismo del crisantemo	'	'	354, 356
TASVd	Viroide del enanismo apical del tomate	'	'	360, 363
IrVd-1	Viroide 1 de iresine	'	'	370
CLVd	Viroide latente de columnea	'	'	370,372,373
<b>HSVd</b>	<b>Viroide del enanismo del lúpulo</b>	<b><i>Hostuviroid</i></b>	'	<b>297-303</b>
<b>CCVd</b>	<b>Viroide del cadang-cadang del cocotero</b>	<b><i>Cocadviroid</i></b>	'	<b>246, 247</b>
CTiVd	Viroide del tinangaja del cocotero	'	'	254
HLVd	Viroide latente del lúpulo	'	'	256
CVd-IV	Viroide IV de los cítricos	'	'	284
<b>ASSVd</b>	<b>Viroide de lapiel cicatrizada de la manzana</b>	<b><i>Apsacaviroid</i></b>	'	<b>329, 33</b>
CVd-III	Viroide III de los cítricos	'	'	294, 297
ADFVd	Viroide del fruto picado del manzano	'	'	306
GYSVd-1	Viroide 1 del moteado amarillo de la vid	'	'	366, 368
GYSVd-2	Viroide 2 del moteado amarillo de la vid	'	'	363
CBLVd	Viroide de la hoja curvada de los cítricos	'	'	318
PCVd	Viroide de los chancros postulosos del peral	'	'	315,316
AGVd	Viroide australiano de la vid	'	'	369
<b>CbVd-1</b>	<b>Viroide 1 del coleus blumei</b>	<b><i>Coleviroid</i></b>	'	<b>248,251</b>
CbVd-2	<b>Viroide 2 del coleus blumei</b>	'	'	301
CbVd-3	<b>Viroide 3 del coleus blumei</b>	'	'	361, 362, 364
<b>ASBVd</b>	<b>Viroide del manchado solar del aguacate</b>	<b><i>Avsunviroid</i></b>	<b><i>Avsunviroidae</i></b>	<b>246-250</b>
<b>PLMVd</b>	<b>Viroide del mosaico latente del melocotonero</b>	<b><i>Pleamoviroid</i></b>	'	<b>335-338</b>
<b>CChMVd</b>	<b>Viroide del moteado clorótico del crisantemo</b>	'	'	<b>399</b>
<b>ELVd</b>	<b>Viroide latente de la brenjena</b>	<b><i>Elaviroid</i></b>	'	<b>333-335</b>

Tabla 1.1 Clasificación de los viroides caracterizados molecularmente (adaptado de Flores *et al.*, 2005). Los viroides se agrupan en dos familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, que contienen cinco y tres géneros respectivamente. Las especies tipo de cada género están señaladas en negrita. En la tabla se especifica, de izquierda a derecha, la abreviatura del nombre del viroide en inglés, su nombre en castellano, y el tamaño en nucleótidos de las especies descritas.

Los viroides de la familia *Pospiviroidae* poseen dominios estructurales conservados, adoptando una estructura en varilla con cinco dominios (Keese y Symons, 1985): una central, la

cual integra una región central conservada (CCR), flanqueada por los dominios patogénico (P) y variable (V), y los dos dominios terminales derecho (TR) e izquierdo (TL), éste último conteniendo una región terminal conservada (TCR) o una horquilla terminal conservada (TCH), tal y como se muestra en la Figura 1.1. Se replican y acumulan en el núcleo (para consultar detalles sobre el proceso de replicación de los viroides nucleares ver Gas *et al.*, 2007) y carecen de ribozimas de cabeza de martillo. En función de la secuencia de la CCR y la presencia o ausencia de la región terminal conservada y la horquilla, los miembros de esta familia se clasifican en cinco géneros (Tabla 1.1) (Flores *et al.*, 2005).



**Figura 1.1.** Representación esquemática de la estructura secundaria de tipo varilla propuesta para los viroides del género *Pospiviroid* de la familia *Pospiviroidae*. En la parte inferior se indica la localización de los diferentes dominios. A color se representan los nucleótidos conservados de cada una de las regiones.

Las especies de la familia *Avsunviroidae* carecen de los motivos conservados típicos de los *Pospiviroidae* poseyendo, sin embargo, estructuras de cabeza de martillo con actividad ribozimática. Estas estructuras no aceptan ningún cambio nucleotídico en el centro catalítico del ribozima. Sólo se han detectado mutaciones en las zonas adyacentes que forman los bucles y siempre están asociados a mutaciones compensatorias para no afectar a la estabilidad de las hélices. A diferencia de los *Pospiviroidae* los viroides de esta familia se replican y acumulan en el cloroplasto (Navarro y Flores, 1997; Ambrós *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2000; Nohales *et al.*, 2012 a y b).

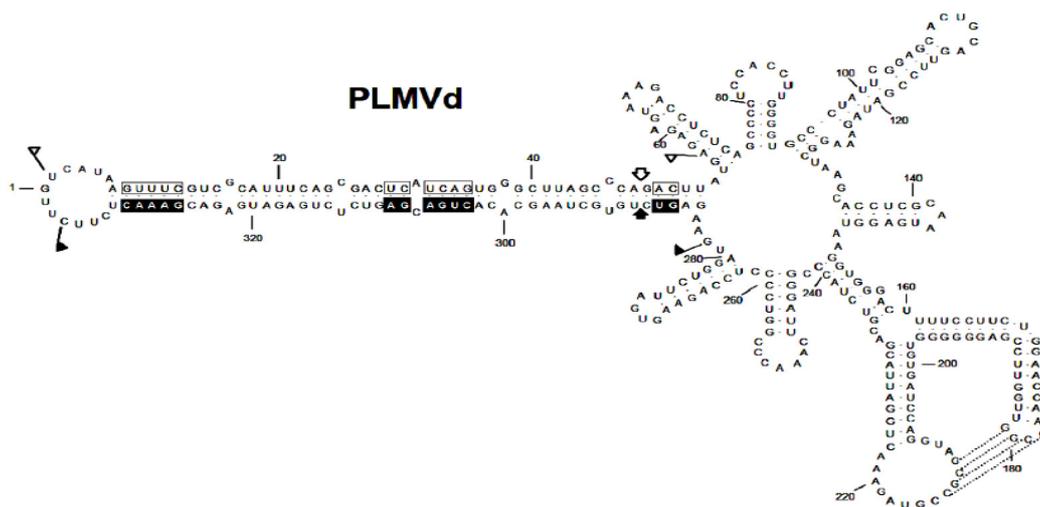


Figura 1.2. Representación de la estructura secundaria de tipo cuasi-varilla y ramificada del PLMVd de la familia *Avsunviroidae*.

Como ya se ha comentado anteriormente, los viroides presentan un elevado grado de estructura secundaria debido a la alta autocomplementariedad de sus secuencias. Los modelos estructurales predichos, por lo general, presentan tramos apareados alternados con pequeños bucles desapareados, lo que les confiere una estructura de tipo cuasi-varilla o ramificada en el caso exclusivo de algunos miembros de la familia *Avsunviroidae* (Figura 1.2).

### 1.1.2 Localización y replicación de los viroides.

Para que se produzca de manera exitosa una infección viroidal sistémica el viroide, una vez localizado en las células inicialmente infectadas, debe replicarse en el orgánulo correspondiente (el cloroplasto para *Avsunviroidae* y el núcleo para *Pospiviroidae*) de la célula, para posteriormente invadir las células vecinas a través de los plasmodesmos, y, finalmente entrar en el floema del tejido vascular para extenderse a larga distancia e invadir nuevos tejidos (Ding y Itaya , 2007; Flores *et al.*, 2005; Gora-Sochacka , 2004; Tabler *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010) (Figura 1.3).

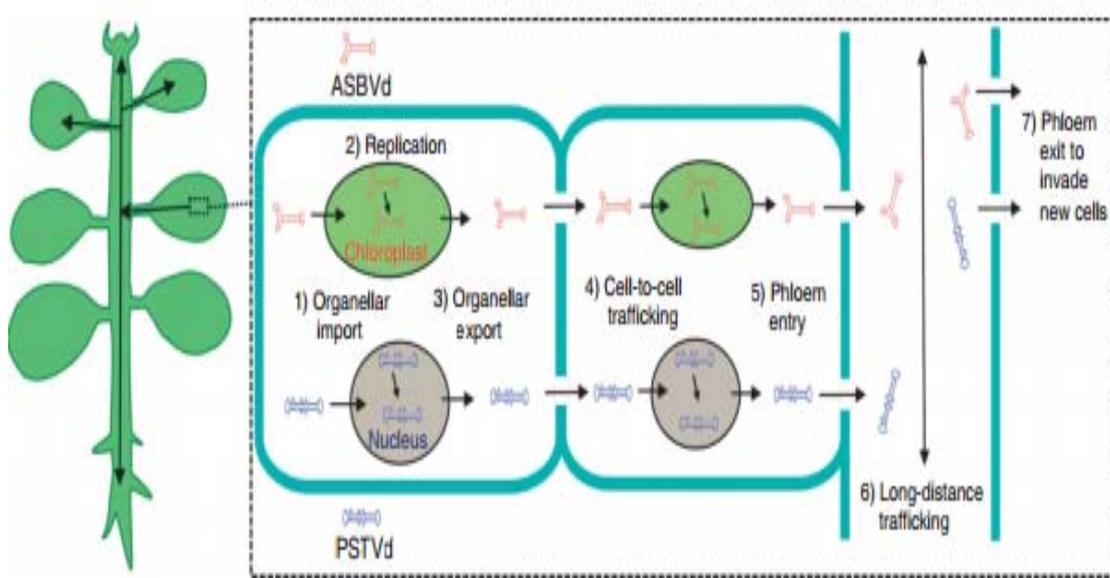


Figura 1.3. Esquema del movimiento intra e intercelular viroidal de ambas familias (Ding *et al*, 2005)

Mediante estudios de centrifugación diferencial y más tarde por experimentos de hibridación in-situ y microscopía electrónica, se confirmó la localización subcelular de los viroides de la familia *Pospiviroidae*, observándose su acumulación fundamentalmente en el núcleo y el nucleolo (Diener 1971; Bonfiglioli *et al.*, 1996; Harders *et al.*, 1989). Estos viroides se encuentran en diferentes formas dentro del núcleo, siendo el más abundante el monómero viroidal con una determinada polaridad a la que se le atribuye arbitrariamente polaridad positiva (Branch y Robertson, 1984).

Por su parte, los miembros de la familia *Avsunviroidae* se replican y acumulan preferentemente en el cloroplasto y es en este orgánulo dónde se localizan mayoritariamente los monómeros circulares de ambas polaridades (Mohamed y Thomas 1980; Bonfiglioli *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 1994; Bussière *et al.*, 2000).

La replicación y propagación de los viroides depende de diferentes factores del huésped. Se ha demostrado que la ARN polimerasa ADN dependiente II está implicada en la replicación de los viroides localizados en el núcleo (Revisado en Tabler y Tsagris, 2004), mientras que los viroides cloroplásticos se replican a través de una ARN polimerasa cloroplástica codificada en el núcleo (Flores *et al.*, 2004). La naturaleza circular de los viroides y la falta de intermediarios de DNA homólogos o complementarios a su secuencia (Zaitlin *et al.*, 1980; Branch y Dickson, 1980) determinan que la naturaleza de la replicación de los viroides siga el modelo de círculo rodante.

En este mecanismo de replicación intervienen solamente intermediarios de RNA y se basa en la presencia de moléculas de ambas polaridades que se acumulan a distintas concentraciones.

En función de la familia del viroide, el mecanismo de replicación tiene diversas variantes (Figura 1.4). Los viroides de la familia *Pospiviroidae* siguen la vía asimétrica, donde la molécula circular de polaridad positiva sirve de molde para la síntesis de oligómeros lineales de polaridad negativa que a su vez sirven de molde para la síntesis de oligómeros de polaridad positiva. Los miembros de la familia *Avsunviroidae* siguen la vía simétrica (Branch y Robertson, 1984; Darós *et al*, 1994; Navarro *et al*, 2000). La molécula circular de polaridad positiva sirve de síntesis de oligómeros lineales de polaridad negativa que se autocortan y circularizan, obteniendo moléculas viroidales de polaridad negativa que servirán a su vez como molde para generar monómeros de polaridad positiva que serán recircularizados, encontrándose de nuevo en el punto de partida (Figura 1.4).

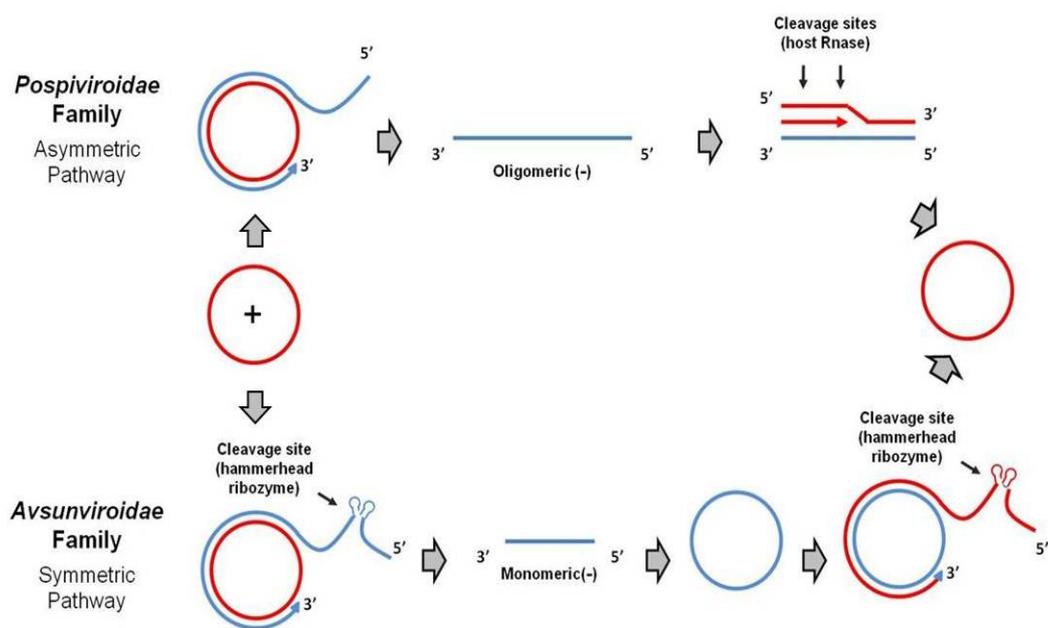


Figura 1.4. Replicación de los viroides mediante el modelo de círculo rodante. Vías simétrica y asimétrica de las familias *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae* respectivamente (Flores *et al*, 2004).

### 1.1.3 Familia *Avsunviroidae*

#### 1.1.3.1 Movimiento intracelular

##### 1.1.3.1.1 Movimiento del núcleo al cloroplasto

La replicación de los viroides también plantea algunas preguntas intrigantes sobre la biología de la célula vegetal. Por ejemplo, ¿cómo los viroides entran y salen de los cloroplastos? ¿Se puede suponer que lo realizan explotando vías de tráfico intracelular de ARN endógeno, aún sin identificar? ¿Existe una red de vías de tráfico de ARN entre el núcleo y otros orgánulos que queda por descubrir?

La evidencia inicial sugiere que la localización subcelular de los viroides de la familia *Pospiviroidae* está mediada en cis por secuencias o motivos estructurales de ARN, que son necesarios para la importación nuclear por un receptor específico a través de una ruta independiente del citoesqueleto (Woo *et al*, 1999; Zhao *et al*, 2001; Abraitene *et al*, 2008). Sin embargo, cómo son transportados los miembros de la familia *Avsunviroidae* al cloroplasto es una cuestión intrigante aún sin resolver, ya que los *Avsunviroidae* son los únicos ARN funcionales capaces de transportarse específicamente al interior de este orgánulo (Daròs *et al*, 2006; Gómez *et al*, 2009).

Los cloroplastos constituyen la característica distintiva de los orgánulos fotosintéticos eucarióticos (Woodson y Chory, 2008; Jarvis, 2008). Son responsables de muchos procesos metabólicos, incluyendo la fotosíntesis y la biosíntesis de diversos metabolitos esenciales, primarios y secundarios (Lopez-Juez y Pyke, 2005; Pogson *et al.*, 2008). Aunque han mantenido restos del genoma ancestral, la mayoría de los genes que codifican las proteínas del cloroplasto se han transferido al genoma de la planta. En consecuencia, la mayor parte de las proteínas que se encuentran en este orgánulo se codifican en el núcleo (Woodson y Chory, 2008; Jarvis, 2008; Bruce, 2000). El intercambio de información genética entre el núcleo y el cloroplasto supone una estrecha coordinación de las actividades de estos dos orgánulos durante el desarrollo de la planta. Por lo tanto, la señalización entre plastidios y el núcleo es necesaria para mantener las funciones biológicas del cloroplasto. Es ampliamente aceptado que este mecanismo de coordinación del genoma está mediado por proteínas codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citosol en la forma precursora correspondiente (que contiene una señal de direccionamiento denominado péptido de tránsito, (TP) y luego importada al orgánulo (Bruce, 2000). Sin embargo, la identificación, en los últimos años de un número significativo de proteínas codificadas en el

núcleo que carecen de este péptido señal (Nada y Soll, 2004; Kleffmann *et al*, 2004) apoya la existencia de vías alternativas en la célula de la planta que sincronizan la acumulación de las proteínas en los cloroplastos (Woodson y Chory, 2008; Gómez y Pallás, 2010).

Los datos procedentes de estudios de secuenciación masiva han puesto de manifiesto la existencia de un gran número de RNAs no codificantes en organismos eucariotas que, en los últimos años han sido reconocidos como reguladores de la expresión de genes. Hasta muy recientemente se pensaba que este papel correspondía sólo a proteínas (Rymarquis *et al*, 2008; Mattick, 2010; Clark *et al*, 2012; Rinn y Chang, 2012). Inicialmente estos RNAs no codificantes estaban restringidos a los compartimentos nucleares o citosólicos de la célula pero recientemente también se han localizado en las mitocondrias y los cloroplastos (Lung *et al*, 2006). La localización subcelular y el tráfico de RNAs son procesos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta. A diferencia de los progresos realizados en los estudios sobre el movimiento de célula a célula y el tráfico de RNA de larga distancia (Lucas *et al*, 2001; Gómez y Pallás, 2004; Fernández-Calvino *et al*, 2011; Pallás *et al*, 2012), el conocimiento del tráfico intracelular sigue siendo limitada.

En un trabajo reciente realizado en nuestro laboratorio, se ha demostrado que una secuencia de ARN no codificante derivado de un viroide (el viroide latente de la berenjena, ELVd de sus siglas en inglés) miembro de la familia *Avsunviroidae* (actuando como un extremo 5'UTR), media el tráfico específico y la acumulación en los cloroplastos de un ARNm (GFP) expresado en el núcleo (Gómez y Pallás, 2010), sugiriendo así la existencia de un nuevo mecanismo de señalización entre el núcleo y estos orgánulos. Con el objeto de determinar qué parte de la secuencia del viroide estaba comprometida con éste tráfico específico del núcleo al cloroplasto, se analizaron deleciones de la secuencia del ELVd fusionadas como extremo 5'UTR a la secuencia codificante de la GFP. La observación de la expresión de estas construcciones al microscopio confocal, permitieron determinar que un fragmento interno de 110 nucleótidos era suficiente para mediar el tráfico de estos transcritos desde el núcleo hacia los cloroplastos. Sin embargo, la capacidad de este motivo para actuar como una señal de localización del cloroplasto aumentó cuando éste se encontraba fusionado a cualquiera de las regiones 5' o 3' de la secuencia del viroide. Estos hallazgos sugirieron que la localización específica de ARN en los cloroplastos podría ser dependiente de un motivo estructural más que de su secuencia de nucleótidos y sirvieron como base experimental para proponer la existencia de un nuevo mecanismo (mediado por ARN no codificante), capaz de regular la importación selectiva de los transcritos nucleares hacia los cloroplastos (Gómez y Pallás, 2010). Sin embargo, esta vía

requeriría la existencia de un paso anterior que implica el transporte del viroide desde el citoplasma al núcleo, de tal manera que durante la fase inicial de su ciclo biológico, los miembros de la familia *Avsunviroidae* serían transportados del citoplasma al núcleo para ser exportados específicamente a los cloroplastos donde ocurre la replicación y se acumulan eficientemente.

#### 1.1.3.1.2 Movimiento del citoplasma al núcleo, y del núcleo al cloroplasto

Para determinar si esta ruta de importación de los viroides de la familia *Avsunviroidae* al cloroplasto ocurría de tal manera, se desarrolló un enfoque experimental combinando la expresión citoplasmática y nuclear de formas lineales del ELVd (Gómez y Pallás, 2012). En este trabajo se propuso un modelo en el que durante la fase inicial del ciclo de vida, los viroides de la familia *Avsunviroidae* podrían ser primero transportados desde el citoplasma al núcleo para ser exportados posteriormente a los cloroplastos, orgánulo donde se replicarían y acumularían de manera eficiente (Gómez y Pallás, 2012). Esta hipótesis es consistente en un escenario subcelular donde unas pocas moléculas de viroides se encuentran transitoriamente en el núcleo (sólo durante las primeras fases breves de su ciclo biológico). De hecho esto ya se había observado previamente en hojas infectadas tanto con el viroide ELVd como con el PLMVd (Mohamed y Thomas, 1980; Bussière *et al.*, 1999), indicando que este fenómeno podría extenderse a todos los miembros de la familia *Avsunviroidae*. Estas observaciones parecerían sugerir que, a pesar de replicarse y acumularse en el cloroplasto de las células infectadas, fracciones menores de estos ARN patogénicos podrían localizarse transitoriamente en los núcleos de las células en etapas tempranas a la infección, reforzando la existencia del paso nuclear previo al cloroplasto. Otro punto que proporciona robustez biológica al modelo emerge de la observación de que una misma región del ELVd estaría regulando tanto la localización en el núcleo (Gómez y Pallás, 2010) como en el cloroplasto (Gómez y Pallás, 2010), lo que sugiere la implicación de la estructura y/o de la secuencia de RNA en la regulación en esta vía de transporte (Gómez y Pallás, 2012).

En resumen, estos resultados obtenidos con el ELVd proporcionaron una nueva visión sobre el movimiento intracelular de los viroides pertenecientes a la familia *Avsunviroidae*. Llegados a este punto cabría plantearse si los demás miembros de la familia *Avsunviroidae* podrían seguir el mismo patrón observado en el ELVd. Para ello, en este trabajo se han realizado estudios de movimiento intracelular empleando RNAs derivados de dos miembros diferentes de dicha familia, *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) y *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd).



## II. OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Analizar aspectos del tráfico subcelular del "*Avocado sunblotch viroid*" (ASBVd) y "*Peach latent mosaic viroid*" (PLMVd), para determinar si la capacidad de explotar la ruta de transporte núcleo-cloroplasto previamente descrita para el "*Eggplant latent viroid*" (ELVd), es una característica común de los viroides miembros de la familia *Avsunviroidae*

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Diseñar los clones de ambos viroides fusionados como extremos 5' UTR a la secuencia de la GFP.
- II. Expresar de manera transitoria dichas construcciones por agroinfiltración en *N. benthamiana* y determinar su localización subcelular en cloroplastos por:
  - a) Observación de fluorescencia de la GFP al microscopio confocal.
  - b) Detección de transcritos en el cloroplasto.
- III. Determinar la contribución de la estructura del viroide en la funcionalidad de la construcción a analizar.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* de 3-4 semanas a las que se les agroinocularon las hojas con un cultivo de la cepa C58C1 de *Agrobacterium Tumefaciens* transformada con el vector binario pMOG800, que llevaba insertado el cDNA de los viroides ELVd, PLMVd y ASBVd así como fragmentos parciales de éstos. Las plantas inoculadas se mantuvieron junto con plantas sin inocular (empleadas como control) en cámaras de ambiente controlado a 30°C durante 16 h/luz y a 25°C durante 8 h/oscuridad. Las plantas se analizaron a los 3 días post-agroinoculación.

#### 3.2 Recogida de muestras

Se recogieron hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas a los 3 días post-infiltración. De las muestras que iban a ser extraídos el RNA o las proteínas, se recogieron sobre nitrógeno líquido y se congelaron inmediatamente a -80°C; las muestras que iban a ser observadas en el microscopio confocal se recogieron sobre hielo.

#### 3.3 Clonación de los viroides y sus fragmentos.

El objetivo final de este proceso fue generar 2 construcciones en las que las secuencias del ASBVd y el PLMVd se fusionasen con el cDNA de la GFP, de tal manera que el transcrito generado a partir de esta quimera constara de un RNAm recombinante, en el que la secuencia derivada del viroide actuase como extremo 5' no traducible (5'UTR) de la secuencia codificante de la GFP (tal y como se muestra en la Figura 3.1).

Para la clonación tanto de los viroides como de sus fragmentos se ha seguido la misma metodología, por lo que se describe de forma común todas las etapas de clonado, indicando en los casos que fuese necesario las características propias de cada clon.



Figura 3.1 Esquema de la construcción viroide-GFP en la que el RNA viroidal actúa como extremo 5' de la molécula de RNAm de la GFP.

### 3.3.1 Amplificación de la secuencia a clonar

El RNA de los viroides fue amplificado a partir de plásmidos disponibles en el laboratorio, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) utilizando el termociclador “GeneAmp PCR system 2400”, la polimerasa de alta fidelidad de copia PrimeSTAR® HS (Takara Bio Inc) y la mezcla de reacción que se muestra en la tabla 3.1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (realizando 30 ciclos de amplificación): 20 s a 94°C de desnaturalización, 18 s a 52°C de hibridación con los cebadores y 18 s a 72°C para la extensión en cada ciclo. El DNA amplificado fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

Los cebadores utilizados en la amplificación cuya secuencia se muestra en la Tabla 2.2, contienen los sitios de restricción BmaHI (sentido) y KpnI (antisentido)

Mezcla de reacción PCR para un volumen de 50µl	Volúmenes
Tampón 5X	10µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4µl
Mix dNTPs (10mM cada uno)	1µl
Cebador sentido	0,1µl
Cebador antisentido	0,1µl
Taq DNA polimerasa (5U/µl)	0,5µl
Molde (hasta 0,5 µg/50µl)	0,5µl
Agua miliQ	33,8µl

Tabla 3.1. Cantidades de cada componente de la mezcla de reacción de la PCR siguiendo el protocolo de Promega.

ASBVd	Dir	TTTGGTACCTTGGTGTCCGACTTTCCGACTC
	Rev	GGATCCCATGACCTGGTTTCGTCAAACA
PLMVd	Dir	TTTGGTACCTTGGTGTGCTAAGCACACTGATG
	Rev	GGATCCCATGACTCTTTCATCCAGAATCACTTCTGGAGGGG
ELVd1	Dir	TGGTACC GGGGTTTCGCCATGGGTCCGGACT
	Rev	TGGATCCCATCCTGATGAGTCCGAAAGGACG
ELVd2	Dir	TGGTACC GGGGTTTCGCCATGGGTCCGGACT
	Rev	TGGATCCCATCGAACCACCGTCGGAAAGTG
1/2 ASBVd KpnI	Dir	TTTGGTACCAGATGGGAAGAACACTGATGAGT
	Rev	GGATCCCATGACCTGGTTTCGTCAAACA
2/3 ASBVd KpnI	Dir	TTTGGTACCCACTCGTCTTCAATCTCTTGATC
	Rev	GGATCCCATGACCTGGTTTCGTCAAACA
1/3 ASBVd KpnI	Dir	TTTGGTACCCAAGGTTTATTCCTCTATCTTCA
	Rev	GGATCCCATGACCTGGTTTCGTCAAACA
1/2 ASBVd BamHI	Dir	TTTGGTACCTTGGTGTCCGACTTTCCGACTC
	Rev	TTGGATCCCATTTTCCCTGAAGAGACGAAGT
2/3 ASBVd BamHI	Dir	TTTGGTACCTTGGTGTCCGACTTTCCGACTC
	Rev	TTGGATCCCATAGAGGAATAAACCTTGCGAG
GFP	Dir	GTGAGCAAGGGCCGAGGAGC
	Rev	GGCCATGATATAGACGTTG

Tabla 3.2 Secuencias de los oligos directo y reverso de cada viroide, de los fragmentos de ASBVd y de la GFP.

### 3.3.2 Extracción de la banda de PCR

Una vez cargados los productos de PCR y separados por electroforesis en gel de agarosa se extrajeron las bandas del gel que correspondían a las secuencias de los viroides o sus fragmentos. Para ello se cortaron las bandas con ayuda del bisturí, se introdujeron en un tubo *ependorf* y se purificó el DNA de la banda siguiendo el protocolo de extracción del kit comercial GeneJET de Thermo Scientific.

### 3.3.3 Ligación al vector pTZ57R/T

Se construyó un plásmido recombinante para su inserción posterior en bacterias mediante la ligación del cDNA purificado a un plásmido comercial abierto pTZ57R/T (*Fermentas*) Figura 3.2. El plásmido posee en sus extremos una Timina desapareada (extremos cohesivos) que establece puentes de hidrógeno con los fragmentos de cDNA, debido a que éstos poseen una Adenina desapareada en los extremos gracias a la actividad adenina terminal transferasa de la Taq Pol. Para llevar a cabo la ligación se preparó una mezcla con 1 µl de plásmido, 3.5 µl de tampón de ligación 2X, 0.3 µl de DNA ligasa (Promega) (que tras la unión mediante puentes de hidrógeno establece puentes disulfuro entre nucleótidos de una misma cadena) y 2.5 µl de cDNA. La mezcla se incubó 1 h y 30 min a temperatura ambiente.

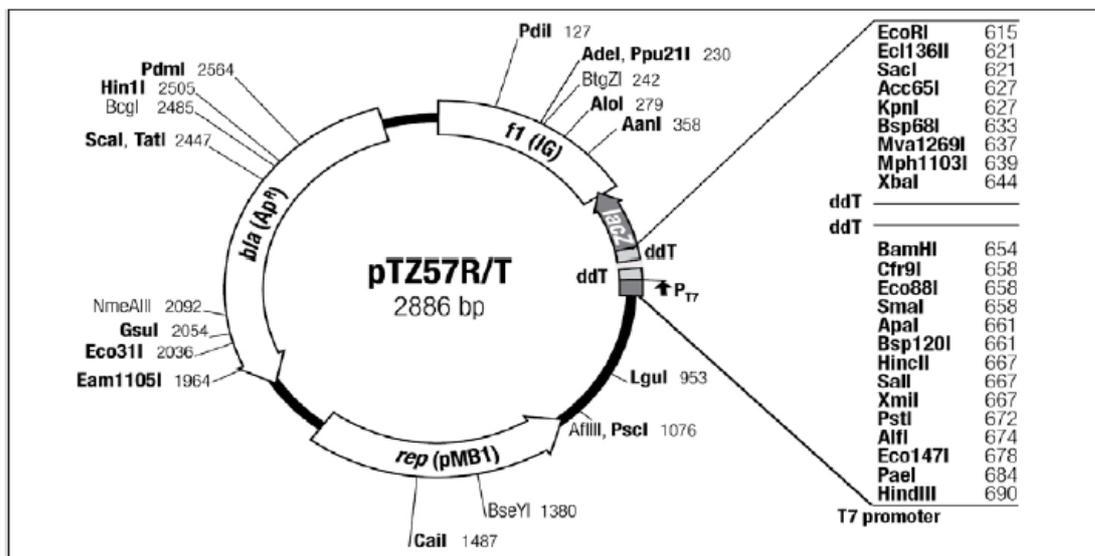


Figura 3.2. Esquema del vector pTZ utilizado en la clonación.

### 3.3.4 Transformación de las bacterias con el plásmido recombinante

El plásmido recombinante se introdujo en células competentes de *E. Coli* (cepa DH5 $\alpha$ ) mediante electroporación. Para ello la mezcla procedente de la ligación se introdujo en una cubeta de electroporación junto con 50  $\mu$ l de células competentes de *E. Coli* DH5 $\alpha$  y se sometió a un pulso eléctrico de alto voltaje. Inmediatamente después del pulso eléctrico se añadieron 500  $\mu$ l de medio LB a la cubeta para que las células se recuperaran del estrés generado. Después se traspasó el contenido de las cubetas a tubos *ependorf* y las muestras se incubaron 30 minutos a 37°C. Por último se sembraron las bacterias en medio sólido selectivo (placas Petri con medio LB más ampicilina (50  $\mu$ g/ml), a las que previamente se les añadió 40  $\mu$ l de X-gal) con el fin de que sólo crecieran aquellas bacterias que hubieran incorporado el plásmido (recombinante o no), y se incubó a 37°C durante 16 h.

La cantidad de muestra que se añadió a la placa fue aproximadamente de 40  $\mu$ l tras someter a un pulso de centrifuga para que precipitasen las células competentes. Al día siguiente se observaron las placas para identificar las colonias que habían incorporado el plásmido recombinante en función de su color, blanco (plásmido con inserto) o azul (plásmido sin inserto) respectivamente.

### 3.3.5 Selección de clones para secuenciación

Las colonias blancas (compuestas por bacterias que incorporaron el plásmido recombinante) fueron seleccionadas como candidatas para su secuenciación. Para asegurar que dichos clones poseían el plásmido recombinante, se tomaron 6 colonias de cada placa y se cultivaron en medio líquido (3 ml de LB más ampicilina (50  $\mu$ g/ml)) en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se realizó una PCR (en la Tabla 3.3 se muestra las cantidades y condiciones de la PCR), utilizando oligos que amplificaran sólo la secuencia del viroide, con una alícuota del medio de cultivo bacteriano. De los clones que se obtuvo amplificación del fragmento se realizó una purificación de DNA plasmídico o *Miniprep* mediante un kit comercial GeneJET de Thermo Scientific. Se utilizaron 5  $\mu$ l de este DNA purificado para la determinación de la secuencia por el servicio secuenciación del IBMCP.

<b>Mezcla de reacción de la PCR para un volumen de 25µl</b>	<b>Volúmenes</b>
Tampón 5X	5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2µl
Mix dNTPs (10mM cada uno)	0,5µl
Cebador sentido	0,1µl
Cebador antisentido	0,1µl
Taq DNA polimerasa (5U/µl)	0,25µl
Molde (hasta 0,5 µg/50µl)	1µl
Agua miliQ	16,3µl

Tabla 3.3 Cantidades de cada componente de la mezcla de reacción de la PCR con la DNA polimerasa PrimeSTAR® HS (Takara Bio Inc.)

<b>Condiciones PCR de colonias</b>	<b>23 ciclos</b>
94°C (15 s)	Desnaturalización
55°C ( 15 s)	Anillamiento
72°C (30 s)	Extensión
72°C (1 min)	
18°C	

Tabla 3.4 Condiciones de la PCR de colonias bacterianas en medio líquido

### 3.3.6 Análisis bioinformáticos

Una vez obtenidas las secuencias de los clones que se enviaron, se comprobó que sus secuencias eran correctas realizando un BLAST entre la secuencia que habíamos obtenido y la secuencia esperada. Cerciorando que no se había producido ningún cambio en la secuencia de nucleótidos del viroide y que estaban presentes los sitios de restricción KpnI y BamHI, insertados en los cebadores, utilizando para ello aplicaciones en línea que en un punto posterior se detalla.

### 3.3.7 Liberación de los fragmentos incorporados en el vector pTZ

A continuación se realizó una digestión doble (30 µl de la miniprep, 0.5 µl buffer de BamHI, 0.75 µl enzima BamHI, 3 µl de KPNI y 11.25 µl de agua) de los clones con las secuencias correctas, durante 2 horas y media a 37°C. Con ello se liberaba el inserto del viroide (o en los casos que se clonaron sólo fragmentos de éstos, sólo una parte de ellos) flanqueados por estas dos enzimas de restricción.

En el caso de la clonación del viroide completo PLMVd, al tener un sitio de restricción KpnI interno en su secuencia se tuvieron que hacer digestiones seriadas, primero con BamHI (60  $\mu$ l miniprep, 5  $\mu$ l BamHI, 10  $\mu$ l tampón de BamHI y 25  $\mu$ l agua) dejándolo 2 h y 30 min a 37°C para después hacer la digestión a diferentes tiempos con KpnI (15  $\mu$ l de la digestión con BamHI, 2  $\mu$ l KpnI, 3.5  $\mu$ l tampón de BamHI y 30  $\mu$ l agua). Se sacaron alícuotas de 12  $\mu$ l para digerirlas a 5, 10, 15 y 20 minutos y cargarlas en gel de agarosa al 1% para ver el tiempo óptimo en el que la enzima había cortado en el extremo y no en el interior de la secuencia. El tiempo que resultó ser el adecuado fue de 10 min.

Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se extrajo la banda correspondiente mediante el kit ya mencionado GeneJET de Thermo Scientific.

### 3.3.8 Ligación al vector pIVEX2.3

Se utilizó un plásmido pIVEX2.3, con resistencia a ampicilina, digerido previamente con BamHI y KpnI (6  $\mu$ l de miniprep, 3  $\mu$ l buff BamHI, 0.5  $\mu$ l BamHI, 2  $\mu$ l KpnI y 21.5  $\mu$ l agua, durante 3 h a 36°C) y extraído de un gel de agarosa al 1% con el kit GeneJet, para generar los sitios donde se ligará el fragmento del viroide que se está clonando. El vector consta de la siguiente construcción:

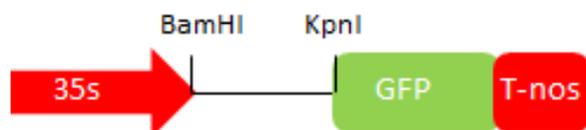


Figura 3.3 Esquema del casete de expresión del vector pIVEX2.3.

El fragmento a clonar se situaba entre los sitios de restricción BamHI y KpnI para así crear un casete formado por el promotor constitutivo 35S, seguido de la secuencia del viroide que actúa como extremo 5' UTR, la GFP y el terminador.

Para la ligación se prepara una mezcla de 4  $\mu$ l del inserto digerido, 2  $\mu$ l del vector, 6.5  $\mu$ l del tampón 2X ligasa y 0.5  $\mu$ l de la enzima ligasa. Se deja dos horas y media a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo se transforma en células competentes de *E. Coli* (cepa DH5 $\alpha$ ) mediante electroporación, tal y como se ha descrito anteriormente, con 4  $\mu$ l de la mezcla de ligación.

### 3.3.9 Selección de clones

Transcurrido un día, y tras ver crecimiento de colonias en las placas, se eligieron 6 de ellas y se cultivaron en medio líquido LB con ampicilina, durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se comprobó si los clones seleccionados contenían el inserto mediante PCR (con las mismas cantidades de cada elemento, sólo con la diferencia de que se utilizaron oligos que amplificaran desde la zona del viroide hasta mitad de la GFP). Las condiciones se detallan en la Tabla 3.5.

De los clones positivos se realizó una *Miniprep* mediante un kit comercial GeneJET de Thermo Scientific y 5 µl de éstos se utilizaron para determinar su secuencia, como con el vector anterior.

Condiciones PCR de colonias	30 ciclos
94°C (20 s)	Desnaturalización
55°C ( 20 s)	Anillamiento
72°C (45 s)	Extensión
72°C (3 min)	
18°C	

Tabla 3.5 Condiciones de la PCR de colonias bacterianas en medio líquido

Una vez se obtuvieron las secuencias, se comprobaron mediante los análisis informáticos ya mencionados.

### 3.3.10 Ligación al vector binario pMOG800

Los vectores construidos anteriormente sobre el plásmido pIVEX2.3, se clonaron en el vector binario pMOG800. Para extraer el vector correspondiente se realizó una digestión utilizando la enzima HindIII (30 µl miniprep, 5 µl tampón HindIII, 2.5 µl HindIII y 12.5 µl agua, durante 2 h y 30 min a 37°C), ya que reconoce los sitios de corte de sus extremos. Posteriormente, los casetes digeridos se purificaron tal y como se ha explicado en apartados anteriores.

En paralelo, se digirió también el plásmido pMOG800 con HindIII (30 µl miniprep, 5 µl buffer HindIII, 3 µl HindIII y 12. µl agua) y se realizó una defosforilación (Fermentas) para evitar la religación del plásmido. A continuación se llevó a cabo la ligación de los casetes de la misma forma que en el apartado anterior. Una vez realizada la ligación, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α por medio de la electroporación, siguiendo el

procedimiento ya explicado, pero suplementando el medio LB con 50 mg/l de kanamicina. Una vez obtenidas las colonias y pasadas a medio líquido LB /Kan, las preparaciones se analizaron por digestión para comprobar si presentaban el inserto.

### 3.3.11 Transformación de *Agrobacterium Tumefaciens*

Se cogieron 3 µl de la miniprep del vector binario pMOG800 y se transformaron cepas de *Agrobacterium* C58 (con resistencia a kanamicina y Rifampicina) mediante electroporación. Las placas se dejaron crecer durante 2 días a 28°C. Transcurrido este tiempo se cultivaron en medio líquido LB (kan/R) durante toda la noche a 28°C para obtener el cultivo bacteriano al que se le ha insertado el plásmido con el casete de expresión requerido, y estar listo para ser guardado (glicerinado a 80°C) o ser procesado para agroinfiltrarse. A continuación se representa de forma esquematizada todo el proceso de clonaje, la transferencia del producto de PCR de vector a vector hasta agroinfiltrar hojas de *N. benthamiana*.

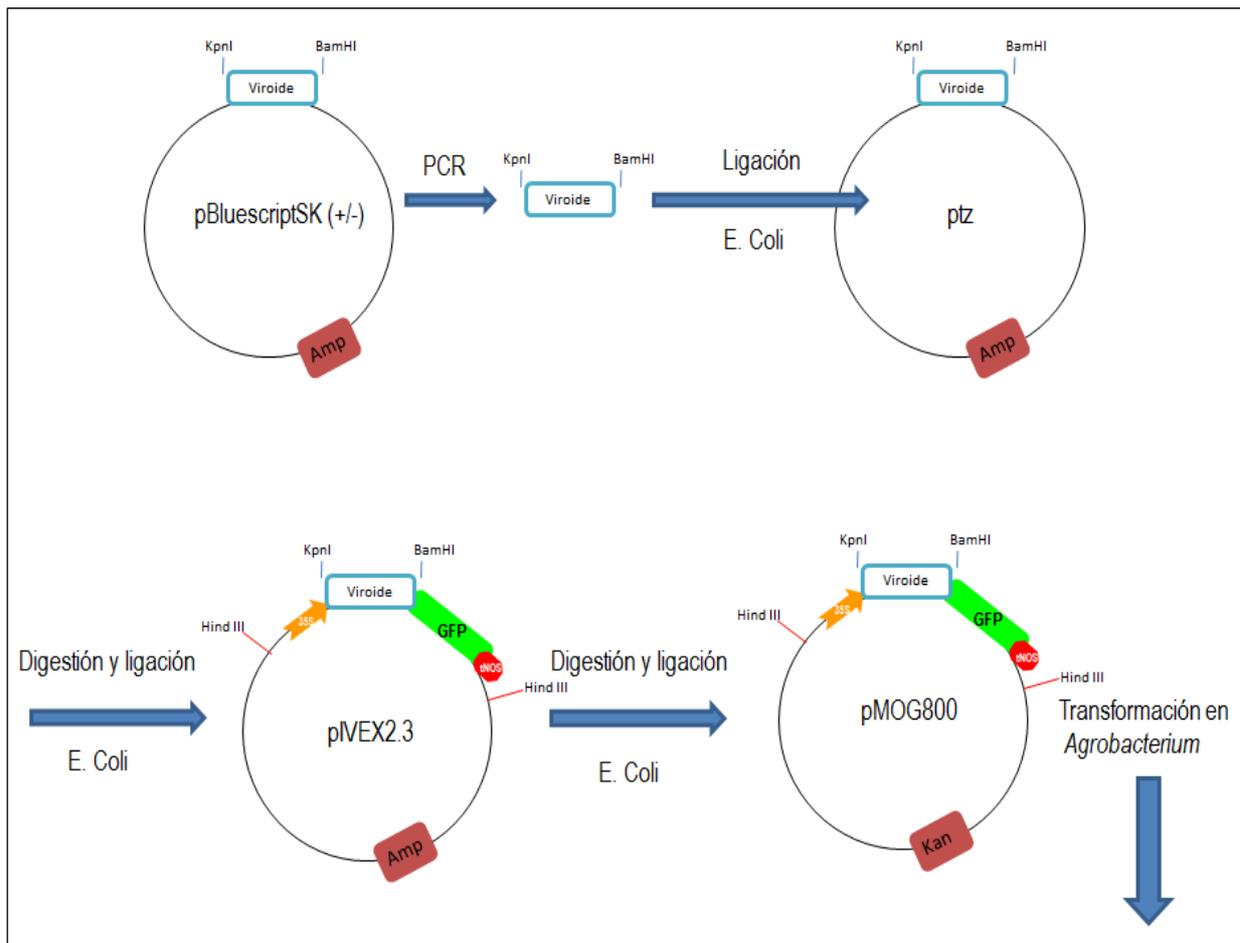


Figura 3.4. Esquema del proceso de clonaje tanto de los clones totales como de los fragmentos parciales de estos.

### 3.4 Agroinfiltración

El plásmido binario pMOG800 que lleva inserta la construcción con el promotor 35S, la secuencia del viroide, la GFP y un terminador T-NOS, se transformó en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Hamilton *et al.*, 1996) y se dejaron crecer en LB con kan/rif durante toda la noche a 28°C. El medio líquido bacteriano se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos y se resuspendió en tampón de agroinfiltración (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES pH 5.5 y H<sub>2</sub>O) hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.5. Con este material se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* de 3-4 semanas con el clon correspondiente; transcurridos tres días se observó la fluorescencia de la GFP con el microscopio láser confocal de barrido Leica TCS SL, con excitación a 488 nm y emisión a 510-560 nm.

### 3.5 Aplicaciones bioinformáticas

Las secuencias de los viroides (ELVd, ASBVd y PLMVd) se buscaron en las bases de datos disponibles en GeneBank mediante el algoritmo BLAST de las bases de datos EMBL/GeneBank, a través de formularios en línea que se encuentran en la dirección de Internet del National Center for Biotechnology Information.

Los estudios de alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas durante el proceso de clonación se comprobaron mediante la aplicación Clustal-W ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw)), con el objetivo de comprobar si las secuencias introducidas en los diferentes vectores no habían sufrido ninguna delección o cambio de nucleótidos. Para determinar la estructura más probable (de menor energía) que adoptaban diferentes viroides de la familia *Avsunviroidae* se utilizó el programa RNAfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>).

Durante el proceso de clonación de los diferentes viroides fue necesario buscar los enzimas de restricción que no cortasen dentro de las secuencias a clonar, y así generar los sitios de restricción en sus extremos para posteriores digestiones, mediante el diseño de los oligos. Para ello se utilizó el programa informático Neb cut (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). También fue necesario comprobar que al introducir la secuencia del viroide dentro del plásmido pIVEX2.3, la secuencia del viroide actuase como un verdadero extremo 5'UTR para la pauta de lectura que permitiera la correcta traducción de la secuencia de GFP. Esto se comprobó utilizando el programa informático ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>), el cual determina la pauta de lectura de la secuencia introducida.

### 3.6 Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

#### 3.6.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó a partir de las hojas agroinfiltradas de *N.benthamiana*. Las hojas se trituraron en mortero con nitrógeno líquido, y se cogieron aproximadamente 50 mg en un eppendorf al que se le añadió 1 ml de TRIzol (el volumen de la muestra no debe superar el 10% del TRIzol utilizado). La extracción continuó siguiendo las instrucciones del fabricante (TRI REAGENT™). Para las posteriores RT-PCRs se utilizó 1 µl. Una vez purificado el RNA, la concentración de cada muestra se midió por medio de un espectrofotómetro de tipo nanodrop.

Para el caso particular de la extracción de RNA a partir de cloroplastos se cogieron 100 µl de la muestra a la que se adicionó el ml de TRIzol, a partir de este punto se continúa el proceso de extracción de RNA de cloroplasto de la misma forma que la extracción de RNA total.

#### 3.6.2 RT-PCR

Las RT-PCRs se realizaron mediante el uso del kit superscript RT/ platinum Taq Mix, con el que se producen las dos reacciones de forma secuencial pero con una sola mezcla de reactivos. Los componentes de la reacción son: 2X Reaction Mix (25 µl), 1 µl de RNA, 0.5 µl de cada oligo, 1 µl de la enzima (Taq) y un volumen de agua hasta alcanzar los 25 µl del volumen total de la reacción.

#### 3.6.3 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de las reacción de RT-PCR y PCR se analizan mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v en tampón TAE1X (40 Mm Tris-HCl pH 7, 20 mM acetato sódico, 1 Mm EDTA). Las muestras, de forma general, se corrieron durante 30 minutos a 110 voltios. El gel se tiñó con bromuro de etidio (BrEt) y se visualizó con luz UV  $\lambda = 260$  nm

### 3.7 Preparación y análisis de proteínas

#### 3.7.1 Preparación de la muestra

El extracto de proteínas totales se obtuvo mediante homogeneización del tejido vegetal en presencia de tampón de extracción de proteínas Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 25%, SDS 2%, DTT 350 mM). Los restos vegetales se eliminaron mediante centrifugación a

12000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo, se desnaturalizaron las proteínas durante 15 min a 95°C y se añadió un 0,01% de azul de bromofenol.

### 3.7.2 Electroforesis desnaturalizante de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

Las muestras almacenadas con tampón de carga de electroforesis se calentaron a 95°C durante 5 min para permitir la desnaturalización de las proteínas, y se cargó 40 µl de las mismas en un gel al 12% de poliacrilamida (40% acrilamida mix, 1M Tris pH 6,8, 10% SDS, 0,01% de APS al 10%, 0,001% TEMED) con una fase superior de separación de muestras compuesta por un gel de concentración o *stacking* (40% poliacrilamida mix, 1 M Tris pH 6,8, 20% SDS, 0,01% de APS al 10%, 0,001% TEMED). Tras su gelificación, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis y cubierto con tampón de electroforesis específico de proteínas (0,025M Tris-HCl pH 8,3, 0,2 M glicina, 1% SDS). Las muestras se corrieron durante 2 h a 100 V. Se cargó, además, un marcador de peso molecular (Fermentas) para la posterior identificación de las bandas proteicas.

Finalizado el proceso, los geles se tiñeron con una solución colorante (Azul Coomassie 0.05%, ácido acético 10%, isopropanol 10%) durante 40 min y se destiñeron con solución decolorante (ácido acético 10%, isopropanol 10%) en agitación durante varias horas, hasta eliminar la tinción de fondo.

### 3.7.3. Análisis serológico de proteínas por *Western-blot*

Las proteínas separadas previamente por SDS-PAGE se transfirieron a membrana de PVDF (Amersham Hybond TM-P) con un tampón de transferencia que contenía: Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 10 % a 100 V durante 1 h. El montaje (las esponjas, el papel, la membrana y el gel de acrilamida) se realizó de forma sumergida en el tampón de transferencia, procurando evitar la formación de burbujas. La transferencia se llevó a cabo en el seno del mismo tampón.

Una vez finalizada la transferencia, los centros de unión libres de la membrana se saturaron mediante incubación con una solución bloqueante (tampón TBS 1X, Tween-20 al 0.3% y un 5% de leche en polvo desnatada) durante 1 h y 30 min a 4°C en agitación suave. A continuación se incubó la membrana durante toda la noche en solución de hibridación (2,5% de leche desnatada y TBS 1X más Tween 20 al 0,3%) a la que se añadió el antisuero (en dilución 1:10.000) específico contra la proteína GFP. Seguidamente se hicieron 3 lavados de 15 minutos cada uno con TBS más Tween 20 al 0,3% para eliminar el exceso del anticuerpo de la

membrana. Una vez lavada, la membrana se incubó 1 h con una solución que contenía un 2% de leche desnatada, TBS más Tween 20 al 0,3% y un anticuerpo secundario (dilución 1:10.000), que reconoce la fracción constante del anticuerpo primario, conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP). Finalmente, con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se hicieron 2 lavados de 10 min cada uno con TBS 1X más Tween 20 al 0,3%, y un lavado de 10 min con TBS 1X.

Para el revelado de la membrana fue necesario preparar el sustrato quimioluminiscente, siguiendo las instrucciones del Kit de revelado (kit revelado Thermo Pierce® ECL Blotting substrate). El sustrato se aplicó sobre la membrana durante 5 min en plena oscuridad. La membrana una vez marcada se expuso a una película fotográfica de autorradiografía (Amersham Hyperfilm™ ECL y Thermo CL-XPosure™ Film) durante 5 min para la detección de la señal quimioluminiscente. Pasado este tiempo las películas fueron reveladas en una procesadora automática M35X-Omat (Kodak)

### 3.8 Extracción y purificación de cloroplastos

Pasados tres días de la fecha de agroinfiltración, se recogieron tres gramos de hojas infiltradas, para proceder a la purificación de cloroplastos. Éste material se homogeneizó en mortero (a 4°C) con 10 ml de tampón de extracción (300 mM sorbitol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES/KOH (pH 7.8), 2 mM EDTA, 0.04% de β-mercaptoetanol y 0.1% polyvinilpyrrolidone). Seguidamente el homogenizado se filtró con *miracloth* y se centrifugó 10 minutos a 1500 g a 4°C en tubos grandes de centrifuga. A continuación, el pellet formado se resuspendió en 4 ml de tampón de aislamiento (300 mM sorbitol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES/KOH (pH 7.8), 2 mM EDTA). Una vez resuspendido, se cargó 1 ml de la muestra en un gradiente de percol (15%-35%-55%) y se centrifugó 20 minutos a 8000 g a 4°C. Los cloroplastos sanos acumulados como una banda verde entre los gradientes de 35-55% de percol, se extrajeron con una pipeta pasteur y se lavaron con tampón de aislamiento con un volumen proporcional al volumen de cloroplastos extraídos. Una vez lavados, se centrifugaron 5 minutos a 100 g (4°C). El pellet resultante (conteniendo los cloroplastos purificados) se resuspendió en tampón de aislamiento para continuar con la extracción de RNA o proteínas.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Obtención de construcciones quimera Viroide-GFP

Con el fin de averiguar si tanto el ASBVd como el PLMVd (actuando como extremos 5'UTR) eran capaces de dirigir de forma específica el tráfico del mRNA de la GFP desde el núcleo hacia los cloroplastos, tal y como se había visto que ocurría con el ELVd (Gómez y Pallás, 2010), se prepararon las correspondientes construcciones quimera Viroide-GFP.

Los pasos que se requirieron hasta conseguir la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pMOG800 con la construcción diseñada, fueron los siguientes:

Se llevó a cabo la amplificación de las secuencias viroidales por PCR a partir de dos plásmidos (uno con la secuencia del ASBVd y otro con la del PLMVd) disponibles en el laboratorio. Las amplificaciones dieron lugar a fragmentos de DNA de tamaños cercanos a los 300 pb, correspondientes al tamaño de los viroides correspondientes (Figura 4.1).

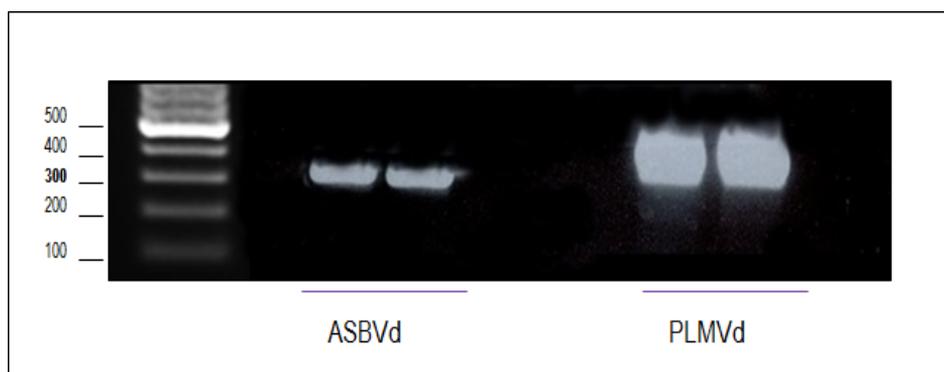


Figura 4.1 Análisis electroforético en gel de agarosa al 1,5% TAE 1X, de las amplificaciones de las secuencias viroidales del ASBVd y PLMVd, ambas de aproximadamente 300 pb. Los tamaños del marcador molecular de DNA se indican en pares de bases (pb) a la izquierda de la figura.

A continuación, se clonaron en el vector pTZ, y, una vez crecidas las colonias, primero en placas de LB con resistencia a ampicilina y luego en medio líquido (también LB con ampicilina), se realizó una PCR a partir de 1  $\mu$ l del medio líquido con los oligos específicos de cada viroide, para comprobar si los clones seleccionados presentaban el inserto (Figura 4. 2).

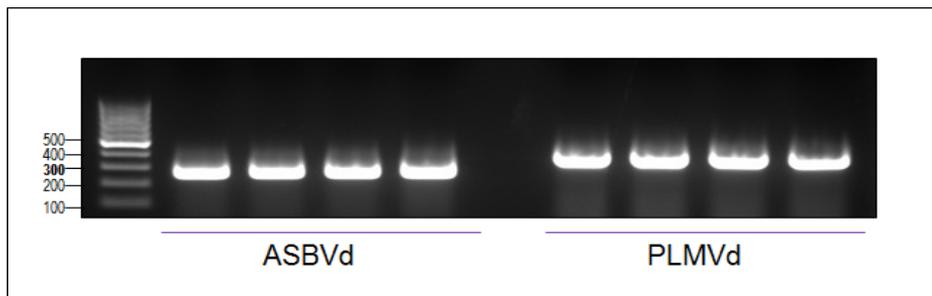


Figura 4.2 Análisis electroforético en gel de agarosa al 1,5% TAE 1X, de las amplificaciones de las secuencias del ASBVd y PLMVd a partir de 1  $\mu$ l de medio líquido procedente de colonias transformadas tras la reacción de ligación entre el vector pTZ y los insertos viroidales. La banda de 300 pb que se observa corresponde al tamaño del fragmento clonado. Los tamaños del marcador molecular de DNA se indican en pares de bases (pb) a la derecha de la figura.

De las muestras obtenidas se secuenciaron varios clones para comprobar que las secuencias nucleotídicas fueran correctas y digerirlas con las enzimas de restricción KpnI y BamHI, las cuales liberarían el fragmento clonado, ya que los oligos utilizados para sus amplificaciones se diseñaron con los nucleótidos que reconocen dichas enzimas, tal y como se muestra en la Figura 4.3.

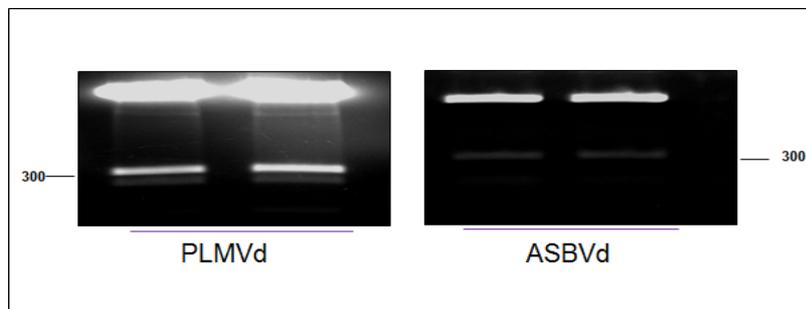


Figura 4.3 Análisis electroforético en gel de agarosa 1% TAE. Resultado de la digestión de los plásmidos con las enzimas de restricción KpnI y BamHI tras incubarlas 2h a 37°C. Se observa la liberación de la banda del viroide, de tamaño aproximadamente de 300 pb en ambos casos.

Estas bandas se eluyeron y se ligaron al vector pIVEX2.3, el cual, como se observa en la Figura 4.4, contiene el promotor 35S, la secuencia de la molécula fluorescente GFP y el terminador T-nos (el casete de expresión).

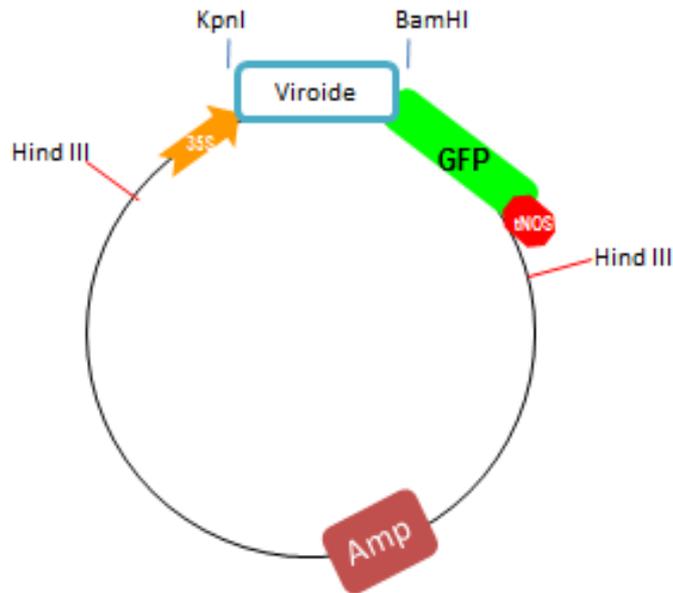


Figura 4.4 Esquema del plásmido pVEX2.3 formado por el casete de expresión 35s+viroide+GFP+ T-nos, flanqueado por los sitios de restricción HindIII. Las secuencias de ambos viroides (ASBVd y PLMVd) están situadas entre las enzimas de restricción KpnI y BamHI. El plásmido confiere resistencia a ampicilina.

Entre el promotor y la GFP se encuentran las secuencias de las enzimas de restricción que habíamos utilizado para digerir el inserto del viroide dentro del plásmido pTZ57R/T. Así pues, las secuencias tanto del ASBVd como del PLMVd se insertaron (como extremos 5'UTR), entre la secuencia del promotor y la GFP para formar el casete de expresión y transformarlas en cepas *E. Coli* DH5 $\alpha$ . Una vez obtenidas las colonias y tras haber comprobado que sus secuencias eran correctas, los clones estaban listos para ser insertados en el vector binario pMOG800 y transformarlos en *A. tumefaciens*, tal y como se describe en materiales y métodos.

Para la clonación final del plásmido pMOG800, después de crecer las colonias y pasarlas a medio líquido, las minipreps fueron digeridas con HindIII (durante 2 h a 37°C), ya que el vector estaba flanqueado por sitios de restricción de esta enzima, con el fin de comprobar si los clones seleccionados presentaban el inserto. Como se muestra en la Figura 4.5, las muestras que liberaron el inserto, se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens*. Pasados dos días a 28°C en placa con rifampicina y kanamicina, se pudo observar el crecimiento de colonias.

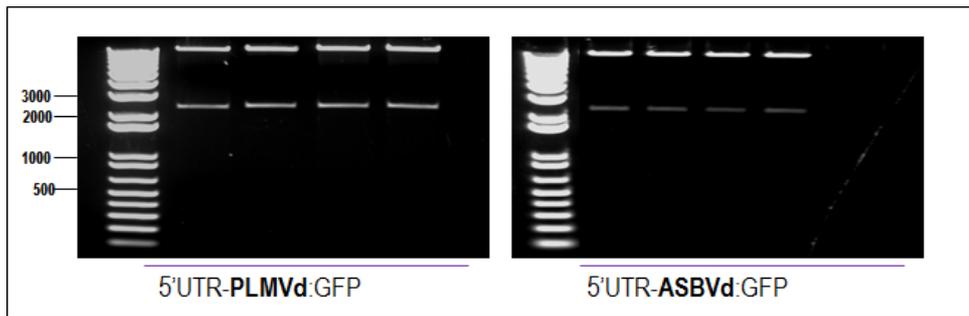


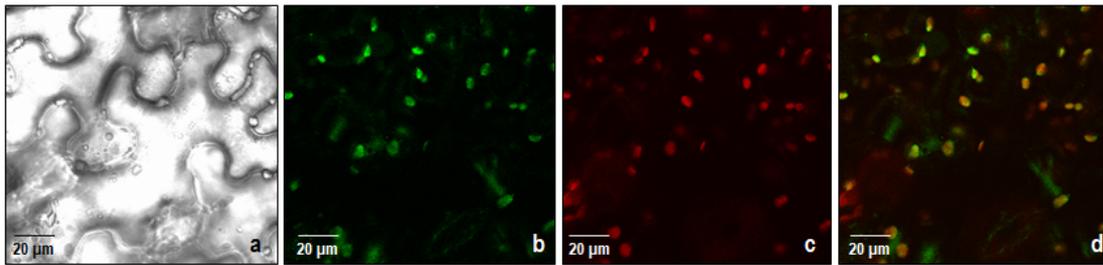
Figura 4.5 Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% TAE. Digestión de 4 plásmidos de cada viroide con HindIII durante 2h a 37°C. La banda que se observa corresponde al casete liberado que contiene el promotor, el viroide y la secuencia de GFP.

#### 4.2. Agroinfiltración de las construcciones quimera Viroide-GFP en *N. benthamiana*.

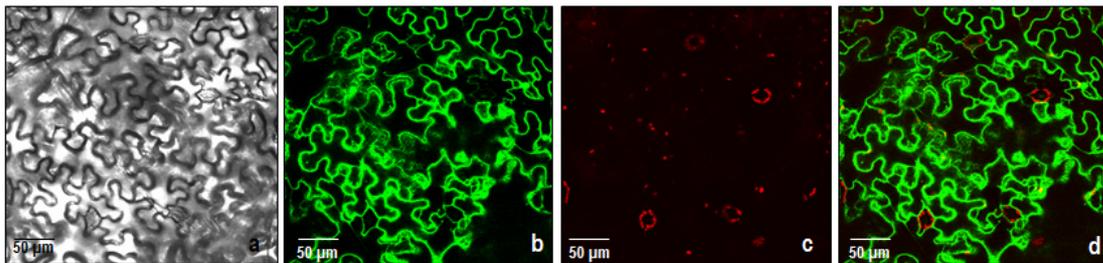
Una vez se obtuvieron los clones 5'UTR-ASBVd:GFP y 5'UTR-PLMVd:GFP en medio líquido LB con kanamicina y rifampicina, se resuspendieron en tampón de agroinfiltración y se infiltraron en las hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante jeringuilla. Transcurridos tres días se recogieron las muestras en hielo y se observaron al microscopio confocal.

La construcción formada por la molécula de GFP se tomó como control negativo, pues esta secuencia por sí misma se acumula indistintamente en citoplasma y núcleo. La construcción formada por el ELVd fusionado como extremo 5'UTR a la GFP se utilizó como control positivo, ya que en trabajos anteriores se había demostrado que dicha secuencia de RNA mediaba el tráfico hacia los cloroplastos, observada la fluorescencia emitida por la molécula de GFP exclusivamente en dichos orgánulos al microscopio confocal. Cabe mencionar, que todas las muestras agroinfiltradas contenían HcPro, un supresor del silenciamiento, que evita o aminora la activación del sistema de silenciamiento endógeno de las plantas, permitiendo una mayor estabilidad de los transcritos expresado transitoriamente.

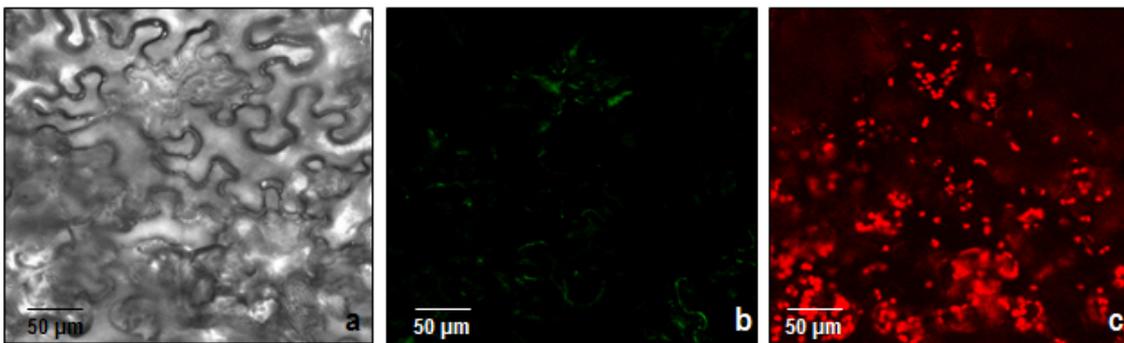
### 1. 5'UTR-ELVd:GFP



### 2. GFP



### 3. 5'UTR-ASBVd:GFP



### 4. 5'UTR-PLMVd:GFP

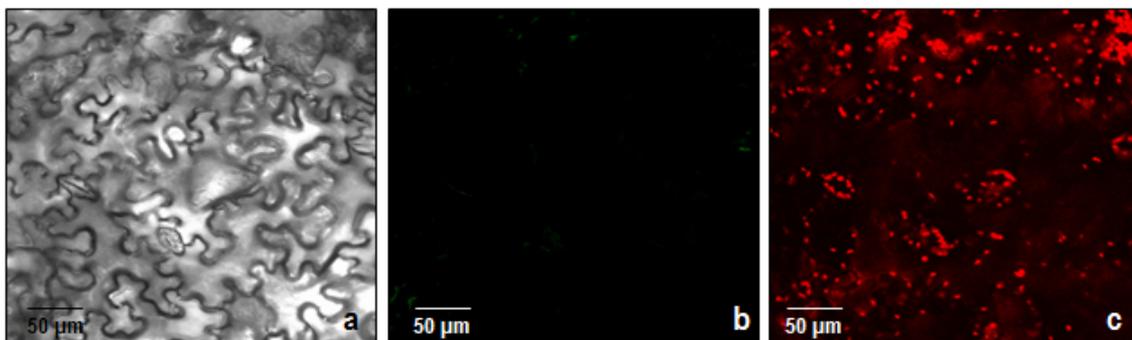


Figura 4.6. Análisis de la capacidad de los viroides ASBVd y PLMVd de dirigir el tráfico específico hacia los cloroplastos desde el núcleo. Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con la construcciones de 5'UTR- ELVd, 5'UTR-ASBVd y 5'UTR-PLMVd fusionadas a GFP, más la molécula de GFP exclusivamente. Como controles se utilizaron, la construcción de ELVd como positivo y la GFP como control negativo. La imagen a muestra las células epidérmicas de la sección enfocada, la b muestra la fluorescencia emitida por la molécula de GFP, la imagen c corresponde a la autofluorescencia de los cloroplastos (color rojo) y por último, la imagen d corresponde al solapamiento de la imagen b y c. En cada panel se muestra la fluorescencia obtenida al excitar con láser una sección de la hoja infiltrada al microscopio confocal.

Tal y como se esperaba tras la agroinfiltración con solo GFP (Figura 4.6-2), la fluorescencia se detecta en todo el citoplasma celular, sin localizarse en ningún orgánulo celular específico. Por el contrario la infiltración de la construcción del ELVd fusionada como extremo 5'UTR a la GFP pone de manifiesto claramente la expresión de la GFP en los cloroplastos (Figura 4.6.-2). La autofluorescencia de los cloroplastos (color rojo) al ser excitadas con un láser junto con el verde de la fluorescencia de la molécula de GFP colocalizan, dando como resultado un color anaranjado, propio de la unión de estos dos colores (Figura 4.6-2d). Esta aproximación experimental, permitió proponer que el RNA del ELVd, actuando como extremo 5'UTR, era capaz de regular el movimiento específico del transcrito ELVd:GFP desde el núcleo hacia los cloroplastos donde la GFP era traducida, ya que mediante la agroinfiltración, introducimos el DNA insertado en el T-DNA del plásmido directamente a los núcleos de las células vegetales.

En cuanto a las construcciones objeto de estudio en este trabajo procedentes de los otros dos viroides (5'UTR-ASBVd:GFP y 5'UTR-PLMVd:GFP), cabe destacar que no se observó fluorescencia, en ningún sector de la célula, cuyas hojas infiltradas se analizaron al microscopio confocal (paneles 4.6-3 y 4.6-4).

Teniendo en cuenta que por estudios de traducción *in silico* se había determinado que las secuencias estaban insertadas de manera correcta en la construcción, supusimos que la falta de fluorescencia podría ser debida a la imposibilidad de traducción de la molécula de GFP a partir del transcrito quimérico, a causa de la compleja estructura secundaria que poseen ambos viroides. La falta de expresión de la GFP en estas construcciones también podría deberse a que el ATG de la GFP podría no encontrarse, dentro de estas construcciones, en el contexto más idóneo para que los ribosomas tradujeran de forma eficiente dicha molécula.

### 4.3. Análisis de la acumulación de la GFP y de los RNAs quimera de las muestras infiltradas

#### 4.3.1 Determinación de la acumulación de GFP.

Con el objeto de comprobar si la falta de la expresión de la fluorescencia era debida a la falta de la expresión de la proteína se llevó a cabo un análisis tipo Western-blot con antisuero frente a la GFP de las muestras que habían sido agroinfiltradas con las diferentes construcciones quimera (Figura 4.7).

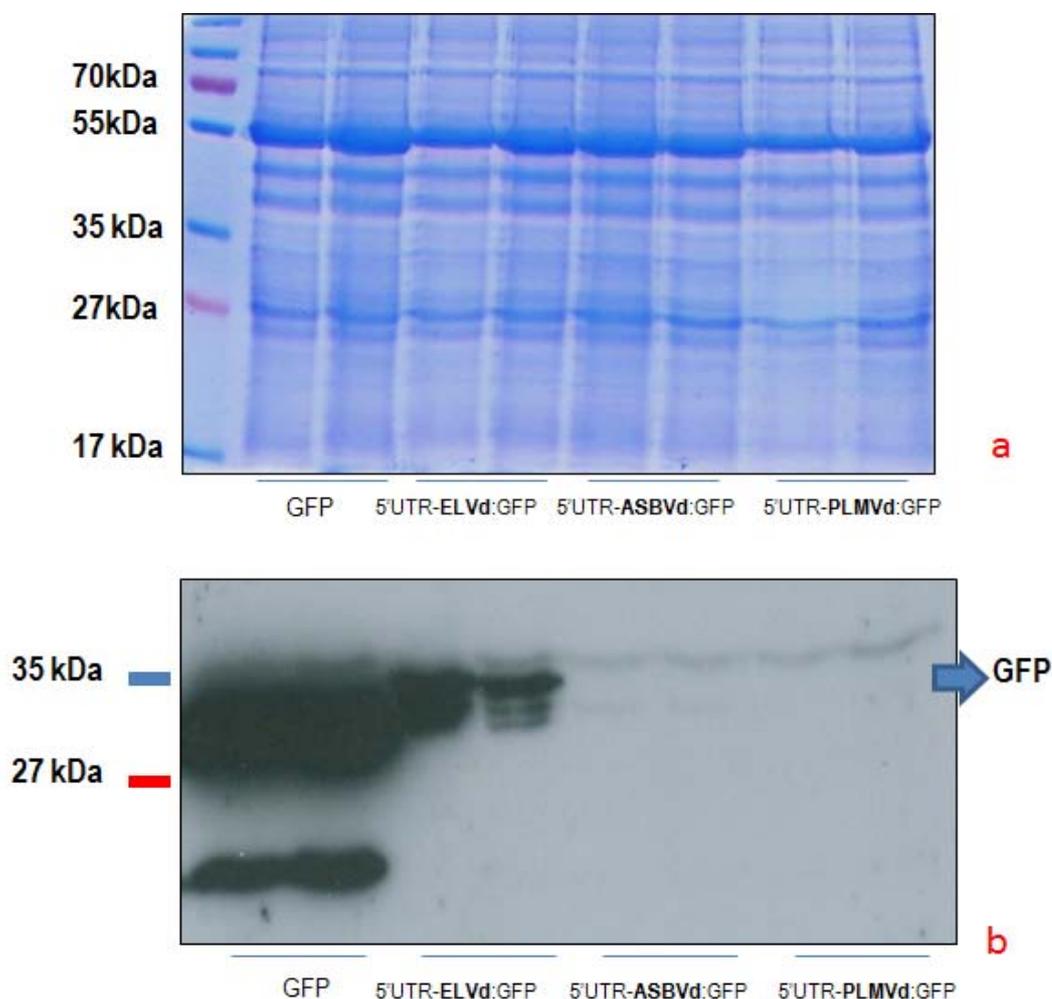


Figura 4.7. Análisis Western blot para la detección de la proteína de la GFP expresadas en *N.benthamiana*. En A se observa el patrón de proteínas totales transferidas a las membranas utilizadas para el análisis Western blot (B), después de la tinción con azul de coomassie. Los dos primeros carriles representan la extracción proteica de hojas infiltradas con la construcción exclusiva de GFP, utilizada como control positivo; los dos carriles siguientes pertenecen a las muestras del viroide ELVd; a continuación se cargaron dos carriles de ASBVd y por último el PLMVd. A la derecha de los paneles se muestra el marcador de tamaños de las proteínas.

Como se puede observar en la Figura 4.7, tan solo se detecta acumulación de GFP en las muestras que fueron agroinfiltradas con la construcción propia de la proteína fluorescente y la

del viroide ELVd fusionada a ésta. Sin embargo, en ninguna de las cuatro muestras correspondientes a 5'UTR-ASBVd:GFP y 5'UTR-PLMVd:GFP se observa acumulación de dicha proteína, consistentemente con los datos obtenidos por observación al microscopio confocal. Estos resultados parecen indicar que la causa más probable de la falta de expresión de las construcciones 5'UTR-PLMVd:GFP y 5'UTR-ASBVd:GFP pueda ser debida a la incapacidad de traducción de la proteína fluorescente, como consecuencia de la estructura secundaria que presentan estos viroides al estar fusionados como extremo 5'UTR a la secuencia codificante de la GFP.

Cabe indicar que las dos bandas que aparecen en las muestras de GFP corresponden a la proteína (la de mayor peso molecular) y una degradación de ésta (la de menor tamaño), mostrando ambas especificidad con el anticuerpo.

#### 4.3.2 Observación de la presencia de transcritos.

Para determinar si la falta de expresión de las construcciones 5'UTR-ASBVd:GFP y 5'UTR-PLMVd:GFP estaba ocasionada por problemas en la traducción y no en la transcripción, se procedió al análisis de los niveles de transcrito en las muestras infiltradas, realizando para ello una RT-PCR. Para ello se utilizó el oligo directo específico de cada secuencia viroidal siendo el reverso para todas ellas el correspondiente al oligo de la GFP (tal y como se observa en la Figura 4.8) pudiendo comprobar por tanto si el ARNm de la construcción estaba o no presente en su totalidad. El tamaño esperado del producto amplificado sería de unas 700 pb aproximadamente.



Figura 4.8. Esquema de la situación de los oligos dentro de las construcciones obtenidas.

Una vez realizada la extracción de RNA de las hojas infiltradas, las muestras se trataron con DNasa con el fin de eliminar las posibles trazas de DNA que pudiesen quedar por la elevada acumulación de copias plasmídicas que genera *Agrobacterium tumefaciens*. Así pues, para

comprobar que el material estaba libre de DNA realizamos una PCR directa de las muestras. Tal y como se observa en la Figura 4.8-a la falta de amplificación indica que todas las muestras estaban libres de DNA.

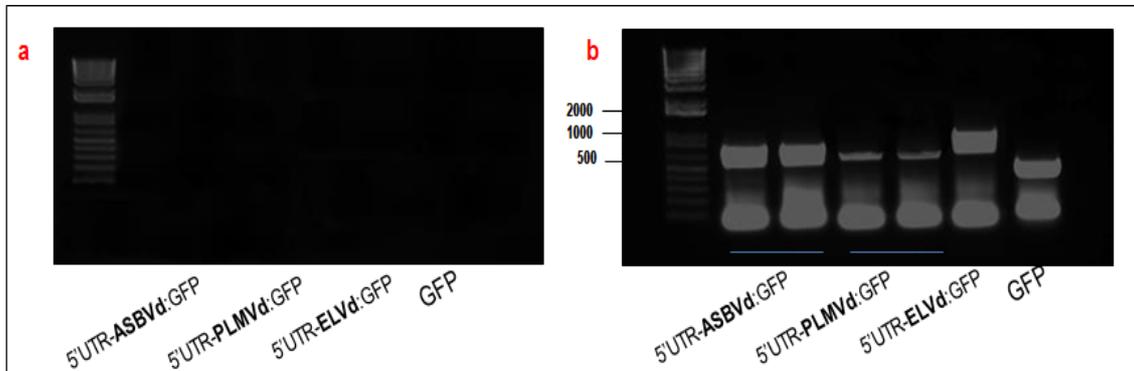


Figura 4.9. Análisis de los transcritos de las quimeras viroide-GFP agroinfiltradas. Las preparaciones de ácidos nucleicos totales obtenidas a partir de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las correspondientes construcciones se analizaron por PCR (a) o RT-PCR (b). Se utilizó el oligo directo de cada viroide y el reverso de la secuencia de GFP, excepto para el caso de la propia construcción de la GFP que se utilizaron sus oligos, directo y reverso. Las dos muestras primeras corresponden a 5'UTR-ASBVd:GFP, las dos siguientes a 5'UTR-PLMVd:GFP, el penúltimo carril a 5'UTR-ELVd:GFP y el último a la muestra de GFP (amplificado con oligos específicos para ella) como control positivo. A la parte izquierda se muestra el marcador de 1kb.

Una vez demostrado que las muestras no presentaban DNA, se llevó a cabo la RT-PCR. Como indica la Figura 4.9-b, se detectaron transcritos tanto en las construcciones de GFP como en la 5'UTR-ELVd fusionada a GFP en 3', tal y como se esperaba, pues se había observado fluorescencia al microscopio confocal y se había detectado acumulación de la proteína. Por lo que respecta a las muestras de las otras dos construcciones (5'UTR-ASBVd:GFP y 5'UTR-PLMVd:GFP), en ambos casos se pudieron detectar transcritos derivados de ellas. Además, en el caso de la construcción 5'UTR-ASBVd:GFP, la acumulación de transcritos parece ser mayor (al menos por este método de detección) que la observada para el RNA mensajero de 5'UTR-PLMVd:GFP. Así pues, la detección de transcritos procedentes de los ARNm de estas construcciones en los tejidos infiltrados, sugiere que la falta de fluorescencia observada en ambos casos se debe a problemas a nivel traduccional y no transcripcional, ya que los RNAs mensajeros están presentes en todas las muestras analizadas.

#### 4.4. Estudio de la acumulación de los viroides a nivel subcelular.

Una vez determinada que la falta de fluorescencia en las hojas infiltradas se debía a problemas traduccionales, diseñamos una estrategia diferente para comprobar si los transcritos generados por ambas construcciones eran capaces de translocarse del núcleo hacia los cloroplastos como se ha descrito para el 5'UTR-ELVd:GFP. Investigamos la acumulación de RNAs mensajeros en dicho orgánulo, para determinar de forma más precisa si este movimiento

sucedía, a pesar de no poder visualizarlo al confocal por la falta de traducción de la proteína fluorescente.

Para ello se volvieron a realizar las agroinfiltraciones para, a continuación, llevar a cabo extracciones y purificaciones de cloroplastos de las hojas infiltradas. En la Figura 4.10 se observa el halo de cloroplastos que resulta tras las centrifugaciones en gradientes de percol y en la 4.11 las imágenes al microscopio confocal una vez finalizada la extracción.

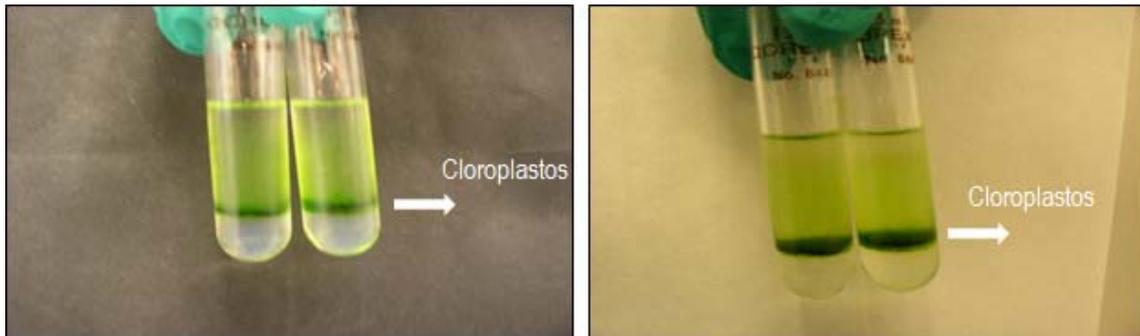


Figura 4.10. Halo de cloroplastos tras realizar la extracción en mortero y someterlo a centrifugaciones en gradientes de percol. Los cloroplastos (el aro de color verde intenso) se depositan sobre los gradientes de 30 al 60% de percol.

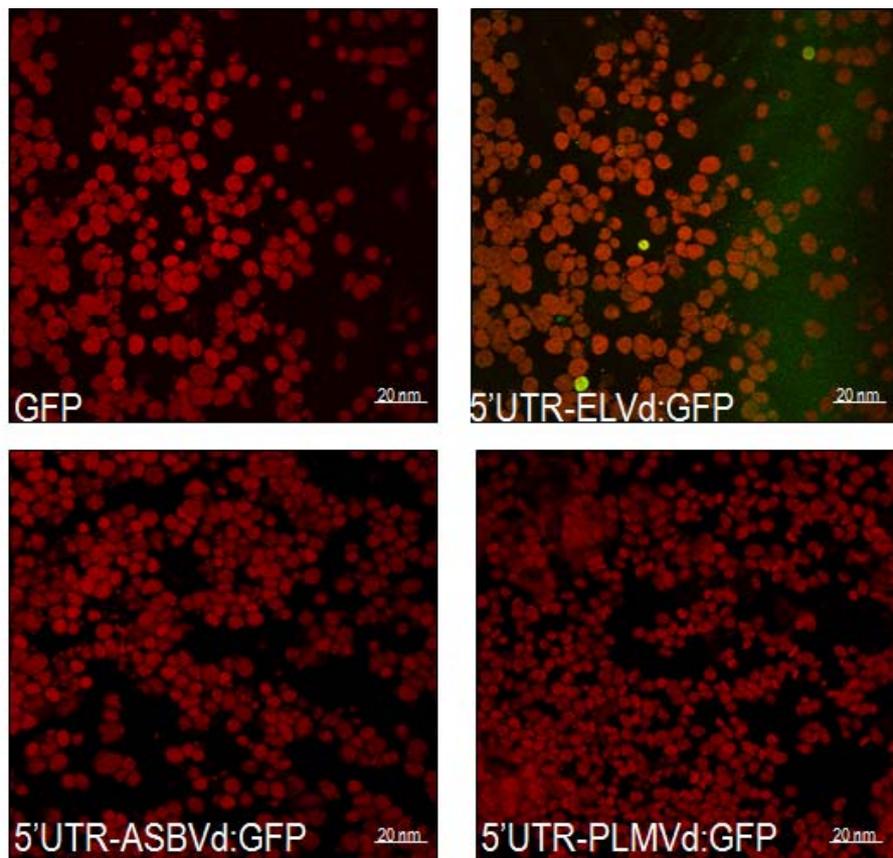


Figura 4.11. Imágenes al microscopio confocal de la extracción de cloroplastos de hojas infiltradas de *N. benthamiana*. Los puntos que se observan de color amarillo/verde corresponden a los cloroplastos que contienen GFP en su interior. El color rojo de los restantes es debido a la fluorescencia emitida de los cloroplastos que se visualiza al confocal en este color.

Como cabía esperar, los cloroplastos extraídos de las muestras infiltradas con GFP, 5'UTR- ASBVd y 5'UTR-PLMVd fueron de color rojo, pues, tal y como se observaba en las hojas, no se detectaba presencia de GFP en dichos orgánulos en ningún caso. Sorprendente resultó sin embargo la observación de que en cloroplastos extraídos de hojas infiltradas con la construcción 5'UTR-ELVd:GFP, y a pesar de que en las hojas se observaban todos los cloroplastos de color verde, el número de cloroplastos que resultaron fluorescentes tras su extracción fueron escasos. Este hecho pudo ser debido a la escasa capacidad de penetración que tiene la técnica de infiltración, ya que sólo alcanza la capa epidérmica de las hojas, sin penetrar en tejidos más internos, siendo la proporción de cloroplastos de esta primera capa (dónde ha sido capaz de penetrar la GFP) en relación a la totalidad, menor de la esperada.

A partir del RNA extraído de cloroplastos, se procedió a realizar una RT-PCR, utilizando el oligo directo para cada viroide y el reverso de la molécula de GFP (de la misma forma que se realizó en la RT-PCR de hojas infiltradas), obteniendo un producto de un tamaño aproximado de 600 pb (Figura 4.12-c). Antes se realizó una PCR directa de las muestras para comprobar si contenían trazas de DNA. Además, se llevó a cabo una RT-PCR con oligos del rRNA 23s cloroplástico como control y así comprobar el nivel de transcrito de todas las muestras y determinar si todas las extracciones se habían realizado de forma satisfactoria (Figura 4.12-a y b).

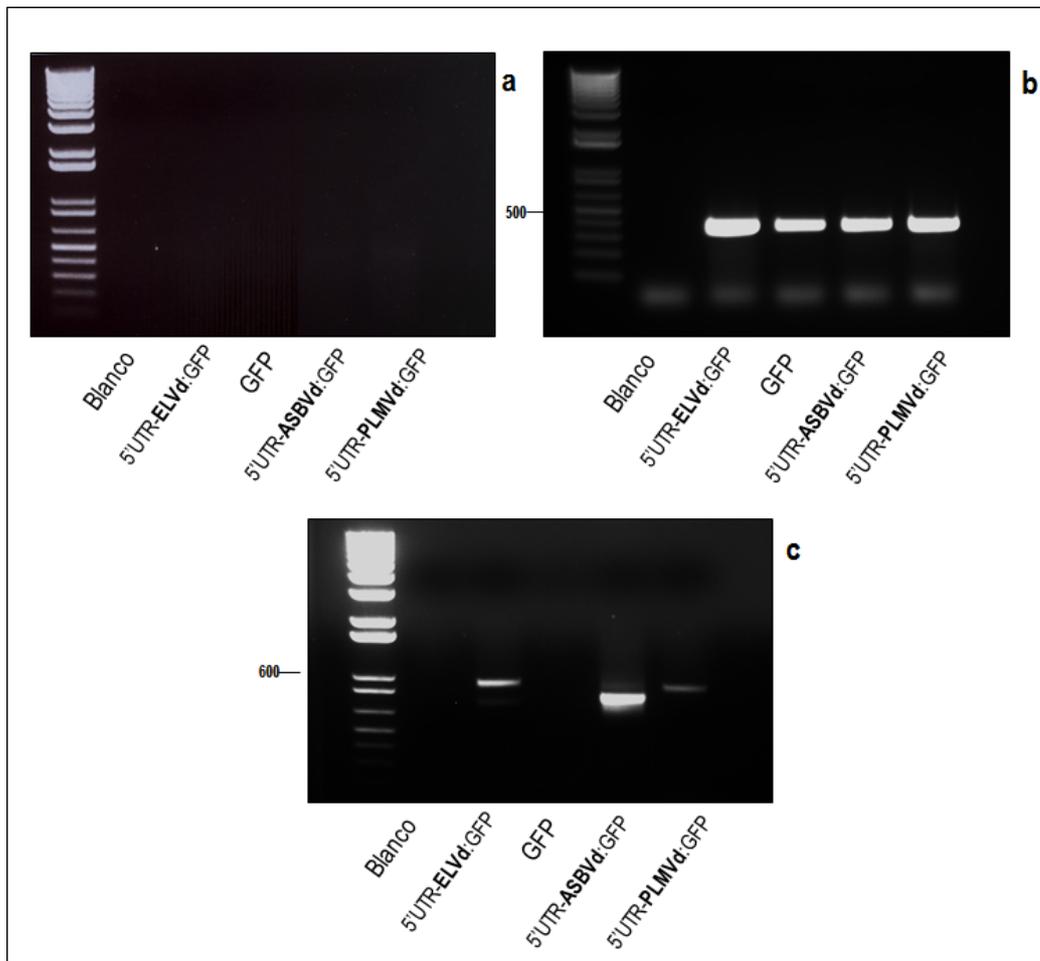


Figura 4.12 Análisis de la presencia del RNA quimera de las diferentes construcciones en cloroplastos. La Figura a corresponde a la PCR directa de las muestras. La b a la RT-PCR utilizando el rRNA 23s cloroplástico como control. (c) RT-PCR de cloroplastos de hojas de *N.benthamiana* infiltradas utilizando el oligo directo del viroide y el reverso de la secuencia nucleotídica GFP. El producto presenta un tamaño aproximado de 600pb. La primera muestra corresponde al blanco (H<sub>2</sub>O), la segunda a la construcción 5'UTR- ELVd:GFP, tomado como control positivo, la tercera GFP (control negativo), las dos siguientes corresponden a las muestras problema, 5'UTR-ASBVd:GFP y 5'UTR-PLMVd:GFP respectivamente. A la parte izquierda se muestra el marcador de 1kb.

Como se puede observar (Figura 4.12-a), ninguna de las muestras contenían trazas de DNA, ya que estas no se detectaron por PCR. Además todas las muestras analizadas presentaban concentraciones similares de RNA, tal como lo refleja la amplificación equivalente en todos los casos del cDNA del rRNA cloroplástico empleado como control (Figura 4.12-b). Sin embargo y como se observa en la Figura 4.12-c, se detectaron transcritos procedentes de todas las construcciones analizadas en esta prueba (excepto GFP) en los cloroplastos aislados de hojas infiltradas con cada construcción.

Por lo que respecta al transcrito 5'UTR-ELVd:GFP cabía esperar que hubiera amplificación, pues, como ya se ha comentado en reiteradas ocasiones, se conoce que se transporta eficientemente por la vía núcleo-cloroplasto. Por otro lado, la amplificación de los RNAs mensajeros de las muestras del 5'UTR-ASBVd:GFP y 5'UTR-PLMVd:GFP demuestra que los transcritos derivados de ambas construcciones se acumulan en este orgánulo. Estos

resultados sugieren de manera robusta que tanto el ASBVd como el PLMVd tienen capacidad de explotar la vía de transporte núcleo-cloroplasto previamente descrita para el ELVd (Gómez y Pallás, 2010).

#### 4.5. Obtención de clones parciales para la realización de ensayos de expresión transitoria con *A. tumefaciens* en *N. benthamiana*

Para determinar si la falta de expresión de las quimeras viroide:GFP analizadas en este estudio se debía a interferencias de la estructura secundaria del extremo 5'UTR derivado del viroide, se generaron construcciones empleando fragmentos parciales del ASBVd fusionados, de nuevo, como 5'UTR a la GFP.

Para ello se diseñaron una serie de oligos (Tabla 2.2) que contenían los sitios de restricción BamHI o KpnI en fragmentos internos de la secuencia de RNA del ASBVd. De esta forma se clona mediante PCR el fragmento parcial delimitado por los nuevos oligos, continuando del mismo modo que para la clonación de los fragmentos totales de 5'UTR-ASBVd:GFP y 5'UTR-PLMVd:GFP, pasando por los mismos vectores de subclonado y agroinfiltrando tal y como se explica en el primer apartado del capítulo.

Las imágenes de cada etapa del clonaje se observan en la Figura 4.13, donde se muestra en geles de agarosa la amplificación de los diferentes fragmentos utilizando los nuevos oligos diseñados (a), su confirmación tras ser insertados en el vector pTZ (b), su digestión con las enzimas de restricción en el nuevo vector pIVEX2.3 (c) y, por último, tras ser clonado en el vector pMOG, su comprobación antes de realizar la agroinfiltración mediante la digestión con el enzima HindIII, pues, como ya se ha especificado, el casete de expresión está acotado por los sitios de restricción de esta enzima.

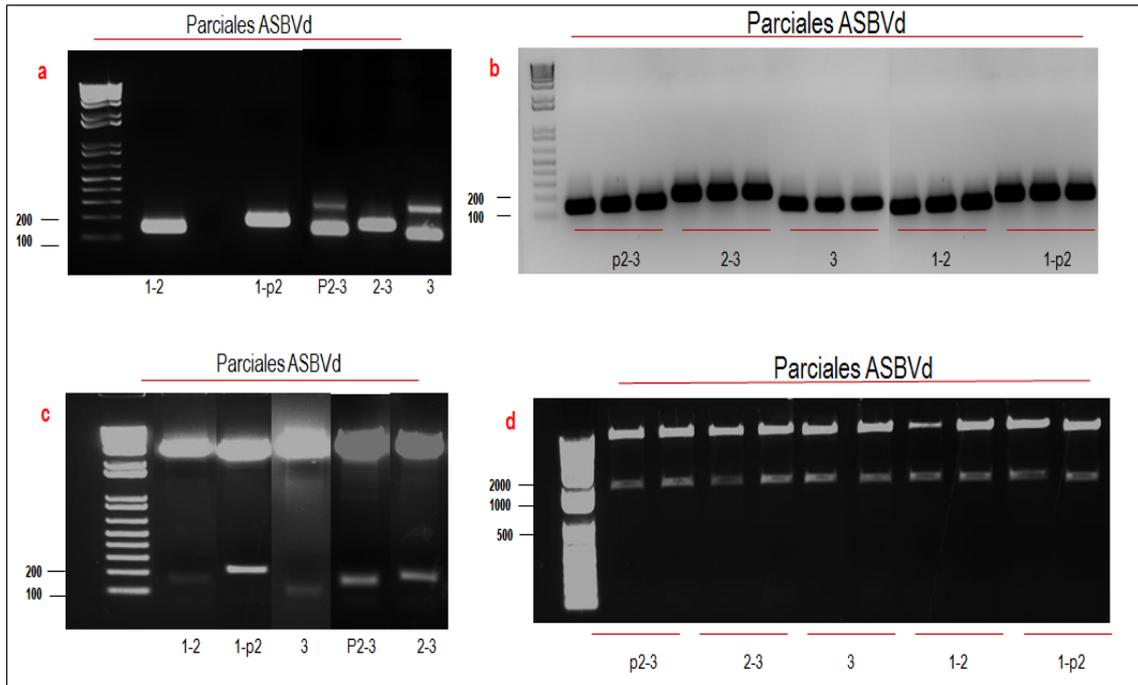


Figura 4.13. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% TAE de diferentes clones parciales de ASBVd. (a) Amplificación mediante PCR de los fragmentos parciales a clonar, con un tamaño entre 100 y 200pb. (b) Amplificación PCR en el vector pTZ. (c) Digestión con BamHI y KpnI del vector pIVEX2.3 y (d) digestión con HindIII del vector pMOG. A la izquierda se muestra el marcador de 1kb.

En la Figura 4.14 se observan los fragmentos que se clonaron del ASBVd para garantizar un barrido general de tanto la parte 3' como la 5', comprobando también de esta forma, qué fragmento de la estructura podría ser la determinante del movimiento del núcleo al cloroplasto.

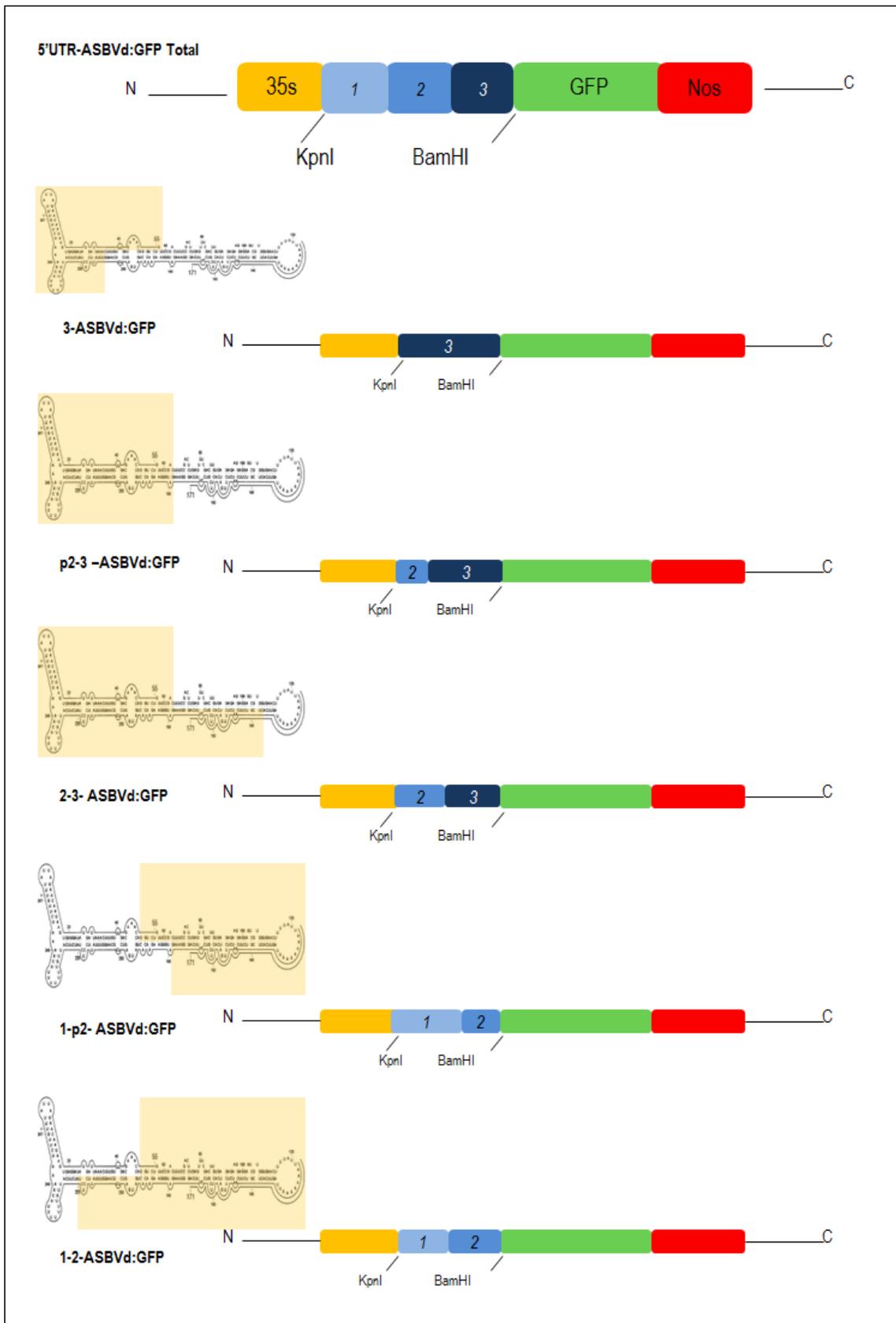


Figura 4.14. Esquema (no a escala) de las construcciones de los clones parciales de *ASBVd*. El clon total (5'UTR-ASBVd:GFP) se ha dividido en tres secciones, las cuales se diferencian por los números y las diferentes tonalidades de azul. El color amarillo representa el promotor 35S, el verde la secuencia de GFP y el color rojo el terminador Nos. La letra p de los clones parciales indica que la construcción está formada por la porción del fragmento señalado. El genoma completo del ASBVd contiene 251nt. El clon parcial 3-ASBVd:GFP contiene 99nt, que corresponden al fragmento nº3. El clon p2-3-ASBVd:GFP presenta los dos fragmentos parciales 2 y 3, con un genoma de 168nt. El clon 2-3-ASBVd:GFP presenta los dos fragmentos parciales 2 y 3, con un genoma de 168nt. El clon 1-p2-ASBVd:GFP contiene la fracción 1, con 99nt más una porción del nº 2, con 27nt. Por último, el clon 1-2-ASBVd:GFP recoge en su genoma las porciones 1 y 2 del genoma del ASBVd, con 168 nucleótido

En las siguientes imágenes se muestra (Figura 4.15) la fluorescencia observada al confocal tras ser agroinfiltradas plantas de *N. benthamiana*, del mismo modo que se realizó en el experimento anterior.

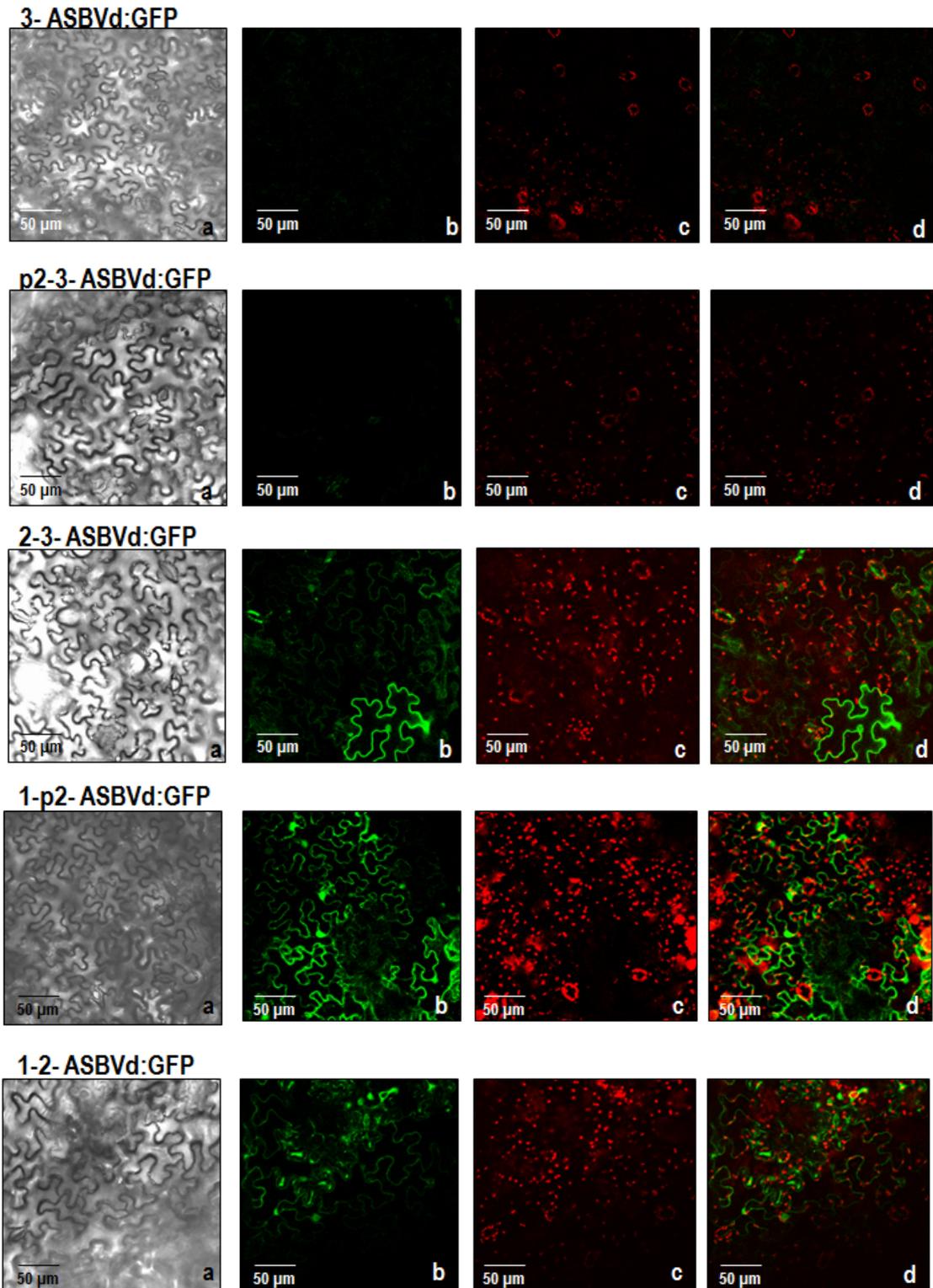


Figura 4.15. Análisis de la capacidad de dirigir el tráfico específico hacia los cloroplastos de los fragmentos viroidales. Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con cada construcción. Los controles utilizados son GFP, como control negativo, y el clon ELVd completo como control positivo. La imagen a muestra las células epidérmicas de la sección enfocada, la b muestra la fluorescencia emitida por la molécula de GFP, la imagen c corresponde a la autofluorescencia de los cloroplastos (color rojo), en la imagen d se observa el solapamiento de la imagen b y c. En cada panel se muestra la fluorescencia obtenida al excitar con láser una sección de la hoja infiltrada al microscopio confocal.

De la misma forma que se observó en el caso de las primeras agroinfiltraciones, tanto el control positivo (5'UTR-ELVd:GFP) como el negativo (GFP), volvieron a mostrar los mismos patrones de distribución, donde en el primer caso se localizaba claramente en los cloroplastos y en el segundo se situaba por todo el citoplasma y núcleos respectivamente.

Por lo que respecta a las construcciones con fragmentos parciales del viroide fusionadas a la GFP, se detectó fluorescencia en 3 de las 5 quimeras analizadas. Los fragmentos que mostraron fluorescencia fueron: 2-3-ASBVd:GFP, 1-p2-ASBVd:GFP y 1-2-ASBVd:GFP, los cuales presentan *in silico* una estructura poco ramificada, permitiendo, si fuera cierta esta estructura *in vivo*, la traducción de la proteína fluorescente GFP. Además, los otros dos clones (3-ASBVd:GFP y p2-3-ASBVd:GFP) en los que no se detectó GFP, mostraron una estructura secundaria ligeramente mayor. Esta observación sugiere que la compleja estructura secundaria del ASBVd podría estar impidiendo la correcta traducción del transcrito quimérico viroide:GFP. También cabe destacar que los clones parciales que mostraron mayor traducción de la GFP fueron los que carecían en su genoma del fragmento nº 3 del ASBVd, por lo que podría estar indicando que esta región fuera la responsable del impedimento de traducción de la proteína fluorescente debido a su conformación secundaria.

Además de este hecho, también se podría considerar la posibilidad de que los fallos a nivel traduccional, fuesen consecuencia del posicionamiento de la maquinaria de traducción del cloroplasto en el codón de inicio de los ARNm, ya que es altamente restrictivo y dependiente de su estructura (Bruce, 2000; B. Stern, R. Radwanski, L. Kindleb, 1991). En este supuesto, la estructura secundaria que adopta la región 5'UTR del ARN mensajero quimera, podría no ser la adecuada para ser reconocida por los ribosomas cloroplásticos, y, en consecuencia, estar impidiendo la traducción de estos transcritos. Otro punto a considerar es que, tal y como se observa en la figura, ninguna de las construcciones analizadas fueron capaces de emitir fluorescencia localizada en los cloroplastos, lo que sugiere (al menos para estas construcciones donde la expresión de GFP no se ve alterada) que la región (estructura) de RNA responsable de mediar el transporte núcleo-cloroplasto de estos transcritos no pudo ser reconstituida en ninguna de estas construcciones.

V. CONCLUSIONES.

## V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo final de máster pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

1- Se obtuvieron diferentes construcciones quiméricas viroide-GFP utilizando el RNA derivado del ASBVd y el PLMVd como extremo 5'UTR.

2- Mediante análisis de acumulación de transcritos por RT-PCR en el tejido infiltrado se demostró que estas construcciones eran transcripcionalmente funcionales.

3- La no detección de GFP tanto por observación al microscopio confocal como por análisis Western-blot en el tejido infiltrado puso de manifiesto que los transcritos 5'UTR-ASBVd:GFP y 5'UTR-PLMVd:GFP no eran funcionalmente traducibles, lo que impidió su uso en estudios de localización subcelular mediante observación de fluorescencia. Estudios realizados con fragmentos parciales del ASBVd fusionados como extremo 5'UTR a la GFP sugieren que esta falta de actividad traduccional podría deberse a cuestiones de estructura secundaria del RNA derivado del viroide.

4- La estrategia alternativa de purificar cloroplastos y analizar la presencia de mRNAs quiméricos viroide:GFP en estos orgánulos permitió determinar que estos transcritos eran capaces de acumularse en el cloroplasto. Estos resultados ponen de manifiesto que tanto el RNA del PLMVd como del ASBVd eran capaces, actuando como extremos 5'UTR, de regular el transporte específico de estos transcritos desde el núcleo al cloroplasto.

5- En resumen, estos resultados sugieren que la posible vía de transporte núcleo-cloroplasto propuesta en trabajos previos para el ELVd puede ser un fenómeno común para todos los miembros de la familia *Avsunviroidae*.

## IV. BIBLIOGRAFÍA

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abraitene, A., Zhao, Y. y Hammond, R.** (2008). Nuclear targeting by fragmentation of the potato spindle tuber viroid genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 11, 470-475.
- Ambrós, S., Hernández, C., Desvignes, J.C. y Flores, R.** (1998). Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasispecies. *J Virol.* 72, 7397-7406.
- Stern, B., Radwanski, R. y Kindleb, L.** (1991). A 3' stem loop structure of the chlamydomonas chloroplast atp B gene regulates mRNA accumulation *in vivo*. *Plant Cell.* 3, 285-297.
- Bhushan, S., Kuhn, C., Berglund, A-K., Roth, C. y Glaser, E.** (2006). The role of the N-terminal domain of chloroplast targeting peptides in organellar protein import and miss-sorting. *FEBS Letters.* 580, 3966-3972.
- Bonfiglioli, R., Webb, D. y Symons, R.** (1996). Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by in situ hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.* 9, 457-465.
- Börner, T. y Hagemann, R.** (1980). Transport of RNA across the chloroplast envelope? *Endocytobiology.* 1, 657-659.
- Branch, A.D. y Dickson, E.** (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by Southern hybridization. *Virology.* 15, 10-26.
- Branch, A.D. y Robertson, H.D.** (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science.* 3, 450-455.
- Bruce, B.D.** (2000). Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol.* 10, 440-447.
- Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczkowski, L.J. y Perreault, J.** (1999). Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J Virol.* 73, 6353-6360.
- Bussière, F., Ouellet, J., Côté, F., Lévesque, D. y Perreault, J.P.** (2000). Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J Virol.* 74, 2647-2654.
- Clark, M., Johnston, R.L., Inostroza-Ponta, M., Fox, A.H., Fortini, E., Moscato, P., Dinger, M.E. y Mattick, J.S.** (2012). Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res.* 22, 885-898.
- Daròs, J.A., Elena, S.F. y Flores, R.** (2006). Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO.* 7, 593-598.
- Daròs, J.A., Marcos, J.F., Hernández, C. y Flores, R.** (1994). Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26, 12813-12817.

- Diener, T.O.** (1971). Potato spindle tuber virus. IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*. 45, 411-428.
- Diener, T.O.** (2003). Discovering viroids--a personal perspective. *Nat Rev Microbiol*. 1, 75-80.
- Diener, T.O.** (2001). The viroid: biological oddity or evolutionary fossil?. *Adv Virus Res*. 57, 137-184.
- Ding, B. y Itaya, A.** (2007). Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol Plant Microbe Interact*. 20, 7-20.
- Ding, B., Itaya, A. y Zhong, X.** (2005). Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Plant Biol*. 8, 606-612.
- Ding, B.** (2009). The biology of viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 47, 105-131.
- Fadda, Z., Daròs, J.A., Fagoaga, C., Flores, R. y Duran-Vila, N.** (2003). N. Eggplant latent viroid, the cyadate type specie for a new genus within the family Avsunviroidae (hammerhead viroids). *J Virol*. 77, 6528-6532.
- Fernández-Calvino, L., Faulkner, C. y Maule, A.** (2011). Plasmodesmata as active conduits for virus cell-to-cell movement. *Recent Adv Plant Virol*. 3, 47-74
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, AE., Daròs, J.A. y Di Serio, F.** (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 43, 117-139.
- Flores, R., Delgado, S., Gas, ME., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., de la Peña M.** (2004). Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS*. 567, 42-48.
- Gas, M.E., Hernández, C., Flores, R. y Daròs, JA.** (2007). Processing of nuclear viroids in vivo: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathog*. 3, e182.
- Gómez, G., Martínez, G. y Pallás, V.** (2009). Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends Plant Sci*. 14, 264-269.
- Gómez, G. y Pallás, V.** (2010). Can the import of mRNA into chloroplasts be mediated by a secondary structure of a small non-coding RNA?. *Plant Signaling & Behav*. 11, 1517-1519.
- Gómez, G. y Pallás, V.** (2010) Noncoding RNA mediated traffic of foreign mRNA into chloroplasts reveals a novel signaling mechanism in plants. *PLoS ONE*. 19, e12269.
- Gómez, G. y Pallás, V.** (2012). A pathogenic non coding RNA that replicates and accumulates in chloroplasts traffics to this organelle through a nuclear-dependent step. *Plant Signaling & Behav*. 7, 882- 884.
- Gómez, G. y Pallás, V.** (2012). Studies on subcellular compartmentalization of plant. Pathogenic Noncoding RNAs Give New Insights into the Intracellular RNA-Traffic Mechanisms. *Plant Physiol*. 159, 558-564.
- Gómez, G., Pallás, V.** (2013). Viroids: a light in the darkness of the lncRNA-directed regulatory networks in plants. *New Phytol*. 198, 10-15.

- Gómez, G., Martínez, G. y Pallás, V.** (2009). Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends Plant Sci.* 14, 264-269.
- Gómez, G. y Pallás, V.** (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *J Virol.* 78, 10104-10110.
- Gora-Sochacka, A.** (2004). Viroids: unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochim Pol.* 51, 587-607.
- Gross, H.J.** (1978). [Viroids. The structure of a new class of pathogens]. *Fortschr Med.* 9, 2147-2149.
- Harders, J., Lukács, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, T.M. y Riesner, D.** (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* 20, 3941-3949.
- Jarvis, P.** (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.* 179, 257-285.
- Keese, P. y Symons, R.H.** (1985). Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 4582-4586.
- Kholmatova, M.D., Makhmadbekova, L.M. y Aliev, K.A.** (1979). Preliminary indications on a possible transport of nuclear RNA into chloroplasts of regenerating *Acetabularia* cells. *Develop Cell Biol* 3, 233-234. *Developmental Biology of Acetabularia*, North-Holly Biomedical Press.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölyer, K., Gruisseem, W. y Baginsky, s.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr Biol.* 14, 354-362.
- Lima, M. I., Fonseca, M. E., Flores, R. y Kitajima, E. W.** (1994). Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Arch Virol.* 138, 385-390.
- Liu, B., Tabler, M. y Tsagris, M.** (2000). Episomal expression of a hammerhead ribozyme directed against plum pox virus. *Virus Res.* 68, 15-23.
- Lopez-Juez, E. y Pyke, K.** (2005). Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol.* 49, 557-577.
- Lucas, W. J., Yoo, B. C. y Kragler, F.** (2001). RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 849-857.
- Lung, B., Zemann, A., Madej, M. J., Schuelke, M., Techritz, S., Ruf, S., Bock, R. y Hüttenhofer, A.** (2006). Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* 34, 3842-3852.
- Marín-Navarro, J., Manuell, A., Wu, J. y Mayfield, S.** (2007). Chloroplast translation regulation. *Photosynth Res.* 94, 359-374.
- Mattick, J.** (2010). Non-coding RNAs and eukaryotic evolution-a personal view. *BMC Biol* 8, 67.

- Mohamed, N. A. y Thomas, W.** (1980). Viroid-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocado. *J Gen Virol.* 46, 157-167.
- Nada, A. y Soll, J.** (2004). Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J Cell Sci.* 117, 3975-3982.
- Navarro, J. A., Vera, A. y Flores, R.** (2000). A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology.* 268, 218-225.
- Navarro, B. y Flores, R.** (1997). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 11262-11267.
- Nohales, M. A., Flores, R. y Darós, J. A.** (2012a). Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as RNA ligase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109, 13805-13811.
- Nohales, M. A., Molina-Serrano, D., Flores, R. y Darós, J. A.** (2012b). Involvement of the chloroplastic isoform of tRNA ligase in the replication of viroids belonging to the family Avsunviroidae. *J Virol.* 86, 8269-8276.
- Pogson, B. J., Woo, N. S., Förster, B. y Small, I. D.** (2008). Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci.* 13, 602-609.
- Rinn, J. L. y Chang, H. Y.** (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem.* 81, 145-166.
- Rymarquis, L. A., Kastenmayer, J. P., Hüttenhofer, A. G. y Green, P.** (2008). Diamonds in the rough: mRNA-like ncRNAs. *Trends Plant Sci.* 13, 329-334.
- Schoelz, J.E. y Zaitlin, M.** (1989). Tobacco mosaic-virus RNA enters chloroplasts *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86, 4496-4500.
- Semancik, J. S. y Weathers, L. G.** (1972) Exocortis disease: evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nat New Biol.* 237, 242-244.
- Symons, R. H.** (1981). Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 9, 6527-6537.
- Tabler, M. y Tsagris, M.** (2004). Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* 9, 339-348.
- Tsagris, E. M., Martínez de Alba, A. E., Gozmanova, M. y Kalantidis, K.** (2008). Viroids. *Cell Microbiol.* 10, 2168-2179.
- Wang, Y. y Ding, B.** (2010). Viroids: small probes for exploring the vast universe of RNA trafficking in plants. *J Integr Plant Biol.* 52, 28-39.
- Wijk, K.** (2000). Proteomics of the chloroplast: experimentation and prediction. *Trends Plant Sci.* 5, 420-425.

**Woo, Y., Itaya, A., Owens, R. A., Tang, L., Hammond, R. W., Chou, H., Lai, M. y Ding, B.** (1999). Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.* 17, 627-635.

**Woodson, J. D. y Chory, J.** (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev.* 9, 383-383.

**Zaitlin, M., Niblett, C. L., Dickson, E. y Goldberg, R. B.** (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by solution and filter hybridization. *Virology.* 104, 1-9.

**Zhao, Y., Owens, R. A. y Hammond, R. W.** (2001). Use of a vector based on Potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of potato spindle tuber viroid. *J Gen Virol.* 82, 1491-1497.